

Оригинальная статья / Original article
УДК 578.8, 578.833.25, 57.083, 615.371
DOI: 10.18470/1992-1098-2026-2-5



Валидация иммуноферментной тест-системы на основе рекомбинантного антигена d34 для мониторинга протективного гуморального ответа к вирусу денге при иммунизации мышей вакцинным препаратом MVA-d34

Софья С. Гогина¹, Галина М. Цыганова², Богдан С. Черепович¹, Алексей С. Оксанич¹

¹Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия

²Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью
Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Контактное лицо

Софья С. Гогина, м.н.с. лаборатории молекулярной биотехнологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; 105064 Россия, г. Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А.
Тел. +79251486177
Email fominasofya@yandex.ru
ORCID <https://orcid.org/0009-0009-2889-9680>

Формат цитирования

Гогина С.С., Цыганова Г.М., Черепович Б.С., Оксанич А.С. Валидация иммуноферментной тест-системы на основе рекомбинантного антигена d34 для мониторинга протективного гуморального ответа к вирусу денге при иммунизации мышей вакцинным препаратом MVA-d34 // Юг России: экология, развитие. 2026. Т.21, N 2. С. 48-62. DOI: 10.18470/1992-1098-2026-2-5

Получена 2 марта 2026 г.

Прошла рецензирование 19 апреля 2026 г.

Принята 25 апреля 2026 г.

Резюме

Цель исследования — валидация иммуноферментной тест-системы для полуколичественного определения специфических IgG-антител к домену III Е-белка вируса денге (ДЕНВ) серотипов 1-4 в сыворотке крови мышей.

Коммерческие наборы реагентов АО БТК «Биосервис» (Москва, Россия). Рекомбинантный белок d34, экспрессированный в бакуловирусной системе. Сыворотки мышей линии BALB/c (n=100, 11 групп). Вируснейтрализующие антитела к серотипам D1–D4 ДЕНВ определяли методом реакции нейтрализации (РН) в культуре клеток Vero.

Специфичность и чувствительность разработанной тест-системы составили 100 % (95 % ДИ: 91,2–100,0 %), критический уровень ОП составил 0,16, CV не превышал 8,2 %. Исследование стабильности при 37 °C (14 сут) выявило снижение сигнала на 4,7 % (95 % ДИ: от –11,3 % до +1,9 %), что позволяет прогнозировать сохранение функциональных свойств иммуносорбента в течение 12 месяцев при хранении при 2–8 °C. Закономерное превышение значений ИФА над титрами РН отражает различие в детектируемых пулах антител и подтверждает целесообразность совместного применения обоих методов для комплексной оценки гуморального ответа.

ИФА тест-система обладает высокими диагностическими характеристиками и пригодна для полуколичественного определения специфических IgG-антител к домену III Е-белка ДЕНВ в сыворотке лабораторных мышей. Ее применение обеспечивает надежный инструмент для доклинического мониторинга иммуногенности вакцинных кандидатов и создает методологическую основу для стандартизации контроля качества биопрепаратов на основе серотип-специфичных эпитопов.

Ключевые слова

ИФА, вирус денге, ДЕНВ, DENV, домен III Е-белка, d34, вируснейтрализующие антитела, валидация аналитических методик, MVA, модифицированная осповакцина Анкара, modified vaccinia Ankara, MVA-d34.

Validation of a d34 recombinant antigen-based ELISA for monitoring protective humoral immunity to dengue virus in MVA-d34-immunized mice

Sofya S. Gogina¹, Galina M. Tsyganova², Bogdan S. Cherepovich¹ and Alexey S. Oksanich¹

¹I.I. Mechnikov Vaccine and Serum Research Institute, Moscow, Russia

²Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia

Principal contact

Sofya S. Gogina, Postgraduate Student, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, I.I. Mechnikov Vaccine and Serum Research Institute; 5a Maly Kazenny pereulok, Russia 105064.

Tel. +79251486177

Email fominasofya@yandex.ru

ORCID <https://orcid.org/0009-0009-2889-9680>

How to cite this article

Gogina S.S., Tsyganova G.M., Cherepovich B.S., Oksanich A.S. Validation of a d34 recombinant antigen-based ELISA for monitoring protective humoral immunity to dengue virus in MVA-d34-immunized mice. *South of Russia: ecology, development*. 2026; 21(2):48-62. (In Russ.)
DOI: 10.18470/1992-1098-2026-2-5

Received 2 March 2026

Revised 19 April 2026

Accepted 25 April 2026

Abstract

To validate an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test system for the semi-quantitative detection of specific IgG antibodies against domain III of the E protein of dengue virus (DENV) serotypes 1–4 in mouse serum. Commercial reagent kits (JSC BTK Bioservice, Moscow, Russia) were utilised. The recombinant d34 protein expressed in a baculovirus system served as the immunosorbent. Analytical performance was evaluated using a panel of 100 serum samples from BALB/c mice (11 groups). Virus-neutralising antibodies against DENV serotypes D1–D4 were determined by a virus neutralisation test in *Vero* cell culture.

