

На правах рукописи

Тимошичева Татьяна Александровна

РАЗРАБОТКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ГЕКСОНУ
АДЕНОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА

03.02.02 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Амосова Ирина Викторовна

Официальные оппоненты:

Ведущая организация:

Защита диссертации состоится _____ в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.043.01 при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (197376, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17), тел. (812) 499 15 00; e-mail: office@influenza.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17); на сайте <http://www.influenza.spb.ru>

Автореферат разослан _____
(дата)

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидат биологических наук

Амосова И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В России ежегодно регистрируется около 50 миллионов случаев инфекционных заболеваний. До 95% из них приходится на острые респираторные вирусные инфекции (Европейское руководство ВОЗ по эпиднадзору за гриппом среди людей, 2011). Наиболее важное место в развитии патологии дыхательных путей занимают вирусы гриппа, респираторно-синцитиальный вирус и аденовирусы. В отличие от других респираторных вирусов, для циркуляции аденовирусов не показано чёткой сезонной зависимости, вспышки аденовирусной инфекции регистрируются на протяжении всего года (Walter J.M. et al., 2017). При респираторной форме аденовирусной инфекции в первую очередь поражаются верхние дыхательные пути, возможно развитие осложнений в виде бронхитов, бронхолитов, пневмоний, энцефалитов, менингитов, миокардитов, особенно у пациентов с иммуносупрессией (Rautonen J., 1991, Wold W. et al., 2013). 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 (O'Shea M.K., 2013, Львов Н.И., 2016) и до трети – среди детского населения (Яцышина С.Б., 2015). Описаны случаи смертельных исходов аденовирусной пневмонии среди детей, а также среди военнослужащих армий России, Канады и США. Причины, по которым такие серьезные заболевания возникают и приводят к летальному исходу пациентов без нарушений иммунитета, остаются неясными.

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 (Львов Н.И., 2016). 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 при использовании 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 (Chen L. et al., 2019, Wang H. et al., 2019, Malik A. et al., 2015, Guo C. et al., 2018, Yasuhara A. et al., 2017), так и отечественных (Климова Р.Р. и др., 2011, Масалова О.В. и др., 2011, Федорова Н.Е. и др., 2008, Сорокин Е.В. и др., 2018) 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 (González L.A. et al., 2018), в Китае получены МКА к фибрилле актуальных типов аденовирусов (Tian X. et al., 2018). Однако МКА, полученные к фибрилле, обладают субтиповой, а часто и штаммовой специфичностью, что делает их непригодными для создания тест-систем с широким диагностическим диапазоном. Для получения МКА широкого спектра, способных эффективно выявлять аденовирусы различных типов, в качестве иммуногена целесообразно использовать гексон, являющийся общим высококонсервативным белком для всех представителей рода *Mastadenovirus*. Подобные разработки в настоящее время ведутся в Бразилии (Paulini I. et al., 2017) и Китае (Tian X. et al., 2015, Liu M. et al., 2014, Qiu H. et al., 2009). В России разработкой МКА к гексону аденовирусов занимались в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, в ходе исследований получены МКА 7F1 (в настоящее время гибридома-продуцент утрачена) и МКА #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 работы

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 полученных результатов

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 гибридной 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».

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 в проведенное исследование. 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 респираторно-синцитиальный вирус (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. Методическая помощь автору была оказана сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России при проведении масс-спектрометрического анализа белков, вестерн-блоттинга и секвенировании геномов аденовирусов методом Сенжера.

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 и III Российском конгрессе лабораторной медицины (Россия, Москва, 2016, 2017), IX Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Россия, Москва, 2017), Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика» (Россия, Москва, 2017), Международной научно-практической конференции

«Молекулярная диагностика 2018» (Республика Беларусь, Минск, 2018), IV научно-практической международной конференции «Современные биотехнологии для науки и практики» (Россия, Санкт-Петербург, 2017), 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) и др.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 5 статей, 3 из которых в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные культуры А 549 (карцинома легкого человека), МА-104 (эпителий почки эмбриона макаки), аденовирусы 3, 4, 6 и 19 типов и респираторно-синцитиальный вирус, штамм Long (РСВ), получены из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Биохимическим методом из вирусосодержащей культуральной жидкости, полученной при культивировании аденовируса 6 типа в культуре клеток А 549, выделен гексон. Аминокислотная последовательность очищенного гексона подтверждена методом масс-спектрометрического анализа.

