

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Тимошичева Татьяна Александровна

РАЗРАБОТКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ГЕКСОНУ
АДЕНОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА

03.02.02 – Вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Амосова Ирина Викторовна
кандидат биологических наук

Санкт-Петербург – 2019

Оглавление

Введение.....	4
1. Обзор литературы.....	12
1.1. Строение вириона аденовирусов	13
1.2. Цикл репродукции аденовирусов	18
1.3. Антигенные свойства аденовирусов	20
1.4. Клиническая характеристика аденовирусной инфекции	21
1.5. Методы диагностики аденовирусной инфекции.....	25
2. Материалы и методы.....	35
2.1. Клеточные культуры.....	35
2.2. Вирусы.....	35
2.3. Очистка и концентрирование вирусов	36
2.4. Измерение концентрации белка.....	36
2.5. Получение очищенного гексона аденовируса	36
2.6. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле	36
2.7. Масс-спектрометрический анализ	37
2.8. Получение гибридом-продуцентов моноклональных антител к гексону аденовирусов ..	38
2.9. Первичный скрининг моноклональных антител.....	38
2.10. Получение асцитов и очищенных фракций моноклональных антител	39
2.11. Вестерн-блоттинг	39
2.12. Определение специфической активности моноклональных антител методом непрямого иммуноферментного анализа	40
2.13. Выделение моноклональных антител из асцитной жидкости	40
2.14. Конъюгация моноклональных антител с пероксидазой хрена	41
2.14.1. Изучение специфической активности пероксидазных конъюгатов моноклональных антител в иммуноферментном анализе	41
2.15. Конкурентный иммуноферментный анализ	42
2.16. Конъюгация моноклональных антител с биотином	42
2.17. Сэндвич-иммуноферментный анализ.....	42
2.18. Определение специфической активности моноклональных антител в непрямом иммунофлуоресцентном анализе.....	43
2.19. Конъюгация моноклональных антител с флуоресцеин изотиоцианатом	43
2.20. Изучение специфической активности конъюгата моноклональных антител с флуоресцеин изотиоцианатом.....	44
2.21. Образцы для исследования.....	44
2.22. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.....	44
2.23. Секвенирование последовательности гена, кодирующего фибриллу	45
2.24. Статистическая обработка результатов	48
3. Результаты собственных исследований и их обсуждение	49
3.1. Разработка коллекции гибридом, продуцирующих высокоспецифичные моноклональные антитела к гексону аденовирусов	49
3.1.1. Получение очищенного гексона аденовируса.....	49
3.1.2. Разработка моноклональных антител к гексону аденовируса	51
3.1.3. Первичный скрининг моноклональных антител.....	52
3.1.4. Определение направленности моноклональных антител	54
3.2. Изучение иммунохимических свойств моноклональных антител	56
3.2.1. Определение специфической активности моноклональных антител в непрямом иммуноферментном анализе	56
3.2.2. Определение специфической активности пероксидазных конъюгатов моноклональных антител в иммуноферментном анализе.....	57

3.2.3. Определение направленности моноклональных антител 4В7 и 6В12 методом конкурентного иммуноферментного анализа.....	59
3.2.4. Исследование свойств моноклональных антител в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа	60
3.2.5. Изучение специфической активности моноклональных антител методом непрямой иммунофлуоресценции	62
3.2.6. Изучение свойств конъюгата моноклональных антител 6В12 с флуоресцеин изотиоцианатом	63
3.3. Изучение генетического разнообразия аденовирусов, циркулирующих на территории Северо-Западного региона России	65
3.3.1. Отбор клинических образцов для исследования.....	65
3.3.2. Определение типов аденовирусов из клинических образцов	68
3.4. Изучение диагностических свойств моноклональных антител в отношении современных штаммов аденовирусов	70
3.4.1. Выявление аденовирусов методом микрокультурального иммуноферментного анализа в клеточных культурах, зараженных клиническими образцами	70
3.4.2. Выявление аденовирусов в клинических образцах методом сэндвич-иммуноферментного анализа	73
3.4.3. Выявление аденовирусов в клеточной культуре, зараженной клиническими образцами, методом иммунофлуоресценции	74
Обсуждение результатов	76
Заключение	85
Выводы	87
Список сокращений и условных обозначений	88
Список литературы	90
Приложение А Множественные выравнивания аминокислотных последовательностей гексона аденовирусов различных типов	103
Приложение Б Множественные нуклеотидные выравнивания секвенированных генов фибриллы и последовательностей, кодирующих фибриллу аденовирусов 4 и 7 типов	107

Введение

Актуальность проблемы

В России ежегодно регистрируется около 50 миллионов случаев инфекционных заболеваний. До 95% из них приходится на острые респираторные вирусные инфекции [1,2]. Наиболее важное место в развитии патологии дыхательных путей занимают вирусы гриппа, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) и аденовирусы. В отличие от других респираторных вирусов, для циркуляции аденовирусов не показано чёткой сезонной зависимости, вспышки аденовирусной инфекции регистрируются на протяжении всего года [3,4]. При респираторной форме аденовирусной инфекции в первую очередь поражаются верхние дыхательные пути, возможно развитие осложнений в виде бронхитов, бронхиолитов, пневмоний, энцефалитов, менингитов, миокардитов, особенно у пациентов с иммуносупрессией [5–8]. В отличие от других респираторных вирусов, аденовирусы поражают помимо детей и лиц старшего возраста молодых людей из организованных коллективов, в частности военных подразделений. На долю аденовирусной инфекции приходится более половины всех ОРВИ среди военнослужащих и до трети – среди детского населения. [9,10]. Описаны случаи смертельных исходов аденовирусной пневмонии среди детей, а также среди военнослужащих армий России, Канады и США [11–13]. Причины, по которым такие серьезные заболевания возникают и приводят к летальному исходу пациентов без нарушений иммунитета, остаются неясными [14,15].

Многообразие клинических форм аденовирусной инфекции определяет необходимость разработки эффективных средств дифференциальной диагностики этой инфекции. Использование точных диагностических тестов дает возможность клиницистам своевременно поставить диагноз, что особенно актуально для пациентов из групп риска.

В настоящее время для быстрой диагностики аденовирусной инфекции используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР), иммуноферментный анализ (ИФА) и иммунофлуоресцентный (ИФЛ) метод с применением поликлональных

специфичных сывороток. Чувствительность методов лабораторной диагностики аденовирусной инфекции составляет 83,0% для ПЦР, 44,6% для ИФЛ и 48,7% для ИФА [10]. Несмотря на экономическую эффективность и надежность ПЦР диагностики, имеющей ряд ограничений, связанных, в первую очередь, с высокими требованиями к техническому оснащению лаборатории и квалификации персонала, традиционные методы лабораторной диагностики остаются широко востребованными. Существенно повысить эффективность лабораторной диагностики аденовирусной инфекции позволит разработка и включение в состав диагностических тестов высокоспецифичных моноклональных антител (МКА).

Степень разработанности темы исследования

МКА являются незаменимыми инструментами как в фундаментальных исследованиях, так и в клинической лабораторной диагностике. Использование специфичных к респираторным вирусам МКА при конструировании диагностических тест-систем обеспечивает высокую чувствительность анализа, а также необходимый уровень стандартизации препаратов. Основное внимание как зарубежных [16–20], так и отечественных [21–24] исследователей при разработке МКА к возбудителям ОРВИ традиционно уделяется вирусам гриппа. Разработкой МКА к аденовирусам человека в мире занимаются лишь отдельные исследовательские группы. При этом выбор мишеней, к которым должны быть направлены разрабатываемые МКА, определяется задачами, для достижения которых предполагается использовать эти иммунопрепараты. Так, исследователями из Чили получены МКА к пентону аденовируса [25], в Китае получены МКА к фибрилле актуальных типов аденовирусов [26]. Однако МКА, полученные к фибрилле, обладают субтиповой, а часто и штаммовой специфичностью, что делает их непригодными для использования при создании тест-систем с широким диагностическим диапазоном. Для получения МКА широко спектра, способных эффективно выявлять аденовирусы различных типов, в качестве иммуногена целесообразно использовать высококонсервативный белок гексона, являющегося общим белком для всех представителей рода *Mastadenovirus*. Подобные разработки в настоящее время ведутся

в Бразилии [27] и Китае [28–30]. В России разработкой МКА к гексону аденовируса занимались в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, в ходе исследований получены моноклональные антитела 7F1 (в настоящее время гибридома-продуцент утрачена) и #6 с использованием мышей линии SJL/J, особенностью работы с которыми является необходимость проведения облучения животных для эффективного получения МКА.

В настоящее время в России отсутствуют систематические исследования, связанные с разработкой МКА, позволивших бы улучшить качество дифференциальной диагностики аденовирусной инфекции. Недостаточная чувствительность существующих методов лабораторной диагностики и малое количество разработок в данном направлении определяют актуальность создания новых подходов к разработке средств этиологической диагностики аденовирусной инфекции.

Цель исследования

Разработать панель моноклональных антител, способных выявлять аденовирусы, в том числе современные штаммы, в иммунологических реакциях.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить гибридомы, продуцирующие высокоспецифичные МКА к гексону аденовирусов, имеющему в своем составе обширный консервативный участок с родоспецифическими детерминантами.
2. Определить направленность и специфичность разработанных МКА. Отобрать наиболее перспективные МКА для детекции аденовирусных антигенов в различных иммунологических тестах.
3. Провести молекулярно-генетическое типирование аденовирусов, циркулирующих на территории Северо-Западного региона России.
4. Оценить диагностический потенциал разработанных МКА в отношении современных штаммов аденовирусов.

Научная новизна

Впервые методом масс-спектрометрического анализа подтверждена аминокислотная последовательность гексона, использованного в качестве иммуногена для получения МКА.

Впервые для определения типов аденовирусов, циркулирующих на территории России, применено секвенирование методом Сенжера гена, кодирующего фибриллу.

Выявлено преобладание аденовирусов 4 и 7 типов в циркуляции среди населения Северо-Западного региона России за период 2014-2017 гг.

Разработана панель МКА, доказана их способность выявлять аденовирусы, принадлежащие к различным группам, в вирусологических и иммунологических реакциях.

Разработанные МКА 4В7 и МКА 6В12 включены в состав инновационного многопараметрического диагностического комплекса ТОРИ-ТЕСТ, позволяющего определять соответствующий этиологический агент и способствующего проведению рациональной противовирусной терапии и снижению неоправданного применения антибиотиков.

Практическая значимость

Сформирована коллекция современных штаммов аденовирусов, два штамма аденовирусов 4 типа переданы в коллекцию вирусов гриппа и ОРВИ при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Пополнение коллекции современными штаммами аденовирусов дает возможность их использования, как в научных исследованиях, так и при создании модели аденовирусной инфекции *in vitro* для скрининга и тестирования потенциальных противовирусных препаратов.

Разработанные МКА 4В7 и МКА 6В12 могут быть использованы как при изучении этиологической структуры заболеваемости населения, в том числе в рамках осуществления надзора за гриппом и ОРВИ на территории России, так и для диагностики аденовирусной инфекции в практическом здравоохранении.

Разработанные МКА 4В7 и МКА 6В12 включены в состав многопараметрического диагностического комплекса ТОРИ-ТЕСТ для детекции и прогноза тяжести течения острых респираторных инфекций (проект поддержан Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2019-1241 от 10.06.2019 г. (ранее № 14.604.21.0180 от 26.09.2017 г.)).

Разработанные МКА 6В12 рекомендованы для внедрения в производство отечественного препарата «Иммуноглобулин диагностический флуоресцирующий аденовирусный антигексоновый» взамен используемых в настоящее время гипериммунных поликлональных сывороток.

Методология и методы исследования

Для разработки МКА к аденовирусам человека применялись стандартные вирусологические (культивирование вирусов в клеточной культуре), биохимические (выделение очищенного гексона аденовируса 6 типа) методы и подходы гибридомной технологии. Исследование свойств разработанных МКА и их конъюгатов с пероксидазой хрена, биотином и ФИТЦ проводили иммунологическими методами (вестерн-блоттинг, иммуноферментный и иммунофлуоресцентный анализ). Проведен отбор клинических образцов от больных ОРВИ (назофарингеальные мазки), идентификацию аденовирусов в исследуемом материале проводили с помощью ПЦР в реальном времени. Генотипирование обнаруженных аденовирусов осуществляли методом секвенирования по Сенжеру последовательности участка генома, кодирующего фибриллу, и дальнейшего сравнительного анализа с последовательностями, депонированными в международной базе NCBI GenBank. Диагностические свойства разработанных МКА исследованы в иммунологических реакциях с клиническими образцами. Более подробно способы проведения экспериментов отражены в разделе «Материалы и методы».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработаны 9 стабильных гибридом, продуцирующих высокоспецифичные МКА к гексону аденовирусов, имеющему в своем составе обширный консервативный участок с родоспецифическими детерминантами. Доказана направленность разработанных МКА к гексону аденовирусов.

2. Разработанные МКА обладают специфической активностью в отношении лабораторных штаммов аденовирусов 3, 4, 6 и 19 типов. Наиболее перспективными для детекции аденовирусных антигенов в различных иммунологических тестах являются МКА 4В7 и МКА 6В12.

3. В этиологической структуре аденовирусной инфекции на территории Северо-Западного региона России в 2014-2017 гг. преобладали аденовирусы 4 и 7 типов.

4. МКА 4В7 и МКА 6В12 выявляют как эталонные, так и современные штаммы аденовирусов различных типов в различных иммунологических реакциях, и могут быть рекомендованы для включения в состав современных диагностических тестов.

Личный вклад автора

Автор лично планировала и выполняла все основные лабораторные исследования, проводила анализ и статистическую обработку полученных результатов. Автором лично получены очищенный гексон аденовируса, использованный в качестве иммуногена для разработки МКА, очищенные аденовирус и РСВ, использованные для изучения свойств разработанных МКА. Работы по созданию МКА, включая работу с лабораторными животными, так же выполняла автор. Автор лично проводила выделение и характеристику циркулирующих штаммов аденовирусов из клинических материалов от больных и исследовала диагностические свойства разработанных МКА в иммунологических реакциях с выделенными вирусами. Систематизация полученных данных, подготовка материалов для публикации и их представление на научных конференциях международного и российского уровня также выполнены непосредственно автором.

Вклад соавторов

При выполнении диссертационной работы методическая помощь автору была оказана сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России Забродской Я.А. при проведении масс-спектрометрического ана-

лиза и вестерн-блоттинга, Ивановой А.А. при секвенировании геномов аденовирусов методом Сенжера, сотрудниками лаборатории молекулярной вирусологии (зав. лабораторией Комиссаров А.Б.) при проведении ПЦР в реальном времени.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов исследований, проведенных автором, подтверждена статистическим анализом большого массива данных, полученных в ходе экспериментов. Материалы диссертационного исследования доложены на II Российском конгрессе лабораторной медицины (Россия, Москва, 2016), IX Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Россия, Москва, 2017), Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика» (Россия, Москва, 2017), IV научно-практической международной конференции «Современные биотехнологии для науки и практики» (Россия, Санкт-Петербург, 2017), Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии» (Республика Беларусь, Минск, 2017), III Российском конгрессе лабораторной медицины (Россия, Москва, 2017), международной научной конференции «Тенденции в исследовании гриппа» (Trends in Influenza Research) (Россия, Санкт-Петербург, 2017), Двадцать второй Санкт-Петербургской Ассамблее молодых ученых и специалистов (Россия, Санкт-Петербург, 2017), Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018» (Республика Беларусь, Минск, 2018), Межрегиональной научно-практической конференции «Инфекции и соматическая патология» (Россия, Казань, 2018), Научно-практической конференции «Актуальные вопросы государственного санитарно-эпидемиологического надзора в Вооружённых Силах Российской Федерации» (Россия, Санкт-Петербург, 2018), Научно-практической конференции с международным участием «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» (Россия, Санкт-Петербург, 2018), Российско-Китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии «XXII Кашкинские чтения» (Россия, Санкт-Петербург, 2019).

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 16 печатных работ, в том числе 5 статей, 3 из которых в изданиях, рекомендованных ВАК, а также тезисы докладов российских и международных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, описания использованных материалов и методов, 4 глав собственных исследований, обсуждения, выводов, списка литературы, включающего 198 отечественных и зарубежных источников, и 2 приложений. Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста, иллюстрирована 11 таблицами и 20 рисунками.

Работа поддержана грантом для студентов, аспирантов, молодых учёных, молодых кандидатов наук ВУЗов и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга в 2017 году. Также работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий № 075-15-2019-1241 от 10.06.2019 г. (ранее № 14.604.21.0180 от 26.09.2017 г.), проект по теме «Разработка многопараметрического диагностического комплекса ТОРИ-ТЕСТ для детекции и прогноза тяжести течения острых респираторных инфекций».

1. Обзор литературы

Аденовирусы впервые выделены У.П. Роу и соавторами в 1953 г. при исследовании первичных культур, полученных из хирургически удаленных небных миндалин и аденоидов здоровых людей, в которых наблюдалась специфическая дегенерация клеток [31]. В 1954 г. Р.Дж. Хьюбнер получил новые данные, указывающие на то, что аналогичные вирусы обнаруживаются также в секретах больных с острым фарингитом и конъюнктивитом, в связи с чем они были названы «аденоидо-фарингеально-конъюнктивальные вирусы» [32].

В 1962 г. Д. Трентин и соавторы описали первый случай индукции злокачественной опухоли у животных патогенным вирусом человека - им оказался аденовирус 12 типа, вызывавший опухоли у грызунов [33]. Онкогенность аденовирусов послужила сильнейшим стимулом для их дальнейшего детального молекулярно-биологического изучения. П. Шарп и Р. Робертс показали, что гены аденовирусов имеют мозаичную экзон-интронную структуру, и открыли явление сплайсинга [34].

В настоящее время семейство *Adenoviridae* объединяет около 130 типов аденовирусов, выделенных от млекопитающих, птиц и холоднокровных [35]. Аденовирусы человека относятся к роду *Mastadenovirus* - аденовирусы млекопитающих [36]. В настоящее время известно о существовании 88 типов аденовирусов, патогенных для человека [37–40]. На основе способности агглютинировать эритроциты, трансформировать клеточные культуры, онкогенности и секвенированных последовательностей геномов аденовирусы человека делятся на семь групп (А – G) (таблица 1).

Таблица 1 - Краткая характеристика групп аденовирусов человека [41,42]

Группа аденовирусов	Группа гемагглютинации	Риск возникновения опухолей у животных	Трансформации в клеточной культуре	Поражаемые системы и органы
А	IV	высокий	+	Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), респираторный тракт
В	I	умеренный	+	Респираторный тракт, мочеполовая система
С	III	низкий или отсутствует	+	Респираторный тракт, печень
Д	II	низкий или отсутствует	+	Глаза, ЖКТ
Е	III	низкий или отсутствует	+	Респираторный тракт
F	III	н/д	-	ЖКТ
G	III	н/д	н/д	ЖКТ

Примечание - Группа гемагглютинации I – полная агглютинация эритроцитов обезьян, группа II – полная агглютинация крысиных эритроцитов, группа III – неполная агглютинация крысиных эритроцитов, группа IV – агглютинация незначительная или отсутствует.

1.1. Строение вириона аденовирусов

Зрелые вирионы аденовирусов имеют форму икосаэдра диаметром 70-90 нм. Внешняя липопротеидная оболочка отсутствует. Капсид аденовирусов строится из 252 структурных единиц, 240 из которых - гексоны, 12 – пентоны, расположенные на вершинах икосаэдра, от 12 вершин икосаэдра отходят отростки – фибриллы, длина которых в зависимости от типа аденовируса составляет 9-77,5 нм (рисунок 1) [35,43,44].

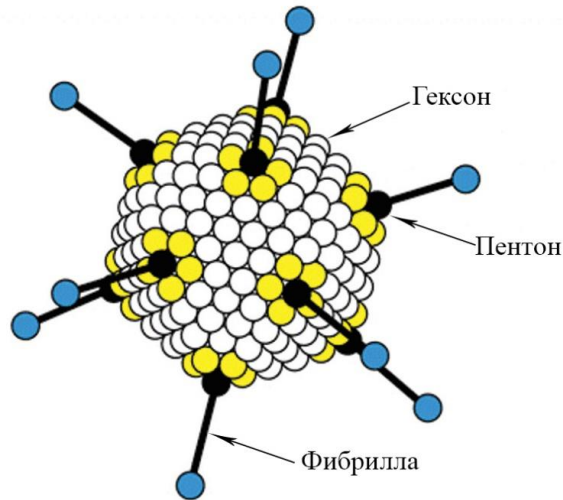


Рисунок 1 - Схема вириона аденовирусов [41].

Вирионы аденовирусов содержат 14 белков [44,45]. Структурные белки аденовирусов обозначаются римскими цифрами в порядке убывания молекулярной массы: капсидные белки II (гексон), III (белок основания пентона), IIIa, IV (фибрилла), VI, VIII и IX входят в состав вирусной оболочки, коровые белки V, VII, X (белок μ) нековалентно связаны с геномной ДНК и обеспечивают ее правильную укладку внутри капсида (рисунок 2). Неструктурные белки вирионов аденовирусов (растворимые антигены) – это капсидные белки, синтезированные в избытке, не использованные при сборке вирионов, они составляют до 20% массы вирионов [46,47].

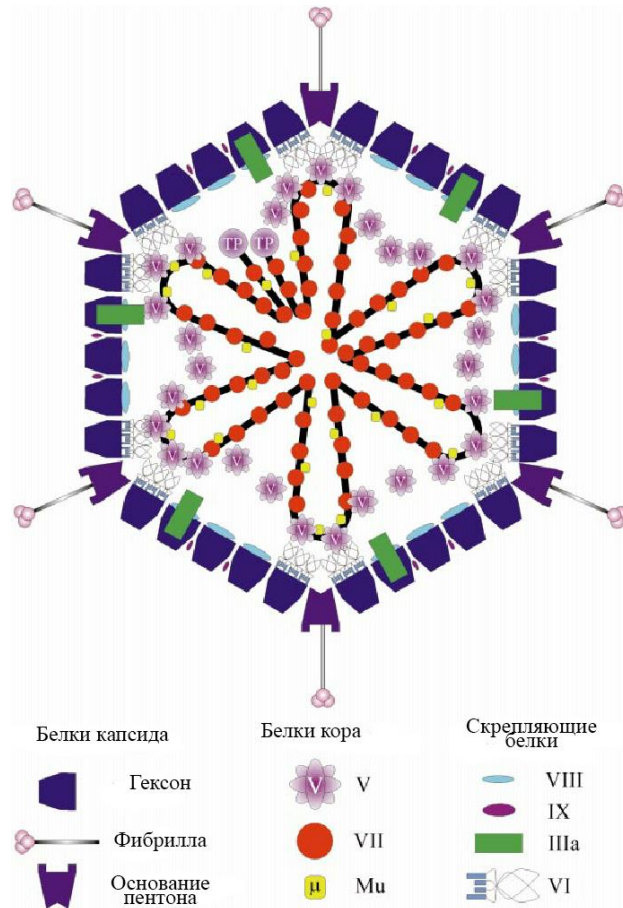


Рисунок 2 – Структурные белки аденовирусов [48].

Гексон является крупнейшим белком капсида аденовирусов (молекулярная масса 109 кДа). Гексоновый капосмер представляет собой тример, состоящий из трех идентичных полипептидов II, прочно связанных между собой нековалентными связями.

Пять молекул полипептида III образуют капосмер пентона, с которым нековалентно связан тример полипептида IV, формирующий фибриллу.

Полипептиды VI, VIII и IX связаны с гексоном. С пятью перепентоновыми гексонами ассоциирован полипептид IIIa.

Белок V связан с основанием пентонов и определяет ориентацию структур, формируемых белками VII и X [42].

Два терминальных полипептида TP (terminal protein) ковалентно связаны с геномной ДНК, защищая ее от действия экзонуклеаз и также участвуют в инициации репликации вирусной ДНК [36,46].

Полипептиды IIIa, VI, VIII, IX – «клей-белки», обеспечивают прочность связывания структурных белков, что придает дополнительную структурную устойчивость вириону. Два мономера белка IIIa при каждой вершине граней повышают прочность ассоциации перипентонных гексонов с пентоном. Белки VI образуют «подкладку» в основании пятерки перипентонных гексонов. Белок VIII выстилает внутреннюю сторону капсида. Белок IX ассоциирован с центральной частью каждой грани икосаэдра [42,49].

Структурные белки выполняют определенную функцию в жизненном цикле аденовирусов (таблица 2).

Таблица 2 - Структурные белки аденовирусов и их функции [42,44,45,47,50]

Полипептид	Локализация	Количество копий в вирионе аденовирусов	Функция
II (гексон)	Капсид	720	Структурная
III (основание пентона)	Вершины капсида	60	Структурная, проникновение в клетку
IIIa	Капсид	68±2	Стабилизирующая
IV (фибрилла)	Вершины капсида	36	Структурная, рецептор-связывающая
V	Кор	157	Гистоноподобный белок; упаковка вириона
VI	Вершины капсида изнутри	342±4	Стабилизирующая, проникновение в клетку, транслокация вирусной ДНК в клетку, регуляция экспрессии ранних генов
VII	Кор	527±44	Упаковка геномной ДНК
VIII	Капсид	128±3	Стабилизирующая
IX	Капсид	247±2	Стабилизирующая
X (μ)	Кор	290±18	Упаковка геномной ДНК
TP	Кор	2	Репликация геномной ДНК

Геном аденовирусов представлен 2-цепочечной линейной молекулой ДНК длиной 30-37 тысяч пар нуклеотидов. На концах молекулы ДНК находятся инвертированные повторы (inverted terminal repeat, ITR), при спаривании которых образуется шпилька [36]. Далее за ITR на 5'-конце расположен сигнал инкапсидирования (последовательность ψ), необходимый для упаковки ДНК. Концы геномной ДНК ковалентно связаны через остатки серина с молекулами терминального белка TP, участвующие в инициации репликации (рисунок 3).

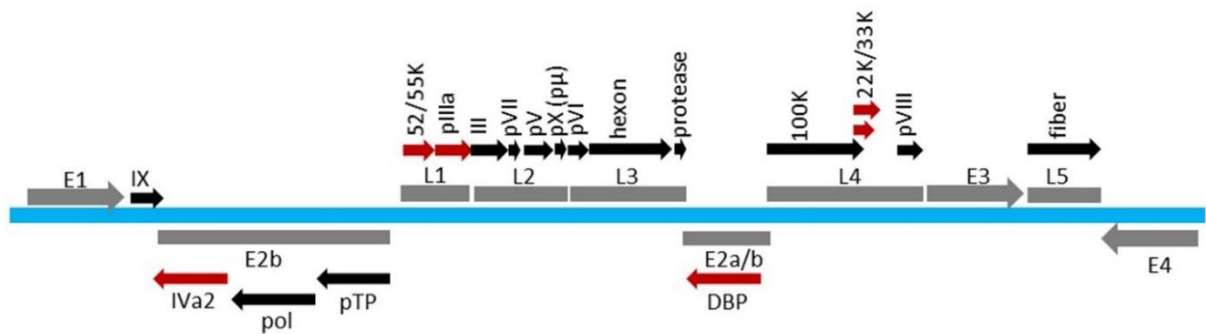


Рисунок 3 - Схема транскрипции генома аденовируса 5 типа [35,45].

Примечание - Вирусный геном показан голубым цветом. Ранние (E1-E4) и поздние (L1-L5) транскрипционные единицы показаны серым цветом. Транскрибируемые белки подписаны над или под соответствующим участком. Красным цветом показаны белки, участвующие в упаковке вириона.

Геном аденовирусов обладает высокой плотностью кодирования: при наличии 10 промоторов в нем закодировано более 50 белков [36]. Вирусные матричные РНК (мРНК) синтезируются клеточной РНК-полимеразой II. 12 сигналов полиаденилирования находятся на 3'-конце мРНК. Большинство генов транскрибируется в направлении 5'-3', но гены, необходимые для репликации ДНК (Pol, pTP, DBP) – в направлении 3'-5'. Транскрипционные единицы могут быть разделены на три класса в зависимости от сроков их использования во время инфекционного цикла. Пять ранних транскрипционных единиц (E1A, E1B, E2, E3 и E4). 4 промежуточные (IX, IVa2, L4 intermediate, E2 late). Существует только один сайт поздней транскрипции, с одним промотором (MLP), но пятью различными сайтами полиаденилирования, что обуславливает синтез пяти семейств мРНК (L1 - L5)

(рисунок 3). Разнообразие матричных РНК обеспечивается за счет альтернативного сплайсинга [36,45].

1.2. Цикл репродукции аденовирусов

Аденовирусы обладают широким спектром тканевого тропизма и могут эффективно размножаться в разных клетках, строго контролируя свой онтогенез от адсорбции до высвобождения вирионов. Жизненный цикл аденовирусов схематически показан на рисунке 4.

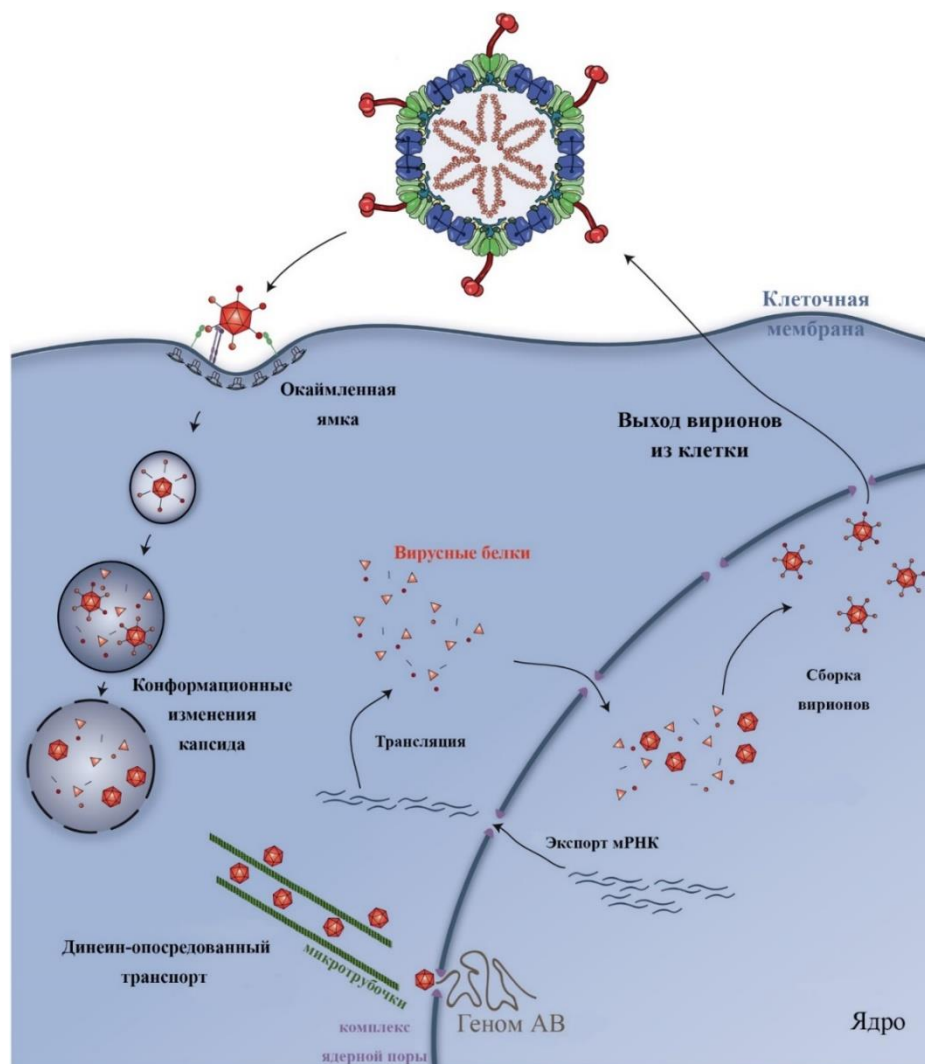


Рисунок 4 - Цикл репродукции аденовируса в клетке [51].

Адсорбция аденовирусов начинается с взаимодействия фибриллы с клеточным рецептором. Аденовирусы используют несколько различных рецепторов

[52]. Рецептором для аденовирусов групп А, С, Е и F является белок CAR (компонент плотных контактов эпителиальных клеток) [36]. Это трансмембранный белок, входящий в состав плотных контактов, в избытке встречающийся в клетках сердца, поджелудочной железы, клетках центральной и периферической нервной системы, легких, печени, кишечника [41]. Представители групп В и D связываются с трансмембранным белком CD46, который так же довольно широко экспрессируется клетками всего организма [53]. Кроме того, ряд рецепторов, включая CD80 и CD86 [54], CD46 [55,56], сиаловые кислоты [57,58], гепарансульфат-протеогликаны [59] факторы коагуляции [60] используются отдельными типами аденовирусов для адсорбции на клетках [61].