The specificity and sensitivity of the test system developed both reached 100 % (95 % CI: 91.2–100.0 %), with a critical optical density (OD_{crit}) of 0.16 and a coefficient of variation (CV) not exceeding 8.2 %. Stability testing at 37°C for 14 days revealed a 4.7 % signal decrease (95 % CI: –11.3 % to +1.9 %), indicating that the immunosorbent is expected to retain its functional properties for up to 12 months when stored at 2–8°C. The systematically higher ELISA values compared to neutralisation test titers reflect differences in the detected antibody pools and support the combined use of both methods for a comprehensive evaluation of the humoral immune response.

The validated ELISA test system exhibits high diagnostic performance and is suitable for the semi-quantitative determination of specific IgG antibodies against domain III of the DENV E protein in laboratory mouse serum. Its application provides a reliable tool for preclinical monitoring of vaccine candidate immunogenicity and establishes a methodological basis for standardising the quality control of biologics targeting serotype-specific epitopes.

Key Words

ELISA, dengue virus, DENV, domain III of E protein, d34, virus-neutralizing antibodies, validation of analytical methods, MVA, modified vaccinia Ankara, MVA-d34.

ВВЕДЕНИЕ

Лихорадка денге — одна из наиболее быстро распространяющихся трансмиссивных болезней XXI века. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно регистрируется до 400 млн случаев заболевания лихорадкой денге, более 100 стран являются эндемичными, а угроза экспансии вируса на новые территории, включая юг европейской части России, становится все более реальной в условиях глобального потепления и усиления международных миграционных потоков [1; 2]. Несмотря на наличие зарегистрированных вакцин (*Dengvaxia*®, *Qdenga*®), их применение ограничено узкими возрастными рамками, риском антитело-зависимого усиления инфекции (ADE, *antibody-dependent enhancement*) и дисбалансом иммунного ответа по серотипам, что делает задачу создания безопасной, эффективной и сбалансированной тетравалентной вакцины одной из приоритетных в современной вакцинологии [3; 4].

Ключевым барьером на пути разработки таких препаратов остается отсутствие стандартизированных аналитических подходов, позволяющих избирательно оценивать поствакцинальный иммунный ответ у человека, вызывающий нейтрализацию вируса, минимизируя таким образом вклад неспецифических или потенциально опасных (ADE-индуцирующих) антител. Традиционные ИФА тест-системы, основанные на вирионах или полноразмерном Е-белке, демонстрируют высокую кросс-реактивность между флавивирусами и не позволяют дифференцировать антитела, направленные против критически важного домена III (EDIII) Е-белка — структурного элемента, ответственного за связывание вируса с рецепторами клетки-мишени и являющегося основной мишенью для серотип-специфических, высоконейтрализующих антител [5; 6]. Более того, в РФ на сегодняшний день отсутствуют отечественные диагностические наборы, пригодные для доклинической оценки иммуногенности субъединичных вакцинных кандидатов, что создает технологическую зависимость и ограничивает темпы импортозамещения в области биобезопасности.

В этих условиях разработка рекомбинантного тетравалентного антигена d34 — слитого белка, объединяющего домены III всех четырех серотипов вируса денге, — представляет собой стратегически значимый шаг вперед [7]. Однако его успешное внедрение в вакцинные платформы (в частности, на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (*modified vaccinia Ankara*) — MVA-d34) требует создания специализированной аналитической базы, которая будет обеспечивать высокую точность и воспроизводимость оценки как функциональных параметров индуцированного иммунного ответа.