Мышей линии BALB/c двукратно иммунизировали очищенным гексоном по 50 и 30 мкг на мышь с интервалом в 6 недель. Через 3 дня после второй иммунизации проводили гибридизацию спленоцитов иммунизированных мышей с клетками мышинной миеломы. Через 2 недели после слияния проводили тестирование антител, продуцируемых гибридами, методом микрокультурального ИФА (мкИФА) с использованием клеточной культуры А 549, зараженной аденовирусами 3, 4, 6 и 19 типов. В качестве отрицательных контролей использовали неинфицированную культуру А 549, а также клеточную культуру МА-104, инфицированную РСВ.

Направленность МКА определяли методом иммуноблоттинга. Специфическую активность МКА оценивали в непрямом ИФА с очищенным аденовирусом 6 типа и в непрямом ИФЛ с аденовирусами 3, 4, 6 и 19 типов. В качестве препарата сравнения использовали МКА #6, ранее полученные и охарактеризованные в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Конъюгацию МКА с пероксидазой хрена проводили перйодатным методом согласно (Tijssen P., 1985). Конъюгацию МКА с биотином проводили с использованием набора EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo scientific, кат. № 21335) в соответствии с инструкцией производителя. Конъюгацию МКА с ФИТЦ проводили согласно (McKinney R., 1976). Свойства полученных конъюгатов при выявлении аденовирусов разных типов, в том числе из клинических образцов, исследовали методами ИФА, сэндвич-ИФА и ИФЛ.

Исследовали 991 назофарингеальный мазок от пациентов, госпитализированных с симптомами респираторного заболевания в военно-медицинские организации МО РФ Северо-Западного региона РФ в 2014-2017 гг. Выявление нуклеиновых кислот возбудителей ОРВИ в клинических образцах проводили методом ПЦР в реальном 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».

Секвенирование гена, кодирующего фибриллу обнаруженных аденовирусов, проводили по методу Сенжера с использованием коммерческого набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing 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). Сборку, хранение и обработку секвенированных последовательностей проводили в программе Vector NTI 10 Advance с использованием алгоритма CLUSTAL W (Thompson J.D., et al., 1994). Филогенетическое дерево строили в программе MEGA 6.

Диагностические свойства разработанных МКА исследовали в мКИФА, сэндвич-ИФА и ИФЛ с клиническими образцами.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2010 и Statistica 5.0. Различия считали статистически значимыми для значений $p < 0,05$. Для представления полученных данных использовали такие показатели описательной статистики, как среднеарифметическое значение и стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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, необходимо использовать высокоочищенный белок, обладающий сходной антигенной структурой среди патогенных для человека представителей семейства *Mastadenovirus*. Гексон аденовирусов несет в своем составе обширный консервативный участок с родоспецифическими детерминантами (вариабельность аминокислотного состава этого участка белка составляет менее 15%). На долю гексона приходится около 60% массы вирионов аденовирусов, в инфицированных клетках гексон синтезируется в значительном избытке, только 20-30% белка используется для сборки вирусных частиц, что позволяет эффективно выявлять его в инфицированных клетках.