Это первое взаимодействие между вирусом и рецептором приводит к конформационным изменениям последнего [55]. Затем пентон аденовируса взаимодействует с трансмембранными гликопротеинами интегринами $\alpha\beta3$ и $\alpha\beta5$, что приводит к проникновению вириона в клетку путем клатрин-опосредованного эндоцитоза [36].

При закислении среды в эндосоме капсид подвергается конформационным изменениям и освобождается в цитоплазму. Здесь из него удаляются пентоны, гексоны и внутренний белок рVI, появляются скрытые ранее сигналы ядерной локализации, с помощью которых он по микротрубочкам транспортируется к ядру. Вблизи комплекса ядерной поры капсид приоткрывается и освобождает комплекс ДНК с ДНК-связывающими белками, который проникает в ядро за счет белков – импортинов [36].

Транскрипция ранних генов осуществляется клеточной РНК-полимеразой II (геномные участки E1 и E3) и приводит к экспрессии ранних белков, которые ответственны за нарушение клеточного цикла инфицированной клетки и модуляции иммунного ответа организма [41]. Так ранний белок E1A (кодируется ранней областью генома E1) активирует метаболизм клетки, и она переходит в S-фазу. Гены области E3 кодируют несколько белков, которые ингибируют экспрессию на по-

верхности инфицированной клетки компонентов главного комплекса гистосовместимости I класса, рецепторов альфа-интерферона, фактора некроза опухолей и блокируют сигнальный каскад апоптоза.

В результате накопления ранних белков начинают экспрессироваться поздние гены, а затем происходит репликация генома вирусной полимеразой AdVPol, которая в качестве праймера использует предшественник терминального белка TP. Накопление вирусной ДНК в ядре зараженной клетки приводит к активации поздних генов pIX и IVa2, а также главного позднего промотора MLP. Образовавшийся транскрипт подвергается полиаденилированию и сплайсингу, что приводит к образованию 5 семейств мРНК, с которых транслируются предшественники капсидных белков. Эти белки содержат в себе сигнал ядерной локализации и транспортируются в ядро, где образуются незрелые капсиды. После упаковки в них ДНК предшественники белков капсида процессируются вирусной протеазой AVP. Выход зрелых вирионов в межклеточное пространство происходит при лизисе клетки, который индуцируется поздним вирусным «белком смерти» [62]. Цикл репродукции аденовирусов в клетке продолжается 14-24 ч.

1.3. Антигенные свойства аденовирусов

Антигенная структура аденовирусов человека, в отличие от вирусов гриппа, обладает стабильностью. Вирионы аденовирусов содержат как группоспецифические, так и типоспецифические антигены, расположенные в трех белках – пентоне, гексоне и фибрилле. Пентон и фибрилла аденовируса несут типоспецифические антигены. Нуклеокапсид является комплементсвязывающим антигеном аденовируса, идентичным для различных типов вируса. Белок гексона составляет около 60% массы вирионов аденовирусов и несет в своем составе обширный консервативный участок с родоспецифическими детерминантами [63]. Вариабельность аминокислотного состава этого участка гексона составляет менее 15% [64].

До массового внедрения технологии секвенирования, разделение аденовирусов на типы осуществлялось по результатам реакции нейтрализации: выделение

в отдельный тип происходило при отсутствии перекрестной реактивности, либо при соотношении гомологичного:гетерологичного титров более 16. Гемагглютинация эритроцитов – свойство фибриллы, которая должна быть связана с основанием пентона для полной гемагглютинации [65].

Нейтрализующие антитела вырабатываются на антигенные детерминанты гексона и фибриллы, которые расположены на поверхности вириона [47,66–69].

Аденовирусы человека устойчивы к воздействию факторов окружающей среды. Они способны сохраняться до 14 суток при комнатной температуре. Вирионы аденовирусов не чувствительны к органическим растворителям и низким рН среды [35,49,50]. Эффективны в отношении аденовирусов хлорсодержащие препараты, инактивация аденовирусов происходит при температуре выше 56°C в течение 10 минут и ультрафиолетовом облучении [70].

Аденовирусы не размножаются в развивающихся куриных эмбрионах. Культивируют аденовирусы на человеческих клеточных линиях HEK 293– эмбриональная почка человека, A 549 – клетки карциномы легкого человека, HeLa – клетки раковой опухоли шейки матки, Her-2 – клетки рака гортани, KB – клетки носоглоточной карциномы человека, MRC-5 – клетки легких плода и др.

1.4. Клиническая характеристика аденовирусной инфекции

Источником инфекции является человек. Входными воротами для инфекции могут быть слизистая оболочка верхних дыхательных путей (воздушно-капельный механизм передачи) [71–73], конъюнктивы (контактно-бытовой механизм передачи) [74,75], эпителий кишечника (фекально-оральный механизм передачи) [76], так же известны случаи инфицирования реципиентов органов и тканей [77–79]. Заражение может происходить как от людей с ярко-выраженными симптомами заболевания, так и от переболевших лиц и здоровых вирусоносителей. Выделение вируса при респираторной форме аденовирусной инфекции может наблюдаться до 25 дней от начала заболевания и до 1,5 мес при поражении ЖКТ [80,81]. Аденовирусы могут проникать через плаценту, вызывая внутриутробные

заболевания, аномалии развития плода, смертельные пневмонии новорожденных [82].

Аденовирусы распространены повсеместно, вспышки аденовирусной инфекции могут возникать на протяжении всего года не только среди лиц с ослабленным иммунитетом [8], но и среди здоровых детей или взрослых в закрытых коллективах (в частности, военнослужащих), а также в домах престарелых, специализированных медицинских учреждениях и летних лагерях [9,14,49,83,84]. Наиболее широко среди людей по всему миру циркулируют аденовирусы группы С (1, 2, 5 типы), группы В (3, 7, 21 типы), группы Е (4 тип) и группы F (41 тип) [85–88]. Точные данные о распространенности и частоте возникновения случаев аденовирусной инфекции отсутствуют, так как большинство случаев заболевания протекают с характерными симптомами ОРВИ и не требуют обращения за специализированной медицинской помощью [2,89,90]. Описаны крупные вспышки аденовирусной инфекции, произошедшие в последние годы в США [90,91], Малайзии [92], Южной Корее [93] и Китае [94,95]. Изучение таких вспышек необходимо для определения типов циркулирующих аденовирусов, их молекулярно-биологических свойств, определяющих особенности взаимодействия вируса и хозяина, а так же факторов, определяющих тяжесть протекания заболевания [96,97].

ОРВИ вирусной этиологии являются основной причиной заболеваемости и смертности детей во всем мире, особенно в развивающихся странах [98]. Доля аденовирусов в общей структуре ОРВИ среди детей может достигать 30% [99–101], наиболее часто выделяют аденовирусы 1, 2, 3, 5, 7 и 21 типов. Осложнения в виде пневмоний, бронхолитов развиваются в 14–60% случаев аденовирусной инфекции [101,102]. Тяжелые формы заболевания, в том числе пневмонии с летальным исходом, чаще вызывают аденовирусы 7, 3, реже 21 типов [103,104].

Характер профессиональной деятельности и условия совместной жизнедеятельности военнослужащих определяют особую восприимчивость последних к респираторным инфекциям и являются дополнительными факторами риска развития вспышек ОРВИ [12,105,106]. ОРВИ аденовирусной этиологии являются ос-

новной причиной заболеваемости военнослужащих по всему миру. Вспышки аденовирусной инфекции регистрируются в США [91,107–111], Сингапуре [112], Южной Корее [93,113], Голландии [114], Великобритании [115], Малайзии [92], Китае [94,95] и России [116]. Наиболее подвержены заболеванию новобранцы и курсанты, пиковые показатели заболеваемости достигаются на 3-5 неделе формирования коллектива [11]. Мобильность воинского контингента также способствует распространению заболевания [13]. По данным исследователей из США на долю аденовирусной инфекций приходится более половины всех ОРВИ и до 90% пневмоний среди здоровых военнослужащих [11,107,108], при этом преобладающими типами аденовирусов являются 4 и 7 [117–120]. Исследования, проведенные среди канадских новобранцев и в нескольких европейских странах показали, что аденовирусная инфекция составляла 28% -70% всех случаев ОРВИ среди новобранцев и 19% -62% случаев госпитализации, связанной с ОРВИ, при этом преобладали аденовирусы 3, 4, 7 и 21 типов [9].

После перенесенной первичной инфекции аденовирусы могут сохраняться в латентном состоянии в различных восприимчивых клетках. Латентная инфекция характеризуется экспрессией клеткой-хозяином вирусных белков без репликации полного вируса. Показано, что латентная аденовирусная инфекция сохраняется в тонзиллярных лимфоцитах почти у 80% исследованных детей, количество копий ДНК аденовируса в лимфоидных клетках уменьшается с возрастом [121]. Описаны случаи латентной аденовирусной инфекции в Т-лимфоцитах кишечника и в эпителиальных клетках легких, где они, по-видимому, играют значительную роль в патогенезе обструктивных заболеваний дыхательных путей [122].

При респираторной форме аденовирусной инфекции в первую очередь поражаются верхние дыхательные пути. Однако случаи развития диссеминированной инфекции или пневмонии с фатальными последствиями могут возникать как у пациентов с ослабленным иммунитетом [8,77], так и у иммунокомпетентных пациентов [9,66,91].

Аденовирусы обладают широким спектром тканевого тропизма и вызывают поражения лимфоидной ткани (группа С), центральной нервной системы, слизистых оболочек респираторного тракта (группы В, С, Е), кишечника (группы F и G), конъюнктивы и мочеполовых путей (группы В и D) [49,123–125], что определяет многообразие симптомов аденовирусной инфекции (таблица 3).

Таблица 3 - Разнообразие клинических форм заболеваний, вызываемых аденовирусами [15,49,96]

Группа аденовирусов	Типы аденовирусов	Характер заболевания	Группы риска
А	12, 18, 31, 61	Гепатиты, гастроэнтериты	Дети, пациенты с трансплантацией органов
В	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	Острый геморрагический цистит, гастроэнтериты, ОРВИ	Новобранцы, курсанты военных училищ, дети
С	1, 2, 5, 6	Фарингиты	Дети
Д	8-10, 13, 15, 17, 19, 19а, 19р, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51	Эпидемические и спорадические кератоконъюнктивиты	Все группы населения
Е	4	ОРВИ, фолликулярные конъюнктивиты	Новобранцы, курсанты военных училищ, все группы населения
F	40	Гастроэнтериты	Дети младшего возраста
G	41, 52	Гастроэнтериты	Дети младшего возраста

Перенесенная аденовирусная инфекция формирует типоспецифический гуморальный иммунитет, сопровождающийся выработкой антител классов IgA, IgM и IgG. Большинство людей старше 10 лет имеют серологическое подтверждение перенесенной аденовирусной инфекции [77,81].

В настоящее время не существует специфического лечения для людей с аденовирусной инфекцией. В большинстве случаев аденовирусная инфекция протекает легко, требует только симптоматического лечения. Для пациентов с ослабленным иммунитетом и пациентов с тяжелой формой аденовирусной инфекции

чаще всего применяют цидофовир, который в настоящее время одобрен для лечения цитомегаловирусной инфекции. Цидофовир оказывается более активным в отношении аденовируса *in vitro*, чем другие противовирусные препараты [126]. Такие противовирусные препараты как рибавирин или видарабин не обладают доказанной активностью в отношении аденовируса *in vitro* [127].

В Российской Федерации средства специфической профилактики аденовирусной инфекции также отсутствуют, поэтому важную роль играет своевременное проведение соответствующих противоэпидемических мероприятий.

1.5. Методы диагностики аденовирусной инфекции

Многообразие клинических проявлений аденовирусной инфекции определяет необходимость создания методов быстрой этиологической диагностики с широким кругом инфекций таких как грипп, РСВ, риновирусная и коронавирусная инфекции [80,128].

Современная вирусология располагает большим арсеналом средств диагностики вирусных инфекций от электронной микроскопии и выделения вируса в клеточных культурах до высокотехнологичных молекулярных методов [49,128–130]. Выбор метода диагностики зависит от качества, количества и сроков поступления исследуемого материала в лабораторию, времени получения результата анализа, стандартизации используемых реагентов, а также квалификации персонала и аппаратной оснащенности клинической лаборатории.

До середины 90-х гг. прошлого столетия **выделение вируса в клеточных культурах** считалось «золотым стандартом» при оценке вновь разрабатываемых диагностических тестов. Это положение остается справедливым и сегодня, но на практике метод выделения вирусов, используется только при эпидемиологических расследованиях в специализированных вирусологических лабораториях [131]. Традиционный метод выделения аденовирусов в клеточной культуре является длительным (до 3 недель), дорогостоящим и трудоемким, оценка результатов

носит субъективный характер. При этом выделить аденовирусы в клеточной культуре удастся примерно в 49% случаев по сравнению с данными ПЦР [10]. Обязательным условием для проведения выделения вирусов является наличие инфекционного вируса в клинических образцах. Для грамотной интерпретации результатов выделения требуется опытный персонал, способный дифференцировать цитопатические эффекты, вызванные разными вирусами. Однако выделение вирусов в клеточных культурах не теряет свою актуальность, несмотря на разнообразие диагностических методов, так как является единственным способом получения новых штаммов вирусов для дальнейших исследований, в том числе разработки и тестирования препаратов специфической профилактики и этиотропной терапии.

Серологические методы выявляют антитела к вирусам, и являются ретроспективными, поскольку диагностирование вирусной инфекции основано на выявлении прироста уровня специфических антител в парных сыворотках, полученных в острый период заболевания и период реконвалесценции. Чувствительность ИФА при этиологической диагностике аденовирусной инфекции составила 33,5% при выявлении IgM и 49,9% при выявлении IgG [10]. Однако эти методы необходимы для подтверждения диагноза, поставленного с помощью быстрых методов выявления вируса, для изучения особенностей иммунного ответа при вирусных инфекциях и контроля эффективности вакцин.

В развитых странах **электронная микроскопия (ЭМ)** долгое время использовалась, как эффективный инструмент для прямого обнаружения вирусов посредством визуализации и подсчета вирусных частиц в жидкостях организма, стуле или гистопатологических образцах. Идентификация основана на морфологических признаках, характерных для каждого семейства вирусов, и требует определенного количества вирусных частиц (до 10^6 частиц/мл). Для исследования с помощью ЭМ требуется дополнительная подготовка образца [132], что может привести к снижению концентрации вируса и усложнить учет результатов анализа. Кроме того, ЭМ требует значительных технических навыков и опыта, а наличие клеточного детрита и вирусоподобных органелл в образце может приводить к

ложному результату [133]. ЭМ не может применяться в качестве теста массовой диагностики.

Реакция связывания комплемента (РСК) является одним из старейших методов в истории клинической вирусологии [134]. В присутствии комплекса антиген-антитело комплемент не взаимодействует с сенсibilизированными эритроцитами, используемыми в качестве индикатора. РСК является трудоемким тестом с низкими показателями чувствительности (61% при диагностике аденовирусной инфекции [10]). Стандартизация реагентов путем титрования и подготовки контролей имеет решающее значение для получения достоверных результатов тестирования.

Иммунологические методы, основанные на формировании иммунного комплекса между антителом, присутствующим в образце, и антигеном, присутствующим в реагенте или наоборот, на протяжении нескольких десятилетий используются в клинико-лабораторной практике. Для генерации измеримого сигнала используют метки, конъюгированные с антителами или антигенами, сенсibilизированными на твердой фазе и используются для захвата соответствующих антигенов или антител, присутствующих в клинических образцах. Эти метки могут представлять собой радиоактивные изотопы, ферменты, вызывающие изменение цвета или флуоресцирующих веществ.

Радиоиммуноанализ является прародителем иммуноанализа (1960-е годы), в котором используются радиоизотопы (такие как йод 125) для маркировки антигена или антитела. Количество анализируемого вещества определяется количеством генерируемой радиоактивности. Это очень чувствительный метод, но основным его недостатком является обращение с опасными радиоактивными веществами и их последующая утилизация.

Альтернативой радиоизотопам в качестве маркеров наиболее широко используемой является ферментативная метка с использованием щелочной фосфатазы или пероксидазы хрена (ПХ) [135]. Эти ферменты обеспечивают появление сигнала или изменение цвета, соответственно, и позволяют измерять количество анализируемого вещества.

Иммуноферментный анализ (ИФА) с энзимами имеет множество вариантов, которые различаются в используемом ферменте и принципе обнаружения сигнала. Широкое применение ИФА при диагностике вирусных инфекций обусловлено высокими показателями чувствительности и специфичности метода, быстротой получения результатов (в течение 3-4 часов), а также возможностью одновременного исследования большого числа клинических образцов и количественного определения вирусных антигенов, что удобно для проведения мониторинга инфекционного процесса [136].

Иммунофлуоресцентный анализ (ИФЛ) остается в ряду современных, широко применяемых в клинико-эпидемиологической практике методов. Этот метод наиболее эффективен в острой фазе (первые 3 дня) заболевания, характеризуется невысокой стоимостью и простотой исполнения, а также возможностью проведения дифференциальной диагностики на всю группу наиболее значимых возбудителей респираторных инфекций, включая вирусы гриппа А или В, РСВ, АВ, вирусы парагриппа (ВПГ) и др. [137]. Чувствительность метода ИФЛ существенно зависит от правильности получения клинических материалов, скорости и условий их доставки в лабораторию, а также качества используемых реагентов. К числу недостатков метода следует отнести возможный субъективизм и качественный характер оценки результатов анализа.

Традиционные рутинные методы по-прежнему широко используются во многих клинических лабораториях. Однако с развитием технического прогресса им на смену пришли продвинутые молекулярные методы.

В настоящее время в практическом здравоохранении широко используется **метод ПЦР в реальном времени (real-time PCR)** [138,139]. Ее принципиальной особенностью является возможность мониторинга и количественного анализа накопления продуктов ПЦР при автоматической регистрации и интерпретации полученных результатов. Время, требуемое для анализа, сокращается до 3-5 ч., при этом исключается этап электрофореза как один из методов детекции амплифицированного материала. Метод имеет высокие показатели чувствительности и специфичности и становится все более доступным для клинических лабораторий.

В настоящее время ПЦР благодаря своей скорости, доступности и универсальности наряду с выделением вирусов в культуре клеток и серологического метода относится к методам «золотого стандарта» обнаружения респираторных вирусов. Однако ПЦР, несмотря на экономическую эффективность и надежность диагностики вирусных инфекций, имеет ряд ограничений. Для всех методов на основе ПЦР необходима разработка оригинальных пар праймеров, специфичных для каждого определяемого патогена, что усложняет процедуру подготовки пробы. Кроме того, для постановки ПЦР-теста требуется наличие специального оборудования и квалифицированного персонала [140].

Современные достижения в области иммунохимии и биофизики позволили осуществить разработку быстрых методов детекции вирусных антигенов «у постели больного» в различных вариантах исполнения (иммунохроматографических, иммуносенсорных, флуорометрических). Огромным преимуществом тестов «у постели больного» является их простота и возможность быстрого получения результатов (за 15-30 мин). Тесты «point of care» (POC) и «lab-on-a-chip» (LOC), как правило, обладают достаточной специфичностью, хотя уступают по показателям чувствительности молекулярным методам [140,141].

Для диагностики респираторных инфекций «у постели больного» могут быть использованы быстрые диагностические тесты, такие как, иммунохроматографический тест. Являясь эффективным средством диагностирования, иммунохроматографические тесты позволяют визуально в течение нескольких минут определить и оценить содержание антигенов или антител в организме человека. Иммунохроматографические тесты характеризуются достаточной точностью (достоверность тестов достигает 92 – 99,8%, при этом каждый тест имеет встроенный внутренний контроль). Тесты разработаны более чем на 100 видов заболеваний, в том числе для диагностики РСВ инфекции, аденовирусной инфекции, гриппа и ряда бактериальных инфекций [142,143]. Однако иммунохроматографические тесты не лишены недостатков. Это касается в первую очередь чувствительности, что

в значительной степени определяется свойствами используемых при их конструировании иммунореагентов. Возможность использования экспресс-тестов в рутинной медицинской практике ограничена из-за их стоимости.

К новым средствам оперативной диагностики респираторных инфекций относится диагностическая система *magiPOC*, разработанная в Финляндии (*ArcDia Int. Ltd.*, Финляндия). Она отличается высокой производительностью и позволяет проводить одновременный анализ 6 образцов на наличие антигенов 8 респираторных вирусов (гриппа А и В, аденовирусов, РСВ, метапневмовируса, вирусов парагриппа) и бактерий *Streptococcus pneumoniae*. Предварительные результаты регистрируют через 20 мин., окончательные – через 2ч. Принцип работы прибора основан на применении технологии двухфотонного возбуждения флуоресценции [144]. Сравнение с методом прямой иммунофлуоресценции показало, что в зависимости от способа взятия материала (назофарингеальные аспираты или соскобы) чувствительность системы *magiPOC* достигала 86% и 90% при детекции вируса гриппа А и РСВ, соответственно [145]. Чувствительность и специфичность системы *magiPOC* в сравнении с мультиплексной ПЦР составила при выявлении вирусов гриппа А - 71% и 100%, вирусов гриппа В - 86% и 100%, РСВ - 89% и 100%, аденовируса - 25% и 100% и для метапневмовируса - 60% и 100%, соответственно [146].

Lab-on-a-chip (LOC) - небольшое устройство, которое объединяет в себе несколько лабораторных методик. Для проведения реакции внутри чипа или портативного устройства требуется минимальный объем исследуемых образцов. Методы, используемые в таких микрофлюидных системах, варьируют от амплификации и обнаружения нуклеиновой кислоты, до подсчета количества клеток и иммунологических анализов.

Наиболее распространёнными биочипами являются ДНК-микрочипы - матрицы с иммобилизованными молекулами нуклеиновых кислот [147]. Работа ДНК-чипов основана на взаимодействии между комплементарными основаниями двух цепей молекул ДНК: в исследуемый образец вводят флуоресцентную либо радио-

активную метку, после чего помещают на чип. После гибридизации на чипе высвечиваются лишь те ячейки, которые содержат комплементарные к исследуемому образцу фрагменты ДНК.

Технология белковых микрочипов основана на аффинном взаимодействии между двумя различными белками или белком и лигандом, например, между антителом и антигеном или ферментом и его ингибитором [148,149]. Белок-определяющие чипы с нанесёнными высокоспецифичными лигандами к определяемым белкам позволяют проводить мониторинг уровня белков в биологическом образце. Однако ввиду широкого разнообразия свойств белков, механизмов их взаимодействия, а также значительно меньшей стабильности по сравнению с молекулами ДНК, белковые биочипы менее распространены. Биочипы для выявления наиболее значимых вирусных патогенов, таких как вирусы гриппа, аденовирусы, респираторно-синтициальный вирус, разработанные на основе иммуноанализа с использованием микрофлюидных мультиплексных технологий в комплексе с аппаратно-программным обеспечением, могут составить значительную конкуренцию существующим лабораторным методам как по стоимости, так и по простоте исполнения, особенно при диагностике вирусных инфекций [150,151].

В России наибольшее практическое распространение в лабораторной диагностике респираторных вирусных инфекций получили ИФА и ИФЛ. При постановке данных реакций традиционно используются поликлональные иммуноглобулины, которые характеризуются гетерогенностью состава антител. Чувствительность ИФЛ составляет 44,6%, ИФА - 48,7% относительно результатов ПЦР [9]. При этом использование поливалентных сывороток не исключает возможности перекрёстного реагирования с гетерологичными вирусами и антигенами хозяина. Поэтому основные усилия в разработке препаратов диагностики вирусных заболеваний направлены на создание тест-систем повышенной чувствительности и специфичности, что достигается за счёт включения в их состав высокоспецифичных иммунореагентов – МКА. МКА впервые получены Келлером и Мильштейном в 1975 году [152] в результате слияния клеток миеломы мыши с клетками

селезёнки иммунных мышей и получения перевиваемых линий клонированных гибридных клеток (рисунок 5).

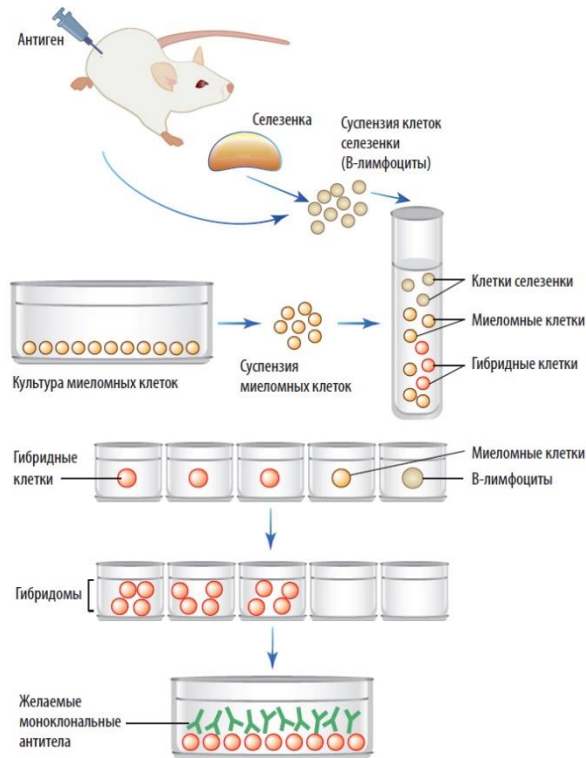


Рисунок 5 - Основные этапы получения моноклональный антител [153].

МКА характеризуются высокой степенью гомогенности по изотипам антител, эпитопной направленности, специфичности, аффинитету. Тем самым, МКА заданной специфичности существенно превышают по своим свойствам и особенностям возможности поликлональных сывороток. МКА могут быть получены практически к любой молекуле белковой природы, углеводам, нуклеиновым кислотам и гаптенам, некоторые МКА обладают каталитической активностью [154,155], что делает потенциальный спектр применения МКА довольно широким [156,157]. Использование МКА различной белковой направленности для диагностики вирусных инфекций позволяет усовершенствовать диагностические препараты, способствует раннему распознаванию этиологии заболевания и назначению специфических средств терапии, облегчает санитарно-эпидемиологический надзор и проведение противоэпидемических мероприятий. В медицинской диа-

гностике МКА являются обычным инструментом при проведении таких исследований как вестерн-блоттинг, иммуногистохимия, иммуноцитохимия, ИФА, ИФЛ и проточный цитометрический анализ [157,158].

Основное внимание как зарубежных [15–19], так и отечественных исследователей [20–23,147] при разработке МКА к возбудителям ОРВИ традиционно уделяется вирусам гриппа. Разработкой МКА к аденовирусам человека занимаются лишь отдельные исследовательские группы. При этом выбор мишеней, к которым должны быть направлены разрабатываемые МКА, определяется задачами, для которых предполагается использовать эти иммунопрепараты. Так, исследователями из Чили получены МКА к пентону аденовирусов [24], в Китае получены МКА к фибрилле актуальных типов аденовирусов [25]. Однако такие МКА обладают суб-типовой, а часто и штаммовой специфичностью, что делает их непригодными для использования при создании тест-систем с широким диагностическим диапазоном. Для получения МКА широко спектра, способных эффективно выявлять аденовирусы различных типов, в качестве иммуногена целесообразно использовать высококонсервативный среди представителей обширного рода *Mastadenovirus* белок гексон.

На российском рынке диагностических препаратов представлены моноклональные тест-системы для дифференциальной диагностики аденовирусной инфекции в основном зарубежного производства. Иммунохроматографические тесты Adeno-Check-1 (Vedlab, Франция), H&R Adenovirus Respiratory (Vegal Pharmaceuticals, Испания) предназначены для выявления аденовирусов в назофарингеальных мазках, RPS Аденодетектор (RPS Diagnostics, США) - в слезной жидкости, QuickStripe™ Adenovirus (Savyon Diagnostics, Израиль), Ротавирус/Аденовирус (Standard Diagnostics, Inc., Корея) – в образцах фекалий. Тест-системы Ridascreen Аденовирус (R-Biopharm AG, Германия) и Аденовирус-антиген–ИФА–БЕСТ (Вектор-Бест, г. Новосибирск) предназначены для диагностического выявления аденовирусного антигена методом сэндвич-ИФА кишечных аденовирусов 40 и 41 типов. Для иммунофлуоресцентной диагностики аденовирусной инфекции

на рынке представлены тест-системы «Imagen respiratory screen kit» (Dako, Дания) и SimulFluor respiratory screen kit (Millipore, Великобритания).

К сожалению, число имеющихся в настоящее время быстрых и чувствительных тестов для дифференциальной диагностики аденовирусной инфекции, недостаточно для назначения своевременной противовирусной терапии. Разработка отечественных высокочувствительных тест-систем на основе МКА остается актуальной задачей, решение которой направлено на повышение уровня дифференциальной диагностики аденовирусной инфекции как при изучении этиологической структуры заболеваемости населения, так и при диагностике аденовирусной инфекции в практическом здравоохранении.

2. Материалы и методы

2.1. Клеточные культуры

Линии клеток А 549 (карцинома легкого человека) и МА-104 (эпителий почки эмбриона макаки) получены из коллекция клеточных линий человека и животных ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Культивирование клеточных культур осуществляли в соответствии с паспортом на соответствующую культуру.

2.2. Вирусы

Аденовирусы 3, 4, 6 (штамм Tonsill-99), 19 типов и РСВ (штамм Long) получены из коллекции вирусов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Для заражения клеточной культуры А 549 использовали аденовирусы в дозе от 100 до 1000 ТИД₅₀/мл, для заражения клеточной культуры МА-104 - РСВ в дозе 100 ТИД₅₀/мл. При заражении клеточных культур А 549 клиническими образцами, инфекционный материал вносили в разведении 1:10. Зараженные клеточные культуры инкубировали при 37°C в СО₂-инкубаторе и ежедневно исследовали под световым микроскопом на наличие признаков цитопатического действия вируса (ЦПД) (образование симпластов в клеточных культурах, зараженных РСВ или появлении круглых клеток и незначительном разрежении монослоя в клеточных культурах, зараженных аденовирусами).

Для приготовления тест-объектов использовали 96-луночные культуральные планшеты (Nunc, Дания). Клеточную культуру А 549, зараженную аденовирусами, инкубировали в течение 2 суток, РСВ – 5 суток, затем клеточные культуры фиксировали в течение 10 минут 80% охлажденным ацетоном. Образцы с незараженной клеточной культурой фиксировали через 48 ч.

Для получения вирусосодержащей культуральной жидкости (ВКЖ) клеточные культуры инкубировали в культуральных флаконах большого объема до

наступления отчетливо выраженного ЦПД в течение 3-5 суток для аденовирусов и в течение 5-7 суток для РСВ.

2.3. Очистка и концентрирование вирусов

После наступления полной дегенерации клеточного монослоя ВКЖ собирали, затем ВКЖ аденовируса подвергали 3-кратному замораживанию при минус 20 °С и оттаиванию при 36 °С, ВКЖ РСВ замораживали однократно. Очищенные аденовирус и РСВ получали из ВКЖ ультрацентрифугированием в 20 – 60% градиенте плотности сахарозы.

2.4. Измерение концентрации белка

Для определения концентрации белка использовали набор Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией.

2.5. Получение очищенного гексона аденовируса

Очищенный гексон получали из предварительно осветленной центрифугированием ВКЖ аденовируса 6 типа согласно методике [159]. Для подтверждения чистоты и аминокислотной последовательности полученного белка был проведено электрофоретическое разделение белков аденовируса в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) с последующим масс-спектрометрическим анализом.

2.6. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле

Проводили согласно [160] с использованием 8% разделяющего и 4% концентрирующего гелей. Образцы (гексон аденовируса 6 типа в концентрации 0,2 мг/мл; очищенный аденовирус 6 типа в концентрации 0,5 мг/мл) подготавливали в денатурирующих и нативных условиях (с добавлением или без добавления бета-меркаптоэтанола в буфер Лэммли, соответственно), денатурацию проводили при 70°С в течение 20 мин. Для подготовки образца очищенного аденовируса 6 типа в нативных условиях его выдерживали в буфере Лэммли без бета-меркаптоэтанола при +4°С в течение 1,5 ч [161]. На дорожку 15-луночного геля наносили по 5 мкл

образца. В качестве маркера молекулярных масс использовали Precision Plus Protein Unstained Standards (Biorad, США). После окончания ЭФ гель окрашивали коллоидным раствором Кумасси согласно [162]. Изображения геля визуализировали при помощи системы ChemiDoc XRS+ (Biorad, США). Электрофоретическую подвижность окрашенных зон оценивали по маркеру молекулярных масс в программном обеспечении прибора.