Цель исследования — комплексная валидация иммуноферментной тест-системы на основе рекомбинантного антигена d34 для полуколичественного определения специфических IgG-антител к вирусу денге в сыворотке лабораторных мышей. Впервые в отечественной практике разработана иммуноферментная тест-система, направленная на детекцию антител к серотип-специфичному домену III (EDIII) Е-белка вируса денге. Для разработанной тест-системы проведена полная оценка диагностических характеристик: специфичность, чувствительность, воспроизводимость и стабильность. Кроме того, выполнено сопоставление показателей ИФА с

результатами реакции нейтрализации. Анализ продемонстрировал, что метод корректно отражает динамику гуморального ответа, при этом систематическое превышение титров ИФА над значениями РН обусловлено различием в детектируемых пулах антител. Это подтверждает целесообразность совместного применения обоих подходов: ИФА позволяет проводить высокопроизводительный мониторинг уровня специфических IgG-антител, тогда как РН необходима для верификации функциональной активности сывороток. Полученные данные обосновывают применимость тест-системы для оценки иммуногенности вакцинных кандидатов против денге и закладывают методологическую основу для последующей стандартизации биопрепаратов на основе EDIII в рамках Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Таким образом, данная работа вносит вклад в решение задачи национальной биобезопасности, обеспечивая отечественную технологическую платформу для контроля качества и эффективности инновационных вакцин против особо опасных инфекций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Коммерческие наборы

В исследовании использовали коммерческие наборы реагентов АО БТК «Биосервис» (Москва, Россия) для определения специфических IgG-антител методом ИФА: «БиоСкрин-ВЗН» (Е-1345) — к вирусу лихорадки Западного Нила, «БиоСкрин-КЭ» (Е-1145) — к вирусу клещевого энцефалита, «БиоСкрин-ЖЛ» (Е-2345) — к вирусу желтой лихорадки, «БиоСкрин-Денге» (Е-1545(D1–D4)) — к вирусам лихорадки денге серотипов 1–4 (к каждому серотипу отдельно), и «БиоСкрин-Чикунгунья» (Е-1645) — к вирусу чикунгунья.

Конъюгат

Для выявления мышинных антител класса IgG применяли пероксидазный конъюгат (козий поликлональный HRP-конъюгат антител к Fc-фрагменту мышинных IgG, MP Biomedicals, США; кат. № ICN55554) в рабочем разведении 1:10 000.

Антигены и иммуносорбент

В качестве основного антигена для иммуноферментного анализа использовали рекомбинантный тетравалентный антиген d34(ДЕНВ-d34), представляющий собой слитый белок, включающий домен III Е-белка всех четырех серотипов вируса денге (D1–D4), экспрессированный в системе бакуловируса с N-концевым гистидиновым тегом и очищенный методом металл-аффинной хроматографии, как описано в [7]. Для сорбции антигена использовали стандартные 96-луночные полистирольные планшеты высокой сорбционной емкости (Corning #2592, LOT 21823010, США).

Лабораторные животные и сыворотки

Исследования проводили с использованием мышей линии BALB/c (гаплотип H-2d) массой 18–20 г в возрасте 6–8 недель (самцы и самки). Животные были получены из лаборатории экспериментальных биомоделей Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России (п. Столбовая, Московская

область). Все процедуры проводили согласно действующим ГОСТам: ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» [8]; ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» [9].

Для получения сывороток крови, используемых в исследовании, было задействовано 100 голов мышей, разделенных на одиннадцать групп:

- четыре группы (по 10 голов в каждой) для получения моносывороток к каждому серотипу вируса денге (D1–D4);
- четыре группы (по 10 голов в каждой) для получения сывороток к гетерологичным вирусам (ВКЭ, ЖЛВ, ВЗН, ЧИКВ);
- контрольная группа (10 голов) – интактные животные;
- группа (5 голов) – для получения сывороток к исходному штамму модифицированному вирусу осповакцины Анкара MVA;
- группа (5 голов) – животные, иммунизированные вакцинным кандидатом MVA-d34.

Для получения моносывороток к вирусу денге животных заражали каждым серотипом живого вируса ДЕНВ отдельно (D1–D4 соответственно). Животным каждой опытной группы вводили вирус одного серотипа однократно, внутривенно, в дозе 10^3 БОЕ/0,2 мл. От начала заражения до дня забора крови за животными проводили ежедневное наблюдение: признаков изменения поведения, отказа от пищи и воды, патологических изменений шерстного покрова отмечено не было. Через 14 суток после заражения производили тотальный забор крови, для получения сыворотки.

Сыворотки к гетерологичным вирусам: клещевого энцефалита (инактивированная вакцина), желтой лихорадки (штамм 17D), Западного Нила (штамм Ast986) и чикунгунья (инактивированный β -пропиолактоном штамм Nika21, GenBank: PQ673601.1) – получали по единой схеме: животным (по 10 голов на вирус) трехкратно, с интервалом 14 суток, вводили соответствующий вирусный препарат. Первое и второе введения осуществляли подкожно и внутривенно одновременно (суммарный объем 0,2 мл), третье – только внутривенно (0,2 мл). Через 14 суток после последнего введения у животных брали кровь и получали сыворотку.