Очищенный гексон был выделен из вирусосодержащей культуральной жидкости. Для подтверждения чистоты и аминокислотной последовательности полученного гексона проводили электрофорез в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) с последующим масс-спектрометрическим анализом. В качестве контроля использовали очищенный аденовирус 6 типа. При окрашивании ПААГ раствором Кумасси были выявлены белковые зоны, по электрофоретической подвижности соответствующие 90-100 кДа и около 300 кДа, что соответствует описанным в литературе массам мономера и тримера гексона, соответственно. Для определения аминокислотной последовательности белка, содержащегося в окрашенных зонах, соответствующие участки ПААГ вырезали, проводили масс-спектрометрическое исследование и сравнивали с аминокислотной последовательностью гексона аденовируса 6 типа, полученной из базы данных GenBank (рисунок 1).

```

1 MATPSMMPQN SYMHISGQDA SEVLSFGLVQ FARATETVFS LMKKFNPTV
51 APFDVDTDR SQRITLRFIP VDREDTAYX KARFTLAVGD NRVLDMASTY
101 FDIRGVLDRG FTTKFYSGTA YNALAKWGP NSCEWEQNET AQVEAQELDE
151 EENEANEQAQ REQEQAQKTH VYAQAPLSGI KITREGLZIG TADATVAGAG
201 KEIFADKTFQ FEPQVGSQM NEADATAAGG RVLKKTFFMK FCIYSIARPT
251 NSNGGQVMY EQNGKLESQV EMQFFSTSTN ATNEVNNIQF TVVLYSEVDN
301 METFDTHLSY KFKMGDRNAK VMGGQAMFN RENVIAFRDN FIGLMYINST
351 GNMGVLAGQA SQLNAVVDLQ DRNTELSYQL LLDISIGDTR YFSMNGQAVD
401 SYDDVRIIE NHGTEDELFN YCFPLGGIGI TDTFQAVKTT AANGDQNTT
451 WQKDFSTFAE NEIGVGNFPA MEINLNANLW RNFLYSNIAL YLPDKLKYNP
501 TNVEISDNFN TYDINMKRVV APLVDCYIN LGARWELDYM DIVNPFNHR
551 NAGLRYRSMI LGNGRVVFFH IQVQKFFAI KNLLLLPGSY TYEWNFRKDV
601 NMVLQSSLGN DLRVDSASIK FDSICLVATF FPMARNTAST LEAMLRNDTN
651 DQSFNDYLSA ANMLPIFAN ATNVPISIPS FNKAAFRGWA FFRKTKETP
701 SLGSGYDPY TYSGSIPYLD GTFYLNHTFK KVAITFDSV SWFGNDRLIT
751 PNEFEIKRSV DQEGYNVQOC NMTKDWFLVQ MLANYNIGVQ GFYIPESYKD
801 RMYSFFRNFQ FMSRVVDDT KYKDYQQVGI IQHNNNSGEV GYLAPTNRBG
851 QAYFANVYP LIGKTAVDSI TQKKFLCDRT LWRIFPFSNF MSMGALTDIG
901 QNLLYANSAH ALDMTEVDPE MDEPFLLYVL FEVFDVVRVH QPHROVIETV
951 YLRTFFSAGN ATT

```

Рисунок 1 – 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. Равномерное покрытие последовательности указывает на то, что все исследованные образцы содержат полный гексон аденовируса 6 типа.

Очищенный гексон использовали для иммунизации мышей линии Balb/c и получения МКА по стандартной методике [Köhler G., Milstein C. 1976], в результате чего было получено 11 гибридом. Первичный скрининг МКА, содержащихся в культуральной жидкости разработанных гибридом, проводили методом мКИФА. В качестве отрицательных контролей использовали незараженную клеточную культуру А 549 и клеточную культуру МА-104, зараженную гетерологичным РСВ. Результаты первичного скрининга представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты первичного скрининга специфичности разработанных моноклональных антител в отношении аденовирусов разных 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 5A8 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 представлять 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, 5Е11, 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, способностью выявлять аденовирусы обладали 9 из разработанных МКА, шесть из которых (МКА 2Н7, 3F12, 4В7, 5D4, 5Е11, 6В12) выявляли аденовирусы 3, 4, 6 и 19 типов и могут быть перспективными иммунореагентами для использования в различных иммунологических реакциях.

Для определения направленности полученных МКА проводили исследование методом вестерн-блоттинга (рисунок 2).

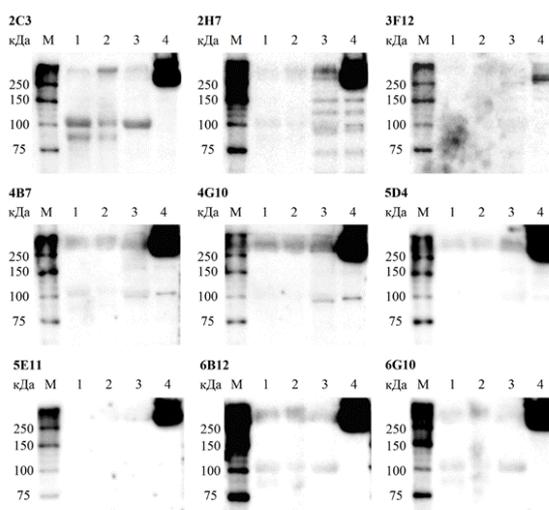


Рисунок 2 - Результаты изучения методом вестерн-блоттинга взаимодействия разработанных моноклональных антител с гексоном аденовируса 6 типа.

Примечание - 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.

Полученные результаты продемонстрировали, что все 9 разработанных МКА связываются преимущественно с нативной формой гексона, присутствующей в составе вирионов аденовируса 6 типа (рисунок 2, дорожка 4).