2.7. Масс-спектрометрический анализ

Ферментативный гидролиз белков в геле трипсином проводили согласно [163], минуя этап восстановления дисульфидных связей и их модификации йодацетамидом. Вырезанные фрагменты геля, содержащие интересующие окрашенные зоны, отмывали от красителя дважды по 15 мин 30 мМ NH_4HCO_3 , 40% ацетонитрилом и обезвоживали ацетонитрилом. После полного испарения ацетонитрила к гелю добавляли 20 мкг/мл свиного трипсина (Promega, США) в 50 мМ NH_4HCO_3 . Ферментативный гидролиз проводили в течение 5 ч при 37°C. Реакцию останавливали раствором 0,5% трифторуксусной кислоты с 10% ацетонитрила. Полученные триптические пептиды смешивали с матрицей HCCA (Bruker, США), наносили на мишень GroundSteel (Bruker, США) и анализировали на MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре ultrafleXtreme (Bruker, США) в режиме регистрации положительных ионов. Для каждого спектра суммировали 5000 импульсов лазера. Идентификация белков осуществлялась с использованием MASCOT (matrixscience.com) при обращении к базе данных National Center of Biotechnology Information (NCBI) [164]. В качестве переменных модификаций указывали окисление метионинов. Погрешность ограничили 20 ppm.

2.8. Получение гибридом-продуцентов моноклональных антител к гексону аденовирусов

Осуществляли согласно [152]. Для этого мышей линии BALB/c двукратно с интервалом в 6 недель иммунизировали очищенным гексоном, смешанным с неполным адьювантом Фрейнда в соотношении 1:1, из расчета 50 и 30 мкг белка на мышь. Через 3 дня после второй иммунизации проводили гибридизацию спленоцитов иммунизированных мышей с клетками мышинной миеломы P_h8Ag.653. Через 2 недели после слияния проводили первичное тестирование антител, секретлируемых гибридами, из всех лунок, в которых регистрировали рост одного клона клеток. Клоны, продуцирующие МКА к аденовирусу и не реагирующие с неинфицированными клетками А 549 и с клетками МА-104, инфицированными РСВ, переносили в 24-луночные планшеты с макрофагами. Активно растущие клоны-продуценты МКА были накоплены и подвергнуты криоконсервации в жидком азоте.

2.9. Первичный скрининг моноклональных антител

Проводили методом микрокультурального ИФА (мКИФА) [165]. Тест-объекты (п. 2.2 раздела Материалы и методы) инкубировали в течение 1 ч при 37 °С с культуральной жидкостью лунок, в которых регистрировали рост одного клона клеток, взятой в разведении 1:10 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH 7,2–7,4). Для детекции связавшихся антител, планшеты отмывали ФСБ с добавлением 0,5% твин-20 (ФСБТ) и инкубировали 45 минут при 37 °С с пероксидазным конъюгатом антител к IgG мыши (Sigma, США), разведенного 1:10 000 ФСБТ с добавлением 5% желатина (ФСБТж). Проявляли реакцию добавлением в каждую лунку 100 мкл субстратной смеси, содержащей 0,1 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) в ацетат-цитратном буфере (pH 5,5), с добавлением 0,005% H₂O₂. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 50 мкл 2н H₂SO₄. Результаты реакции учитывали на иммуноферментном анализаторе фирмы «Anthos» (Австрия) при длине

волны 450 нм (ОП450). В качестве положительных контролей использовали клеточную культуру А 549, инфицированную аденовирусами 3, 4, 6 и 19 типов. В качестве отрицательных контролей использовали неинфицированную культуру А 549, а также клеточную культуру МА-104, инфицированную РСВ. Положительным признавали сигнал ОП450, который превышал ОП450 контрольных образцов не менее, чем в 2 раза. МКА, отобранные по результатам первичного скрининга, были переведены в асцитную форму.

2.10. Получение асцитов и очищенных фракций моноклональных антител

Гибридомы накапливали до концентрации 0,5-1 млн клеток/мл и вводили внутривенно мышам BALB/c, праймированным за 10 дней до инъекции клеток пристаном (0,5 мл на мышь внутривенно). Каждый клон гибридомы был введен в 2 мыши из расчета по 8 млн клеток на мышь. Асциты собирали по мере их формирования (через 30-40 сут после введения гибридом). Фракцию антител получали 2-кратным высаливанием равным объемом насыщенного сульфата аммония и хранили при +4°C.

2.11. Вестерн-блоттинг

Исследование направленности МКА проводили методом вестерн-блоттинга. После ЭФ в ПААГ (аналогично п. 2.6. раздела «Материалы и методы») не окрашенный гель, нитроцеллюлозную мембрану (0,2 мкм, Biorad, США) и фильтровальную бумагу для блоттинга (Biorad, США) инкубировали 15 минут в буфере, содержащем 49,7 мМ трис, 38,6 мМ глицин, 0,0375% додецилсульфат натрия, 20% этанол. Полусухой перенос проводили 40 мин в ячейке Trans-Blot Turbo (Biorad, США) по протоколу производителя. Перенос белков на мембрану подтверждали её окрашиванием АТХ Ponceau S red (Fluka, Германия). Мембрану отмывали дважды ФСБТ, после чего инкубировали в 5% блокирующем реагенте (Biorad, США), разведенном в ФСБТ, в течение 16 ч. Исследуемые МКА и вторичные антитела GAM-HRP (Biorad, США), разбавляли в 5% блокирующем реа-

генте (Biorad, США), разведенном в ФСБТ, и инкубировали по 1 ч с промежуточной отмывкой ФСБТ. Для последующей визуализации маркера молекулярных масс вместе со вторыми антителами добавляли StrepTactin-HRP conjugate (Biorad, США). Мембраны проявляли Clarity Western ECL (Biorad, США), хемилюминесценцию регистрировали на ChemiDoc XRS+ (Biorad, США).

2.12. Определение специфической активности моноклональных антител методом непрямого иммуноферментного анализа

96-луночные планшеты («Медполимер», Россия) в течение 16 ч при +4°C сенсibilизированные очищенным аденовирусом 6 типа, разведенным в 0,01 М карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ, pH 9,5) до концентрации 2,5 мкг/мл. Планшеты отмывали ФСБТ. Далее в лунки планшета по 100 мкл вносили 10-кратные разведения исследуемых МКА, начиная с концентрации 5 мкг/мл. Связавшиеся с аденовирусным антигеном МКА детектировали аналогично мКИФА (п.2.9. раздела «Материалы и методы»). В качестве отрицательного контроля использовали очищенный РСВ в концентрации 2,5 мкг/мл. В качестве препарата сравнения использовали МКА #6, полученные и охарактеризованные в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России [166].

2.13. Выделение моноклональных антител из асцитной жидкости

Осуществляли методом аффинной хроматографии на Protein G-Sepharose 4B Fast Flow (GE, США). Колонку с сорбентом уравнивали MES (150mM NaCl; 50mM 2-[N-морфолин]этансульфат, pH 5,7). Осветленную асцитную жидкость смешивали с MES в соотношении 1:4 и наносили на колонку, скорость потока устанавливали 4,8 мл/ч. Затем колонку пропускали MES для полного удаления балластных белков. Элюцию проводили 100 mM глициновым буфером (pH 2,7). Пик элюции белка, содержащий МКА, собирали и сразу нейтрализовали 1 М трис (pH 8,0) до pH 7,2 – 7,4. Фракцию очищенных МКА диализовали против ФСБ при +4°C в течение 16 ч. Очищенные МКА консервировали NaN₃ и хранили при +4°C

для приготовления конъюгатов с пероксидазой хрена, биотином или флуоресцеин изотиоцианатом.

2.14. Конъюгация моноклональных антител с пероксидазой хрена

Конъюгацию МКА 4В7 и 6В12 с пероксидазой хрена (ПХ) проводили периодическим методом [167]. К конъюгату добавляли бычий сывороточный альбумин (Fluka, Германия) до конечной концентрации белка 10 мг/мл и равный объем безводного глицерина. Готовые конъюгаты хранили в аликвотах при минус 20°C.

2.14.1. Изучение специфической активности пероксидазных конъюгатов моноклональных антител в иммуноферментном анализе

Для определения специфической активности пероксидазных конъюгатов МКА 4В7 и МКА 6В12 использовали прямой вариант ИФА. Лунки 96-луночного планшета («Медполимер», Россия) сенсibilизировали очищенным аденовирусом 6 типа, разведенного в КББ (рН 9,5) в концентрации 5 мкг/мл в течение 16 ч при +4 °С. В качестве отрицательного контроля использован очищенный РСВ в концентрации 5 мкг/мл. После 3-кратного промывания планшетов ФСБТ в лунки вносили по 100 мкл исследуемых пероксидазных конъюгатов МКА, в разведениях от 1:500 до 1:5000 в ФСБТ-ж. После инкубации в течение 45 минут при 37 °С результат учитывали аналогично п.2.9. раздела «Материалы и методы».

Для определения минимальной выявляемой концентрации аденовирусного антигена в лунки 96-луночного планшета («Медполимер», Россия) вносили двукратные разведения очищенного аденовируса 6 типа, разведенного в КББ (рН 9,5), начиная с концентрации 1 мг/мл. В качестве отрицательного контроля использован очищенный РСВ в концентрации 1 мг/мл. Планшет сенсibilизировали антигенами в течение 16 ч при +4 °С. После 3-кратного промывания планшетов ФСБТ в лунки вносили по 100 мкл исследуемого пероксидазного конъюгата МКА, разведенного в ФСБТ-ж 1:3000. После инкубации в течение 45 минут при 37 °С результат учитывали аналогично п.2.9. раздела «Материалы и методы».

2.15. Конкурентный иммуноферментный анализ

Для того, чтобы оценить степень перекрытия антигенных детерминант, к которым направлены МКА, было проведено исследование методом конкурентного ИФА согласно [168]. 96-луночные планшеты («Медполимер», Россия) сенсублизировали очищенным аденовирусом 6 типа в концентрации 2,5 мкг/мл в течение 16 ч при +4°C. Затем в лунки вносили равные объемы 10-кратных разведений МКА и пероксидазных конъюгатов МКА в различных сочетаниях. После инкубации в течение 45 минут при 37 °С результат учитывали аналогично п.2.9. раздела «Материалы и методы».

Для оценки степени ингибирования связывания пероксидазных конъюгатов МКА в присутствии немеченых МКА сравнивали активность маркерного фермента иммунного комплекса, связанного с твердой фазой, в лунках с добавлением и без добавления МКА по формуле (1):

$$\left(1 - \frac{\text{ОП450}_{\text{тест}} - \text{ОП450K}^-}{\text{ОП450K}^+ - \text{ОП450K}^-}\right) * 100\% \quad (1)$$

где ОП450_{тест} – ОП450 тестируемого образца при добавлении смеси МКА и конъюгированных МКА, ОП450K⁻ - ОП450 образца без добавления каких-либо МКА, ОП450K⁺ - ОП450 образца при добавлении только пероксидазного конъюгата МКА.

2.16. Конъюгация моноклональных антител с биотином

Конъюгацию МКА с биотином проводили с использованием набора EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo scientific, кат. № 21335) согласно инструкции.

2.17. Сэндвич-иммуноферментный анализ

В лунках 96-луночного планшета («Медполимер», Россия) сорбировали МКА 4В7 или МКА 6В12 в концентрации 5 мкг/мл в КББ (рН 9,5). Планшеты инкубировали в течение 16 ч при +4 °С, отмывали ФСБТ. Затем вносили по 100 мкл в лунку очищенный аденовирус 6 типа в концентрациях от 500 нг/мл до 1 нг/мл, в

контрольные лунки вносили очищенный РСВ в концентрации 1 мкг/мл, планшеты инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Планшет отмывали ФСБТ и детектировали связавшийся аденовирусный антиген с помощью конъюгатов МКА 4В7 и МКА 6В12 с ПХ либо биотином. Учет результатов проводили, как описано в п.2.9. раздела «Материалы и методы».

2.18. Определение специфической активности моноклональных антител в непрямом иммунофлуоресцентном анализе

Двукратные разведения МКА в ФСБ, начиная с концентрации 20 мкг/мл, наносили на зафиксированные ацетоном клеточные культуры (п.2.2. раздела «Материалы и методы»). Через 30 мин инкубации при комнатной температуре во влажной камере в темноте клеточные культуры отмывали ФСБ в течение 10 мин, а затем связавшиеся МКА детектировали конъюгатом ФИТЦ с антимышиными антителами (Sigma, США) в разведении 1:8 в ФСБ. Окрашенные клеточные культуры анализировали под люминесцентным микроскопом Axioskop 40 (Karl Zeiss, Германия) при увеличении x400.

Оценку яркости флуоресценции проводили по четырехкрестовой шкале яркостей:

- ++++ - исключительно яркая флуоресценция;
 - +++ - выраженная флуоресценция меньшей интенсивности;
 - ++ - отчетливая флуоресценция умеренной интенсивности;
 - +
 -
- слабая, неотчетливая флуоресценция;
- фоновая аутофлуоресценция клеток.

2.19. Конъюгация моноклональных антител с флуоресцеин изотиоцианатом

Конъюгацию с ФИТЦ проводили согласно [169]. Фракцию очищенных с использованием Protein G-Sepharose МКА из асцитической жидкости диализовали против КББ (рН 9,5) в течение 16 ч при +4 °С. К очищенным МКА 6В12 добавляли раствор ФИТЦ в КББ (рН 9,5) из расчета 1 мг ФИТЦ на 80 мг белка. Конъюгацию

проводили в течение 16 ч при +4 °С при перемешивании. Для удаления несвязавшегося ФИТЦ проводили очистку полученного конъюгата на колонке с сефадексом G-25, уравновешенной 0,015 М ФСБ. К конъюгату в качестве консерванта добавляли NaN_3 и хранили при -20 °С или лиофилизировали с добавлением бычьего сывороточного альбумина (Fluka, Германия) до концентрации 1%.

2.20. Изучение специфической активности конъюгата моноклональных антител с флуоресцеин изотиоцианатом

Проводили аналогично непрямому ИФЛ (п.2.18 раздела «Материалы и методы»), за тем исключением, что на зафиксированные клеточные культуры наносили ФИТЦ-конъюгат МКА 6В12 в разведениях 1:8-1:64 в ФСБ.

2.21. Образцы для исследования

В работе исследованы назофарингеальные мазки от 991 пациента, госпитализированных с симптомами ОРЗ в военно-медицинские организации МО РФ в период с апреля 2014 по март 2017 г.

При взятии материала из носовой полости сухими тампонами. Тампоны с взятым материалом погружали в транспортную среду (Соран, Италия). Полученные мазки замораживали и хранили при минус 20°С до использования не более 3 мес.

2.22. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Выявление нуклеиновых кислот возбудителей ОРВИ в клинических образцах проводили методом ПЦР в режиме реального времени на приборе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) с использованием коммерческих наборов «Рибо-преп» для экстракции нуклеиновых кислот вирусов, «Реверта-L» для проведения реакции обратной транскрипции, а также тест-систем «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL» и «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL».

2.23. Секвенирование последовательности гена, кодирующего фибриллу

Для филогенетического анализа из 100 мкл исходных клинических образцов ДНК аденовирусов выделяли с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия).

Аmplификацию гена, кодирующего фибриллу, проводили методом ПЦР с использованием смеси праймеров (таблица 4) и программы амплификации согласно [170].

Таблица 4 - Праймеры на участки гена, кодирующего фибриллу

Группа аденовирусов	Праймер	Нуклеотидная последовательность праймера 5'-3'	Положение нуклеотидов	Размер продукта, п.н.
A	AdA1	GCTGAAGAAMCWGAAGAAAATGA	29392–29414	1444–1537
	AdA2	CRTTTGGTCTAGGGTAAGCAC	30928–30908	
B	AdB1	TSTACCCYTATGAAGATGAAAGC	4573–4595	670–772
	AdB2	GGATAAGCTGTAGTRCTKGGCAT	5242–5220	
C	AdC1	TATTCAGCATCACCTCCTTTCC	333–354	1988–2000
	AdC2	AAGCTATGTGGTGGTGGGGC	2320–2301	
D	AdD1	GATGTCAAATTCCTGGTCCAC	5–25	1205–1221
	AdD2	TACCCGTGCTGGTGTAAAAATC	1219–1198	
E	AdE1	TCCCTACGATGCAGACAACG	48–67	967
	AdE2	AGTGCCATCTATGCTATCTCC	1014–994	
F	AdF1	ACTTAATGCTGACACGGGCAC	1734–1754	541–586
	AdF2	TAATGTTTGTGTTACTCCGCTC	2274–2253	

Состав реакционной смеси: Nuclease-Free water – 5,3 мкл, буфер 5x Green GoTaq Reaction Buffer – 6 мкл, Дна Так-Полимераза – 1 мкл, нуклеотиды - dNTP Set с концентрацией 10 пмоль/мкл, праймеры с концентрацией 10 пмоль/мкл – 0,6 мкл (смесь праймеров в сумме 7,2 мкл), вирусная ДНК – 10 мкл. Конечный объем смеси – 30 мкл. Программа амплификации: 94°C 5 мин; 30 циклов - 94°C 1 мин, 54°C 45 сек, 72°C 2 мин; 72°C 5 мин. Реакцию проводили в термоциклере BioRad CFX96 Real-Time System C100 Thermal Cycler (BioRad, США).

Анализ продуктов амплификации проводили гель-электрофорезом в 1,7% агарозном геле в течение 60 мин при разности потенциалов 120 В. Рабочий трис-боратный буфер TBE с добавлением бромида этидия. В качестве маркера молекулярной массы использовался Low Range DNA Marker (125-3000) (Axygen, США). Наличие продуктов определялось при ультрафиолетовом свете на трасиллюминаторе (Vilber Lourmat, Франция). Фотосъемка осуществлялась системой мультиплексной визуализации ChemiDoc MP Imaging System (BioRad, США).

Фрагменты ДНК аденовирусов выделяли из геля с помощью DEAE бумаги DE-81 «Watman» и колонок Centri-Sep CentriSep (Princeton Separations, США). Концентрацию ДНК после выделения определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo, США).

Секвенирование проводили методом Сенжера с использованием коммерческого набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Секвенирование каждой последовательности проводили с прямого и обратного праймеров. Для секвенирования генов, кодирующих фибриллу аденовирусов, использовали те же праймеры, что и для амплификации (таблица 4).

Состав реакционной смеси: BigDye Terminator - 0,5 мкл, 5X Sequencing Buffer - 3,5 мкл, праймер - 1 мкл, ДНК - 5 мкл. Конечный объем смеси – 10 мкл.

Программа секвенирующей ПЦР: 96°C - 10с, 50°C - 5 с, 60°C - 4 мин (25 циклов). Реакцию секвенирования проводили в термоциклере BioRad CFX96 Real-Time System C100 Thermal Cycler (BioRad, США).

Очистку продуктов секвенирующей реакции от остаточных терминаторов элонгации цепи ДНК проводили с помощью набора BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems, США).

Анализ продуктов реакции секвенирования и определение нуклеотидных последовательностей производились 4-канальной автоматизированной системой капиллярного электрофореза и флуоресцентной детекции ДНК-фрагментов ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Капиллярный электрофорез проводился в полимере ABI PRISM3130 POP-7. Обработка данных, поступающих с регистрирующего устройства, преобразование данных в информацию о

последовательности нуклеотидов (basecalling) осуществлялись программой ABI PRISM 3100-Avant Data Collection.

Сборка, обработка и хранение секвенированных нуклеотидных последовательностей осуществлялись в программе Vector NTI 10 Advance (Invitrogen, США). Филогенетический анализ секвенированных последовательностей генов, кодирующих фибриллу, провели в сравнении с нуклеотидными полными геномными последовательностями, депонированными в базе данных GenBank (таблица 5).

Таблица 5 - Коды доступа к референс-последовательностям аденовирусов в базе данных GenBank

Группа аденовирусов	Типы аденовирусов	Коды доступа
A	12, 18, 31	AC_000005, GU191019, AM749299
B	3, 7, 16 21, 11, 14 34, 35, 50	NC_011203, AC_000018, AY601636 AY601633, AY163756, AY803294 AY737797, AY128640, AY737798
C	1, 2, 5 6	AF534906, ADRCG, AC_000008 FJ349096
D	8, 9, 10 13, 15, 17 19, 20, 22 23, 24, 25 26, 27, 28 29, 30, 32 33, 36, 37 38, 39, 42 43, 44, 45 46, 47, 48 49, 51, 53 54	AB448767, AJ854486, JN226746 JN226747, AB562586, AC_000006 EF121005, JN226749, FJ404771 JN226750, JN226751, JN226752 EF153474, JN226753, FJ824826 AB562587, JN226755, JN226756 JN226758, GQ384080, DQ900900 JN226759, JN226760, JN226761 JN226761, JN226763, JN226764 AY875648, JN226757, EF153473 DQ393829, JN226765, FJ169625 AB333801
E	4	AY487947
F	40 41	L19443 DQ315364
G	52	DQ923122

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе Vector NTI 10 Advance с использованием алгоритма CLUSTAL W [171]. Филогенетические деревья строили в программе MEGA 6.

2.24. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2007 и GraphPad Prism 5. Для представления результатов иммуноферментного анализа использовали показатели описательной статистики: среднее арифметическое значение и стандартное отклонение. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

3. Результаты собственных исследований и их обсуждение

3.1. Разработка коллекции гибридом, продуцирующих высокоспецифичные моноклональные антитела к гексону аденовирусов

Одним из ключевых моментов при создании МКА является выбор иммуногена. Для разработки МКА, специфичных к аденовирусам различных типов, использован высокоочищенный гексон, обладающий сходной антигенной структурой среди патогенных для человека представителей семейства *Mastadenovirus*. Множественные выравнивания аминокислотных последовательностей гексона аденовирусов различных типов, широко циркулирующих среди людей по всему миру, приведены в приложении А.

3.1.1. Получение очищенного гексона аденовируса

Очищенный гексон в кристаллической форме выделяли из ВКЖ, полученной после культивирования аденовируса 6 типа в клеточной культуре А 549 (п.2.5 раздела «Материалы и методы»). Для подтверждения чистоты и аминокислотной последовательности полученного гексона проводили электрофорез в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) (рисунок 6) с последующим масс-спектрометрическим анализом. В качестве контроля использовали очищенный аденовирус 6 типа. Образцы были подготовлены в денатурирующих (с добавлением бета-меркаптоэтанола) и нативных (без добавления бета-меркаптоэтанола) условиях (пп.2.6. - 2.7. раздела «Материалы и методы»).

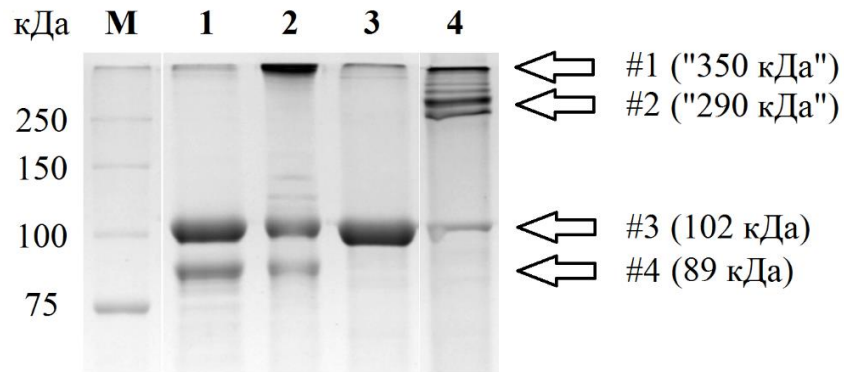


Рисунок 6 - Электрофореграмма продуктов электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле.

Примечание - Окрашено коллоидным раствором Кумасси. 1 – очищенный гексон в денатурирующих условиях; 2 – очищенный гексон в нативных условиях; 3 – очищенный аденовирус 6 типа в денатурирующих условиях; 4 – очищенный аденовирус 6 типа в нативных условиях, М – маркер молекулярных масс.

При окрашивании ПААГ раствором Кумасси (рисунок 6) были выявлены белковые зоны, по электрофоретической подвижности соответствующие 90-100 кДа (#3 и #4) и около 300 кДа (#1 и #2), что соответствует описанным в литературе массам мономера и тримера гексона, соответственно [172]. Для определения аминокислотной последовательности белка, содержащегося в окрашенных зонах (отмечены стрелками на рисунке 6), соответствующие участки ПААГ вырезали, проводили масс-спектрометрическое исследование и сравнивали с аминокислотной последовательностью гексона аденовируса 6 типа, полученной из базы данных GenBank (код доступа BAU36519.1). Результат сравнения представлен на рисунке 7.

```

1 MATPSMMPQW SYMHISGQDA SEYLSPLVQ FARATETYFS LNNKFRNPTV
51 APTHDVTTDR SQRLTLRFIP VDREDTAYSY KARFTLAVGD NRVLDMASTY
101 FDIRGVLDRG PTFKPYSGTA YNALAPKGAP NSCEWEQNET AQVEAQELDE
151 EENEANEQA REQEQAQKTH VYAQAPLSGI KITKEGLQIG TADATVAGAG
201 KEIFADKTFQ PEPQVGESQW NEADATAAGG RVLKKTTPMK PCYGSYARPT
251 NSNGGQGV MV EQNGKLESQV EMQFFSTSTN ATNEVNNIQP TVVLYSEDVN
301 METPDTHLSY KPKMGDKNAK VMLGQQAMPN RPNYIAFRDN FIGLMYYNST
351 GNMGVLAGQA SQLNAVVDLQ DRNTELSYQL LLDSIGDRTR YFSMWNQAVD
401 SYDPDVRIIE NHGTEDELPN YCFPLGGIGI TDTFQAVKTT AANGDQGNNT
451 WQKDSTFAER NEIGVGNNFA MEINLNANLW RNFLYSNIAL YLPDKLKYNF
501 TNVEISDNPN TYDYMNKRVV APGLVDCYIN LGARWSLDYM DNVNPFNHHR
551 NAGLRYRSM L LGNGRYVPFH IQVPQKFFAI KNLLLLPGSY TYEWNFRKDV
601 NMVLQSSLGN DLRVDGASIK FDSICLYATF FPMAHNTAST LEAMLRNDTN
651 DQSFNDYLSA ANMLYPIPAN ATNVPISIPS RNWAAFRGWA FTRLKTKETP
701 SLGSGYDPYY TYSGSIPYLD GTFYLNHTFK KVAITFDSSV SWPGNDRLLT
751 PNEFEIKRSV DGEQYNVAQC NMTKDWFLVQ MLANYNIGYQ GFYIPESYKD
801 RMYSFFRN FQ FMSRQVDDT KYKDYQQVGI IHQHNSGFV GYLAPTMREG
851 QAYPANVPYP LIGKTAVDSI TQKKFLCDRT LWRIPFSSNF MSMGALTDLG
901 QNLLYANSAH ALDMTFEVDP MDEPTLLYVL FEVFDVVRVH QPHRGVIETV
951 YLRTPFSAGN ATT

```

Рисунок 7 - Аминокислотная последовательность гексона аденовируса 6 типа, полученная из базы данных GenBank, с отмеченными красным цветом фрагментами, обнаруженными в спектре исследованных продуктов электрофореза в полиакриламидном геле.

По результатам исследования, во всех образцах методом масс-спектрометрического анализа достоверно идентифицирован гексон аденовируса 6 типа. Величина Score составила 412 при пороговом значении 76 (в случае, если Score превышает пороговое значение, идентификация считается достоверной, $p < 0,05$). Равномерное покрытие последовательности указывает на то, что все исследованные образцы содержат полный гексон аденовируса 6 типа.

3.1.2. Разработка моноклональных антител к гексону аденовируса

Очищенный гексон использовали для иммунизации мышей линии Balb/c. Через 3 дня после бустер-иммунизации проводили гибридизацию спленоцитов иммунизированных мышей с клетками мышинной миеломы X63Ag8.653. Схема получения МКА представлена на рисунке 8.



Рисунок 8 - Схема получения моноклональных антител.

При слиянии спленоцитов иммунизированных очищенным гексоном мышей с клетками миеломы получено 11 гибридом.

3.1.3. Первичный скрининг моноклональных антител

Первичный скрининг МКА, содержащихся в культуральной жидкости полученных гибридом, проводили методом мКИФА (п.2.9. раздела «Материалы и

методы»). В качестве отрицательных контролей использовали незараженную клеточную культуру А 549 и клеточную культуру МА-104, зараженную гетерологичным РСВ. Результаты первичного скрининга представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Результаты первичного скрининга специфичности разработанных моноклональных антител в отношении аденовирусов 3, 4, 6 и 19 типов по данным микрокультурального иммуноферментного анализа

МКА	Показатели ОП 450 при тестировании МКА с аденовирусами разных типов					
	Типы аденовирусов				Отрицательные контроли	
	3	6	4	19	РСВ	А 549
2С3	0,040	0,910	0,058	0,051	0,052	0,054
2Н7	0,126	1,177	0,178	0,328	0,040	0,054
3F12	0,165	1,021	0,636	1,009	0,046	0,049
4В7	0,131	1,436	1,094	0,554	0,030	0,057
4G10	0,039	0,253	0,052	0,040	0,023	0,056
5D4	0,172	0,662	0,316	0,444	0,056	0,044
5E11	0,099	0,975	0,175	0,155	0,044	0,049
6B12	0,105	1,374	0,282	0,138	0,057	0,051
6G10	0,047	1,113	0,033	0,074	0,042	0,046
5A8	0,963	0,809	0,569	0,447	0,555	0,585
3F6	0,049	0,069	0,040	0,050	0,049	0,058

По результатам первичного скрининга, исследуемые МКА были разделены на 3 группы:

1. МКА 5А8 неспецифически взаимодействовали с неинфицированной клеточной культурой А 549 и гетерологичным РСВ, МКА 3F6 не обладали активностью в мКИФА (ячейки таблицы выделены серым цветом). По результатам первичного скрининга данные МКА не удовлетворяли требованиям к специфичности разрабатываемых иммунореагентов и были исключены из дальнейших исследований.

2. МКА 2С3, 4G10, 6G10 обладали специфической активностью только в отношении аденовируса 6 типа, гексон которого был использован в качестве иммуногена (ячейки таблицы выделены желтым цветом). Эти МКА могут представ-

лять интерес для научных исследований, в том числе при типировании аденовирусов, выделенных в лабораториях из клинических образцов. Гибридомы 2С3, 4G10, 6G10 были накоплены и криоконсервированы в жидком азоте.

3. МКА 2Н7, 3F12, 4В7, 5D4, 5E11, 6В12 обладали широким спектром специфической активности, они взаимодействовали с аденовирусами 3, 4, 6 и 19 типов при полном отсутствии неспецифического взаимодействия с гетерологичным РСВ и не инфицированными клетками А 549. Таким образом, 9 из 11 разработанных МКА обладали способностью выявлять аденовирусы, шесть МКА (2Н7, 3F12, 4В7, 5D4, 5E11, 6В12) выявляли аденовирусы 3, 4, 6 и 19 типов и могут быть перспективными иммунореагентами для использования в различных иммунологических реакциях.

3.1.4. Определение направленности моноклональных антител

Для определения направленности полученных МКА проводили исследование методом вестерн-блоттинга (п.2.12 раздела «Материалы и методы») (рисунок 9).

ЭФ в ПААГ проводили с очищенным аденовирусом 6 типа и очищенным гексоном, использованным для иммунизации. По результатам иммуноблоттинга в нативных условиях (без добавления бета-меркаптоэтанола) судили о специфичности МКА в отношении конформационной структуры гексона, присутствующей в вирионе аденовируса. Результаты иммуноблоттинга в денатурирующих условиях (с добавлением бета-меркаптоэтанола) позволили судить о специфичности в отношении первичной последовательности гексона.