Иммунизацию животных (по 5 голов) исходным штамм MVA и экспериментальным вакцинным препаратом MVA-d34, представляющий собой штамм MVA, экспрессирующий антиген d34, подробно описанный в работе Mintae et al., 2023 [7], проводили в дозе 10^8 ТЦД₅₀ на животное, внутримышечно, в соответствии с протоколом, описанным в [7] (иммунизацию проводили трехкратно с интервалом 3 недели). Забор крови осуществляли серийно, для данного этапа работы анализировали только сыворотки, полученные на 21-й неделе после завершения иммунизации.

В работе дополнительно использовали сыворотки интактных животных, которым вводили стерильный физиологический раствор.

Клеточные линии и вирусы

Для проведения вирусологических исследований использовали клеточную линию Vero (почка африканской зеленой марышки), полученную на уровне 145-го пассажа из коллекции ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (Москва, Россия; исходный источник – ООО «Биолот»). В работе применяли коллекционные штаммы вируса денге серотипов D1–D4, полученные из коллекции микроорганизмов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. Мечникова (Москва, Россия) и адаптированные к размножению на клетках Vero. До начала экспериментов генетическую идентичность штаммов верифицировали методом высокопроизводительного секвенирования нового поколения (Illumina NextSeq 2000), что подтвердило соответствие заявленным серотипам и отсутствие значимых субпопуляционных вариантов. В ходе исследования клетки дополнительно пассировали не более 7 раз. Подходы к молекулярной идентификации и генетическому анализу флавивирусов и альфавирусов, применяемые в лаборатории на базе коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, описаны ранее в работах Г.М. Игнатова с соавторами [10; 11].

В качестве среды поддержки для культивирования клеток Vero применяли DMEM («ООО Биолот», Россия), дополненную 5 % эмбриональной телячьей сывороткой. Клетки культивировали в термостате при 37 ± 1 °C с содержанием 5 % CO₂. Штаммы вируса денге поддерживали и титровали на данной клеточной линии.

Методика выявления иммуноглобулинов класса G к домену III E-белка вируса денге в сыворотке/плазме крови мышей методом иммуноферментного анализа

Антиген ДЕНВ-d34 иммобилизовали на планшетах в концентрации 2 мкг/мл в карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ, pH 9,6). Планшеты выдерживали при температуре 4 °C в течение 16–18 ч и блокировали инертным белковым раствором (АО БТК «Биосервис», Россия) при комнатной температуре в течение 90 мин. Далее вносили исследуемые сыворотки крови мышей, разведенные 1:100 в ФСБ-Т (по 100 мкл/лунку), и инкубировали при $37,0 \pm 1,0$ °C в течение 60 мин, после чего планшеты трижды промывали с использованием автоматического промывочного устройства LisaWash (ERBA, Чехия) с применением фосфатно-солевого буфера с добавлением 0,05 % Твин-20 (ФСБ-Т, pH 7,2). Затем в каждую лунку вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата, повторно инкубировали при $37,0 \pm 1,0$ °C в течение 60 мин и промывали пять раз тем же буфером. После этого вносили по 100 мкл раствора хромогена на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ; АО БТК «Биосервис», Россия) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте. Реакцию останавливали внесением 50 мкл раствора серной кислоты (0,89 М). Измерение оптической плотности (ОП) проводили при 450 нм с референсной длиной волны 620–680 нм на планшетном спектрофотометре (LisaScan EM, ERBA, Чехия).

При наличии специфических IgG-антител к вирусу денге в образце они связываются с иммобилизованным антигеном d34; последующее взаимодействие с пероксидазным конъюгатом антител к Fc-фрагменту мышиных IgG-антител приводит к образованию иммунного комплекса. Интенсивность

окраски после остановки реакции в ИФА прямо пропорциональна концентрации специфических IgG в исследуемом образце.

Методика разработки положительного и отрицательного контрольных образцов для набора реагентов на основе рекомбинантного антигена d34 для полуколичественного определения специфических IgG-антител к вирусу денге в сыворотке лабораторных мышей

Положительный контрольный образец (K^+) изготавливали путем пулирования образцов сывороток крови мышей с предварительно подтвержденным высоким уровнем специфических антител класса IgG к ДЕНВ. Все сыворотки подвергали тепловой инаktivации при $56,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ в течение 30 мин для инаktivации комплемента [12]. Отрицательный контрольный образец (K^-) формировали на основе пула образцов сывороток крови мышей с подтвержденным отсутствием антител к ДЕНВ. Пул K^- также подвергали термической инаktivации при $56,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ в течение 30 мин.