2. Изучение иммунохимических свойств моноклональных антител

2.1. Исследование специфической активности МКА в ИФА

С помощью ИФА был проведен отбор МКА, обладающих наибольшей специфической активностью в отношении очищенного аденовируса 6 типа (рисунок 3).

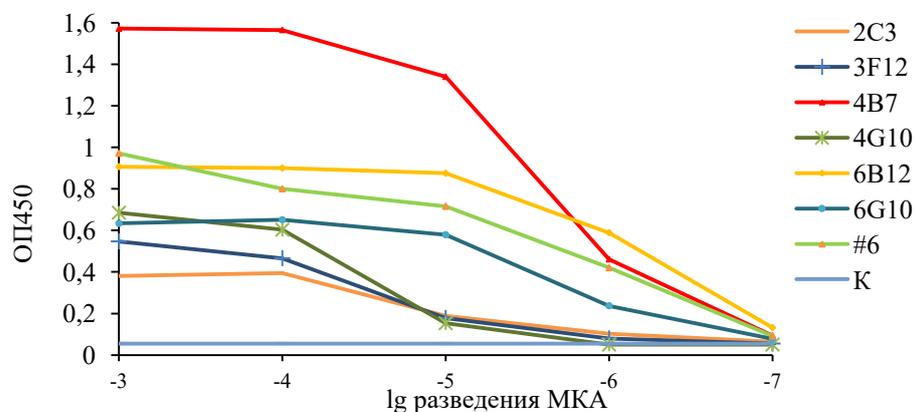


Рисунок 3 – Определение специфической активности моноклональных антител в отношении очищенного аденовируса 6 типа методом иммуноферментного анализа.

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 РСВ 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 слабовыраженной. В качестве отрицательного контроля специфичности МКА использовали очищенный РСВ, неспецифические взаимодействия отсутствовали при исследовании всех МКА.

На следующем этапе исследований МКА 4В7 и МКА 6В12, обладающие наибольшими показателями специфической активности в отношении гексона аденовируса, были конъюгированы с пероксидазой хрена (ПХ) и биотином. Специфическую активность пероксидазных конъюгатов МКА 4В7-ПХ и МКА 6В12-ПХ изучали в прямом варианте ИФА с очищенным аденовирусом 6 типа (рисунок 4).

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.

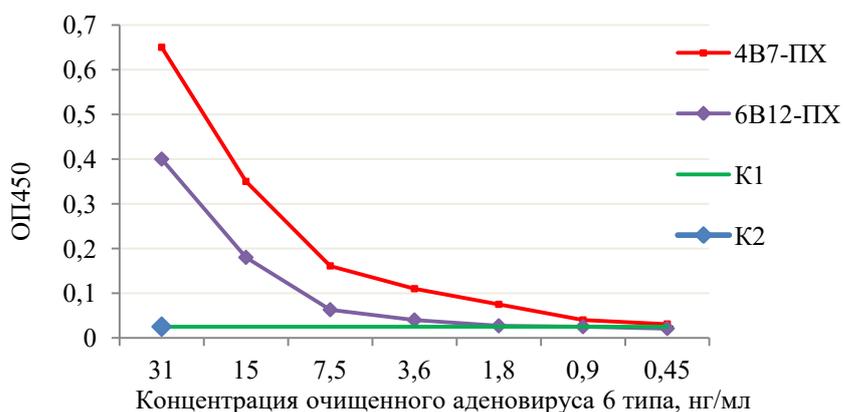


Рисунок 4 – Определение минимальной выявляемой концентрации аденовирусного антигена с использованием пероксидазных конъюгатов моноклональных антител 4B7 и 6B12 методом иммуноферментного анализа.

Примечание – В качестве отрицательного контроля использовали очищенный РСВ в концентрации 1 мг/мл, «K1» - отрицательный контроль для МКА 4B7-ПХ, «K2» - отрицательный контроль для МКА 6B12-ПХ.

Полученные результаты определили выбор МКА 4B7-ПХ для использования в ИФА, в том числе при выявлении аденовирусов в клинических образцах методом мкИФА.

Различные комбинации МКА 4B7 и МКА 6B12 на стадии захвата и их конъюгатов с пероксидазой хрена (рисунок 5) и биотином (рисунок 6) на стадии детекции исследовали методом сэндвич-ИФА.