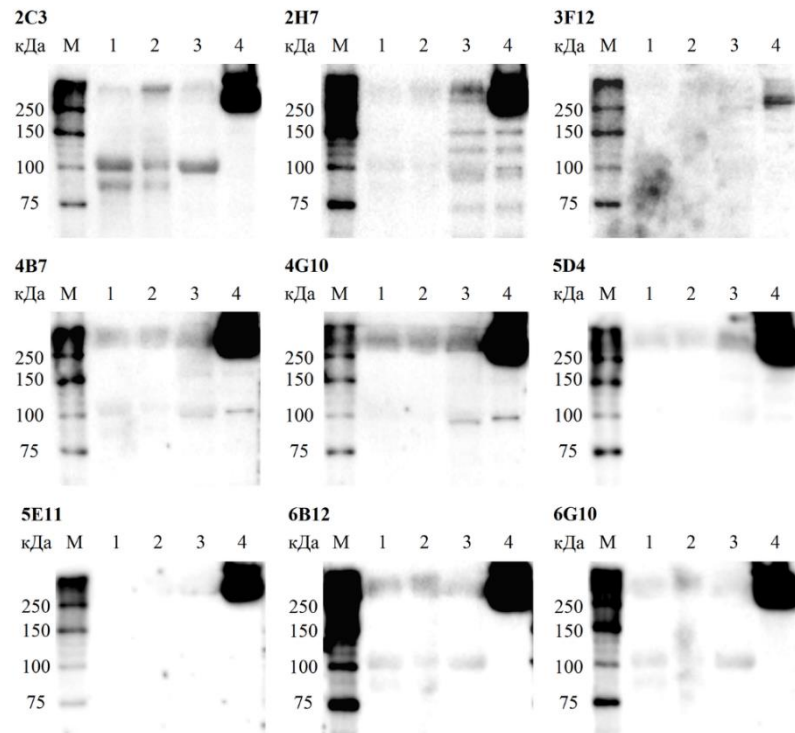


Рисунок 9 - Результаты изучения методом вестерн-блоттинга взаимодействия разработанных моноклональных антител с гексоном аденовируса б типа.

Примечание - 1 – очищенный гексон в денатурирующих условиях; 2 – очищенный гексон в нативных условиях; 3 – очищенный аденовирус б типа в денатурирующих условиях; 4 – очищенный аденовирус б типа в нативных условиях, М – маркер молекулярных масс.

Полученные результаты продемонстрировали, что все 9 разработанных МКА связываются преимущественно с нативной формой гексона, присутствующей в составе вирионов аденовируса б типа (рисунок 10, дорожка 4).

3.2. Изучение иммунохимических свойств моноклональных антител

3.2.1. Определение специфической активности моноклональных антител в непрямом иммуноферментном анализе

С помощью ИФА был проведен отбор МКА, обладающих наибольшей специфической активностью в отношении очищенного аденовируса 6 типа (п.2.12 раздела «Материалы и методы») (рисунок 10).

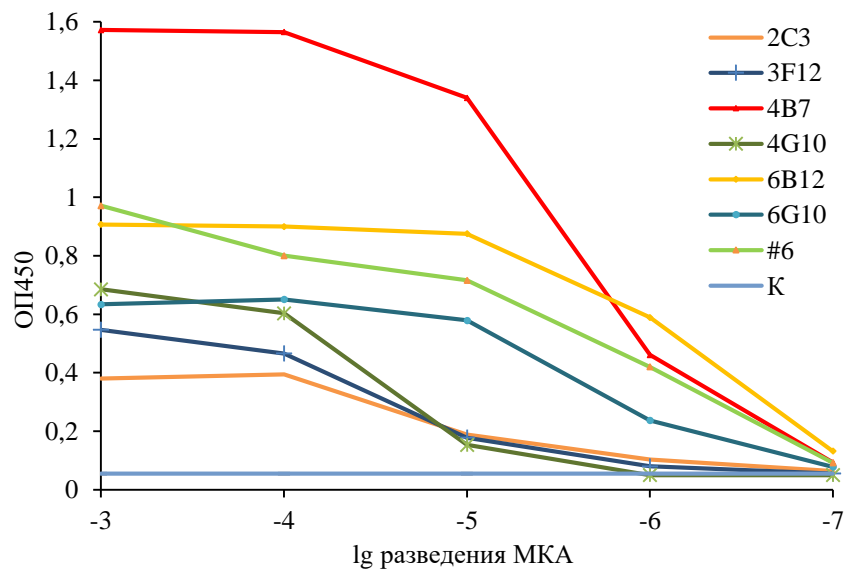


Рисунок 10 - Определение специфической активности моноклональных антител в отношении очищенного аденовируса 6 типа в иммуноферментном анализе (ОП450).

Примечание - На стадии захвата использован очищенный аденовирус 6 типа в концентрации 2,5 мкг/мл, на стадии детекции – пероксидазный конъюгат антител к IgG мыши (Sigma, США). В качестве отрицательного контроля «К» использовали гетерологичный респираторно-синцитиальный вирус в концентрации 2,5 мкг/мл.

По результатам непрямого ИФА наибольшей специфической активностью в отношении очищенного аденовируса 6 типа обладали МКА 4В7 и МКА 6В12 (титр антител составил 10^{-6}). МКА 3F12 и МКА 5E11 обладали меньшей активностью (титр антител составил 10^{-4}), активность МКА 2Н7 и МКА 5D4 была слабо выраженной. В качестве отрицательного контроля специфичности МКА исполь-

зовали очищенный РСВ, неспецифические взаимодействия отсутствовали при исследовании всех МКА. Величина оптического сигнала (ОП450) при использовании МКА 4В7 и МКА 6В12 так же превышала ОП450, наблюдаемую при использовании МКА #6.

Для дальнейших исследований были отобраны МКА 4В7 и МКА 6В12 как обладающие наибольшими показателями специфической активности в отношении гексона аденовируса.

3.2.2. Определение специфической активности пероксидазных конъюгатов моноклональных антител в иммуноферментном анализе

Проведена конъюгация МКА 4В7 и МКА 6В12 с пероксидазой хрена (ПХ). Специфическую активность пероксидазных конъюгатов МКА 4В7-ПХ и МКА 6В12-ПХ изучали в прямом варианте ИФА с очищенным аденовирусом 6 типа.

Определено оптимальное разведение конъюгатов МКА 4В7-ПХ и МКА 6В12-ПХ для детекции аденовирусного антигена методом ИФА, которое составило 1:3000 (рисунок 11).

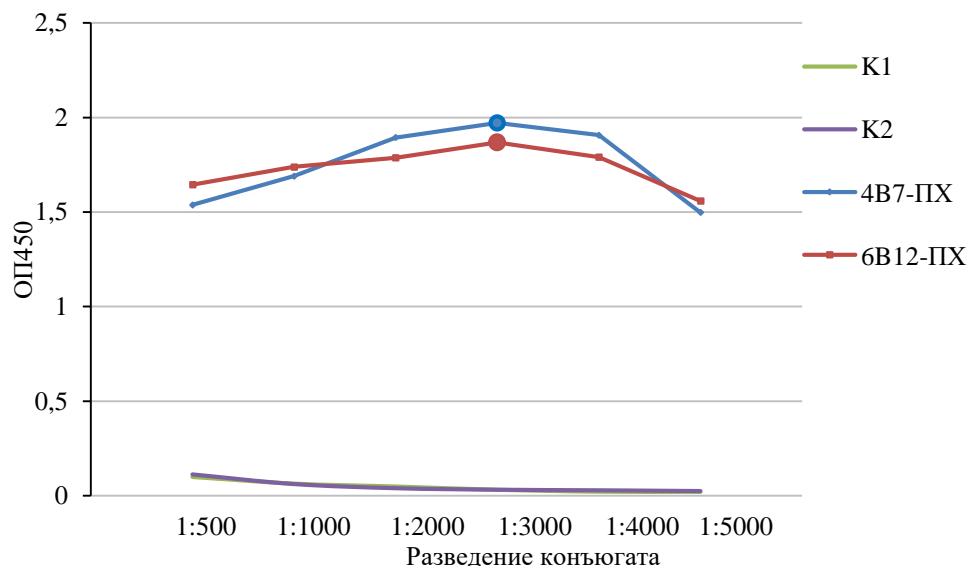


Рисунок 11 - Определение специфической активности пероксидазных конъюгатов моноклональных антител 4В7 и 6В12 в иммуноферментном анализе.

Примечание – В качестве отрицательного контроля использовали очищенный респираторно-синцитиальный вирус в концентрации 1 мг/мл, «K1» - отрицательный контроль МКА 4В7-ПХ, «K2» - отрицательный контроль МКА 6В12-ПХ.

Для определения минимальной выявляемой концентрации аденовирусного антигена проводили исследование методом ИФА двукратных разведений очищенного аденовируса 6 типа с использованием МКА 4В7-ПХ и МКА 6В12-ПХ в выбранном разведении (рисунок 12).

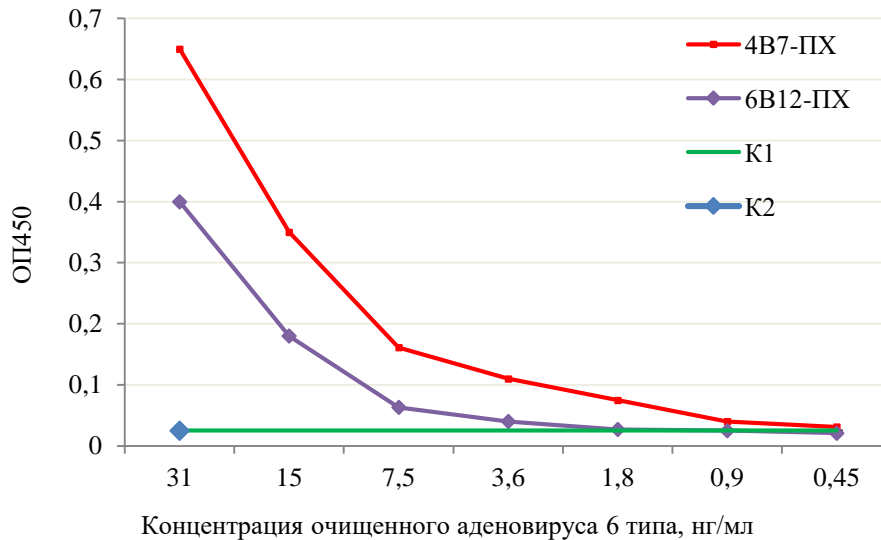


Рисунок 12 - Определение минимальной выявляемой концентрации аденовирусного антигена с использованием пероксидазных конъюгатов моноклональных антител 4В7 и 6В12 методом иммуноферментного анализа.

Примечание – В качестве отрицательного контроля использовали очищенный респираторно-синцитиальный вирус в концентрации 1 мг/мл, «К1» - отрицательный контроль МКА 4В7-ПХ, «К2» - отрицательный контроль МКА 6В12-ПХ.

Конъюгаты МКА 4В7-ПХ и МКА 6В12-ПХ сохраняли специфическую активность в отношении аденовируса 6 типа, при полном отсутствии неспецифических реакций. Минимальные выявляемые концентрации аденовирусного антигена при использовании МКА 6В12-ПХ составили 15 нг/мл и 3,6 нг/мл при использовании МКА 4В7-ПХ. Полученные результаты определили выбор МКА 4В7-ПХ для использования в ИФА, в том числе при выявлении аденовирусов в клинических образцах методом мКИФА.

3.2.3. Определение направленности моноклональных антител 4В7 и 6В12 методом конкурентного иммуноферментного анализа

Для оценки направленности разработанных МКА 4В7 и МКА 6В12 провели исследование конкурентного ингибирования связывания МКА 4В7-ПХ и МКА 6В12-ПХ с гексонным антигеном аденовируса 6 типа в присутствии не конъюгированных МКА 4В7 и МКА 6В12 (п.2.15. раздела «Материалы и методы»). Результаты исследования приведены в таблице 7.

Таблица 7 - Оценка степени конкурентного взаимодействия моноклональных антител 4В7 и 6В12 с гексонным антигеном аденовируса 6 типа (по данным конкурентного иммуноферментного анализа)

МКА	Пероксидазные конъюгаты	Степень ингибирования, %	
		МКА 4В7-ПХ	МКА 6В12-ПХ
4В7		90	79
6В12		16	93

При исследовании комбинаций МКА 4В7 с МКА 4В7-ПХ и МКА 6В12 с МКА 6В12-ПХ степень ингибирования составила 90% и 93%, соответственно. При исследовании комбинации МКА 6В12 с МКА 4В7-ПХ степень ингибирования составила 16%. При исследовании комбинации МКА 4В7 с МКА 6В12-ПХ степень ингибирования достигала 79%. Существенные различия в степени ингибирования при использовании разных комбинаций меченых и не меченых МКА могут быть объяснены более высокой афинностью к гексону МКА 4В7 по сравнению с МКА 6В12, в связи с чем МКА 4В7 быстрее специфически реагировали с антигенным эпитопом, препятствуя последующему связыванию с ним МКА 6В12.

Полученные результаты демонстрируют, что сайты связывания МКА 4В7 и МКА 6В12 с гексоном перекрываются частично, то есть МКА являются разнонаправленными, использование разнонаправленных антител при конструировании иммунологических тестов является предпочтительным для обеспечения наилучших показателей чувствительности и специфичности анализа [17,173].

3.2.4. Исследование свойств моноклональных антител в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа

Различные комбинации МКА 4В7 и МКА 6В12 на стадии захвата и их конъюгатов с пероксидазой хрена (рисунок 13) и биотином (рисунок 14) на стадии детекции исследовали методом сэндвич-ИФА.

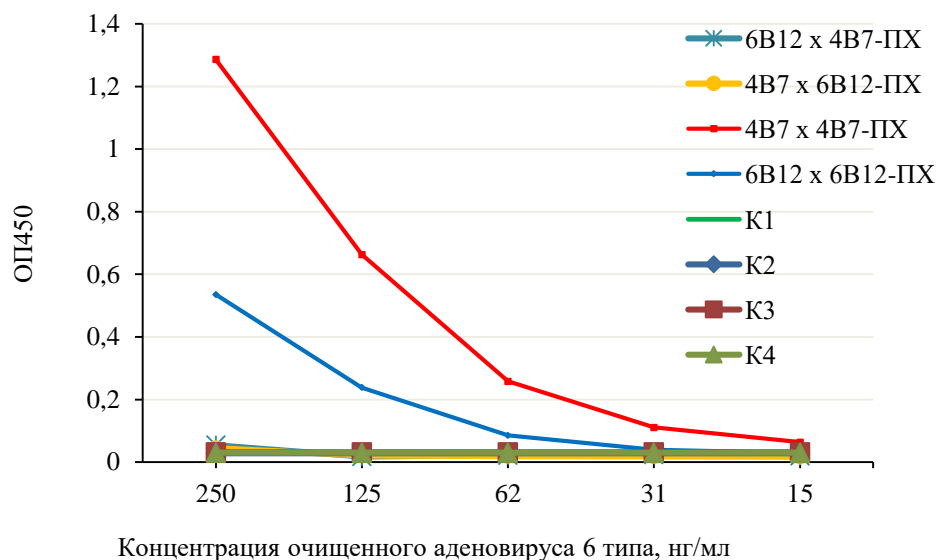


Рисунок 13 – Результаты изучения различных комбинаций моноклональных антител 4В7 и 6В12 на стадии захвата и их конъюгатов с пероксидазой хрена на стадии детекции аденовирусного антигена методом сэндвич-иммуноферментного анализа.

Примечание – МКА 4В7 и МКА 6В12 использованы в концентрации 5 мкг/мл, в качестве отрицательного контроля использовали РСВ в концентрации 1 мкг/мл, «К1» - отрицательный контроль для комбинации МКА 4В7 x МКА 4В7-ПХ, «К2» - отрицательный контроль для комбинации МКА 4В7 x МКА 6В12-ПХ, «К3» - отрицательный контроль для комбинации МКА 6В12 x МКА 4В7-ПХ, «К4» - отрицательный контроль для комбинации МКА 6В12 x МКА 6В12-ПХ.

Наибольшую чувствительность теста обеспечивало использование МКА 4В7 на стадии захвата антигена и МКА 4В7-ПХ на стадии детекции, выявляемая концентрация очищенного аденовируса 6 типа при этом составила 15 нг/мл. При исследовании комбинации МКА 6В12 с МКА 4В7-ПХ концентрация выявляемого

очищенного аденовируса 6 типа составила 30 нг/мл. Существенно ниже чувствительность была при использовании комбинации МКА 6В12 и МКА 4В7 с МКА 6В12-ПХ (125 нг/мл и 500 нг/мл, соответственно).

Комбинация МКА 4В7 на стадии захвата антигена и МКА 4В7-ПХ на стадии детекции в дальнейшем было использовано для исследования клинических образцов методом сэндвич-ИФА.

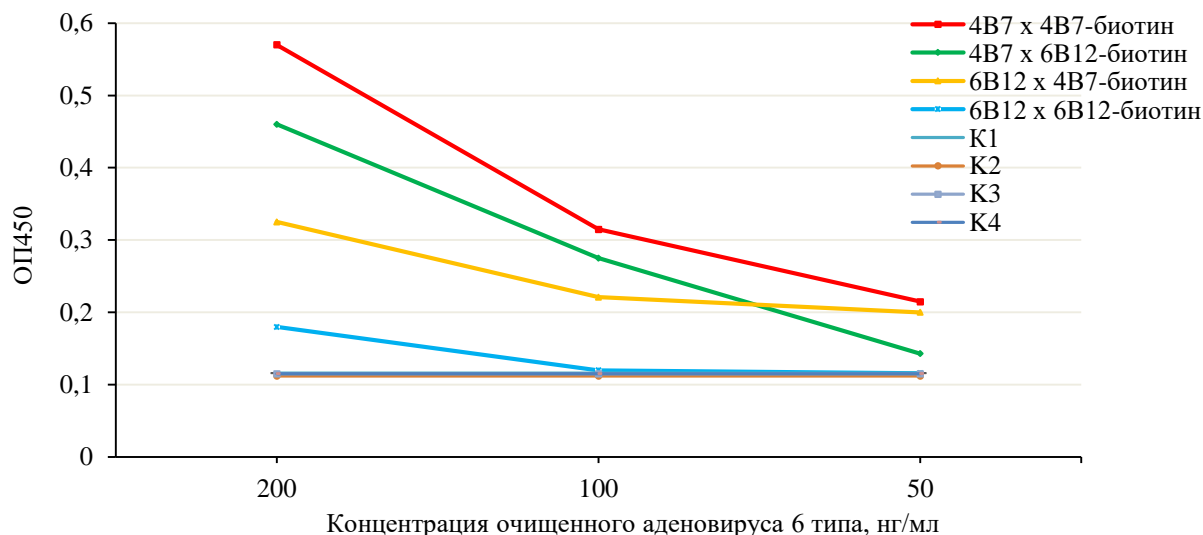


Рисунок 14 - Результаты изучения различных комбинаций моноклональных антител 4В7 и 6В12 на стадии захвата и их конъюгатов с биотином на стадии детекции аденовирусного антигена методом сэндвич-иммуноферментного анализа.

Примечание – Моноклональные антитела 4В7 и 6В12 использованы в концентрации 5 мкг/мл, в качестве отрицательного контроля использовали очищенный респираторно-синцитиальный вирус в концентрации 1 мкг/мл, «К1» - отрицательный контроль для комбинации МКА 4В7 x МКА 4В7-биотин, «К2» - отрицательный контроль для комбинации МКА 4В7 x МКА 6В12-биотин, «К3» - отрицательный контроль для комбинации МКА 6В12 x МКА 4В7-биотин, «К4» - отрицательный контроль для комбинации МКА 6В12 x МКА 6В12-биотин.

Показатели чувствительности сформированных вариантов теста варьировали в широких пределах. Использование МКА 4В7 либо МКА 6В12 на стадии захвата антигена и конъюгата МКА 4В7 с биотином на стадии детекции позволяет выявлять аденовирус 6 типа до концентрации 50 нг/мл. При использовании МКА 4В7 на стадии захвата и конъюгата МКА 6В12 с биотином на стадии детекции

выявляемая концентрация аденовируса 6 типа составила 100 нг/мл. При использовании МКА 6В12 и конъюгата МКА 6В12 с биотином детектируемая концентрация аденовируса 6 типа была наименьшей и составила только 200 нг/мл.

МКА 6В12 и конъюгат МКА 4В7 с биотином включены в состав белкового биочипа многопараметрического диагностического комплекса ТОРИ-ТЕСТ.

3.2.5. Изучение специфической активности моноклональных антител методом непрямой иммуофлуоресценции

Проведен отбор МКА, обладающих наибольшей специфической активностью в отношении аденовирусного антигена в ИФЛ (рисунок 15).

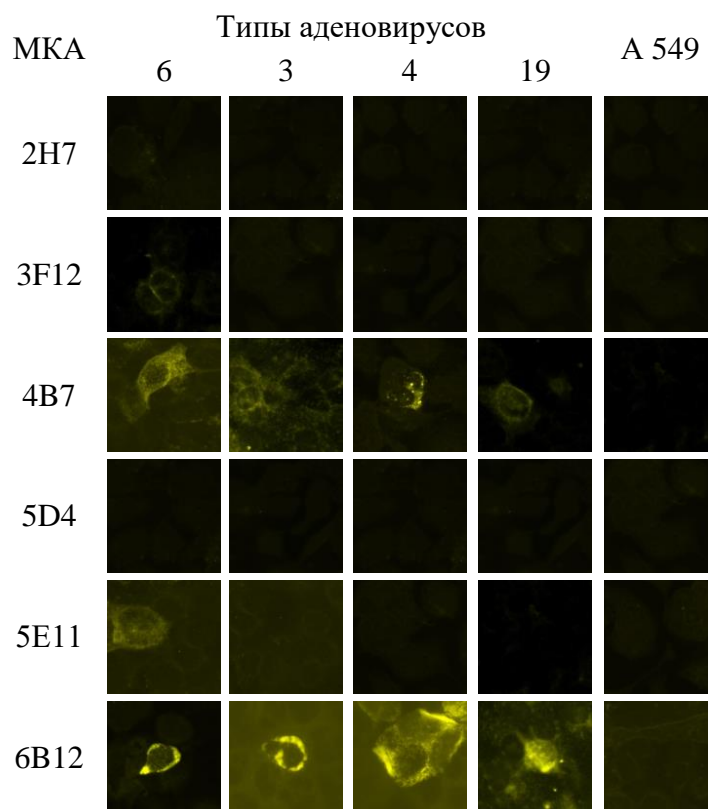


Рисунок 15 - Специфическое свечение в культуре клеток А 549, зараженной аденовирусами разных типов, при исследовании методом непрямой иммуофлуоресценции с использованием разработанных моноклональных антител.

Примечание - В качестве отрицательного контроля использована незараженная клеточная культура А 549. Клеточные культуры фиксировали через 48 ч после заражения. Моноклональные антитела использованы в концентрации 10 мкг/мл. Окрашено ФИТЦ, ув. х40.

По результатам проведенного исследования установлено:

1. МКА 2Н7 и МКА 5D4 не обладали активностью в непрямом ИФЛ.
2. МКА 5E11 и МКА 3F12 обладали слабовыраженной активностью в отношении клеток, инфицированных только аденовирусом 6 типа.
3. МКА 4B7 обладали слабо выраженной активностью при исследовании клеток, инфицированных аденовирусами 3 и 19 типов. При исследовании клеток, инфицированных аденовирусами 4 и 6 типов, наблюдалась флуоресценция умеренной яркости.
4. МКА 6B12 выявляли аденовирусы 3, 4, 6 и 19 типов в инфицированных клетках, при этом интенсивность флуоресценции была значительно выше, чем при использовании остальных МКА.

МКА 2Н7, 5D4, 5E11, 3F12, 4B7 не подходят для выявления аденовирусов в инфицированных клетках методом флуоресцирующих антител. Для определения возможности использования МКА 6B12 в прямом ИФЛ была проведена конъюгация МКА 6B12 с ФИТЦ.

3.2.6. Изучение свойств конъюгата моноклональных антител 6B12 с флуоресцеин изотиоцианатом

Свойства полученного конъюгата МКА 6B12-ФИТЦ исследовали в прямом ИФЛ с использованием клеточной культуры А 549, зараженной аденовирусами 6, 3, 4 и 19 типов (Рисунок 16).

МКА 6B12 выдержали процедуру конъюгации с ФИТЦ, сохранив специфическую активность в отношении аденовирусов различных типов. Неспецифическое взаимодействие с контрольной клеточной культурой полностью отсутствовало.

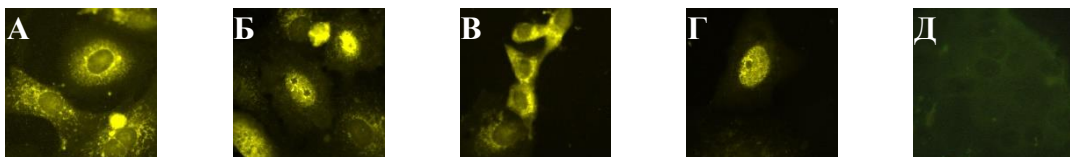


Рисунок 16 - Специфическое свечение в культуре клеток А 549, зараженной аденовирусами разных типов, при исследовании методом иммунофлуоресценции с использованием конъюгата моноклональных антител 6В12 с флуоресцеин изотиоцианатом.

Примечание - Примечание – А, Б, В, Г – клеточная культура А 549, зараженная аденовирусами 6, 3, 4, 19 типов, соответственно, Д – незараженная клеточная культура А 549. Клеточные культуры фиксировали через 48 ч после заражения. Конъюгат МКА 6В12-ФИТЦ использован в разведении 1:8, ув. х40.

Наиболее яркая гранулярная флуоресценция при окрашивании конъюгатом МКА 6В12-ФИТЦ наблюдалась в клетках, зараженных аденовирусом 6 типа, в отношении аденовирусов 3, 4 и 19 типов интенсивность флуоресценции была умеренной.

В дальнейшем конъюгат МКА 6В12-ФИТЦ был использован для выявления аденовирусов в клеточной культуре А 549, зараженной клиническими образцами.

3.3. Изучение генетического разнообразия аденовирусов, циркулирующих на территории Северо-Западного региона России

3.3.1. Отбор клинических образцов для исследования

Для изучения диагностических свойств разработанных МКА в отношении современных штаммов аденовирусов проведено исследование 991 клинического образца методом ПЦР в реальном времени с целью выявления в них респираторных вирусов.

По результатам ПЦР в реальном времени в 424 образцах был обнаружен генетический материал респираторных вирусов в виде моно- и микст-инфекций. Вирус гриппа А выявили в 205 образцах, вирус гриппа В - в 128 образцах, аденовирус - в 326, риновирус - в 115, РСВ - в 56, вирус парагриппа 3 типа - в 6, метапневмовирус - в 3, бокавирус - в 2, коронавирусы - в 2 образцах (рисунок 17). В остальных 567 образцах генетический материал возбудителей ОРВИ не обнаружен.

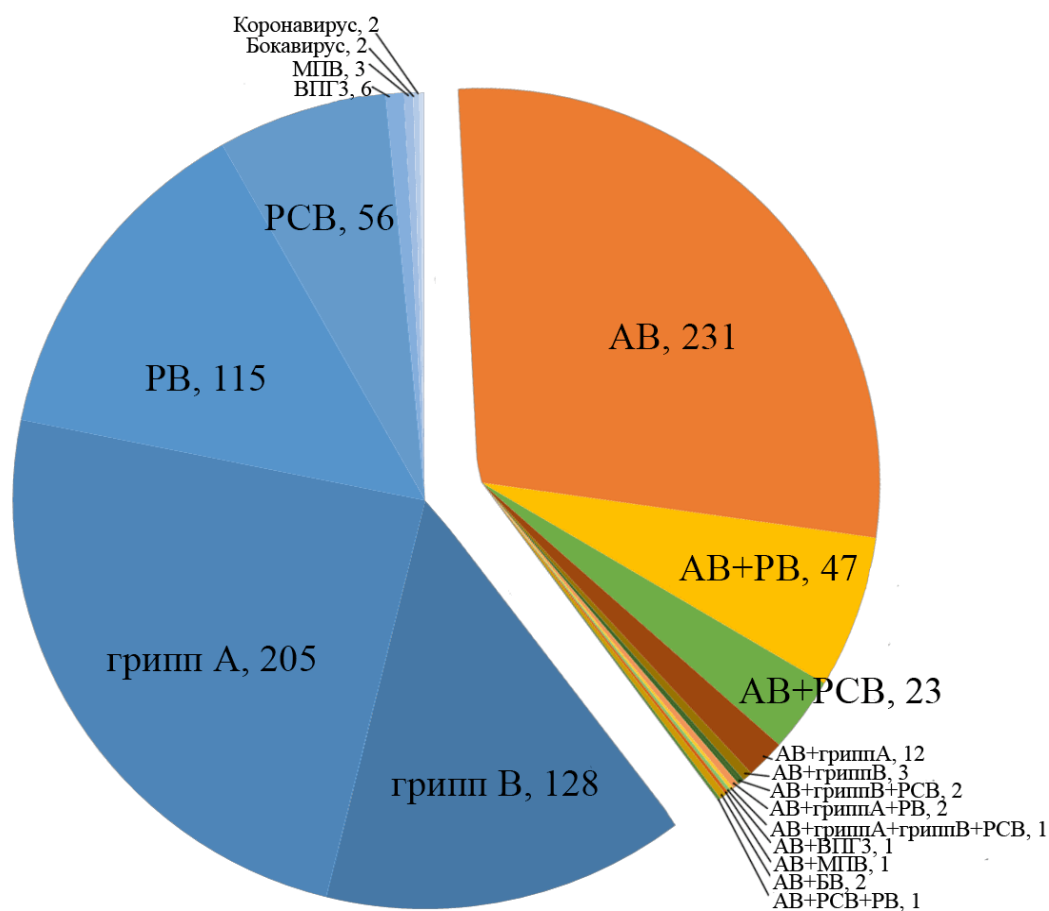


Рисунок 17 - Результаты выявления возбудителей острых респираторных вирусных инфекций в клинических образцах методом полимеразной цепной реакции.

Примечание – АВ – аденовирус, RV – риновирус, РСВ – респираторно-синтициальный вирус, ВПГ3 - вирус парагриппа типа 3, МПВ - метапневмовирус, БВ – бокавирус.

Из 326 образцов, положительных по данным ПЦР на наличие аденовируса, 95 (29,1%) так же содержали генетический материал других респираторных вирусов (рисунок 18).

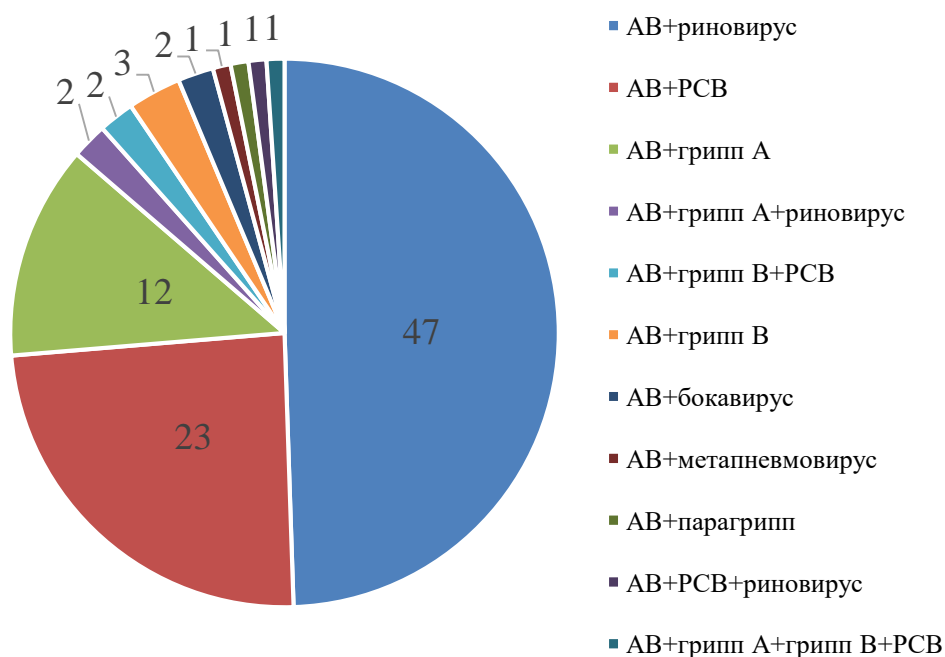


Рисунок 18 - Частота выявления возбудителей острых респираторных вирусных инфекций методом полимеразной цепной реакции в образцах, содержащих аденовирус.

Примечание: АВ – аденовирус, РСВ – респираторно-синцитиальный вирус, ВПГЗ – вирус парагриппа 3 типа.