Полученный инаktivированный пул разводили в 10 раз в стабилизирующем растворе для положительных и отрицательных контролей (АО БТК «Биосервис», Москва, Россия).

Методика «ускоренного старения»

Стабильность иммуносорбента оценивали с помощью методики «ускоренного старения» согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения и ICH Q1A(R2) Stability testing of new drug substances and products. Исходя из эмпирического правила Вант-Гоффа, увеличение температуры хранения на 10°C увеличивает скорость реакций в 2–4 раза [12; 13]. Экспериментальное хранение при $+37,0 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 3, 7, 10 и 14 суток коррелировало с 79, 183, 261 и 365 сутками реального хранения при $+4^\circ\text{C}$ при температурном коэффициенте скорости реакции $A=2,6862$ и коэффициенте соответствия $K=26,07$.

Методика классической реакции нейтрализации

Оценку вируснейтрализующей активности IgG-антител в сыворотках крови мышей проводили с использованием классической РН с живым вирусом денге серотипов D1–D4, полученными из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Москва, Россия), в соответствии с модифицированным протоколом [2; 7; 14; 15]. За 48 ч до проведения реакции в 24-луночные культуральные планшеты (Corning® Falcon™, арт. № 353047, США) вносили по 0,5 мл суспензии клеток Vero в концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде DMEM («ООО Биолот», Россия) с 5 % эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС; «ООО Биолот», Россия). Планшеты культивировали при 37°C и 5 % CO_2 до формирования сплошного монослоя. Сыворотки перед анализом подвергали тепловой инаktivации при 56°C в течение 45 мин. Затем готовили последовательные двукратные разведения (начальное разведение 1:10) в среде MEM («ООО Биолот», Россия) без сыворотки. Каждое разведение смешивали с фиксированной дозой вируса — 30 бляшкообразующих единиц (БОЕ) в объеме 70 мкл — и инкубировали при 37°C и 5 % CO_2 в течение

60 мин. В качестве контроля использовали вирус, инкубированный либо со средой MEM, либо с сывороткой от интактных мышей.

После инкубации 120 мкл вирус-сывороточной смеси переносили в лунки 24-луночного планшета с монослоем клеток Vero. Планшеты дополнительно инкубировали 60 минут при 37°C и 5 % CO_2 , после чего осторожно удаляли жидкость, не нарушая целостности монослоя. Затем в каждую лунку аккуратно по краю вносили по 0,5 мл первого агарового покрытия, приготовленного из 1,5 % легкоплавкого агара (Агар Нобль, BD Difco Agar Noble, кат. № 214230), двукратной среды MEM и 10% ЭТС, предварительно доведенного до температуры $44\text{--}46^\circ\text{C}$. Планшеты культивировали при 37°C и 5 % CO_2 в течение 7 суток. На 7-е сутки готовили второе агаровое покрытие, содержащее 0,033 % нейтрального красного (Neutral Red Solution, кат. № 15330-079, Life Technologies, Великобритания), и наносили его по 0,5 мл в каждую лунку. Через 24 ч проводили подсчет бляшек под световым микроскопом.

Титр нейтрализации (PRNT_{50}) определяли, как наибольшее разведение сыворотки, вызывающее 50 %-ное снижение количества бляшек по сравнению с вирусным контролем.

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2013 и GraphPad Prism 9.0. Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$) или среднее с 95 % доверительным интервалом (95 % ДИ). Пороговое значение оптической плотности ($\text{ОП}_{\text{крит}}$) рассчитывали по формуле $M + 3SD$. Сопоставление показателей ИФА и РН проводили методами описательной статистики с качественной интерпретацией согласованности профилей ответов.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика панели контрольных образцов сыворотки крови мышей

Первым этапом валидации разрабатываемой тест-системы на основе рекомбинантного антигена d34 для полуколичественного определения специфических IgG-антител к вирусу денге в сыворотке лабораторных мышей стало формирование детально охарактеризованной панели контрольных сывороток мышей линии BALB/c. В панель включали образцы с подтвержденным наличием IgG-антител к вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ), вирусу желтой лихорадки (ЖЛВ), вирусу Западного Нила (ВЗН) и вирусу чикунгунья (ЧИКВ), а также сыворотки, полученные от мышей, зараженных живым вирусом денге каждого серотипа отдельно (D1–D4) и характеризующиеся преобладанием серотип-специфических IgG-антител к соответствующему серотипу.