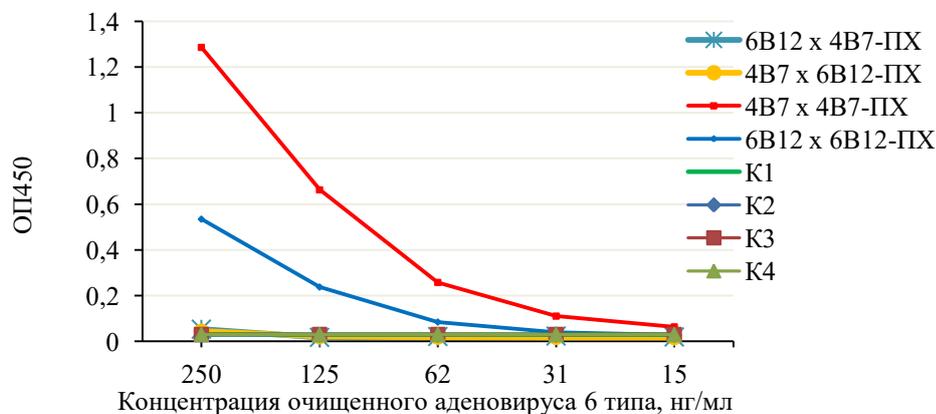


Рисунок 5 - Результаты изучения различных комбинаций моноклональных антител 4B7 и 6B12 на стадии захвата и их конъюгатов с пероксидазой хрена на стадии детекции аденовирусного антигена методом сэндвич-иммуноферментного анализа.

Примечание – МКА 4B7 и МКА 6B12 использованы в концентрации 5 мкг/мл, в качестве отрицательного контроля использовали РСВ в концентрации 1 мкг/мл, «K1» - отрицательный контроль для комбинации МКА 4B7 x МКА 4B7-ПХ, «K2» - отрицательный контроль для комбинации МКА 4B7 x МКА 6B12-ПХ, «K3» - отрицательный контроль для комбинации МКА 6B12 x МКА 4B7-ПХ, «K4» - отрицательный контроль для комбинации МКА 6B12 x МКА 6B12-ПХ.

Наибольшая чувствительность теста была получена при комбинации МКА 4B7 на стадии захвата и МКА 4B7-ПХ на стадии детекции и составила 15 нг/мл. Данная

комбинация МКА была использована для дальнейших исследований клинических образцов методом сэндвич-ИФА.

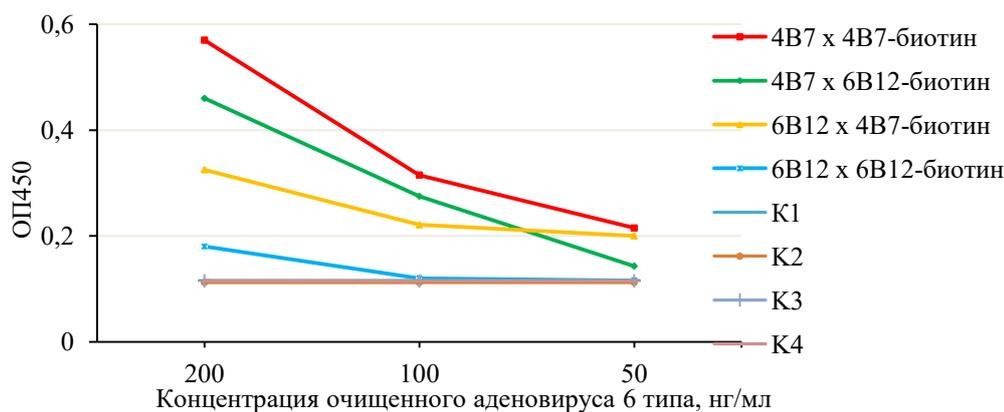


Рисунок 6 - Результаты изучения различных комбинаций моноклональных антител 4В7 и 6В12 на стадии захвата и их конъюгатов с биотином на стадии детекции аденовирусного антигена методом сэндвич-иммуноферментного анализа.

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

При исследовании различных комбинаций МКА 4В7 и МКА 6В12 и их конъюгатов с биотином выявлено, что наибольшая чувствительность теста достигается при использовании МКА 4В7 либо МКА 6В12 на стадии захвата антигена и конъюгата МКА 4В7 с биотином на стадии детекции. МКА 6В12 и конъюгат МКА 4В7 с биотином включены в состав белкового биочипа многопараметрического диагностического комплекса ТОРИ-ТЕСТ.