Наиболее частым вариантом микст-инфекции было сочетание аденовируса с риновирусом ($n = 47$) и РСВ ($n = 23$). В 15 образцах аденовирус обнаружен в сочетании с вирусом гриппа А, в том числе в 2 случаях также обнаружен риновирус, в одном случае – вирус гриппа В и РСВ, в 4 случаях - с вирусом гриппа В, в том числе в одном случае с РСВ, с бокавирусом – в 2 образцах, с вирусом парагриппа 3 типа и метапневмовирусом – по одному образцу соответственно. В одном образце аденовирус обнаружен в сочетании с РСВ и риновирусом.

При исследовании 9 образцов, полученных от больных пневмонией, в 4 образцах обнаружен генетический материал только аденовируса; один образец содержал генетический материал аденовируса и риновируса; в 3 образцах обнаружен только риновирус; в одном образце возбудители ОРВИ не обнаружены.

При исследовании ПЦР клинических образцов, содержащих генетический материал аденовируса и других респираторных вирусов, аденовирус выявляли на

6-30 циклах амплификации, в то время как для выявления гетерологичных вирусов циклы амплификации составили 16-34, что может свидетельствовать о ведущей роли аденовирусов в возникшей патологии.

Для определения типов аденовирусов, вызывавших подъёмы заболеваемости среди военнослужащих в 2014-2017 гг., из общего количества положительных на содержание аденовируса образцов был отобран 31 (10 образцов, полученных в 2014-2015 г., 15 образцов 2015-2016 гг. и 6 образцов 2016-2017 гг.). По результатам ПЦР в реальном времени, во всех этих образцах аденовирус присутствовал как единственный возбудитель ОРВИ, генетический материал аденовируса был выявлен на низких циклах амплификации (до 10).

3.3.2. Определение типов аденовирусов из клинических образцов

Для типирования аденовирусов методом секвенирования по Сенжеру выбрали ген, кодирующий фибриллу. Выбор этого гена в качестве мишени для типирования аденовирусов определялся тем, что именно фибрилла отвечает за прикрепление аденовируса к клетке, то есть определяет тропизм конкретного вируса и, следовательно, определяет спектр возможных осложнений возникшего заболевания.

Филогенетический анализ секвенированных последовательностей проводили в сравнении с нуклеотидными последовательностями референс-штаммов аденовирусов различных типов, депонированными в базе данных GenBank. Секвенированные нуклеотидные последовательности приведены в приложении Б. В результате исследования установлено, что:

- 10 аденовирусов из клинических образцов, полученных в 2014 г., относятся к 4 типу (группа E).
- 14 аденовирусов из клинических образцов, полученных в 2015 - 2016 гг., относятся к типу 4 (группа E), один аденовирус относится к типу 7 (группа B).
- 6 аденовирусов из клинических образцов, полученных в 2016 – 2017 гг., относятся к типу 4 (группе E).

Филогенетическое дерево аденовирусов из клинических образцов приведено на рисунке 19.

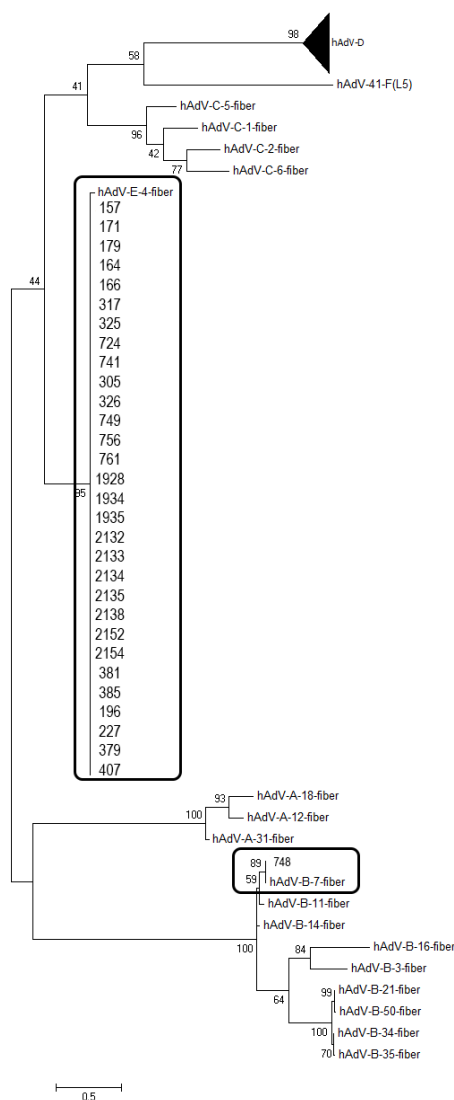


Рисунок 19 - Филогенетическое дерево аденовирусов, выделенных из клинических материалов, полученных в 2014-2017 гг.

Примечание - Секвенированные последовательности и соответствующие референс-последовательности аденовирусов из базы данных GenBank выделены рамкой.

Полученные результаты совпадают с литературными данными о типах аденовирусов, циркулирующих по всему миру. Рядом авторов отмечается связь тяжести течения аденовирусной инфекции с типом аденовируса, вызвавшим заболевание, в частности, отмечается ведущая роль аденовирусов 7 типа в развитии тяжелой аденовирусной инфекции с поражением нижних дыхательных путей.

3.4. Изучение диагностических свойств моноклональных антител в отношении современных штаммов аденовирусов

Клинические образцы, положительные на наличие аденовируса по данным ПЦР в реальном времени, исследовали методами мкИФА, сэндвич-ИФА и ИФЛ с использованием МКА 4В7 и МКА 6В12.

3.4.1. Выявление аденовирусов методом микрокультурального иммуноферментного анализа в клеточных культурах, зараженных клиническими образцами

Клеточную культуру А 549 заражали клиническими образцами (n=30). По данным ПЦР в реальном времени аденовирусы присутствовал в 27 образцах, при этом в 2 образцах помимо аденовируса так же присутствовали РСВ и риновирус. В качестве отрицательного контроля использовали 3 клинических образца: один образец содержал вирус гриппа А, один – РСВ, один образец был отрицательным на наличие возбудителей ОРВИ по результатам ПЦР.

Для выявления аденовирусного антигена методом мкИФА использовали МКА 4В7-ПХ (выбран в п. 3.2.2. раздела собственных исследований), в качестве препарата сравнения использован пероксидазный конъюгат МКА #6-ПХ.

Для материалов, оказавшихся отрицательными по результатам мкИФА на первом пассаже, было проведено до 4 последовательных «слепых» пассажа на клеточной культуре А 549. После каждого пассажа учет репродукции аденовирусов в клеточной культуре проводили методом мкИФА.

При использовании МКА #6-ПХ из 27 клинических образцов, положительных на наличие аденовируса по данным ПЦР, удалось выявить аденовирусы в 14. Исследование этих же материалов с использованием МКА 4В7-ПХ позволило выявить аденовирусы в 18 клинических образцах (таблица 8).

Таблица 8 - Показатели чувствительности и специфичности выявления аденовирусов в клинических материалах методом микрокультурального иммуноферментного анализа с применением пероксидазных конъюгатов моноклональных антител 4В7 и #6 в сравнении с методом полимеразной цепной реакции

мКИФА с использованием пероксидазных конъюгатов		ПЦР		Чувствительность	Специфичность
		+	-		
4В7-ПХ	+	18	0	67%	100%
	-	9	3		
#6-ПХ	+	14	0	52%	100%
	-	13	3		

Полученные результаты свидетельствуют о наибольшей чувствительности мКИФА с применением МКА 4В7-ПХ по сравнению с МКА #6-ПХ при выявлении аденовирусов в клеточных культурах, инфицированных клиническими образцами. Дальнейшие исследования проводили с использованием МКА 4В7-ПХ.

Для определения возможности использования мКИФА с применением МКА 4В7-ПХ в качестве альтернативы традиционному методу выделения аденовирусов в культуре клеток исследовали клеточную культуру А 549, зараженную 63 клиническими образцами. В качестве отрицательного контроля использованы 3 клинических образца: один образец содержал вирус гриппа А, один – РСВ, один образец был отрицательными на наличие возбудителей ОРВИ по результатам ПЦР. Было проведено 4 последовательных пассажа исследуемых образцов в клеточной культуре А 549. Репродукцию аденовирусов в культуре клеток учитывали как визуально (по наличию или отсутствию характерного ЦПД), как это делается при проведении традиционного метода выделения вирусов в культуре клеток, так и полуколичественно методом мКИФА с использованием МКА 4В7-ПХ (таблица 9).

Таблица 9 - Показатели чувствительности и специфичности выявления аденовирусов в клинических образцах методами микрокультурального иммуноферментного анализа и выделения вирусов в культуре клеток в сравнении с полимеразной цепной реакцией

Метод		ПЦР		Чувствительность	Специфичность
		+	-		
мКИФА	+	61	0	96%	100%
	-	2	3		
Метод выделения вирусов в культуре клеток	+	47	0	74%	100%
	-	16	3		

Методом мКИФА аденовирусы выявлены в 61 из исследованных образцов, тогда как по результатам метода выделения вирусов в культуре клеток положительными были признаны только 47 образцов. В сравнении с данными ПЦР чувствительность мКИФА значительно превышала чувствительность классического метода выделения вирусов в культуре клеток и составила 96% и 74%, соответственно, при 100% специфичности обоих методов.

Исследование образцов методом мКИФА с применением МКА 4В7-ПХ позволило получить результаты уже в течение первых 3 суток с момента заражения клеточной культуры, использовать микроколичества исследуемого материала, проводить одновременно большое количество исследований, результаты анализа учитывали полуколичественно и, следовательно, носили объективный характер. Использование мКИФА позволило сократить сроки выделения этиологического агента в клеточной культуре, при этом были выявлены и аденовирусы, не вызывающие характерного ЦПД в клетках.

Кроме качественного выявления аденовирусов в зараженных клеточных культурах, методом мКИФА с использованием МКА 4В7-ПХ определена инфекционная активность выделенных аденовирусов. Так, по результатам мКИФА на первом-втором пассаже были выделены аденовирусы с инфекционной активностью, достигающей 6-7 lg ТИД₅₀/мл. Аденовирусы, выделенные на 3-4 пассажах,

обладали значительно более низкой инфекционной активностью – до 2 Ig ТИД₅₀/мл.

3.4.2. Выявление аденовирусов в клинических образцах методом сэндвич-иммуноферментного анализа

Методом сэндвич-ИФА исследованы те же клинические образцы, которые были исследованы методом мКИФА (п.3.4.1 раздела собственных исследований). Исследовали как исходные образцы, так и ВКЖ, полученную после пассирования (4 пассажа) образцов в культуре клеток А 549. На стадии захвата антигена использовали МКА 4В7, на стадии детекции – МКА 4В7-ПХ (в соответствии с выводами, сделанными в п. 3.2.4 раздела собственных исследований) (таблица 10). Результаты сэндвич-ИФА учитывали на каждом этапе пассирования клинических образцов вне зависимости от наличия или отсутствия ЦПД.

Таблица 10 - Показатели чувствительности и специфичности выявления аденовирусов в клинических образцах методом сэндвич-иммуноферментного анализа в сравнении с полимеразной цепной реакцией

Метод		ПЦР		Чувствительность	Специфичность
		+	-		
Сэндвич-ИФА	+	54	0	86%	100%
	-	9	3		

По результатам сэндвич-ИФА аденовирусы выявлены в 54 исследованных образцах - в 35 исходных клинических образцах и в 19 образцах ВКЖ. Использование комбинации МКА 4В7 на стадии захвата и МКА 4В7-ПХ на стадии детекции позволило выявить аденовирусы в клинических образцах методом сэндвич-ИФА. Чувствительность метода составила 86% при 100% специфичности.

3.4.3. Выявление аденовирусов в клеточной культуре, зараженной клиническими образцами, методом иммунофлуоресценции

Для исследования методом ИФЛ использовали 45 клинических образцов, положительных на наличие аденовирусов в мКИФА на первом пассаже, и 3 образца отрицательных по данным ПЦР. Клеточную культуру А 549, зараженную клиническими образцами, фиксировали через 48 ч и исследовали в прямом ИФЛ с использованием конъюгата МКА 6В12-ФИТЦ (рисунок 20). В качестве препарата сравнения использовали конъюгат МКА #6-ФИТЦ.

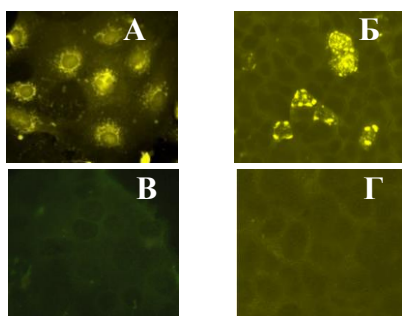


Рисунок 20 - Специфическое свечение в культуре клеток А 549, зараженной клиническими образцами, окрашенной с использованием конъюгатов моноклональных антител 6В12 и #6 с флуоресцеин изотиоцианатом.

Примечание – А, Б –клеточная культура А 549, зараженная клиническим образцом №741, содержащим аденовирус по данным ПЦР, В, Г – клеточная культура А 549, зараженная клиническим образцом №740, не содержащим аденовирус по данным ПЦР. А, В окрашены МКА #6-ФИТЦ, Б, Г окрашены МКА 6В12-ФИТЦ Ув. х40.

При исследовании незараженных клеточных культур методом ИФЛ с использованием МКА 6В12-ФИТЦ и МКА #6-ФИТЦ неспецифические реакции отсутствовали. По результатам исследования положительными признаны 38 исследованных образцов (таблица 11). При этом интенсивность свечения при использовании МКА 6В12-ФИТЦ была значительно выше (на +/+++ по четырехкростовой шкале яркостей) по сравнению с МКА #6-ФИТЦ. Более яркая специфическая флуоресценция существенно облегчает интерпретацию результатов исследования и обеспечивает большую чувствительность проводимого анализа.

Таблица 11 - Показатели чувствительности и специфичности выявления аденовирусов в клеточной культуре, зараженной клиническими образцами, методом иммунофлуоресценции с использованием конъюгата моноклональных антител 6В12 с флуоресцеин изотиоцианатом

Метод		ПЦР		Чувствительность	Специфичность
		+	-		
Метод иммунофлуоресценции	+	38	0	84%	100%
	-	7	3		

Прямой вариант ИФЛ с использованием МКА 6В12-ФИТЦ позволил выявить аденовирусы в 84% исследованных образцов по сравнению с данными ПЦР, при этом интенсивность свечения при использовании МКА 6В12-ФИТЦ, была значительно выше по сравнению с ранее разработанным препаратом МКА #6-ФИТЦ.

Обсуждение результатов

Инфекционные заболевания вирусной этиологии остаются одной из важнейших проблем здравоохранения. В России ежегодно регистрируется около 50 миллионов случаев инфекционных заболеваний, до 95% из которых приходится на долю ОРВИ [1]. В неэпидемические по гриппу сезоны в качестве основных возбудителей ОРВИ выступают аденовирусы, РСВ, риновирус [3]. Обычно аденовирусы поражают верхний или нижний отделы дыхательного тракта, глотку, конъюнктиву или желудочно-кишечный тракт. Вспышки аденовирусной инфекции могут возникать на протяжении всего года не только среди лиц с ослабленным иммунитетом, но и среди здоровых детей или взрослых в закрытых коллективах (в частности, военнослужащих), а также в домах престарелых, специализированных медицинских учреждениях и летних лагерях. Доля аденовирусной инфекции среди детей и молодых людей призывного возраста в общей структуре ОРВИ может достигать 30% и 64,6% соответственно [99,105]. В очагах таких вспышек наблюдается увеличение частоты пневмоний, в том числе тяжелого течения с фатальными последствиями у пациентов без нарушения иммунитета [174]. К настоящему моменту известно о существовании более 80 типов аденовирусов человека. Антигенное разнообразие циркулирующих среди людей аденовирусов определяет многообразие клинических форм аденовирусной инфекции, затрудняет клиническую диагностику, вызывает необходимость проведения дорогостоящих лабораторных исследований [175]. Эффективная идентификация патогена необходима, чтобы предотвратить распространение инфекции, своевременно назначить соответствующую терапию, что в конечном итоге должно привести к полному выздоровлению.

В настоящее время для дифференциальной диагностики аденовирусной инфекции в России широко применяются ИФА и ИФЛ с применением поликлональных специфических сывороток. Основным недостатком этого типа иммунореагентов является нестабильность их антительного состава, зависящая от особенностей

иммунного ответа продуцента, получение новой серии иммунной сыворотки требует приготовления высокоочищенного антигена, проведения полного цикла иммунизации и контроля сыворотки. Чувствительность методов этиологической диагностики аденовирусной инфекции оказывается недостаточной и составляет для ИФЛ 44,6%, для ИФА 48,7% относительно результатов ПЦР [10]. Актуальной является задача разработки МКА, высокоспецифичных к белкам патогенных для человека аденовирусов, включение которых в тест-системы нового поколения позволит повысить качество и доступность лабораторной диагностики аденовирусной инфекции.

Одним из ключевых моментов при создании МКА является выбор иммуногена. Для получения МКА, специфичных к аденовирусам различных типов, необходимо использовать высокоочищенный белок, обладающий сходной антигенной структурой для всего обширного рода *Mastadenovirus*. Гексон составляет около 60% массы вирионов аденовирусов и несет в своем составе обширный консервативный участок с родоспецифическими детерминантами, вариабельность аминокислотного состава этого участка составляет менее 15% [63,64]. В инфицированных клетках гексон синтезируется в избытке: только 20-30% белка используется для сборки вирусных частиц, что позволит эффективно выявлять его в инфицированных клетках. В коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России депонирована одна гибридома-продуцент МКА #6 к гексонному антигену аденовирусов [166]. Однако, для разработки нового семейства высокочувствительных диагностических тест-систем на основе МКА необходимо расширение коллекции гибридом. Вторым принципиальным моментом является выбор животного-продуцента [176]. Гибридома #6 получена с использованием мышей линии SJL/J. Основную сложность при работе с мышами этой линии представляет необходимость проведения облучения животных для подавления иммунной системы и эффективного накопления МКА. В настоящей работе для получения МКА к гексону аденовируса использованы мыши линии Balb/c, не требующие проведения предварительного облучения, что существенно упрощает и удешевляет процесс получения МКА.

Биохимическим методом выделен очищенный гексон, аминокислотная последовательность которого определена методом масс-спектрометрического анализа. При сравнении исследуемой аминокислотной последовательности с последовательностями, депонированными в международной базе NCBI GenBank, подтверждено, что полученный белок является полным гексоном аденовируса 6 типа.

С использованием подходов гибридной технологии были получены 11 гибридом-продуцентов МКА к аденовирусам человека. Первичный скрининг МКА, содержащихся в культуральной жидкости разработанных гибридом, проведен методом микрокультурального ИФА с использованием клеточной культуры, зараженных аденовирусами 3, 4, 6 и 19 типов. По результатам первичного скрининга 9 из 11 разработанных МКА обладали способностью выявления аденовирусов, эти МКА продемонстрировали отсутствие неспецифических взаимодействий с антигенами клеток хозяина и гетерологичным РСВ. Три МКА (2С3, 4G10, 6G10) обладали специфической активностью только в отношении аденовируса 6 типа, гексон которого был использован в качестве иммуногена, эти МКА могут быть использованы для типирования выделенных в лабораториях аденовирусов. Шесть МКА (2Н7, 3F12, 4В7, 5D4, 5E11, 6В12) выявляли аденовирусы 3, 4, 6 и 19 типов. В результате исследования методом вестерн-блоттинга установлено, что все 9 разработанных МКА направлены к гексону аденовируса 6 типа. По результатам первичного скрининга дальнейшие исследования проводили в отношении шести МКА 2Н7, 3F12, 4В7, 5D4, 5E11, 6В12, специфически взаимодействующих с аденовирусами различных типов.

При изучении свойств разработанных МКА методом ИФА показано, что все МКА обладали специфической активностью в отношении очищенного аденовируса 6 типа, при этом титр МКА 4В7 и 6В12 был максимальным и составил 10^{-6} . При исследовании методом ИФЛ так же все МКА позволяли выявлять аденовирусы 3, 4, 6 и 19 типов, при этом интенсивность флуоресценции при использовании МКА 6В12 была значительно выше, чем при использовании остальных МКА.

На основании полученных данных МКА 4В7 и 6В12 были конъюгированы с пероксидазой хрена и биотином, МКА 6В12 также конъюгировали с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ). МКА выдерживали процедуру конъюгации, сохранив специфическую активность в ИФА и ИФЛ. Исследована специфическая активность полученных пероксидазных конъюгатов в ИФА с очищенным аденовирусом 6 типа. Наибольшую чувствительность ИФА обеспечивало применение пероксидазного конъюгата МКА 4В7, позволяя выявлять аденовирусный антиген до концентрации 3,6 нг/мл, что определило выбор пероксидазного конъюгата МКА 4В7 при исследовании клинических образцов методом микрокультурального ИФА.

При исследовании методом ИФЛ с использованием конъюгата МКА 6В12 с ФИТЦ клеточных культур, зараженных аденовирусами 3, 4, 6 и 19 типов, во всех культурах наблюдали отчетливую специфическую флуоресценцию. В дальнейшем конъюгат МКА 6В12-ФИТЦ был также использован для выявления аденовирусного антигена в клеточных культурах, зараженных клиническими образцами.

Исследование различных сочетаний МКА 4В7 и МКА 6В12 на стадии захвата и их конъюгатов с пероксидазой хрена и биотином на стадии детекции аденовирусного антигена методом сэндвич-ИФА показало, что использование МКА 4В7 на стадии захвата антигена и пероксидазного конъюгата МКА 4В7 на стадии детекции позволяет выявлять аденовирусный антиген до концентрации 15 нг/мл, что значительно превышает минимальную выявляемую концентрацию с использованием, например, МКА #6 в сэндвич-ИФА, которая составляет 20 нг/мл [166]. Сопоставимые результаты получены при использовании МКА 4В7 либо МКА 6В12 на стадии захвата антигена и конъюгата МКА 4В7 с биотином на стадии детекции. На основании полученных результатов МКА 4В7 и МКА 6В12-ПХ включены в состав белкового биочипа, в основе технологии которого также лежит принцип сэндвич-ИФА. Технология биочипов уже зарекомендовала себя как высокоэффективный диагностический метод, позволяющий минимизировать объем реагентов и образцов и одновременно детектировать сотни белков: антигены ви-

вирусов, бактерий, а также маркеры крови больного [177]. Чувствительность современных белковых микрочипов на два порядка выше в сравнении с аналогичными показателями ИФЛ и ИФА [17]. Разработка отечественного многопараметрического диагностического комплекса, объединяющего в себе чипы для выявления вирусов, бактерий, белковых маркеров системной воспалительной реакции организма-хозяина позволит не только проводить одномоментный высокочувствительный мультиплексный анализ респираторных вирусных инфекций, но и прогнозировать развитие возможных осложнений, а также снизит затраты на приобретение оборудования и расходных материалов по сравнению с зарубежными производителями и обеспечит доступность быстрых и эффективных средств диагностики для системы здравоохранения России.

Для дальнейшей оценки диагностических свойств разработанных МКА в отношении современных штаммов аденовирусов проведено молекулярно-генетическое типирование аденовирусов, выделенных из клинических образцов. Методом ПЦР в реальном времени на наличие нуклеиновых кислот респираторных вирусов исследован 991 клинический образец (назофарингеальный мазок) от пациентов, госпитализированных с симптомами ОРЗ в военно-медицинские организации МО РФ в 2014 - 2017 гг. У госпитализированных военнослужащих наблюдалось повышение температуры тела, недомогание и интоксикация, ринит, фарингит, тонзиллит, конъюнктивит, катаральные явления, такие как гиперемия зева, кашель, заложенность носа и выделения из него (от слизистых до слизистогнойных), а также по данным клинического анализа крови - ускорение СОЭ, лейкоцитоз, лимфопения. Преобладала респираторная форма заболевания средней тяжести, в 9 случаях диагностирована пневмония. Аденовирусы были выявлены в 326 (32,9%) образцах, из них как единственный этиологический агент в 231 (70,9%) случае и в сочетании с другими респираторными вирусами - в 95 (29,1%) образцах. Этиологическим агентом в 5 случаях диагностированной пневмонии также явились аденовирусы. Секвенирование гена, кодирующего фибриллу, 31 аденовируса из клинических образцов показало принадлежность большинства (30 из исследован-

ных аденовирусов) к 4 типу и одного аденовируса к 7 типу. Эти результаты совпадают с литературными данными о типах аденовирусов, выявляемых в разных частях земного шара [83,99,105,178,179]. При этом рядом авторов отмечается связь тяжести течения аденовирусной инфекции с типом аденовируса, вызвавшим заболевание. В частности, отмечается ведущая роль аденовирусов 7 и 14 типов в развитии тяжелой аденовирусной инфекции с поражением нижних дыхательных путей, в том числе с летальным исходом [91,102,104,180–182]. Следует отметить, что систематическое типирование аденовирусов, циркулирующих на территории России, в настоящее время не проводится. Работы, посвященные изучению этой проблемы, ведутся отдельными исследователями в отношении ограниченного круга возрастных или социальных групп населения, кроме того эти исследования носят краткосрочный характер. Так, по данным [99], в период с 2010 по 2014 г. среди населения в г. Москве циркулировали аденовирусы 1, 2, 3, 4, 6 и 7 типов. По данным [183] среди военнослужащих в 1997-2011 гг циркулировали аденовирусы 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 21 типов. Типирование выделенных штаммов аденовирусов в этих исследованиях проводили в реакции нейтрализации с поликлональными типоспецифическими кроличьими сыворотками к аденовирусам 1-7 и 21 типов либо методом секвенирования гипервариабельных областей гексона аденовирусов [10,99]. В настоящем исследовании для типирования аденовирусов из клинических образцов использовано секвенирование гена, кодирующего фибриллу, так как фибрилла является рецепторным белком аденовируса, то есть определяет тропизм конкретного вируса и, следовательно, спектр возможных осложнений возникшего заболевания.

Клинические образцы, содержащие аденовирусы по данным молекулярно-генетического анализа, были исследованы методом мКИФА с использованием МКА 4В7. Метод мКИФА с использованием специфичных МКА широко используется при идентификации респираторных вирусов в клеточных культурах, зараженных клиническими материалами от больных ОРВИ как в России, так и за рубежом [184–186]. В частности, мКИФА с использованием специфических МКА к NP вирусов гриппа рекомендован ВОЗ как тест серологической диагностики

гриппа, в том числе для обнаружения штаммов вируса со слабой гемагглютинирующей активностью [187,188]. По литературным данным чувствительность мКИФА при выявлении возбудителей ОРВИ варьирует в пределах 78-94% для различных респираторных вирусов, что значительно превосходит показатели чувствительности традиционного метода выделения вирусов в клеточных культурах [185].

В наших исследованиях при сравнительном анализе первичных результатов мКИФА на 30 клинических образцах с использованием пероксидазных конъюгатов МКА 4В7 и МКА #6 показатели чувствительности составили 74% и 52%, соответственно, в сравнении с данными ПЦР. Дальнейшие исследования клинических образцов в мКИФА провели с использованием пероксидазного конъюгата МКА 4В7. При этом показатели чувствительности и специфичности мКИФА достигали 96% и 100%, соответственно, в сравнении с ПЦР, что значительно превосходит аналогичные показатели традиционного метода выделения аденовирусов в клеточных культурах, с использованием которого выделить аденовирусы удается примерно в половине случаев относительно данных ПЦР [10]. Использование мКИФА с применением разработанных МКА 4В7 позволяет не только сократить сроки выделения этиологического агента в клеточной культуре, но и выявить аденовирусы, не вызывающие характерного ЦПД в клетках. Также метод мКИФА может быть использован в качестве скринингового теста, позволяющего определить целесообразность дальнейшего проведения традиционного выделения аденовируса из конкретного клинического образца.

Возможность проведения вирусологических исследований с использованием клеточных культур имеют только специализированные лаборатории. Для детекции респираторных вирусов в клинических образцах широко используют сэндвич-ИФА [16,25,189,190]. При исследовании 63 клинических образцов методом сэндвич-ИФА с использованием МКА 4В7 на стадии захвата антигена и конъюгата МКА 4В7-ПХ на стадии детекции чувствительность метода составила 86%, специфичность - 100% относительно ПЦР. Чувствительность метода с использо-

ванием МКА 4В7 при выявлении аденовирусного антигена оказалась сопоставимой, а специфичность существенно выше, чем у ранее разработанной тест-системы «Аденовир», использующей в своем составе МКА #6 [166]. Необходимо отметить, что на российском рынке в настоящее время отсутствуют коммерческие тест-системы для выявления респираторных аденовирусов методом сэндвич-ИФА. Разработанные МКА 4В7 могут быть использованы для создания подобных тест-систем.

Еще одним направлением использования МКА при диагностике ОРВИ является исследование методом ИФЛ как назофарингеальных мазков, так и клеточных культур, зараженных клиническими образцами от больных [191–194]. В зарубежных исследовательских лабораториях широко используют модифицированный ИФЛ, так называемый «shell vial culture», позволяющий детектировать репродукцию вирусов в клеточных культурах уже через 16 часов после внесения исследуемого материала [195]. Сокращение времени проведения и повышение чувствительности анализа при этом достигаются как за счет проведения предварительного центрифугирования клеточных культур с внесенными клиническими материалами [196], так и за счет использования специфичных МКА [197,198].

При исследовании клеточных культур, зараженных клиническими материалами, методом ИФЛ с использованием МКА 6В12 и МКА #6, конъюгированных с ФИТЦ, показатели чувствительности ИФЛ составили 84% и 80%, соответственно, в сравнении с ПЦР. Интенсивность свечения при использовании МКА 6В12, конъюгированных с ФИТЦ, была значительно выше (на +/++) по сравнению с ранее разработанным конъюгатом МКА #6 с ФИТЦ. Полученные результаты сопоставимы с показателями чувствительности зарубежных тест-систем для иммунофлуоресцентной диагностики ОРВИ, приближающимся к 90% [166] и значительно превосходит показатель чувствительности ИФЛ с использованием поликлональных иммунореагентов, широко используемых в России, и составляющим 44,6% [10]. Конъюгат МКА 6В12 с ФИТЦ рекомендован для внедрения в производство отечественного препарата «Иммуноглобулин диагностический флуоресцирую-

щий аденовирусный антигексоновый» взамен используемых гипериммунных поликлональных сывороток, что позволит облегчить работу исследователей при интерпретации результатов дифференциальной диагностики аденовирусной инфекции от других ОРВИ.

Анализ результатов проведенных исследований наглядно доказывает, что МКА 4В7 и МКА 6В12 являются перспективными инструментами для создания новых быстрых и эффективных средств диагностики аденовирусной инфекции, что чрезвычайно важно для практической медицины.

Заключение

В ходе выполнения работы проведено выделение очищенного гексона аденовируса 6 типа (штамм Tonsill-99) из ВКЖ. Аминокислотная последовательность выделенного белка подтверждена методом масс-спектрометрического анализа. В результате иммунизации мышей очищенным гексоном получено 9 стабильных гибридом-продуцентов МКА. Методом иммуноблоттинга определена направленность всех разработанных МКА к гексону. По результатам исследования иммунохимических свойств МКА в непрямом ИФА и ИФЛ для дальнейших исследований отобраны МКА 4В7 и МКА 6В12, обладающие наибольшей активностью в отношении аденовирусов 3, 4, 6 и 19 типов. Получены конъюгаты МКА 4В7 и МКА 6В12 с пероксидазой хрена, ФИТЦ, биотином. В опытах с очищенным аденовирусом 6 типа в прямом ИФА показано, что МКА 4В7-ПХ позволяет выявлять аденовирусный антиген до концентрации 3,6 нг/мл.

Определена оптимальная комбинация МКА для сэндвич-ИФА - МКА 4В7 на стадии захвата и МКА 4В7-ПХ на стадии детекции, позволяющая выявлять до 15 нг/мл очищенного аденовируса 6 типа.

Наибольшая чувствительность сэндвич-ИФА при использовании конъюгатов МКА с биотином достигается при комбинации МКА 4В7 либо МКА 6В12 на стадии захвата и конъюгата МКА 4В7 с биотином на стадии детекции. Комбинация МКА 6В12 и конъюгат МКА 4В7 с биотином включены в состав мультиплексного микрофлюидного биочипа многопараметрического диагностического комплекса ТОРИ-ТЕСТ.