Характеризацию мышиных сывороток выполняли методом ИФА с использованием коммерческих наборов реагентов с заменой конъюгата и контрольных образцов (подробнее см. раздел «Материалы и методы»). Это позволило подтвердить серологический профиль каждой группы и исключить возможные случаи перекрестной реактивности. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты тестирования панели контрольных сывороток методом ИФА с использованием коммерческих наборов реагентов**Table 1.** Results of testing a panel of control sera by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercial reagent kits

ИФА набор реагентов ELISA reagent kit		IgG-антитела к* / IgG antibodies for*								
		ВКЭ TBEV	ЖЛВ YFV	ВЗН WNV	ЧИКВ CHIKV	ДЕНВ / DENV				Интактные Intact
						D1	D2	D3	D4	
БиоСкрин-ВЗН BioScrin-WNV		-	-	+	-	+	+	+	+	-
БиоСкрин-ВКЭ BioScrin-TBEV		+	-	+	-	+	+	+	+	-
БиоСкрин-ЖЛВ BioScrin-YFV		-	+	-	-	+	+	+	+	-
БиоСкрин-ЧИКВ BioScrin-CHIKV		-	-	-	+	-	-	-	-	-
БиоСкрин-ДЕНВ BioScrin-DENV	D1	-	+	+	-	+	+	+	+	-
	D2	-	+	+	-	+	+	+	+	-
	D3	+	-	+	-	+	+	+	+	-
	D4	-	-	+	-	+	+	+	+	-

Примечание: результаты ИФА на коммерческих наборах: + — положительно (ОП > ОП_{крит}), — — отрицательно;

* — сыворотки, полученные от мышей, зараженных живым вирусом ДЕНВ каждым серотипом отдельно (D1–D4); клещевого энцефалита (инактивированная вакцина), желтой лихорадки (штамм 17D), Западного Нила (штамм Ast986) и чикунгунья (инактивированный β-пропиолактоном штамм Nika21, GenBank: PQ673601.1). Каждый образец сыворотки анализировался в 3-х точках (количество образцов в группе n=10)

Note: ELISA results obtained with commercial reagent kits: + — positive (OD > OD_{crit}), — — negative; * — Serum samples obtained from mice infected with live dengue virus (DENV) of each serotype individually (D1–D4); tick-borne encephalitis virus (inactivated vaccine); yellow fever virus (strain 17D); West Nile virus (strain Ast986); and Chikungunya virus (β-propiolactone-inactivated strain Nika21, GenBank: PQ673601.1). Each serum sample was analyzed in triplicate; the number of samples per group was n = 10

Результаты показали, что сыворотки, содержащие антитела к ВКЭ (среднее ОП $0,41 \pm 0,03$; 95 % ДИ: 0,34–0,49), ЖЛВ (среднее ОП $0,36 \pm 0,03$; 95 % ДИ: 0,29–0,44) и ВЗН (среднее ОП $0,49 \pm 0,03$; 95 % ДИ: 0,42–0,56), дают слабоположительный, но воспроизводимый сигнал в коммерческих диагностических тест-системах на денге («БиоСкрин-Денге» D1–D4). Эта перекрестная реактивность объясняется высокой степенью структурного сходства домена II Е-белка у различных флавивирусов [5]. Исследования на модели вируса клещевого энцефалита подтверждают принципиальную возможность использования рекомбинантных доменов Е-белка для повышения специфичности серодиагностики: антигены sE и dIII сибирского подтипа ВКЭ обеспечивали 100 % специфичность, не давая перекрестных реакций с сыворотками против ДЕНВ, ВЗН, Зика и других флавивирусов [16]. Интересно, что для ВКЭ полноразмерный sE показал более высокую чувствительность по сравнению с dIII при сохранении специфичности [16], что подчеркивает необходимость выбора антигена для серологических исследований исходя из поставленной задачи. Для денге, где важна серотип-специфичность, домен III остается предпочтительным, тогда как для ВКЭ, не требующего такой дифференциации, sE может оказаться более эффективным решением. Следовательно, применение в разрабатываемой ИФА тест-системе рекомбинантного тетравалентного антигена ДЕНВ-d34, содержащего исключительно серотип-специфичные детерминанты домена III, является методологически обоснованным решением, направленным на устранение ложноположительных реакций, характерных для препаратов на основе полноразмерного Е-белка или цельных вирионов [1].