2.2. Исследование специфической активности МКА в ИФЛ

Проведен отбор МКА, обладающих наибольшей специфической активностью в отношении аденовирусного антигена в ИФЛ (таблица 2). Яркость специфической флуоресценции оценивали по четырехкрестовой шкале яркостей. 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 4В7 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.

Таблица 2 - Интенсивность специфической флуоресценции в клеточных культурах А 549, инфицированных аденовирусами 3, 4, 6 и 19 типов, в непрямом варианте иммунофлуоресцентного анализа с использованием разработанных моноклональных антител

МКА	Типы аденовирусов				А 549
	6	3	4	19	
2H7	–	–	–	–	–
3F12	+	–	–	–	–
4B7	++	+	++	+	–
5D4	–	–	–	–	–
5E11	+	–	–	–	–
6B12	+++	++	++	++	–

Для определения возможности использования МКА 6B12 в прямом ИФЛ была проведена конъюгация МКА 6B12 с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ). 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 7).

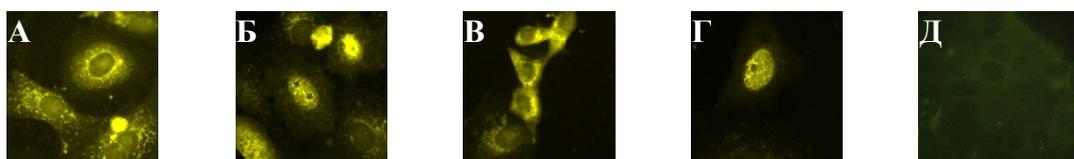


Рисунок 7 - Специфическое свечение в культуре клеток А 549, зараженной аденовирусами разных типов, при исследовании методом иммунофлуоресценции с использованием конъюгата моноклональных антител 6B12 с флуоресцеинизотиоцианатом.

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 6B12-ФИТЦ использован в разведении 1:8, ув. х40.

МКА 6B12 выдержали процедуру конъюгации с ФИТЦ, сохранив специфическую активность в отношении аденовирусов различных типов. Неспецифическое взаимодействие с контрольной клеточной культурой полностью отсутствовало. Наиболее яркая гранулярная флуоресценция при окрашивании конъюгатом МКА 6B12-ФИТЦ наблюдалась в клетках, зараженных аденовирусом 6 типа, в отношении аденовирусов 3, 4 и 19 типов интенсивность флуоресценции была умеренной. В дальнейшем конъюгат 6B12-ФИТЦ был использован для выявления аденовирусов в клеточной культуре А 549, зараженной клиническими образцами.

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

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 ряда 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 8). В остальных 567 образцах генетический материал возбудителей ОРВИ не обнаружен.

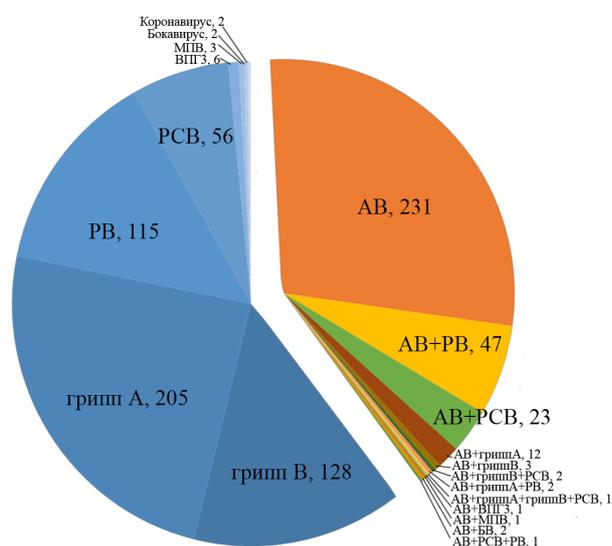


Рисунок 8 - Результаты выявления возбудителей острых респираторных вирусных инфекций в клинических образцах методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Примечание – АВ – аденовирус; РВ – риновирус; РСВ – респираторно-синтициальный вирус, ВПГЗ - вирус парагриппа типа 3, МПВ - метапневмовирус, БВ – бокавирус.

Для определения типов аденовирусов, вызывавших подъёмы заболеваемости среди военнослужащих в 2014-2017 гг., из общего количества положительных на содержание аденовируса образцов был отобран 31 образец (10 образцов, полученных в 2014-2015 гг., 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, аденовирус был выявлен на низких циклах амплификации (до 10).