Для оценки диагностического потенциала МКА 4В7 и МКА 6В12 в отношении современных штаммов аденовирусов, проведен отбор клинических образцов методом ПЦР в реальном времени. Аденовирусы из 31 клинического образца типировали методом секвенирования по Сенжеру гена, кодирующего фибриллу. Показано, что аденовирусы 4 и 7 типов являются основными этиологическими агентами, вызывающими респираторные заболевания негриппозной этиологии среди военнослужащих в Северо-Западном регионе России.

Клинические образцы исследовали с использованием МКА 4В7 и МКА 6В12 и их конъюгатов с пероксидазой хрена и ФИТЦ в различных иммунологических и вирусологических реакциях – мКИФА, сэндвич-ИФА, ИФЛ. Чувствительность методов по сравнению с данными ПЦР составила: 96% для мКИФА, 86% для сэндвич-ИФА, 84% для ИФЛ.

Таким образом, разработанные МКА 4В7 и МКА 6В12 являются перспективными иммунореагентами для конструирования различных диагностических тестов и их дальнейшего использования в лабораторной практике при выявлении аденовирусов различных типов.

Перспективы дальнейшей разработки темы и рекомендации

1. Разработанные МКА 4В7 и МКА 6В12 включены в состав многопараметрического диагностического комплекса ТОРИ-ТЕСТ для детекции и прогноза тяжести течения острых респираторных инфекций (проект поддержан Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2019-1241 от 10.06.2019 г. (ранее № 14.604.21.0180 от 26.09.2017 г.).

2. Разработанные МКА 6В12 рекомендованы для внедрения в производство отечественного препарата «Иммуноглобулин диагностический флуоресцирующий аденовирусный антигексоновый» взамен используемых в настоящее время гипериммунных поликлональных сывороток.

3. Сформированная в ходе выполнения исследования коллекция современных штаммов аденовирусов может быть использована как в научных исследованиях, так и в целях создания модели аденовирусной инфекции *in vitro* для скрининга и тестирования потенциальных противовирусных препаратов.

4. Внедрение в практику здравоохранения МКА 4В7 и МКА 6В12, позволяющих выявлять аденовирусы в различных реакциях, основанных на специфическом взаимодействии антиген-антитело, позволит не только проводить высокочувствительную диагностику аденовирусной инфекции, но и снизит затраты на приобретение оборудования и расходных материалов по сравнению с зарубежными производителями и обеспечит доступность быстрых и эффективных средств диагностики для системы здравоохранения Российской Федерации.

Выводы

1. Получены 9 стабильных гибридом-продуцентов МКА к гексону аденовируса 6 типа, чистота и аминокислотная последовательность которого подтверждена методом масс-спектрофотометрического анализа.
2. Методом иммуноблоттинга определена направленность разработанных МКА к гексону аденовирусов. Показана высокая специфическая активность МКА 4В7 и МКА 6В12 в различных иммунологических реакциях. Получены конъюгаты МКА 4В7 и МКА 6В12 с пероксидазой хрена, ФИТЦ, биотином. Определены оптимальные комбинации и концентрации МКА 4В7 и МКА 6В12 и их конъюгатов для выявления аденовирусного антигена в сэндвич-ИФА. МКА 4В7 и МКА 6В12 включены в состав мультиплексного микрофлюидного биочипа многопараметрического диагностического комплекса ТОРИ-ТЕСТ.
3. Молекулярно-генетическое типирование аденовирусов методом секвенирования гена фибриллы показало, что аденовирусы 4 и 7 типов являются основными представителями рода Mastadenovirus, вызывающими респираторные заболевания негриппозной этиологии среди военнослужащих в Северо-Западном регионе России.
4. Доказана диагностическая эффективность МКА 4В7 и МКА 6В12 при выявлении современных штаммов аденовирусов в клинических образцах в различных иммунологических и вирусологических реакциях. Чувствительность методов мКИФА составила 96%, сэндвич-ИФА - 86%, ИФЛ – 84% при выявлении аденовирусов в клинических образцах с использованием МКА 4В7 и 6В12 по сравнению с данными ПЦР.

Список сокращений и условных обозначений

- IgA - иммуноглобулины класса А
- IgG - иммуноглобулины класса G
- IgM - иммуноглобулины класса M
- ITR - инвертированные повторы
- lg – десятичный логарифм
- АВ – аденовирус
- БВ – бокавирус
- ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения
- ВПГ - вирус парагриппа
- ВКЖ - вирусосодержащая культуральная жидкость
- ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЖКТ - желудочно-кишечный тракт
- ИФА - иммуноферментный анализ
- ИФЛ - иммунофлуоресцентный анализ
- КББ - 0,01 М карбонатно-бикарбонатный буфер
- МКА - моноклональное антитело
- мКИФА - микрокультуральный иммуноферментный анализ
- МПВ - метапневмовирус
- мРНК — матричная РНК
- ОП450 - оптическая плотность, измеренная при длине волны 450 нм
- ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция
- ОРЗ – острое респираторное заболевание
- ПААГ - полиакриламидный гель
- ПХ - пероксидаза хрена
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- РВ – риновирус
- РНК - рибонуклеиновая кислота
- РСВ - респираторно-синцитиальный вирус

РСК – реакция связывания комплимента

ТИД₅₀ – доза возбудителя, инфицирующая 50% клеточной культуры

ТМБ - 3,3',5,5'-тетраметилбензидина

ТР - терминальный полипептид

ФИТЦ - флуоресцеин изотиоцианат

ФСБ - фосфатно-солевой буфер

ФСБТ - фосфатно-солевой буфер с добавлением твин-20

ФСБТж - фосфатно-солевой буфер с добавлением твин-20 и желатины

ЦПД - цитопатическое действие вируса

ЭМ - электронная микроскопия

ЭФ – электрофорез

Список литературы

1. Европейское региональное бюро ВОЗ. Руководство Европейского регионального бюро ВОЗ по дозорному эпиднадзору за гриппом среди людей [Электронный ресурс]. URL: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/90444/e92738R.pdf?ua=1 (дата обращения: 28.06.2019).
2. Системы здравоохранения и проблемы инфекционных заболеваний. Опыт Европы и Латинской Америки / под ред. Coker R., Atun R., McKee M. Европейская обсерватория по системам и политике здравоохранения, 2009. 308 с.
3. Walter J.M., Wunderink R.G. Severe Respiratory Viral Infections: New Evidence and Changing Paradigms // *Infect. Dis. Clin. North Am.* Elsevier, 2017. Vol. 31, № 3. P. 455–474.
4. Rath B. et al. Influenza and other respiratory viruses: standardizing disease severity in surveillance and clinical trials // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2017. Vol. 15, № 6. P. 545–568.
5. Bunz O. et al. Effect of cold atmospheric plasma (CAP) on human adenoviruses is adenovirus type-dependent // *PLoS One* / ed. Hamblin M.R. Public Library of Science, 2018. Vol. 13, № 10. P. e0202352.
6. Rautonen J., Koskiniemi M., Vaheri A. Prognostic factors in childhood acute encephalitis. // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1991. Vol. 10, № 6. P. 441–446.
7. Wold W., Ison M. Adenoviruses // *Fields Virology*. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013. P. 1732–1767.
8. Ison M.G. Emerging Infections: Adenovirus Infections in Transplant Recipients // *Clin. Infect. Dis.* 2006. Vol. 43, № 3. P. 331–339.
9. O’Shea M.K., Wilson D. Respiratory infections in the military // *J R Army Med Corps.* 2013. Vol. 159. P. 181–189.
10. Львов Н.И. Аденовирусная инфекция у военнослужащих: клиника, диагностика и лечение: : Автореф... дис. докт. мед. наук. СПб: ФГБВОУ ВО «ВМА им. С.М.Кирова» МО РФ, 2016. 22 с.
11. Russell K.L. et al. Vaccine-preventable adenoviral respiratory illness in US military recruits, 1999–2004 // *Vaccine.* Elsevier, 2006. Vol. 24, № 15. P. 2835–2842.
12. Sanchez J.L. et al. Respiratory Infections in the U.S. Military: Recent Experience and Control // *Clin Microbiol Rev.* 2015. Vol. 28, № 3. P. 743–800.
13. Trei J.S. et al. Spread of adenovirus to geographically dispersed military installations, May-October 2007. // *Emerg. Infect. Dis. Centers for Disease Control and Prevention*, 2010. Vol. 16, № 5. P. 769–775.
14. Ferda O.H. et al. Adenovirus infection as possible cause of acute liver failure in a healthy child: A case report // *Turk J Gastroenterol.* 2008. Vol. 19, № 4. P. 281–283.
15. Ghebremedhin B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. // *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp).* Akadémiai Kiadó, 2014. Vol. 4,

- № 1. P. 26–33.
16. Chen L. et al. Establishment of sandwich ELISA for detecting the H7 subtype influenza A virus // *J. Med. Virol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2019. Vol. 91, № 6. P. 1168–1171.
 17. Wang H. et al. Development and optimized pairing of mouse monoclonal antibodies for detecting hemagglutinin in novel H7 subtype influenza viruses // *Sci China Life Sc.* 2019. Vol. 62. P. 1–11.
 18. Malik A. et al. Generation and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific to Avian Influenza H5N1 Hemagglutinin Protein // *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* 2015. Vol. 34, № 6. P. 436–441.
 19. Guo C. et al. H1N1 influenza virus epitopes classified by monoclonal antibodies // *Exp. Ther. Med.* 2018. Vol. 16, № 3. P. 2001–2007.
 20. Yasuhara A. et al. Diversity of antigenic mutants of influenza A(H1N1)pdm09 virus escaped from human monoclonal antibodies // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 17735.
 21. Климова Р.Р. и др. Моноклональные антитела к пандемическому вирусу гриппа А/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl, обладающие высокой вируснейтрализующей активностью // *Вопросы вирусологии.* 2011. Т. 56, № 3. С. 15–20.
 22. Masalova O. V et al. Development of monoclonal antibodies to highly pathogenic avian influenza H5N1 virus and their application to diagnostics, prophylaxis, and therapy. // *Acta Virol.* 2011. Vol. 55, № 1. P. 3–14.
 23. Федорова Н.Е. и др. Получение и свойства моноклональных антител к высокопатогенному штамму вируса гриппа птиц А(Н5N1), с выделенного на территории Российской Федерации // *Вопросы вирусологии.* 2008. Т. 53, № 5. С. 9–14.
 24. Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Желтухина А.И. Моноклональные антитела к гемагглютинуину вирусов гриппа в викторианской эволюционной линии // *Вопросы вирусологии.* 2018. Т. 63, № 6. С. 275–280.
 25. González L.A. et al. Evaluation of monoclonal antibodies that detect conserved proteins from Respiratory Syncytial Virus, Metapneumovirus and Adenovirus in human samples // *J. Virol. Methods.* 2018. Vol. 254. P. 51–64.
 26. Tian X. et al. Broadly neutralizing monoclonal antibodies against human adenovirus types 55, 14p, 7, and 11 generated with recombinant type 11 fiber knob // *Emerg. Microbes Infect.* 2018. Vol. 7:206.
 27. Paulini I. et al. Development of a prototype immunochromatographic test for rapid diagnosis of respiratory adenovirus infection // *Brazilian J. Infect. Dis.* Elsevier, 2017. Vol. 21, № 5. P. 500–506.
 28. Tian X. et al. Mapping the epitope of neutralizing monoclonal antibodies against human adenovirus type 3 // *Virus Res.* 2015. Vol. 208. P. 66–72.
 29. Liu M. et al. Generation of Neutralizing Monoclonal Antibodies against a Conformational Epitope of Human Adenovirus Type 7 (HAdv-7) Incorporated in Capsid Encoded in a HAdv-3-Based Vector // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, № 7. P. 103058.

30. Qiu H. et al. Epitope mapping and cross-reactivity analysis of the monoclonal antibodies against hexon protein of human adenovirus type 3 // *Virus Res.* Elsevier, 2009. Vol. 146, № 1–2. P. 58–65.
31. Rowe W.P. et al. Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture // *Exp. Biol. Med.* SAGE Publications Sage UK: London, England, 1953. Vol. 84, № 3. P. 570–573.
32. Huebner R.J. et al. Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents: a newly recognized group of common viruses of the respiratory system // *N. Engl. J. Med.* 1954. Vol. 251, № 27. P. 1077–1086.
33. Trentin J.J., Yabe Y., Taylor G. The quest for human cancer viruses. // *Science.* American Association for the Advancement of Science, 1962. Vol. 137, № 3533. P. 835–841.
34. Carr K. Nobel goes to discoverers of ‘split genes’ // *Nature.* 1993. Vol. 365. P. 597.
35. Fenner’s veterinary virology. 5th ed. / ed. Maclachlan N., Dubovi E. Academic Press, 2017. 602 p.
36. Пиневич А.В. et al. Вирусология. СПб: СПбГУ, 2013. 432 с.
37. Schnurr D., Dondero M.E. Two new candidate adenovirus serotypes. // *Intervirology.* Karger Publishers, 1993. Vol. 36, № 2. P. 79–83.
38. Kajon A.E. et al. Molecular epidemiology of adenovirus acute lower respiratory infections of children in the South Cone of South America (1991–1994) // *J. Med. Virol.* 1996. Vol. 48, № 2. P. 151–156.
39. Hage E. et al. Human mastadenovirus type 70: a novel, multiple recombinant species D mastadenovirus isolated from diarrhoeal faeces of a haematopoietic stem cell transplantation recipient // *J. Gen. Virol. Microbiology Society,* 2015. Vol. 96, № 9. P. 2734–2742.
40. Dhingra A. et al. Molecular Evolution of Human Adenovirus (HAdV) Species C. // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 1039.
41. J. Bennett, R. Dolin M.J.B. Mandell, Douglas, and Bennett’s principles and practice of infectious diseases. 8th ed. / ed. John E. Bennett R.D., Martin J. Blaser. 2014. 4320 p.
42. Robinson C., Echavarría M. Adenoviruses // *Manual of Clinical Microbiology,* 10th Edition. 10th ed. / ed. Versalovic J. et al. American Society of Microbiology, 2011. P. 1600–1611.
43. Payne S. Virus Structure. // *Viruses.* 1st ed. Academic Press, 2017. 352 p.
44. Russell W.C. Adenoviruses: update on structure and function // *J. Gen. Virol.* 2009. Vol. 90, № 1. P. 1–20.
45. Ahi Y.A., Mittal S.K. Components of adenovirus genome packaging // *Front. Microbiol.* 2016. Vol. 7. P. 1–15.
46. Вопросы общей вирусологии: Учебное пособие / ed. Киселев О.И., Жилинская И.Н. СПб: СПбГМА им. И.И. Мечникова, 2007. 374 с.
47. Rhee E.G., Barouch D.H. Adenoviruses // *Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases. Content Repository Only!*, 2015. Vol. 2. P. 1787–1793.e2.

48. Russell W.C. Update on adenovirus and its vectors // *Journal of General Virology*. 2000. Vol. 81, № 11. 2573-2604 p.
49. Lynch J., Kajon A. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention // *Semin. Respir. Crit. Care Med.* Thieme Medical Publishers, 2016. Vol. 37, № 04. P. 586–602.
50. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. *Fields virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 2664 p.
51. Kremer E.J., Nemerow G.R. Adenovirus Tales: From the Cell Surface to the Nuclear Pore Complex // *PLOS Pathog.* / ed. Spindler K.R. Public Library of Science, 2015. Vol. 11, № 6. P. e1004821.
52. Zhang Y., Bergelson J.M. Adenovirus receptors // *J. Virol.* American Society for Microbiology (ASM), 2005. Vol. 79, № 19. P. 12125–12131.
53. Gaggar A., Shayakhmetov D.M., Lieber A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses // *Nat. Med.* Nature Publishing Group, 2003. Vol. 9, № 11. P. 1408–1412.
54. Short J.J. et al. Members of adenovirus species B utilize CD80 and CD86 as cellular attachment receptors. // *Virus Res.* NIH Public Access, 2006. Vol. 122, № 1–2. P. 144–153.
55. Andersson E.K., Mei Y.-F., Wadell G. Adenovirus interactions with CD46 on transgenic mouse erythrocytes // *Virology*. Academic Press, 2010. Vol. 402, № 1. P. 20–25.
56. Marttila M. et al. CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. // *J. Virol.* American Society for Microbiology (ASM), 2005. Vol. 79, № 22. P. 14429–14436.
57. Arnberg N. et al. Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. // *J. Virol.* American Society for Microbiology, 2000. Vol. 74, № 1. P. 42–48.
58. Chandra N. et al. Sialic Acid-Containing Glycans as Cellular Receptors for Ocular Human Adenoviruses: Implications for Tropism and Treatment // *Viruses*. 2019. Vol. 11, № 5. P. 395.
59. Dehecchi M.C. et al. Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5. // *J. Virol.* American Society for Microbiology, 2001. Vol. 75, № 18. P. 8772–8780.
60. Waddington S.N. et al. Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. // *Cell*. Elsevier, 2008. Vol. 132, № 3. P. 397–409.
61. Arnberg N. Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors // *Trends Pharmacol. Sci.* 2012. Vol. 33, № 8. P. 442–448.
62. Wechman S. et al. Adenovirus with DNA Packaging Gene Mutations Increased Virus Release // *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2016. Vol. 8, № 12. P. 333.
63. Weaver E.A. et al. Characterization of species C human adenovirus serotype 6 (Ad6). // *Virology*. NIH Public Access, 2011. Vol. 412, № 1. P. 19–27.
64. Ebner K., Pinsker W., Lion T. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. // *J. Virol.* American Society for Microbiology

- Journals, 2005. Vol. 79, № 20. P. 12635–12642.
65. Tatsumi C. et al. First Identification of Human Adenovirus 57 (HAdV-57) in Japan // *Jpn. J. Infect. Dis.* 2018. Vol. 71. P. 259–263.
 66. Zhang S.-Y. et al. Fatal pneumonia cases caused by human adenovirus 55 in immunocompetent adults // *Infect. Dis. (Auckl)*. Taylor & Francis, 2016. Vol. 48, № 1. P. 40–47.
 67. Liu T. et al. Identification of adenovirus neutralizing antigens using capsid chimeric viruses // *Virus Res.* Elsevier, 2018. Vol. 256. P. 100–106.
 68. Bradley R.R. et al. Adenovirus serotype 5 neutralizing antibodies target both hexon and fiber following vaccination and natural infection. // *J. Virol.* American Society for Microbiology (ASM), 2012. Vol. 86, № 1. P. 625–629.
 69. Zhu R. et al. Localization of neutralization epitopes on adenovirus fiber knob from species C // *J. Gen. Virol.* 2016. Vol. 97, № 4. P. 955–962.
 70. Girones R. et al. Chlorine inactivation of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water. // *J. Water Health.* 2014. Vol. 12, № 3. P. 436–442.
 71. De Conto F. et al. Epidemiology of human respiratory viruses in children with acute respiratory tract infection in a 3-year hospital-based survey in Northern Italy // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* Elsevier, 2019.
 72. Carducci A., Verani M. Effects of Bacterial, Chemical, Physical and Meteorological Variables on Virus Removal by a Wastewater Treatment Plant // *Food Environ. Virol.* 2013. Vol. 5, № 1. P. 69–76.
 73. Carducci A. et al. Quantitative Microbial Risk Assessment in Occupational Settings Applied to the Airborne Human Adenovirus Infection. // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2016. Vol. 13, № 7. P. 733.
 74. OYong K. et al. Outbreak of Epidemic Keratoconjunctivitis Caused by Human Adenovirus Type D53 in an Eye Care Clinic - Los Angeles County, 2017. // *Morb. Mortal. Wkly. Rep. Centers for Disease Control and Prevention*, 2018. Vol. 67, № 48. P. 1347–1349.
 75. Love D.C. et al. Human viruses and viral indicators in marine water at two recreational beaches in Southern California, USA // *J. Water Health.* 2014. Vol. 12, № 1. P. 136–150.
 76. Hassan F. et al. Viral Etiology of Acute Gastroenteritis in <2-Year-Old US Children in the Post-Rotavirus Vaccine Era // *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 2018.
 77. Singh S.K. Human respiratory viral infections. CRC Press, 2014. 698 p.
 78. Ramsay I.D. et al. Disseminated adenovirus infection after allogeneic stem cell transplant and the potential role of brincidofovir – Case series and 10 year experience of management in an adult transplant cohort // *J. Clin. Virol.* Elsevier, 2017. Vol. 96. P. 73–79.
 79. Pettengill M.A. et al. Probable Donor-Derived Human Adenovirus Type 34 Infection in 2 Kidney Transplant Recipients From the Same Donor // *Open Forum Infect. Dis.* 2019. Vol. 6, № 3. P. ofy354.
 80. Wilson P., Zumla A. Transmission and prevention of acute viral respiratory tract infections in hospitals // *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2019. P. 1.
 81. Fox J.P., Hall C.E., Cooney M.K. The Seattle Virus Watch. VII. Observations of

- adenovirus infections. // *Am. J. Epidemiol.* 1977. Vol. 105, № 4. P. 362–386.
82. Rieger-Fackeldey E., Aumeier S., Genzel-Boroviczény O. Disseminated adenovirus infection in two premature infants. // *Infection.* 2000. Vol. 28, № 4. P. 237–239.
 83. Lin G.-L. et al. Molecular epidemiology and clinical features of adenovirus infection in Taiwanese children, 2014 // *J. Microbiol. Immunol. Infect.* Elsevier, 2019. Vol. 52, № 2. P. 215–224.
 84. Liu L. et al. Adenoviruses Associated with Acute Diarrhea in Children in Beijing, China // *PLoS One* / ed. Alazawi W. 2014. Vol. 9, № 2. P. e88791.
 85. Guo L. et al. Detection of three human adenovirus species in adults with acute respiratory infection in China. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012. Vol. 31, № 6. P. 1051–1058.
 86. Ylihärsilä M. et al. Genotyping of clinically relevant human adenoviruses by array-in-well hybridization assay. // *Clin. Microbiol. Infect.* 2013. Vol. 19, № 6. P. 551–557.
 87. Tabain I. et al. Adenovirus respiratory infections in hospitalized children: clinical findings in relation to species and serotypes. // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2012. Vol. 31, № 7. P. 680–684.
 88. Barrero P.R. et al. Molecular typing of adenoviruses in pediatric respiratory infections in Buenos Aires, Argentina (1999-2010). // *J. Clin. Virol.* 2012. Vol. 53, № 2. P. 145–150.
 89. World Health Organization (WHO). Water Recreation and Disease. Plausibility of Associated Infections: Acute Effects, Sequelae and Mortality. 2017.
 90. Binder A.M. et al. Human Adenovirus Surveillance - United States, 2003-2016. // *Morb. Mortal. Wkly. Rep. Centers for Disease Control and Prevention*, 2017. Vol. 66, № 39. P. 1039–1042.
 91. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Two fatal cases of adenovirus-related illness in previously healthy young adults--Illinois, 2000. // *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2001. Vol. 50, № 26. P. 553–555.
 92. Yusof M.A. et al. Human adenovirus type 7 outbreak in Police Training Center, Malaysia, 2011. // *Emerg. Infect. Dis. Centers for Disease Control and Prevention*, 2012. Vol. 18, № 5. P. 852–854.
 93. Jeon K. et al. High isolation rate of adenovirus serotype 7 from South Korean military recruits with mild acute respiratory disease // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* Springer-Verlag, 2007. Vol. 26, № 7. P. 481–483.
 94. Cheng J. et al. Epidemiology and transmission characteristics of human adenovirus type 7 caused acute respiratory disease outbreak in military trainees in East China. // *Am. J. Transl. Res.* e-Century Publishing Corporation, 2016. Vol. 8, № 5. P. 2331–2342.
 95. Yu P. et al. Outbreak of acute respiratory disease caused by human adenovirus type 7 in a military training camp in Shaanxi, China // *Microbiol. Immunol.* Wiley/Blackwell (10.1111), 2013. Vol. 57, № 8. P. 553–560.
 96. Khanal S. et al. The Repertoire of Adenovirus in Human Disease: The Innocuous to the Deadly // *Biomedicines.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute

- (MDPI), 2018. Vol. 6, № 1. P. 30.
97. Abd-Jamil J. et al. Molecular identification of adenovirus causing respiratory tract infection in pediatric patients at the University of Malaya Medical Center. // BMC Pediatr. BioMed Central, 2010. Vol. 10. P. 46.
 98. Liu C. et al. Adenovirus infection in children with acute lower respiratory tract infections in Beijing, China, 2007 to 2012. // BMC Infect. Dis. BioMed Central, 2015. Vol. 15. P. 408.
 99. Яцышина С.Б. и др. Аденовирусы в этиологической структуре острых респираторных вирусных инфекций в Москве в 2004 - 2014 гг // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015. Т. 5. С. 50–57.
 100. Katz S.E., Williams D.J. Pediatric Community-Acquired Pneumonia in the United States: Changing Epidemiology, Diagnostic and Therapeutic Challenges, and Areas for Future Research. // Infect. Dis. Clin. North Am. NIH Public Access, 2018. Vol. 32, № 1. P. 47–63.
 101. Xie L. et al. Human adenovirus load in respiratory tract secretions are predictors for disease severity in children with human adenovirus pneumonia. // Virol. J. BioMed Central, 2018. Vol. 15, № 1. P. 123.
 102. Hong J.-Y. et al. Lower Respiratory Tract Infections due to Adenovirus in Hospitalized Korean Children: Epidemiology, Clinical Features, and Prognosis // Clin. Infect. Dis. Narnia, 2001. Vol. 32, № 10. P. 1423–1429.
 103. Munoz F.M., Piedra P.A., Demmler G.J. Disseminated Adenovirus Disease in Immunocompromised and Immunocompetent Children // Clin. Infect. Dis. Oxford University Press, 1998. Vol. 27, № 5. P. 1194–1200.
 104. Tang L. et al. Adenovirus serotype 7 associated with a severe lower respiratory tract disease outbreak in infants in Shaanxi Province, China // Virol. J. BioMed Central, 2011. Vol. 8. P. 23.
 105. Львов Н.И. et al. Особенности этиологической структуры ОРВИ в отдельных возрастных и профессиональных группах населения Санкт-Петербурга в эпидемический сезон 2013-2014 гг. // Журнал инфектологии. 2014. Т. 6, № 3. С. 62–70.
 106. Zdanov K.V. et al. Main aetiological features of acute respiratory viral diseases in young people of draft age and conscripts during the 2013-2014 epidemic season // Int. Rev. Armed Forces Med. Serv. 2016. Vol. 89, № 2. P. 58–63.
 107. Ryan M.A.K. et al. Large Epidemic of Respiratory Illness Due to Adenovirus Types 7 and 3 in Healthy Young Adults // Clin. Infect. Dis. Oxford University Press, 2002. Vol. 34, № 5. P. 577–582.
 108. Erdman D.D. et al. Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966-2000. // Emerg. Infect. Dis. Centers for Disease Control and Prevention, 2002. Vol. 8, № 3. P. 269–277.
 109. McNeill K.M. et al. Epidemic spread of adenovirus type 4-associated acute respiratory disease between U.S. Army installations. // Emerg. Infect. Dis. Centers for Disease Control and Prevention, 2000. Vol. 6, № 4. P. 415–419.
 110. Gray G.C. et al. Adult Adenovirus Infections: Loss of Orphaned Vaccines Precipitates Military Respiratory Disease Epidemics // Clin. Infect. Dis. Oxford

- University Press, 2000. Vol. 31, № 3. P. 663–670.
111. Potter R.N. et al. Adenovirus-associated Deaths in US Military during Postvaccination Period, 1999–2010 // *Emerg. Infect. Dis.* 2012. Vol. 18, № 3. P. 507–509.
 112. Kajon A.E. et al. Outbreak of febrile respiratory illness associated with adenovirus 11a infection in a Singapore military training cAMP. // *J. Clin. Microbiol.* American Society for Microbiology (ASM), 2010. Vol. 48, № 4. P. 1438–1441.
 113. Yoon H. et al. Characteristics of Adenovirus Pneumonia in Korean Military Personnel, 2012-2016. // *J. Korean Med. Sci.* Korean Academy of Medical Sciences, 2017. Vol. 32, № 2. P. 287–295.
 114. Veen J. Van der, Kok G. Isolation and typing of adenoviruses recovered from military recruits with acute respiratory disease in The Netherlands. // *Am. J. Epidemiol.* Oxford University Press, 1957. Vol. 65, № 2. P. 119–129.
 115. Cooper R.J. et al. The epidemiology of adenovirus infections in Greater Manchester, UK 1982-96. // *Epidemiol. Infect.* Cambridge University Press, 2000. Vol. 125, № 2. P. 333–345.
 116. Львов Н.И. et al. Клиническое и эпидемиологическое значение аденовирусной инфекции у военнослужащих // *Военно-медицинский журнал.* 2013. Т. 334, № 8. С. 19–24.
 117. Kolavic-Gray S.A. et al. Large Epidemic of Adenovirus Type 4 Infection among Military Trainees: Epidemiological, Clinical, and Laboratory Studies // *Clin. Infect. Dis.* Oxford University Press, 2002. Vol. 35, № 7. P. 808–818.
 118. Sanchez J.L. et al. Epidemic of adenovirus-induced respiratory illness among US military recruits: epidemiologic and immunologic risk factors in healthy, young adults. // *J. Med. Virol.* 2001. Vol. 65, № 4. P. 710–718.
 119. Radin J.M. et al. Dramatic Decline of Respiratory Illness Among US Military Recruits After the Renewed Use of Adenovirus Vaccines // *Clin. Infect. Dis.* Oxford University Press, 2014. Vol. 59, № 7. P. 962–968.
 120. Lyons A. et al. A double-blind, placebo-controlled study of the safety and immunogenicity of live, oral type 4 and type 7 adenovirus vaccines in adults // *Vaccine.* Elsevier, 2008. Vol. 26, № 23. P. 2890–2898.
 121. Garnett C.T. et al. Latent Species C Adenoviruses in Human Tonsil Tissues // *J. Virol.* 2009. Vol. 83, № 6. P. 2417–2428.
 122. HOGG J.C. Role of Latent Viral Infections in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001. Vol. 164, № supplement_2. P. S71–S75.
 123. Pauly M. et al. High prevalence and diversity of species D adenoviruses (HAdV-D) in human populations of four Sub-Saharan countries. // *Virol. J.* 2014. Vol. 11, № 1. P. 25.
 124. Matsushima Y. et al. Novel Human Adenovirus Strain, Bangladesh // *Emerg. Infect. Dis.* 2012. Vol. 18, № 5. P. 846–848.
 125. Metzgar D. et al. Evaluation of multiplex type-specific real-time PCR assays using the LightCycler and joint biological agent identification and diagnostic

- system platforms for detection and quantitation of adult human respiratory adenoviruses. // *J. Clin. Microbiol.* 2010. Vol. 48, № 4. P. 1397–1403.
126. Doan M.L. et al. Treatment of adenovirus pneumonia with cidofovir in pediatric lung transplant recipients. // *J. Heart Lung Transplant.* 2007. Vol. 26, № 9. P. 883–889.
 127. Sabroe I. et al. Treatment of adenoviral pneumonitis with intravenous ribavirin and immunoglobulin. // *Thorax.* 1995. Vol. 50, № 11. P. 1219–1220.
 128. Mahony J.B. Detection of respiratory viruses by molecular methods. // *Clin. Microbiol. Rev. American Society for Microbiology Journals*, 2008. Vol. 21, № 4. P. 716–747.
 129. Speranskaya E. V et al. Experience of application of the PCR for identification of the causative agent of community acquired pneumonia in the military. // *Klin. Lab. Diagn.* 2018. Vol. 63, № 10. P. 641–645.
 130. Advani S. et al. Detecting respiratory viruses in asymptomatic children. // *Pediatr. Infect. Dis. J. NIH Public Access*, 2012. Vol. 31, № 12. P. 1221–1226.
 131. Stroparo E. et al. Adenovirus respiratory infection: significant increase in diagnosis using PCR comparing with antigen detection and culture methods // *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2010. Vol. 52, № 6. P. 317–321.
 132. Goldsmith C.S., Miller S.E. Modern Uses of Electron Microscopy for Detection of Viruses // *Clin. Microbiol. Rev. American Society for Microbiology Journals*, 2009. Vol. 22, № 4. P. 552–563.
 133. Fauquet C.M. et al. Sequence Analysis and Classification of Apparent Recombinant Begomoviruses Infecting Tomato in the Nile and Mediterranean Basins // *Phytopathology. The American Phytopathological Society*, 2005. Vol. 95, № 5. P. 549–555.
 134. Casals J., Palacios R. The complement fixation test in the diagnosis of virus infections of the central nervous system. // *J. Exp. Med.* 1941. Vol. 74, № 5. P. 409–426.
 135. Voller A. et al. The Detection of Viruses by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) // *J. Gen. Virol.* 1976. Vol. 33, № 1. P. 165–167.
 136. Henrickson K.J., Hall C.B. Diagnostic Assays for Respiratory Syncytial Virus Disease // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2007. Vol. 26, № Supplement. P. S36–S40.
 137. Амосова И.В. et al. Результаты клинико-лабораторных испытаний иммунофлуоресцентной тест-системы для ранней диагностики гриппа и других ОРВИ // *Медицинский алфавит.* 2015. Т. 3, № 11. С. 67–70.
 138. Upadhyay V.P. et al. Etiology of Coinfections in Children with Influenza during 2015/16 Winter Season in Nepal // *Int. J. Microbiol. Hindawi*, 2018. Vol. 2018. P. 1–6.
 139. Sonawane A.A., Shastri J., Bavdekar S.B. Respiratory Pathogens in Infants Diagnosed with Acute Lower Respiratory Tract Infection in a Tertiary Care Hospital of Western India Using Multiplex Real Time PCR // *Indian J. Pediatr.* 2019. Vol. 86, № 5. P. 433–438.
 140. Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика / ed. Киселев