Дополнительную проверку панели сывороток провели с помощью реакции нейтрализации. Результаты показали, что образцы, содержащие антитела к ВКЭ, ЖЛВ, ВЗН и ЧИКВ, не обладали достоверной вируснейтрализующей активностью против ДЕНВ D1–D4: средние $\log_2$ -титры оказались ниже 2. Это дает основание отнести их к отрицательным контрольным образцам при работе с вирусом денге. В то же время сыворотки, полученные от мышей после заражения каждым из четырех серотипов ДЕНВ, демонстрировали выраженную гомологичную нейтрализацию, что подтверждает их соответствие требованиям к положительным контрольным образцам при оценке специфичности разработанного иммуносорбента. Таким образом, проведенная характеристика панели контрольных сывороток подтвердила ее пригодность для последующей валидации иммуносорбента с иммобилизованным ДЕНВ-d34.

Гомологичная вируснейтрализующая активность сывороток, полученных после заражения мышей отдельными серотипами ДЕНВ (D1–D4)

Для оценки серотип-специфической иммуногенности домена III Е-белка были проанализированы титры гомологичной нейтрализации — то есть нейтрализующая активность сыворотки против того же серотипа, которым проводили заражение. Каждый образец тестировали в трех повторах; данные в таблице 2 представляют собой средние значения $\log_2$ -титров по группе сывороток.

Сыворотки, полученные от мышей, зараженных вирусами ДЕНВ D2 и D3, демонстрировали наиболее высокие титры гомологичной нейтрализации (средний $\log_2$ -титр: $5,98 \pm 0,34$ и $6,44 \pm 0,34$ соответственно), тогда как ответ на ДЕНВ D4 был минимальным ($\log_2 = 2,67 \pm 0,58$), а на ДЕНВ D1 — умеренным

($\log_2 = 3,88 \pm 0,51$). Эти различия отражают серотип-специфические особенности иммуногенности целого вируса, которые могут быть обусловлены как

вариабельностью конформации Е-белка, так и степенью экспонирования ключевых нейтрализующих эпитопов на поверхности вириона вируса денге.

Таблица 2. Гомологичная вируснейтрализующая активность сывороток мышей, зараженных вирусом ДЕНВ-серотипами D1–D4

Table 2. Homologous virus-neutralising activity of sera from mice infected with dengue virus (DENV) serotypes D1–D4

Группа сывороток Serum Group	Средний $\log_2$ -титр $\pm$ SD Mean $\log_2$ -titer $\pm$ SD	95% ДИ 95% CI
ДЕНВ D1 / DENV D1	3,88 $\pm$ 0,51	3,52–4,25
ДЕНВ D2 / DENV D2	5,98 $\pm$ 0,34	5,74–6,22
ДЕНВ D3 / DENV D3	6,44 $\pm$ 0,34	6,20–6,68
ДЕНВ D4 / DENV D4	2,67 $\pm$ 0,58	2,26–3,09

Полученные данные согласуются с концепцией антигенной картографии флавивирусов [5], согласно которой серотипы ДЕНВ образуют два основных кластера (D1/D2 и D3/D4), что проявляется как в структуре, так и в иммуногенности. Высокая нейтрализующая активность сывороток к D2 и D3 подтверждает их роль как доминирующих компонентов в формировании протективного ответа, в то время как слабый ответ к D4 согласуется с известной низкой иммуногенностью этого серотипа в составе тетравалентных вакцин [7].

Таким образом, гомологичная вируснейтрализующая активность четко отражает серотип-специфический спектр иммуногенности вирусов ДЕНВ, где D2 и D3 индуцируют наиболее сильный ответ, а D4 — наименее выраженный. Эти различия необходимо учитывать при разработке и анализе тетравалентных вакцин, чтобы обеспечить сбалансированный иммунный ответ против всех четырех серотипов.

Антигенная перекрестная реактивность при нейтрализации вируса ДЕНВ

Для оценки антигенного сродства между серотипами ДЕНВ проводили реакцию нейтрализации в гетерологичном формате: сыворотки, полученные от мышей, зараженных каждым из серотипов ДЕНВ отдельно (D1–D4), тестировали против всех четырех серотипов вируса денге отдельно. Каждую комбинацию «сыворотка–вирус» анализировали в трех повторях.

Анализ перекрестной нейтрализации (рисунок 1) выявил сложную картину антигенных взаимосвязей между серотипами. Процент перекрестной нейтрализации рассчитывали как отношение линейных титров, полученных путем пересчета $\log_2$ -значений в абсолютные величины ($2^{\log_2}$), для гетерологичной и гомологичной реакций. Наблюдается тенденция к формированию двух антигенных кластеров (D1/D2 и D3/D4), что согласуется с данными антигенной картографии флавивирусов [5]. Внутрикластерные реакции проявляются с интенсивностью 37–46 % для пары D1/D2 и 40 % для D3/D4 относительно гомологичных титров. Однако межкластерные взаимодействия не являются равномерно слабыми: например, сыворотка D1 демонстрирует перекрестную активность 31–32 % в отношении серотипов D3 и D4, что превышает некоторые внутрикластерные реакции.