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. В результате исследования установлено, что 1 аденовирус принадлежал к типу 7 (группа В), 30 аденовирусов принадлежали к типу 4 (группа Е). Филогенетическое дерево аденовирусов из клинических образцов приведено на рисунке 9.

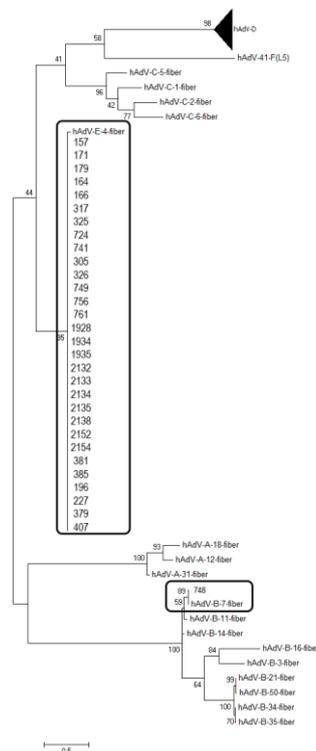


Рисунок 9 - Филогенетическое дерево аденовирусов, выделенных из клинических образцов, полученных в 2014-2017 гг.

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.

4. Изучение диагностических свойств разработанных моноклональных антител в отношении современных штаммов аденовируса

Клинические образцы, положительные на наличие аденовирусов по данным ПЦР в реальном времени, исследовали с использованием МКА 4В7 и МКА 6В12.

4.1. Выявление аденовирусов методом мКИФА в клеточных культурах, зараженных клиническими образцами

Клеточную культуру А 549 заражали клиническими образцами (n=66), 63 образца из которых по результатам ПЦР содержали аденовирусы, 3 образца не содержали. 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 цитопатического действия (ЦПД), так и полуколичественно методом мКИФА с использованием МКА 4В7-ПХ (таблица 3).

Таблица 3 - 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.

4.2. Выявление аденовирусов в клинических образцах методом сэндвич-ИФА

Методом сэндвич-ИФА исследованы те же клинические образцы (n=66), которые были исследованы методом мКИФА. Исследовали как исходные образцы, так и вирусосодержащую жидкость, полученную после пассирования (4 пассажа) образцов в

культуре клеток А 549. На стадии захвата антигена использовали МКА 4В7, на стадии детекции использовали МКА 4В7-ПХ (таблица 4). Результаты сэндвич-ИФА учитывали на каждом этапе пассирования клинических образцов вне зависимости от наличия или отсутствия ЦПД.

Таблица 4 - 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 были выявлены в 54 исследованных образцах - в 35 исходных клинических образцах и в 19 образцах вирусосодержащей культуральной жидкости. Использование 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.

4.3. Выявление аденовирусов в клеточной культуре, зараженной клиническими образцами, методом ИФЛ

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 9).

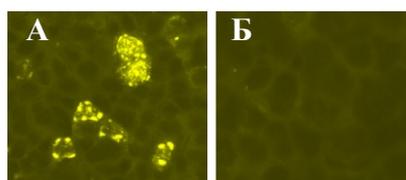


Рисунок 9 - Специфическое свечение в культуре клеток А 549, зараженной клиническими образцами, окрашенной с использованием конъюгата моноклональных антител 6В12 с флуоресцеин изотиоцианатом.

Примечание - А –клеточная культура А 549, зараженная клиническим образцом №741, содержащим аденовирус по данным ПЦР, Б – клеточная культура А 549, зараженная клиническим образцом №740, не содержащим аденовирус по данным ПЦР. Ув. х40.

По результатам исследования положительными признаны 38 исследованных образцов. 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 (на +/++) по сравнению с ранее разработанным препаратом МКА #6-ФИТЦ.