- О.И., Цыбалова Л.М., Покровский В.И. Москва: Медицинское информационное агентство, 2012. 496 с.
141. Tuttle R. et al. Evaluation of novel second-generation RSV and influenza rapid tests at the point of care // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis. Elsevier*, 2015. Vol. 81, № 3. P. 171–176.
 142. Weitzel T. et al. Field evaluation of a rota- and adenovirus immunochromatographic assay using stool samples from children with acute diarrhea in Ghana. // *J. Clin. Microbiol. American Society for Microbiology (ASM)*, 2007. Vol. 45, № 8. P. 2695–2697.
 143. Kumar S. et al. Rapid detection of respiratory syncytial virus in community-acquired lower respiratory tract infections in children by chromatographic assay // *Indian J. Pathol. Microbiol. Medknow Publications and Media Pvt. Ltd.*, 2018. Vol. 61, № 2. P. 236.
 144. Koskinen J.O. et al. Rapid Method for Detection of Influenza A and B Virus Antigens by Use of a Two-Photon Excitation Assay Technique and Dry-Chemistry Reagents // *J. Clin. Microbiol.* 2007. Vol. 45, № 11. P. 3581–3588.
 145. Tuuminen T., Suomala P., Koskinen J.O. Evaluation of the automated multianalyte point-of-care mariPOC® test for the detection of influenza A virus and respiratory syncytial virus // *J. Med. Virol.* 2013. Vol. 85, № 9. P. 1598–1601.
 146. Brotons P. et al. Performance of a rapid multi-analyte 2-photon excitation assay in children with acute respiratory infection // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014. Vol. 79, № 2. P. 190–193.
 147. Beier M., Hoheisel J.D. Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips. // *Nucleic Acids Res. Oxford University Press*, 1999. Vol. 27, № 9. P. 1970–1977.
 148. Moreno-Bondi M., Alarie J., Vo-Dinh T. Multi-analyte analysis system using an antibody-based biochip // *Anal. Bioanal. Chem. Springer-Verlag*, 2003. Vol. 375, № 1. P. 120–124.
 149. Zhu H. et al. Analysis of yeast protein kinases using protein chips // *Nat. Genet.* 2000. Vol. 26, № 3. P. 283–289.
 150. Zhi X. et al. A novel HBV genotypes detecting system combined with microfluidic chip, loop-mediated isothermal amplification and GMR sensors // *Biosens. Bioelectron.* 2014. Vol. 54. P. 372–377.
 151. Guerreiro M.R. et al. Detection and Quantification of Label-Free Infectious Adenovirus Using a Switch-On Cell-Based Fluorescent Biosensor // *ACS Sensors*. 2019. Vol. 4, № 6. P. 1654–1661.
 152. Köhler G., Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion // *Eur. J. Immunol. Wiley-Blackwell*, 1976. Vol. 6, № 7. P. 511–519.
 153. <https://liverr.ru/> [Electronic resource]. URL: <https://liverr.ru/assets/8599230-730x374.jpg> (accessed: 16.02.2019).
 154. Pollack S.J., Jacobs J.W., Schultz P.G. Selective chemical catalysis by an antibody. // *Science. American Association for the Advancement of Science*,

1986. Vol. 234, № 4783. P. 1570–1573.
155. Nelson P.N. et al. Monoclonal antibodies // *J Clin Pathol Mol Pathol*. 2000. Vol. 53. P. 111–117.
156. Будчанов Ю.И. Моноклональные антитела: от создания до клинического применения // *Клиническая онкогематология*. 2016. Т. 9, № 3. С. 247–291.
157. Толькова Е.С. Получение моноклональных антител // *Международный научно-исследовательский журнал*. 2015. Т. 6, № 37. С. 36–40.
158. Будчанов Ю.И. Моноклональные антитела. Использование в диагностике заболеваний и лечебные моноклональные антитела. Методические рекомендации для студентов лечебного, педиатрического, стоматологического и фармацевтического факультетов. Тверь, 2012. 22 с.
159. Döhner L., Dieckmann U. Antigenic composition of adenovirus hexons. // *Acta Biol. Med. Ger*. 1978. Vol. 37, № 11–12. P. 1735–1740.
160. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
161. Fortsas E., Ptric M., Brown M. Electrophoretic migration of adenovirus hexon under non-denaturing conditions // *Virus Res. Elsevier*, 1994. Vol. 31, № 1. P. 57–65.
162. Candiano G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis // *Electrophoresis*. 2004. Vol. 25. P. 1327–1333.
163. Målen H. et al. Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv // *Proteomics*. Wiley-Blackwell, 2007. Vol. 7, № 10. P. 1702–1718.
164. NCBI. National Center for Biotechnology Information [Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed: 04.11.2018).
165. Амосова И.В. et al. Использование микрокультурального иммуноферментного анализа и модифицированного метода иммунофлуоресценции для диагностики аденовирусной инфекции // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017. Т. 62, № 4. С. 230–235.
166. Амосова И.В. Разработка и усовершенствование средств и методов иммунодиагностики аденовирусной инфекции: Автореф... дис. канд. биол. наук. СПб: НИИ гриппа МЗ РФ, 2009. 26 с.
167. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays. 1st ed. Elsevier Science, 1985. 549 p.
168. Кривицкая В.З. et al. Получение и характеристика моноклональных антител, специфичных к респираторно-синцитиальному вирусу // *Биотехнология*. 2016. Т. 1. С. 65–75.
169. Mckinney R., Tracker L., Hebert G.A. Conjugation Methods in Immunofluorescence // *J. Dent. Res. SAGE Publications* Sage CA: Los Angeles, CA, 1976. Vol. 55, № 1_suppl. P. 38–44.
170. Xu W., McDonough M.C., Erdman D.D. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. // *J. Clin. Microbiol. American Society for Microbiology (ASM)*, 2000. Vol. 38, № 11. P. 4114–4120.
171. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the

- sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 1994. Vol. 22, № 22. P. 4673–4680.
172. Khilko S.N. et al. Comparison of adenoviral hexon polypeptides (monomers) and of native hexons (trimers) by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. // *Acta Microbiol. Hung.* 1990. Vol. 37, № 2. P. 233–245.
173. Crowther J.R. *Basic Immunology // ELISA.* New Jersey: Humana Press, 1995. Vol. 42. P. 1–34.
174. Иванов В.В. et al. Тяжелая вирус-ассоциированная пневмония у военнослужащих // *Вестник Российской Военно-Медицинской Академии.* 2015. Т. 1, № 49. С. 146–152.
175. Malhotra V. et al. Viruses causing severe acute respiratory infections (SARI) in children ≤ 5 years of age at a tertiary care hospital in Rajasthan, India // *Indian J. Med. Res.* Medknow Publications and Media Pvt. Ltd., 2016. Vol. 144, № 6. P. 877.
176. Климович В.Б. et al. Моноклональные антитела на основе репертуара иммунного ответа мышей линии SJL/J // *Медицинская иммунология.* 1999. Т. 1, № 1–2. С. 47–58.
177. Sanchez-Carbayo M. Antibody Arrays: Technical Considerations and Clinical Applications in Cancer // *Clin Chem.* 2006. Vol. 52, № 9. P. 1651–1659.
178. Zhang J. et al. A Survey of Recent Adenoviral Respiratory Pathogens in Hong Kong Reveals Emergent and Recombinant Human Adenovirus Type 4 (HAdV-E4) Circulating in Civilian Populations // *Viruses.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019. Vol. 11, № 2. P. 129.
179. Calvo C. et al. Eight year prospective study of adenoviruses infections in hospitalized children. Comparison with other respiratory viruses // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, № 7. P. e0132162.
180. Gray G.C. et al. Genotype Prevalence and Risk Factors for Severe Clinical Adenovirus Infection, United States 2004-2006 // *Clin. Infect. Dis.* 2007. Vol. 45, № 9. P. 1120–1131.
181. Carr M.J. et al. Deaths associated with human adenovirus-14p1 infections, Europe, 2009-2010. // *Emerg. Infect. Dis.* Centers for Disease Control and Prevention, 2011. Vol. 17, № 8. P. 1402–1408.
182. Fu Y. et al. Human adenovirus type 7 infection causes a more severe disease than type 3 // *BMC Infect. Dis.* 2019. Vol. 19, № 1. P. 36.
183. Львов Н.И. et al. Особенности клинического течения острых респираторных заболеваний, вызванных аденовирусами эпидемически значимых серотипов. // *Журнал инфектологии.* 2014. Т. 6, № 2. С. 5–11.
184. Krivitskaya V. et al. Development of the cell-ELISA test for the subtype identification of circulating influenza A(H1) and A(H3) viruses // *Microbiol. Indep. Res. J.* 2015. Vol. 2, № 1. P. 65–68.
185. Rabalais G.P. et al. Rapid diagnosis of respiratory viral infections by using a shell vial assay and monoclonal antibody pool. // *J. Clin. Microbiol.* 1992. Vol. 30, № 6. P. 1505–1508.

186. Hendry R.M., McIntosh K. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of respiratory syncytial virus infection: development and description. // *J. Clin. Microbiol. American Society for Microbiology (ASM)*, 1982. Vol. 16, № 2. P. 324–328.
187. WHO Global Influenza Surveillance Network Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011.
188. Van Baalen C.A. et al. Detection of nonhemagglutinating influenza a(h3) viruses by enzyme-linked immunosorbent assay in quantitative influenza virus culture. // *J. Clin. Microbiol. American Society for Microbiology (ASM)*, 2014. Vol. 52, № 5. P. 1672–1677.
189. Lee K. et al. Development of a diagnostic system for detection of specific antibodies and antigens against Middle East respiratory syndrome coronavirus // *Microbiol. Immunol.* 2018. Vol. 62, № 9. P. 574–584.
190. Djagbare M.D. et al. Monoclonal antibody based in vitro potency assay as a predictor of antigenic integrity and in vivo immunogenicity of a Respiratory Syncytial Virus post-fusion F-protein based vaccine // *Vaccine.* 2018. Vol. 36, № 12. P. 1673–1680.
191. Landry M.L., Cohen S., Ferguson D. Impact of sample type on rapid detection of influenza virus A by cytospin-enhanced immunofluorescence and membrane enzyme-linked immunosorbent assay. // *J. Clin. Microbiol. American Society for Microbiology (ASM)*, 2000. Vol. 38, № 1. P. 429–430.
192. Wang Y. et al. Prevalence of Common Respiratory Viral Infections and Identification of Adenovirus in Hospitalized Adults in Harbin, China 2014 to 2017 // *Front. Microbiol.* 2018. Vol. 9. P. 2919.
193. Corvalán L. P. et al. Inmunofluorescencia indirecta versus reacción de polimerasa en cadena para el diagnóstico de virus respiratorios en niños ingresados en un hospital de la Región Metropolitana // *Rev. Chil. infectología.* 2019. Vol. 36, № 1. P. 26–31.
194. Sun Y. et al. Laboratory evaluation of rapid antigen detection tests for more-sensitive detection of <i>Respiratory syncytial virus</i> antigen // *Jpn. J. Infect. Dis.* 2019.
195. Van Doornum G.J., De Jong J.C. Rapid shell vial culture technique for detection of enteroviruses and adenoviruses in fecal specimens: comparison with conventional virus isolation method. // *J. Clin. Microbiol. American Society for Microbiology (ASM)*, 1998. Vol. 36, № 10. P. 2865–2868.
196. Maitreyi R. et al. Rapid detection of respiratory viruses by centrifugation enhanced cultures from children with acute lower respiratory tract infections // *J. Clin. Virol. Elsevier*, 2000. Vol. 16, № 1. P. 41–47.
197. Matthey S. et al. Rapid detection of respiratory viruses by shell vial culture and direct staining by using pooled and individual monoclonal antibodies. // *J. Clin. Microbiol.* 1992. Vol. 30, № 3. P. 540–544.
198. Kowalski R.P. et al. Evaluation of the shell vial technique for detection of ocular adenovirus. *Community Ophthalmologists of Pittsburgh, Pennsylvania.* // *Ophthalmology. Elsevier*, 1999. Vol. 106, № 7. P. 1324–1327.

Приложение А

Множественные выравнивания аминокислотных последовательностей

гексона аденовирусов различных типов

Тип вируса	Код доступа GenBank		Аминокислотная последовательность	
			1	50
AB1	BAG48778.1	(1)	MATPSMMPQWS	SYMHISGQDASEYLS
AB6	BAG48783.1	(1)	MATPSMMPQWS	SYMHISGQDASEYLS
AB2	BAG48779.1	(1)	MATPSMMPQWS	SYMHISGQDASEYLS
AB5	BAG48782.1	(1)	MATPSMMPQWS	SYMHISGQDASEYLS
AB3	BAG48780.1	(1)	MATPSMMPQW	AYMHISGQDASEYLS
AB7	BAG48784.1	(1)	MATPSMMPQW	AYMHISGQDASEYLS
AB14	BAG48791.1	(1)	MATPSMLPQW	AYMHISGQDASEYLS
AB21	BAG48798.1	(1)	MATPSMLPQW	AYMHISGQDASEYLS
AB4	BAG48781.1	(1)	MATPSMLPQW	AYMHISGQDASEYLS
AB19	BAG48796.1	(1)	MATPSMMPQW	AYMHISGQDASEYLS
AB8	BAG48785.1	(1)	MATPSMMPQW	AYMHISGQDASEYLS
			51	100
AB1	BAG48778.1	(51)	APTHDVT	TDERSQRLTLRFIPVDREDTAYS
AB6	BAG48783.1	(51)	APTHDVT	TDERSQRLTLRFIPVDREDTAYS
AB2	BAG48779.1	(51)	APTHDVT	TDERSQRLTLRFIPVDREDTAYS
AB5	BAG48782.1	(51)	APTHDVT	TDERSQRLTLRFIPVDREDTAYS
AB3	BAG48780.1	(51)	APTHDVT	TDERSQRLMLRFVPVDRENTYS
AB7	BAG48784.1	(51)	APTHDVT	TDERSQRLMLRFVPVDRENTYS
AB14	BAG48791.1	(51)	APTHDVT	TDERSQRLMLRFVPVDRENTYS
AB21	BAG48798.1	(51)	APTHDVT	TDERSQRLMLRFVPVDRENTYS
AB4	BAG48781.1	(51)	APTHDVT	TDERSQRLTLRFVPVDRENTYS
AB19	BAG48796.1	(51)	APTHDVT	TDERSQRLTLRFVPVDRENTYS
AB8	BAG48785.1	(51)	APTHDVT	TDERSQRLTLRFVPVDRENTYS
			101	150
AB1	BAG48778.1	(101)	FDIRGVLDRGPT	TFKPYSGTAYNALAPKGAPNSCEWE
AB6	BAG48783.1	(101)	FDIRGVLDRGPT	TFKPYSGTAYNALAPKGAPNSCEWE
AB2	BAG48779.1	(101)	FDIRGVLDRGPT	TFKPYSGTAYNALAPKGAPNSCEWE
AB5	BAG48782.1	(101)	FDIRGVLDRGPT	TFKPYSGTAYNALAPKGAPNSCEWE
AB3	BAG48780.1	(101)	FDIRGVLDRGPT	SFKPYSGTAYNSLAPKGAPNTSQW
AB7	BAG48784.1	(101)	FDIRGVLDRGPT	SFKPYSGTAYNSLAPKGAPNTSQW
AB14	BAG48791.1	(101)	FDIRGVLDRGPT	SFKPYSGTAYNSLAPKGAPNTSQW
AB21	BAG48798.1	(101)	FDIRGVLDRGPT	SFKPYSGTAYNSLAPKGAPNTSQW
AB4	BAG48781.1	(101)	FDIRGVLDRGPT	SFKPYSGTAYNSLAPKGAPNTSQW
AB19	BAG48796.1	(101)	FDIRGVLDRGPT	SFKPYSGTAYNSLAPKGAPNSQWL
AB8	BAG48785.1	(101)	FDIRGVLDRGPT	SFKPYSGTAYNSLAPKGAPNSQWL
			151	200
AB1	BAG48778.1	(151)	EEEAEEEEAE	EEEEAEAPQADQVKKTHVYAQA
AB6	BAG48783.1	(151)	EENEANE	AQAREQEQ-----AKKTHVYAQA
AB2	BAG48779.1	(151)	EEDEDEE	--EEEEEQNARDQATKTHVYAQA
AB5	BAG48782.1	(151)	DDNEDEV	DEQAEQK-----THVFCQA
AB3	BAG48780.1	(144)	--AVTTT	-----TNTFGIASMKGD--NITKEGL
AB7	BAG48784.1	(144)	--AVTTT	-----TNTFGIASMKGD--NITKEGL
AB14	BAG48791.1	(151)	GENDEKA	-----TYTFCNAPVKAD-ADITKDG
AB21	BAG48798.1	(151)	-EKNL	T-----TYTFCNAPVKAEGGDITKDKGLP
AB4	BAG48781.1	(144)	-----	TFGAAAMPVVTGKKIEADGLP
AB19	BAG48796.1	(148)	---MVT	K-----THTFGVAAMGGT--NITNQG
AB8	BAG48785.1	(147)	---NQKE	-----TRTYGVAATGGY--NITKEG
			201	250
AB1	BAG48778.1	(199)	-TQTE	--GNPVFADPTYQPEPQVGE
AB6	BAG48783.1	(193)	DATVAGAGKE	IFADKTFQPEPQVGE
AB2	BAG48779.1	(197)	NAETQ	--AKPVYADPSYQPEPQVGE
AB5	BAG48782.1	(190)	GQTPK	-----YADKTFQPEPQVGE

AB3	BAG48780.1	(173)	ITTT E GEE KPIYA DKTY QPEPQV GEES WTD TDGT NEKFG GRALK PAT INMK	251	300
AB7	BAG48784.1	(173)	ITADN--- KPIYA DKTY QPEPQV GEES WTD TDGT NEKFG GRALK PAT TKMK		
AB14	BAG48791.1	(182)	EVPAE GDP KPIYA ANKLY QPEPQV QES WTD TDGT EEKY GRV LKPD TKMK		
AB21	BAG48798.1	(183)	EI -TD GEA KPIYA DKLY QPEPQV GET WTD TDGT TEKY GRALK PE TKMK		
AB4	BAG48781.1	(168)	DS -TSGTDT VIYA DKTF QPEPQV GND SWVD TNG AEEKY GRALK DT TKMK		
AB19	BAG48796.1	(175)	EETAD NPP KEIF AD DKLF QPEPQV GEEN WQDTN--- AFY GRALK KE TKMK		
AB8	BAG48785.1	(174)	DE TKEDPNN KIYA DKTF QPEPQV IGENN WQDTN --- VFY GRALK KE TKMK		
AB1	BAG48778.1	(244)	PCYGS YARPTN KN GGQG ILVANNQ----- GALE SK VEMQ FF AP SGTAMN		
AB6	BAG48783.1	(241)	PCYGS YARPTN SN GGQG VMMVEQN----- GKLE SK VEMQ FF ST STNATN		
AB2	BAG48779.1	(243)	PCYGS YARPTN PF GGQS VLV PD E K ----- GVPL PK VLDL Q FF SN TT SLND		
AB5	BAG48782.1	(232)	PCYGS YAKPTN EN GGQG ILV KQ Q N ----- GKLE SK VEMQ FF ST TEAAAG		
AB3	BAG48780.1	(223)	PCYGS FARPTN IK GGQ AKNR KVK PTTEGGVETEP FD ID ME FF GR DAVAG		
AB7	BAG48784.1	(220)	PCYGS FARPTN IK GGQ AKNR KVK P-TEGDVETEP FD ID ME FF GR EAAD-		
AB14	BAG48791.1	(232)	PCYGS FARPTN VK GGQ AK VK TE E ----- GNNI EY DI DM FF LR SQ KQ-		
AB21	BAG48798.1	(232)	PCYGS FAKPTN VK GGQ AK Q K TTE Q--- PQN Q QV EY DI DM FF LR SQ KA-		
AB4	BAG48781.1	(217)	PCYGS FAKPTN KE GGQ AN LK DSE P ---- AAT PNY DI DL AF FF SK TIVA-		
AB19	BAG48796.1	(222)	PCYGS YARPTN TS GGQ AK LK TG DN ---- ID PT KL FD DI DL AF FF TP GGN PP		
AB8	BAG48785.1	(221)	PCYGS FARPTN KK GGQ AK V L TTE D--- GQ PTEN FD DL AF FF IP QAG--	301	350
AB1	BAG48778.1	(288)	ER---- NAV Q PS IVLY SE D VN ME T PD TH LSY KP SK T DE NS KAM L Q Q AMP		
AB6	BAG48783.1	(284)	EV---- NNI Q PT VVLY SE D VN ME T PD TH LSY KP K MG L DK NA K VM L Q Q AMP		
AB2	BAG48779.1	(287)	RQ G --- NAT K PK VVLY SE D VN ME T PD TH LSY KP PK G D EN S KAM L Q Q S MP		
AB5	BAG48782.1	(276)	NG---- DNI L TP KVVLY SE D V D I ET PD THLSY MP T IK E NS REL M Q Q S MP		
AB3	BAG48780.1	(273)	----- AL A PE IVLY T EN V N LE T PD SH VV Y K P ETS N- NS HAN L Q Q AMP		
AB7	BAG48784.1	(268)	----- AF S PE IVLY T EN V N LE T PD SH VV Y K P ETS D NS HAN L Q Q AMP		
AB14	BAG48791.1	(275)	----- GL K PK IVMY A EN V D LE S PD TH VV Y K PE VS D AS S NA N L Q Q S MP		
AB21	BAG48798.1	(278)	----- NF S PK IVMY A EN V D LE T PD TH VV Y K P ETS E S S H AN L Q Q S MP		
AB4	BAG48781.1	(262)	----- NYD PD IV MY T EN V D L Q TP DT HI IVY K P TE L TS E S N L Q Q AMP		
AB19	BAG48796.1	(268)	AGGS G TE EY KAD IV MY T EN V N LE T PD TH VV Y K P KE DES SE AN L V Q Q S MP		
AB8	BAG48785.1	(265)	---- GND N L D PD M IL Y A EN V N LE T PD TH VV Y K P KG D AS S A AN L T Q Q S MP	351	400
AB1	BAG48778.1	(334)	NRP NYIA FRD N FI GLMY YN ST GN M G VLAG QAS QL NA V VD L QDR NE LS Y Q		
AB6	BAG48783.1	(330)	NRP NYIA FRD N FI GLMY YN ST GN M G VLAG QAS QL NA V VD L QDR NE LS Y Q		
AB2	BAG48779.1	(334)	NRP NYIA FRD N FI GLMY YN ST GN M G VLAG QAS QL NA V VD L QDR NE LS Y Q		
AB5	BAG48782.1	(322)	NRP NYIA FRD N FI GLMY YN ST GN M G VLAG QAS QL NA V VD L QDR NE LS Y Q		
AB3	BAG48780.1	(315)	NRP NYI GFRD N FV GLMY YN ST GN M G VLAG QAS QL NA V VD L QDR NE LS Y Q		
AB7	BAG48784.1	(311)	NRP NYI GFRD N FV GLMY YN ST GN M G VLAG QAS QL NA V VD L QDR NE LS Y Q		
AB14	BAG48791.1	(318)	NRP NYI GFRD - IY GLMY YN ST GN M G VLAG QAS QL NA V VD L QDR NE LS Y Q		
AB21	BAG48798.1	(321)	NRP NYI GFRD N FI GLMY YN ST GN M G VLAG QAS QL NA V VD L QDR NE LS Y Q		
AB4	BAG48781.1	(305)	NRP NYI GFRD N FI GLMY YN ST GN M G VLAG QAS QL NA V VD L QDR NE LS Y Q		
AB19	BAG48796.1	(318)	NRP NYI GFRD N FV GLMY YN ST GN M G VLAG QAS QL NA V VD L QDR NE LS Y Q		
AB8	BAG48785.1	(311)	NRP NYI GFRD N FV GLMY YN ST GN M G VLAG QAS QL NA V VD L QDR NE LS Y Q	401	450
AB1	BAG48778.1	(384)	LLL DS I GD R TRY F SM WN Q AV DS Y DP D VR I I EN H G T E DEL P NY C FP L GG I G		
AB6	BAG48783.1	(380)	LLL DS I GD R TRY F SM WN Q AV DS Y DP D VR I I EN H G T E DEL P NY C FP L GG I G		
AB2	BAG48779.1	(384)	LLL DS I GD R TRY F SM WN Q AV DS Y DP D VR I I EN H G T E DEL P NY C FP L GG I G		
AB5	BAG48782.1	(372)	LLL DS I GD R TRY F SM WN Q AV DS Y DP D VR I I EN H G T E DEL P NY C FP L GG V I		
AB3	BAG48780.1	(365)	LLL DS L GD R TRY F SM WN Q AV DS Y DP D VR I I EN H G T E DEL P NY C FP L NG I G		
AB7	BAG48784.1	(361)	LLL DS L GD R TRY F SM WN Q AV DS Y DP D VR I I EN H G T E DEL P NY C FP L D G I G		
AB14	BAG48791.1	(367)	LLL DS L GD R TRY F SM WN Q AV DS Y DP D VR I I EN H G V E DEL P NY C FP L D G I G		
AB21	BAG48798.1	(371)	LLL DS L GD R TRY F SM WN Q AV DS Y DP D VR I I EN H G V E DEL P NY C FP L D G V G		
AB4	BAG48781.1	(355)	LLL DS L GD R TRY F SM WN Q AV DS Y DP D VR I I EN H G V E DEL P NY C FP L NG V G		
AB19	BAG48796.1	(368)	LLL DS L GD R TRY F SM WN S AV DS Y DP D VR I I EN H G V E DEL P NY C FP L D G S G		
AB8	BAG48785.1	(361)	LLL DS L GD R TRY F SM WN S AV DS Y DP D VR I I EN H G V E DEL P NY C FP L D G T G	451	500
AB1	BAG48778.1	(434)	V- TD T Y Q G IK S NGNG N P Q N--- W T K N D D F A A - R NE I G V GN N F A LE I N L N		
AB6	BAG48783.1	(430)	I- TD T F Q AV K T TAANG D Q G - N TT W Q K D S T F A E - R NE I G V GN N F A ME I N L N		
AB2	BAG48779.1	(434)	V- TD T Y Q A IK AN G NG S G D NG D T T W T K D E T F A T - R NE I G V GN N F A ME I N L N		
AB5	BAG48782.1	(422)	N- T E T L T K V K P - K T G Q E NG--- W E K D A T E F S D K NE I R V GN N F A ME I N L N		
AB3	BAG48780.1	(415)	P- G H T Y Q G I K V K T D D ----- T NG W E K D A N V A P - A NE I T I GN N L A ME I N I Q		
AB7	BAG48784.1	(411)	P- A K T Y Q G I K S K----- D NG W E K D N V S K- S NE I A L GN N Q A ME I N I Q		
AB14	BAG48791.1	(417)	PR T D S Y K E I Q L NG----- D Q A W K D V N P NG- I S E L V K GN P F A M E I N L Q		