Заключение

В ходе выполнения работы проведено выделение очищенного гексона аденовируса 6 типа (штамм Tonsill-99) из вирусосодержащей культуральной жидкости. 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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую и искреннюю благодарность своему научному руководителю к.б.н. Амосовой Ирине Викторовне за помощь и поддержку на всех этапах выполнения работы. Автор искренне благодарен Забродской Яне Александровне и Ивановой Анне Андреевне за неоценимую помощь при проведении масс-спектрометрического анализа, вестерн-блоттинга и секвенирования геномов аденовирусов. Автор особо признателен Львову Николаю Ивановичу за предоставленные клинические материалы для исследования, а также сотрудникам лаборатории молекулярной вирусологии (зав. лабораторией Комиссаров А.Б.) за помощь, оказанную в проведении ПЦР в реальном времени.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Амосова И. В., Тимошичева Т. А., Сверлова М. В., Бузицкая Ж. В., Егорова А. А., Львов Н. И. Использование микрокультурального иммуноферментного анализа и модифицированного метода иммунофлуоресценции для диагностики аденовирусной инфекции. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(4). 230-5
2. Амосова И.В., Тимошичева Т.А., Егорова А.А., Мусаева Т.Д., Писарева М.М., Едер В.А., Львов Н. И. Генетическое разнообразие аденовирусов, циркулирующих среди военнослужащих северо-западного региона. Вопросы вирусологии. 2017; 6(62): 283-7
3. Амосова И.В., Тимошичева Т.А., Егорова А.А., Мусаева Т.Д., Писарева М.М., Едер В.А., Львов Н. И. Молекулярно-генетический анализ современных штаммов аденовирусов. Современная медицина. 2018; 3(11): 74-7

4. Timoshicheva T.A., Zabrodskaya Y.A., Ramsay E., Amosova I.V. Use of hexon as an antigen for the production of monoclonal antibodies capable of detecting multiple adenovirus types. *Biologicals*. 2019; 58: 44-9
5. Тимошичева Т.А., Забродская Я.А., Амосова И.В. Гексон как основной белок для получения моноклональных антител, выявляющих аденовирусы различных типов. *Инфекция и иммунитет*. 2019; 9(1): 47–56

Тезисы докладов:

1. Тимошичева Т.А., Амосова И.В., Бузицкая Ж.В., Егорова А.А., Львов Н.И. Перспективы использования методов микрокультурального ИФА и иммунофлуоресценции на культуре клеток для диагностики аденовирусной инфекции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(9): 650-1
2. Тимошичева Т.А., Амосова И.В., Егорова А.А., Бузицкая Ж.В., Львов Н.И. Антигенная характеристика аденовирусов, вызвавших заболевания среди военнослужащих. *Молекулярная диагностика*. Сб. трудов / колл. авт., под ред. В.И. Покровского. 2017; 1: 245
3. Тимошичева Т.А., Амосова И.В., Егорова А.А., Бузицкая Ж.В., Львов Н.И. Генетическое разнообразие аденовирусов, вызывавших заболевания среди военнослужащих в сезон 2015-2016 гг. *Клинико-лабораторный консилиум*. 2017; 1(53): 57-8
4. Тимошичева Т.А., Амосова И.В., Бузицкая Ж.В., Львов Н.И. Применение иммуноферментного анализа для идентификации аденовирусов в культуре клеток. *Современные проблемы инфекционной патологии человека*. Сборник научных трудов. Минск. 2017; 10: 321-3
5. Тимошичева Т.А., Амосова И.В., Мусаева Т.Д. Эффективность лабораторной диагностики аденовирусных инфекций. *Лабораторная служба*. 2017; 6(3): 75
6. Amosova I.V., Timoshicheva T.A., Egorova A.A., Musaeva T.D., Lvov N.I. A Study of Circulating Adenovirus Diversity in the Military. *Trends in Influenza Research. Abstract book*. 2017, P. 138-9
7. Тимошичева Т.А. Молекулярно-генетический анализ современных штаммов аденовирусов. *Сборник тезисов XXII Санкт-Петербургской Ассамблеи молодых ученых и специалистов*. – СПб.: Изд-во СПбГУПТД, 2017, с. 109
8. Тимошичева Т.А., Забродская Я.А., Амосова И.В. Изучение биологических свойств моноклональных антител к гексону аденовируса. *Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2018»*. Сборник трудов – Минск: СтройМедиаПроект, 2018, 156-7
9. Timoshicheva T.A., Amosova I.V. Prospects for monoclonal antibodies using in differential diagnosis of adenovirus infection. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8(4): 537-8
10. Тимошичева Т.А., Амосова И.В., Иванова А.А., Мусаева Т.Д., Львов Н.И. Актуальные типы аденовирусов, циркулирующих среди военнослужащих. *Сборник трудов научно-*

практической конференции «Актуальные вопросы государственного санитарно-эпидемиологического надзора в Вооруженных Силах Российской Федерации». 2018; 124с.

11. Тимошичева Т.А., Амосова И.В., Иванова А.А., Мусаева Т.Д., Львов Н.И. Характеристика современных аденовирусов. Проблемы медицинской микологии. 2019; 21(2): 138-9

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».