AB21	BAG48798.1	(421)	VPIS SY KI I EPNGQ-----GADW KE PD I NG-T SE I GQ GN L F A M E I N L Q
AB4	BAG48781.1	(405)	L- TD TY Q G V K VKTDAG--S-EKWDK DD TT V SN- AN E I H V GN P F A M E I N L Q
AB19	BAG48796.1	(418)	T- NA A Y Q G V K VQDGEDGDK-ETE W E K D TK V AD-R N Q L CK GN I F A M E I N L Q
AB8	BAG48785.1	(411)	T- NA TY Q G V EPDNAQG--Q-NDK W K K D E K V A A - Q N Q L CK GN I Y A M E I N L Q
		501	550
AB1	BAG48778.1	(478)	AN L W R N F L Y S N I A L Y L P D K L K Y T P T N V E I SP N P S Y D Y M N K R V A P G L V D
AB6	BAG48783.1	(477)	AN L W R N F L Y S N I A L Y L P D K L K Y N P T N V E I SD N P N T Y D Y M N K R V A P G L V D
AB2	BAG48779.1	(482)	AN L W R N F L Y S N I A L Y L P D K L K Y N P T N V E I SD N P N T Y D Y M N K R V A P G L V D
AB5	BAG48782.1	(466)	AN L W R N F L Y S N I A L Y L P D K L K Y S P S N V K I SD N P N T Y D Y M N K R V A P G L V D
AB3	BAG48780.1	(458)	AN L W R S F L Y S N V A L Y L P D V Y K Y T P P N I T L P T N T N T Y E Y M N G R V S P S L V D
AB7	BAG48784.1	(451)	AN L W R S F L Y S N V A L Y L P D V Y K Y T P T N I T L P A N T N T Y E Y M N G R V S P S L V D
AB14	BAG48791.1	(458)	AN L W R S F L Y S N V A L Y L P D S Y K Y T P S N V T L P E N K N T Y D Y M N G R V S P S L V D
AB21	BAG48798.1	(463)	AN L W R S F L Y S N V A L Y L P D S Y K Y T P A N V T L P T N T N T Y E Y M N G R V S P S L V D
AB4	BAG48781.1	(450)	AN L W R N F L Y A N V A L Y L P D K Y K Y T P A N I T L P T N T N T Y E Y M N G R V A P S L V D
AB19	BAG48796.1	(465)	AN L W K S F L Y S N V A L Y L P D S Y K Y T P A N V T L P A N T N T Y E Y M N G R V A P S L V D
AB8	BAG48785.1	(456)	AN L W K S F L Y S N V A L Y L P D S E K Y T P A N V T L P T N T N T Y E Y M N G R V A A P S L V D
		551	600
AB1	BAG48778.1	(528)	C Y I N L G A R W S L D Y MDNVNPFNHHRNAGLRYSMLLGNRGYVPPFHIQVPQK
AB6	BAG48783.1	(527)	C Y I N L G A R W S L E Y MDNVNPFNHHRNAGLRYSMLLGNRGYVPPFHIQVPQK
AB2	BAG48779.1	(532)	C Y I N L G A R W S L D Y MDNVNPFNHHRNAGLRYSMLLGNRGYVPPFHIQVPQK
AB5	BAG48782.1	(516)	C Y I N L G A R W S L D Y MDNVNPFNHHRNAGLRYSMLLGNRGYVPPFHIQVPQK
AB3	BAG48780.1	(508)	S Y I N I G A R W S L D PMDNVNPFNHHRNAGLRYSMLLGNRGYVPPFHIQVPQK
AB7	BAG48784.1	(501)	S Y I N I G A R W S L D PMDNVNPFNHHRNAGLRYSMLLGNRGYVPPFHIQVPQK
AB14	BAG48791.1	(508)	T Y V N I G A R W S L D AMDNVNPFNHHRNAGLRYSMLLGNRGYVPPFHIQVPQK
AB21	BAG48798.1	(513)	T Y V N I G A R W S L D AMDNVNPFNHHRNAGLRYSMLLGNRGYVPPFHIQVPQK
AB4	BAG48781.1	(500)	A Y I N I G A R W S L D PMDNVNPFNHHRNAGLRYSMLLGNRGYVPPFHIQVPQK
AB19	BAG48796.1	(515)	A Y V N I G A R W S L D PMDNVNPFNHHRNAGLRYSMLLGNRGYVPPFHIQVPQK
AB8	BAG48785.1	(506)	A Y V N I G A R W S L D PMDNVNPFNHHRNAGLRYSMLLGNRGYVPPFHIQVPQK
		601	650
AB1	BAG48778.1	(578)	F F A I K N L L L L L P G S Y T Y E W N F R K D V N M V L Q S S L G N D L R V D G A S I K F D S I C L
AB6	BAG48783.1	(577)	F F A I K N L L L L L P G S Y T Y E W N F R K D V N M V L Q S S L G N D L R V D G A S I K F D S I C L
AB2	BAG48779.1	(582)	F F A I K N L L L L L P G S Y T Y E W N F R K D V N M V L Q S S L G N D L R V D G A S I K F D S I C L
AB5	BAG48782.1	(566)	F F A I K N L L L L L P G S Y T Y E W N F R K D V N M V L Q S S L G N D L R V D G A S I K F D S I C L
AB3	BAG48780.1	(558)	F F A V K N L L L L L P G S Y T Y E W N F R K D V N M V L Q S S L G N D L R T D G A T I S F T S I N L
AB7	BAG48784.1	(551)	F F A V K N L L L L L P G S Y T Y E W N F R K D V N M V L Q S S L G N D L R T D G A T I S F T S I N L
AB14	BAG48791.1	(558)	F F A V K N L L L L L P G S Y T Y E W N F R K D V N M V L Q S S L G N D L R V D G A S I S F T S I N L
AB21	BAG48798.1	(563)	F F A V K N L L L L L P G S Y T Y E W N F R K D V N M V L Q S S L G N D L R V D G A S I S F T S I N L
AB4	BAG48781.1	(550)	F F A I K S L L L L L P G S Y T Y E W N F R K D V N M I L Q S S L G N D L R T D G A S I T F T S I N L
AB19	BAG48796.1	(565)	F F A I K N L L L L L P G S Y T Y E W N F R K D V N M I L Q S S L G N D L R V D G A S V R F D S V N L
AB8	BAG48785.1	(556)	F F A I K N L L L L L P G S Y T Y E W N F R K D V N M I L Q S S L G N D L R V D G A S V R F D S V N L
		651	700
AB1	BAG48778.1	(628)	Y A T F F P M A H N T A S T L E A M L R N D T N D Q S F N D Y L S A A N M L Y P I P A N A T N V P I
AB6	BAG48783.1	(627)	Y A T F F P M A H N T A S T L E A M L R N D T N D Q S F N D Y L S A A N M L Y P I P A N A T N V P I
AB2	BAG48779.1	(632)	Y A T F F P M A H N T A S T L E A M L R N D T N D Q S F N D Y L S A A N M L Y P I P A N A T N V P I
AB5	BAG48782.1	(616)	Y A T F F P M A H N T A S T L E A M L R N D T N D Q S F N D Y L S A A N M L Y P I P A N A T N V P I
AB3	BAG48780.1	(608)	Y A T F F P M A H N T A S T L E A M L R N D T N D Q S F N D Y L S A A N M L Y P I P A N A T N I P I
AB7	BAG48784.1	(601)	Y A T F F P M A H N T A S T L E A M L R N D T N D Q S F N D Y L S A A N M L Y P I P A N A T N I P I
AB14	BAG48791.1	(608)	Y A T F F P M A H N T A S T L E A M L R N D T N D Q S F N D Y L S A A N M L Y P I P A N A T N I P I
AB21	BAG48798.1	(613)	Y A T F F P M A H N T A S T L E A M L R N D T N D Q S F N D Y L S A A N M L Y P I P A N A T N V P I
AB4	BAG48781.1	(600)	Y A T F F P M A H N T A S T L E A M L R N D T N D Q S F N D Y L S A A N M L Y P I P A N A T N V P I
AB19	BAG48796.1	(615)	Y A T F F P M A H N T A S T L E A M L R N D T N D Q S F N D Y L S A A N M L Y P I P A K A T N V P I
AB8	BAG48785.1	(606)	Y A T F F P M A H N T A S T L E A M L R N D T N D Q S F N D Y L S A A N M L Y P I P A K A T N V P I
		701	750
AB1	BAG48778.1	(678)	S I P S R N W A A F R G W A F T R L K T K E T P S L G S G D P Y Y T Y S G S I P Y L D G T F Y L N
AB6	BAG48783.1	(677)	S I P S R N W A A F R G W A F T R L K T K E T P S L G S G D P Y Y T Y S G S I P Y L D G T F Y L N
AB2	BAG48779.1	(682)	S I P S R N W A A F R G W A F T R L K T K E T P S L G S G D P Y Y T Y S G S I P Y L D G T F Y L N
AB5	BAG48782.1	(666)	S I P S R N W A A F R G W A F T R L K T K E T P S L G S G D P Y Y T Y S G S I P Y L D G T F Y L N
AB3	BAG48780.1	(658)	S I P S R N W A A F R G W S F T R L K T K E T P S L G S G F D P Y F V Y S G S I P Y L D G T F Y L N
AB7	BAG48784.1	(651)	S I P S R N W A A F R G W S F T R L K T K E T P S L G

AB8	BAG48785.1	(656)	SIPSRNWAAFRGWSFTRLKTKETPSLGSGFDPYFVYSGTIPYLDGTFYLN	751	800
AB1	BAG48778.1	(728)	HTFKKVAITFDSSVSWPGNDRLLTPNEFEIKRSVDGEGYNVAQCNMTKDW		
AB6	BAG48783.1	(727)	HTFKKVAITFDSSVSWPGNDRLLTPNEFEIKRSVDGEGYNVAQCNMTKDW		
AB2	BAG48779.1	(732)	HTFKKVAITFDSSVSWPGNDRLLTPNEFEIKRSVDGEGYNVAQCNMTKDW		
AB5	BAG48782.1	(716)	HTFKKVAITFDSSVSWPGNDRLLTPNEFEIKRSVDGEGYNVAQCNMTKDW		
AB3	BAG48780.1	(708)	HTFKKVSIMFDSSVSWPGNDRLLSPNEFEIKRTVDGEGYNVAQCNMTKDW		
AB7	BAG48784.1	(701)	HTFKKVSIMFDSSVSWPGNDRLLSPNEFEIKRTVDGEGYNVAQCNMTKDW		
AB14	BAG48791.1	(708)	HTFKKVSIMFDSSVSWPGNDRLLSPNEFEIKRTVDGEGYNVAQCNMTKDW		
AB21	BAG48798.1	(713)	HTFKKVSIMFDSSVSWPGNDRLLSPNEFEIKRTVDGEGYNVAQCNMTKDW		
AB4	BAG48781.1	(700)	HTFKKVSITFDSSVSWPGNDRLLTPNEFEIKRTVDGEGYNVAQCNMTKDW		
AB19	BAG48796.1	(715)	HTFKKVSIMFDSSVSWPGNDRLLTPNEFEIKRSVDGEGYNVAQCNMTKDW		
AB8	BAG48785.1	(706)	HTFKKVSIMFDSSVSWPGNDRLLTPNEFEIKRSVDGEGYNVAQCNMTKDW	801	850
AB1	BAG48778.1	(778)	FLVQMLANYNIGYQGFYIPEASYKDRMYSFFRNFPMSRQVVDTKYKDYQ		
AB6	BAG48783.1	(777)	FLVQMLANYNIGYQGFYIPEASYKDRMYSFFRNFPMSRQVVDTKYKDYQ		
AB2	BAG48779.1	(782)	FLVQMLANYNIGYQGFYIPEASYKDRMYSFFRNFPMSRQVVDTKYKDYQ		
AB5	BAG48782.1	(766)	FLVQMLANYNIGYQGFYIPEASYKDRMYSFFRNFPMSRQVVDTKYKDYQ		
AB3	BAG48780.1	(758)	FLVQMLANYNIGYQGFYIPEGYKDRMYSFFRNFPMSRQVVDENVYTDYK		
AB7	BAG48784.1	(751)	FLVQMLANYNIGYQGFYIPEGYKDRMYSFFRNFPMSRQVVDENVYTDYK		
AB14	BAG48791.1	(758)	FLVQMLANYNIGYQGFYIPEGYKDRMYSFFRNFPMSRQVVDENVYKDFK		
AB21	BAG48798.1	(763)	FLVQMLANYNIGYQGFYVPEGYKDRMYSFFRNFPMSRQVVDENVYKDYK		
AB4	BAG48781.1	(750)	FLVQMLAHYNIGYQGFYVPEGYKDRMYSFFRNFPMSRQVVDENVYKDYQ		
AB19	BAG48796.1	(765)	FLVQMLS HYNIGYQGFHVPEGYKDRMYSFFRNFPMSRQVVDENVYKDYK		
AB8	BAG48785.1	(756)	FLVQMLS HYNIGYQGFHVPEGYKDRMYSFFRNFPMSRQVVDENVYKDYK	851	900
AB1	BAG48778.1	(828)	QVGI LQHNNSGFVGYLAPTMREGQAYPANFPYPLIGKTAVDSITQKKFL		
AB6	BAG48783.1	(827)	QVGI I LQHNNSGFVGYLAPTMREGQAYPANVPYPLIGKTAVDSITQKKFL		
AB2	BAG48779.1	(832)	QVGI LQHNNSGFVGYLAPTMREGQAYPANVPYPLIGKTAVDSITQKKFL		
AB5	BAG48782.1	(816)	QVGI LQHNNSGFVGYLAPTMREGQAYPANFPYPLIGKTAVDSITQKKFL		
AB3	BAG48780.1	(808)	AVTLPYQHNNSGFVGYLAPTMRQGEFYPANYPYPLIGTTAVKSVTQKKFL		
AB7	BAG48784.1	(801)	AVTLPYQHNNSGFVGYLAPTMRQGEFYPANYPYPLIGTTAVKSVTQKKFL		
AB14	BAG48791.1	(808)	AVAI P YQHNNSGFVGYM APTMRQGPYPANYPYPLIGTTAVNSVTQKKFL		
AB21	BAG48798.1	(813)	AVAVPYQHNNSGFVGYM APTMRQGPAYPANYPYPLIGTTAVT SVTQKKFL		
AB4	BAG48781.1	(800)	AVT LAYQHNNSGFVGYLAPTMRQGPYPANYPYPLIGKSAVT SVTQKKFL		
AB19	BAG48796.1	(815)	AVT L P FQHNNSGFTGYLAPTMRQGPYPANFPYPLIGSTAVPSVTQKKFL		
AB8	BAG48785.1	(806)	AVAL P FQHNNSGFTGYLAPTLRQGPYPANFPYPLIGQTAVPSVTQKKFL	901	950
AB1	BAG48778.1	(878)	CDRTLWRIPFSSNFMSMGALTDLGQNLLYANSAHALDMT FEVDPMDEFTL		
AB6	BAG48783.1	(877)	CDRTLWRIPFSSNFMSMGALTDLGQNLLYANSAHALDMT FEVDPMDEFTL		
AB2	BAG48779.1	(882)	CDRTLWRIPFSSNFMSMGALTDLGQNLLYANSAHALDMT FEVDPMDEFTL		
AB5	BAG48782.1	(866)	CDRTLWRIPFSSNFMSMGALTDLGQNLLYANSAHALDMT FEVDPMDEFTL		
AB3	BAG48780.1	(858)	CDRTMWRIPFSSNFMSMGALTDLGQNMLYANSAHALDMT FEVDPMDEFTL		
AB7	BAG48784.1	(851)	CDRTMWRIPFSSNFMSMGALTDLGQNMLYANSAHALDMT FEVDPMDEFTL		
AB14	BAG48791.1	(865)	CDRTMWRIPFSSNFMSMGALTDLGQNMLYANSAHALDMT FEVDPMDEFTL		
AB21	BAG48798.1	(863)	CDRTMWRIPFSSNFMSMGALTDLGQNLLYANSAHALDMT FEVDPMDEFTL		
AB4	BAG48781.1	(850)	CDRVMWRIPFSSNFMSMGALTDLGQNMLYANSAHALDMN FEVDPMDEFTL		
AB19	BAG48796.1	(865)	CDRVMWRIPFSSNFMSMGALTDLGQNMLYANSAHALDMT FEVDPMDEFTL		
AB8	BAG48785.1	(856)	CDRVMWRIPFSSNFMSMGALTDLGQNMLYANSAHALDMT FEVDPMDEFTL	951	987
AB1	BAG48778.1	(928)	LYVLFVDFVVRVHQPHRGVIE TVYLRTPPFSAGNATT		
AB6	BAG48783.1	(927)	LYVLFVDFVVRVHQPHRGVIE TVYLRTPPFSAGNATT		
AB2	BAG48779.1	(932)	LYVLFVDFVVRVHQPHRGVIE TVYLRTPPFSAGNATT		
AB5	BAG48782.1	(916)	LYVLFVDFVVRVHQPHRGVIE TVYLRTPPFSAGNATT		
AB3	BAG48780.1	(908)	LYLLFVDFVVRVHQPHRGVIEAVYLRTPPFSAGNATT		
AB7	BAG48784.1	(901)	LYLLFVDFVVRVHQPHRGVIEAVYLRTPPFSAGNATT		
AB14	BAG48791.1	(908)	LYLLFVDFVVRVHQPHRGVIE TVYLRTPPFSAGNATT		
AB21	BAG48798.1	(913)	LYLLFVDFVVRVHQPHRGVIEAVYLRTPPFSAGNATT		
AB4	BAG48781.1	(900)	LYVVFVDFVVRVHQPHRGVIEAVYLRTPPFSAGNATT		
AB19	BAG48796.1	(915)	LYLLFVDFVVRVHQPHRGVIEAVYLRTPPFSAGNATT		
AB8	BAG48785.1	(906)	LYLLFVDFVVRVHQPHRGVIEAVYLRTPPFSAGNATT		

Приложение Б

**Множественные нуклеотидные выравнивания секвенированных генов фибриллы
и последовательностей, кодирующих фибриллу аденовирусов 4 и 7 типов**

Лаб. номер вируса		Аминокислотная последовательность	
		151	200
hAdV-E-4-fiber	(151)	CTGGCCGACC	CTGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAAGCTGGG
1928	(1)	-----	CTGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
1934	(1)	-----	CTGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
1935	(1)	-----	CTGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
2132	(1)	-----	CTGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
2133	(1)	-----	CTGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
2134	(1)	-----	CTGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
2135	(1)	-----	CTGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
2138	(42)	CTGGCCGACC	CTGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
2154	(1)	-----	CTGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
2152	(1)	-----	CTGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
157	(1)	-TGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
164	(1)	-TGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
166	(1)	-TGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
171	(1)	-TGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
179	(1)	-TGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
305	(1)	-TGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
317	(1)	-TGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
325	(1)	-TGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
326	(1)	-TGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
724	(1)	-TGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
741	(1)	-TGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
749	(1)	-TGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
756	(1)	-TGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
761	(1)	-TGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
196	(26)	CTGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
227	(61)	CTGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
381	(54)	CTGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
379	(37)	CTGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
385	(21)	CTGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
407	(59)	CTGGCCGACCCT	TGTCACCACCAAGAATGGGGAAATCACCCCTCAATCTGGG
		201	250
hAdV-E-4-fiber	(201)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTAA	
1928	(41)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
1934	(41)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
1935	(41)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
2132	(41)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
2133	(41)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
2134	(41)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
2135	(41)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
2138	(92)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
2154	(41)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
2152	(41)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
157	(50)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
164	(50)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
166	(50)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
171	(50)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
179	(50)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
305	(50)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
317	(50)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
325	(50)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
326	(50)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
724	(50)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	
741	(50)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA	

	749	(50)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA
	756	(50)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA
	761	(50)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA
	196	(76)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA
	227	(111)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA
	381	(104)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA
	379	(87)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA
	385	(71)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA
	407	(109)	GGAGGGGGTGGACCTTGACGACTCGGGAAAACTCATTGCAAACACAGTCA
		251	300
hAdV-E-4-fiber	(251)		ACAAGGCCATTGCCCTCTCAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	1928	(91)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	1934	(91)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	1935	(91)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	2132	(91)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	2133	(91)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	2134	(91)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	2135	(91)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	2138	(142)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	2154	(91)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	2152	(91)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	157	(100)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	164	(100)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	166	(100)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	171	(100)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	179	(100)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	305	(100)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	317	(100)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	325	(100)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	326	(100)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	724	(100)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	741	(100)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	749	(100)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	756	(100)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	761	(100)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	196	(126)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	227	(161)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	381	(154)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	379	(137)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	385	(121)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
	407	(159)	ACAAGGCCATTGCCCTCTTAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCTTAAC
		301	350
hAdV-E-4-fiber	(301)		ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	1928	(141)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	1934	(141)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	1935	(141)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	2132	(141)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	2133	(141)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	2134	(141)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	2135	(141)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	2138	(192)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	2154	(141)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	2152	(141)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	157	(150)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	164	(150)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	166	(150)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	171	(150)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	179	(150)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	305	(150)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	317	(150)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	325	(150)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	326	(150)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC
	724	(150)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACTATCCTTACAAGTTTC

	741	(150)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACATATCCTTACAAGTTTC
	749	(150)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACATATCCTTACAAGTTTC
	756	(150)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACATATCCTTACAAGTTTC
	761	(150)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACATATCCTTACAAGTTTC
	196	(176)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACATATCCTTACAAGTTTC
	227	(211)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACATATCCTTACAAGTTTC
	381	(204)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACATATCCTTACAAGTTTC
	379	(187)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACATATCCTTACAAGTTTC
	385	(171)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACATATCCTTACAAGTTTC
	407	(209)	ATGGATACCCCTTTATACACCAAAGATGGAAAACATATCCTTACAAGTTTC
		351	400
hAdV-E-4-fiber	(351)		TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	1928	(191)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	1934	(191)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	1935	(191)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	2132	(191)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	2133	(191)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	2134	(191)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	2135	(191)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	2138	(242)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	2154	(191)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	2152	(191)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	157	(200)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	164	(200)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	166	(200)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	171	(200)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	179	(200)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	305	(200)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	317	(200)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	325	(200)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	326	(200)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	724	(200)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	741	(200)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	749	(200)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	756	(200)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	761	(200)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	196	(226)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	227	(261)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	381	(254)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	379	(237)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	385	(221)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
	407	(259)	TCCACCATTAAGTATATTAAGATCAACAATTCTAAATACATTAGCTCTAG
		401	450
hAdV-E-4-fiber	(401)		CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	1928	(241)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	1934	(241)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	1935	(241)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	2132	(241)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	2133	(241)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	2134	(241)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	2135	(241)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	2138	(292)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	2154	(241)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	2152	(241)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	157	(250)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	164	(250)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	166	(250)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	171	(250)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	179	(250)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	305	(250)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	317	(250)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	325	(250)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
	326	(250)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA

724	(250)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
741	(250)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
749	(250)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
756	(250)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
761	(250)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
196	(276)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
227	(311)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
381	(304)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
379	(287)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
385	(271)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
407	(309)	CTTTTGGCTCAGGTTTAGGACTGCGTGGCAGCGCTCTGGCAGTACAGTTA
		451 500
hAdV-E-4-fiber	(451)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
1928	(291)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
1934	(291)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
1935	(291)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
2132	(291)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
2133	(291)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
2134	(291)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
2135	(291)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
2138	(342)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
2154	(291)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
2152	(291)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
157	(300)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
164	(300)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
166	(300)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
171	(300)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
179	(300)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
305	(300)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
317	(300)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
325	(300)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
326	(300)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
724	(300)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
741	(300)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
749	(300)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
756	(300)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
761	(300)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
196	(326)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
227	(361)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
381	(354)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
379	(337)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
385	(321)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
407	(359)	GCCTCTCCACTTACATTTGATGATAAAGGGAATATAAAGATTACCCTAAA
		501 550
hAdV-E-4-fiber	(501)	CAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATCAGTT
1928	(341)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
1934	(341)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
1935	(341)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
2132	(341)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
2133	(341)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
2134	(341)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
2135	(341)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
2138	(392)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
2154	(341)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
2152	(341)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
157	(350)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
164	(350)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
166	(350)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
171	(350)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
179	(350)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
305	(350)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
317	(350)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT
325	(350)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATAGTT

326	(350)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATTAGTT
724	(350)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATTAGTT
741	(350)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATTAGTT
749	(350)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATTAGTT
756	(350)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATTAGTT
761	(350)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATTAGTT
196	(376)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATTAGTT
227	(411)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATTAGTT
381	(404)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATTAGTT
379	(387)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATTAGTT
385	(371)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATTAGTT
407	(409)	TAGGGGATTGCATGTTACAACAGGAAATGCAATTGAAAGCAACATTAGTT
		551 600
hAdV-E-4-fiber	(551)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
1928	(391)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
1934	(391)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
1935	(391)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
2132	(391)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
2133	(391)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
2134	(391)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
2135	(391)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
2138	(442)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
2154	(391)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
2152	(391)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
157	(400)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
164	(400)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
166	(400)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
171	(400)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
179	(400)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
305	(400)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
317	(400)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
325	(400)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
326	(400)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
724	(400)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
741	(400)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
749	(400)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
756	(400)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
761	(400)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
196	(426)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
227	(461)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
381	(454)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
379	(437)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
385	(421)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
407	(459)	GGGCTAAAGGTATAAAATTTGAAGATGGTGCCATAGCTACAAACATTGGT
		601 650
hAdV-E-4-fiber	(601)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
1928	(441)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
1934	(441)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
1935	(441)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
2132	(441)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
2133	(441)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
2134	(441)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
2135	(441)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
2138	(492)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
2154	(441)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
2152	(441)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
157	(450)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
164	(450)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
166	(450)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
171	(450)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
179	(450)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
305	(450)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
317	(450)	AAGGGGCTAGAGTTGGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC

325	(450)	AAGGGGCTAGAGTTT	GGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
326	(450)	AAGGGGCTAGAGTTT	GGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
724	(450)	AAGGGGCTAGAGTTT	GGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
741	(450)	AAGGGGCTAGAGTTT	GGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
749	(450)	AAGGGGCTAGAGTTT	GGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
756	(450)	AAGGGGCTAGAGTTT	GGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
761	(450)	AAGGGGCTAGAGTTT	GGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
196	(476)	AAGGGGCTAGAGTTT	GGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
227	(511)	AAGGGGCTAGAGTTT	GGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
381	(504)	AAGGGGCTAGAGTTT	GGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
379	(487)	AAGGGGCTAGAGTTT	GGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
385	(471)	AAGGGGCTAGAGTTT	GGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
407	(509)	AAGGGGCTAGAGTTT	GGAACCAGTAGTACAGAAACAGGAGTTAATAATGC
		651	700
hAdV-E-4-fiber	(651)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGCT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
1928	(491)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
1934	(491)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
1935	(491)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
2132	(491)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
2133	(491)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
2134	(491)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
2135	(491)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
2138	(542)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
2154	(491)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
2152	(491)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
157	(500)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
164	(500)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
166	(500)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
171	(500)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
179	(500)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
305	(500)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
317	(500)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
325	(500)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
326	(500)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
724	(500)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
741	(500)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
749	(500)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
756	(500)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
761	(500)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
196	(526)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
227	(561)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
381	(554)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
379	(537)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
385	(521)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
407	(559)	TTATCCAATCCAAGTTAAACTTGGAT	TCTGGTCTCAGCTTTGACAGCACAG
		701	750
hAdV-E-4-fiber	(701)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
1928	(541)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
1934	(541)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
1935	(541)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
2132	(541)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
2133	(541)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
2134	(541)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
2135	(541)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
2138	(592)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
2154	(541)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
2152	(541)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
157	(550)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
164	(550)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
166	(550)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
171	(550)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
179	(550)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
305	(550)	GAGCTATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA

317	(550)	GAGC	TATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
325	(550)	GAGC	TATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
326	(550)	GAGC	TATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
724	(550)	GAGC	TATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
741	(550)	GAGC	TATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
749	(550)	GAGC	TATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
756	(550)	GAGC	TATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
761	(550)	GAGC	TATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
196	(576)	GAGC	TATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
227	(611)	GAGC	TATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
381	(604)	GAGC	TATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
379	(587)	GAGC	TATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
385	(571)	GAGC	TATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
407	(609)	GAGC	TATAATGGCTGGCAATAAAGACTATGATAAAATTAAC	TTGTGGACA
		751		800
hAdV-E-4-fiber	(751)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
1928	(591)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
1934	(591)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
1935	(591)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
2132	(591)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
2133	(591)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
2134	(591)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
2135	(591)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
2138	(642)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
2154	(591)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
2152	(591)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
157	(600)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAA	-----
164	(600)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAA	-----
166	(600)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAA	-----
171	(600)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAA	-----
179	(600)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAA	-----
305	(600)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAA	-----
317	(600)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAA	-----
325	(600)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAA	-----
326	(600)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAA	-----
724	(600)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAA	-----
741	(600)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAA	-----
749	(600)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAA	-----
756	(600)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAA	-----
761	(600)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAA	-----
196	(626)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
227	(661)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
381	(654)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
379	(637)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
385	(621)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
407	(659)	ACGCCTGACCCATCACCAA	AACTGTCAAATACTTGCAGAAAATGATGCAAA	
		801		850
hAdV-E-4-fiber	(801)	ACTAACACTTTGCTTAACTA	AGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	
1928	(641)	ACTAACACTTTGCTTAACTA	AGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	
1934	(641)	ACTAACACTTTGCTTAACTA	AGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	
1935	(641)	ACTAACACTTTGCTTAACTA	AGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	
2132	(641)	ACTAACACTTTGCTTAACTA	AGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	
2133	(641)	ACTAACACTTTGCTTAACTA	AGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	
2134	(641)	ACTAACACTTTGCTTAACTA	AGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	
2135	(641)	ACTAACACTTTGCTTAACTA	AGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	
2138	(692)	ACTAACACTTTGCTTAACTA	AGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	
2154	(641)	ACTAACACTTTGCTTAACTA	AGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	
2152	(641)	ACTAACACTTTGCTTAACTA	AGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	
196	(676)	ACTAACACTTTGCTTAACTA	AGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	
227	(711)	ACTAACACTTTGCTTAACTA	AGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	
381	(704)	ACTAACACTTTGCTTAACTA	AGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	
379	(687)	ACTAACACTTTGCTTAACTA	AGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	
385	(671)	ACTAACACTTTGCTTAACTA	AGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	

407	(709)	ACTAACACTTTGCTTAACTAAGTGTGACAGTCAAATACTGGCCACTGTAT	
		851	900
hAdV-E-4-fiber	(851)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
1928	(691)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
1934	(691)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
1935	(691)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
2132	(691)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
2133	(691)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
2134	(691)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
2135	(691)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
2138	(742)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
2154	(691)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
2152	(691)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
196	(726)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
227	(761)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
381	(754)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
379	(737)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
385	(721)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
407	(759)	CAGTTTTGGTTGTTAGAAGTGGAAACTTAAACCCAATTACTGGCACAGTA	
		901	950
hAdV-E-4-fiber	(901)	AGCAGTGCTCAAGTTTTTCTACGTTTGGATGCAAAATGGTGTTCCTTTTAAC	
1928	(741)	AGCAGTGCTCAAGTTTTTCTACGTTTGGATGCAAACGGTGTTCCT	-----
1934	(741)	AGCAGTGCTCAAGTTTTTCTACGTTT	-----
1935	(741)	AGCAGTGCTCAAGTTTTTCTACGTTTGGATGCAAACGGTGTTCCT	-----
2132	(741)	AGCAGTGCTCAAGTTTTTCTACGTTTGGATGCAAACGGTGTTCCT	-----
2133	(741)	AGCAGTGCTCAAGTTTTTCTACGTTTGGATGCAAACGGTGTTCCT	-----
2134	(741)	AGCAGTGCTCAAGTTTTTCTACGTTTGGATGCAAACGGTGTTCCT	-----
2135	(741)	AGCAGTGCTCAAGTTTTTCTACGTTTGGATGCAAACGGTGTTCCT	-----
2138	(792)	AGCAGTGCTCAAGTTTTTCTACGTTTGA	-----
2154	(741)	AGCAGTGCTCAAGTTTTTCTACGTTTGGATGCAAACGGTGTTCCT	-----
2152	(741)	AGCAGTGCTCAAGTTTTTCTACGTT	-----
196	(776)	AGCAGTGCTCAAGTTTTTCTACGTTTTGGATGCAAACGGTGT	-----
227	(811)	AGCAGTGCTCAAGTTTTTCTACGTTTTGGATGCAAACGGT	-----
381	(804)	AGCAGTGCTCAAGTTTTTCTACGTTTTGGATGCAAACGGTGTCTTTTAAC	
379	(787)	AGCAGTGCTCAAGTTTTTCTACGTTTTGGATGCAAAA	-----
385	(771)	AGCAGTGCTCAAGTTTTTCTACGTTTTGGATGCAAACGGTGT	-----
407	(809)	AGCAGTGCTCAAG	-----

Лаб.номер вируса			Аминокислотная последовательность
		101	150
hAdV-B-7-fiber	(101)	CCCCAAATGGCTTTACACAAAGCC	CAGACGGAGTTCTTACTTTAAAATGT
748	(1)	-----	CAGACGGAGTTCTTACTTTAAAATGT
		151	200
hAdV-B-7-fiber	(151)	TTAACCCCACTAACAACCACAGGCGGGTCTCTACAGTTAAAAGTGGGAGG	
748	(27)	TTAACCCCACTAACAACCACAGGCGGGTCTCTACAGTTAAAAGTGGGAGG	
		201	250
hAdV-B-7-fiber	(201)	GGGTCTTACAATAGATGACACCGACGGTTTTTTGAAAGAAAAACATAAGTG	
748	(77)	GGGTCTTACAATAGATGACACCGACGGTTTTTTGAAAGAAAAACATAAGTG	
		251	300
hAdV-B-7-fiber	(251)	CCACCACACCACTCGTTAAGACTGGTCACTCTATAGGTTTGTGCGCTAGGA	
748	(127)	CCACCACACCACTCGTTAAGACTGGTCACTCTATAGGTTTGTGCGCTAGGA	
		301	350
hAdV-B-7-fiber	(301)	CCCGGATTAGGAACAAATGAAAACAAACTTTGTGCCAAATTTGGGAGAAGG	
748	(177)	CCCGGATTAGGAACAAATGAAAACAAACTTTGTGCCAAATTTGGGAGAAGG	
		351	400
hAdV-B-7-fiber	(351)	ACTTACATTCAATTCCAACAACATTTGCATTAATGACAATATTAACACCC	
748	(227)	ACTTACATTCAATTCCAACAACATTTGCATTAATGACAATATTAACACCC	
		401	450
hAdV-B-7-fiber	(401)	TATGGACAGGAGTTAACCCCAACAGAGCCAAGTCAAAATAATGGCCTCC	
748	(277)	TATGGACAGGAGTTAACCCCAACAGAGCCAAGTCAAAATAATGGCCTCC	
		451	500
hAdV-B-7-fiber	(451)	AGTGAATCTAATGATTGCAAATTAATTCTAACACTAGTTAAAACCTGGAGC	
748	(327)	AGTGAATCTAATGATTGCAAATTAATTCTAACACTAGTTAAAACCTGGAGC	
		501	550
hAdV-B-7-fiber	(501)	CCTCGTCACTGCATTTGTTTATGTTATAGGAGTATCTAACGATTTTAATA	
748	(377)	CCTCGTCACTGCATTTGTTTATGTTATAGGAGTATCTAACGATTTTAATA	
		551	600
hAdV-B-7-fiber	(551)	TGCTAACTACACATAAAAAATATAAATTTCACTGCAGAGCTGTTTTTTGAT	
748	(427)	TGCTAACTACACATAAAAAATATAAATTTCACTGCAGAGCTGTTTTTTGAT	
		601	650
hAdV-B-7-fiber	(601)	TCTACTGGTAATTTATTAAGTACCTTTTCATCCCTAAAAACTCCACTTAA	
748	(477)	TCTACTGGTAATTTATTAAGTACCTTTTCATCCCTAAAAACTCCACTTAA	
		651	700
hAdV-B-7-fiber	(651)	TCATAAATCAGGGCAAAACATGGCTACTGGTGCCCTTACTAATGCTAAAG	
748	(527)	TCATAAATCAGGGCAAAACATGGCTACTGGTGCCCTTACTAATGCTAAAG	
		701	750
hAdV-B-7-fiber	(701)	GTTTCATGCCAGCACAACCTGCCTATCCTTTCAATGTTAATTCAGAGAA	
748	(577)	GTTTCATGCC-----	