Принципиально иным профилем характеризуется сыворотка D4: несмотря на низкий гомологичный титр ($\log_2$ 2,67, см. табл. 2), она проявляет одинаковый уровень относительной перекрестной реактивности (50 % по отношению ко всем серотипам в линейной шкале, рассчитанной как $2^{\log_2}$). Это явление может отражать смещение иммунного ответа на D4 в сторону перекрестно-реактивных антител, направленных против консервативных эпитопов, общих для всех серотипов вируса денге, на фоне низкой доли серотип-специфичных нейтрализующих антител [3; 18].

Важной особенностью выявленной картины является асимметрия перекрестных реакций. Например, сыворотка D2 нейтрализует вирус D1 с эффективностью 37 % от гомологичного титра в линейной шкале, тогда как обратная реакция (D1→D2) составляет 46 %. Еще более выраженная асимметрия наблюдается в паре D3/D4: сыворотка D3 проявляет 40 % перекрестной активности в отношении D4, тогда как сыворотка D4, хотя и показывает формально высокий относительный уровень перекрестной реактивности (50 % в линейной шкале), в абсолютных значениях не достигает биологически значимых титров нейтрализации ($\log_2 < 2,0$).

Полученные данные подтверждают фундаментальный вывод, сделанный Katzelnick L.C. с соавторами [5] на основании масштабного исследования с применением методов антигенной картографии: хотя вирусы денге действительно образуют четыре генетически обособленные группы, они не представляют собой дискретные антигенные серотипы в классическом понимании. Исследователи показали, что антигенное расстояние между некоторыми штаммами внутри одного серотипа вируса может быть сопоставимо с расстоянием между разными серотипами, а отдельные изоляты вирусов могут быть антигенно более сходны с вирусами другого типа, чем с некоторыми представителями собственного типа [5]. Это явление объясняет высокую вариабельность иммунных ответов при денге и имеет важные последствия для разработки вакцин: протективный иммунитет против одного серотипа не гарантирует защиты от всех штаммов этого же серотипа, а степень кросс-реактивности зависит не только от принадлежности к серотипу, но и от конкретных антигенных характеристик штамма.

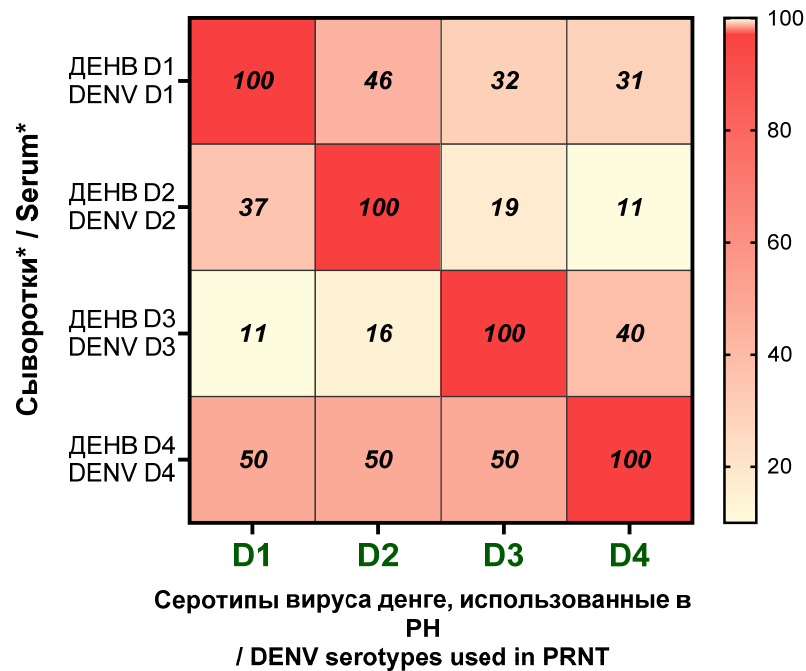


Рисунок 1. Тепловая карта перекрестной нейтрализации, демонстрирующая антигенную кластеризацию серотипов вируса денге (D1/D2 и D3/D4). Данные представлены в процентах от гомологичных титров для каждой сыворотки

Примечание: *— сыворотки, полученные от зараженных ДЕНВ D1–D4 мышей. Процент перекрестной нейтрализации рассчитывали, как отношение линейных титров ($2^{\log_2}$) гетерологичной реакции к гомологичной реакции для каждой сыворотки

Figure 1. Heat map of cross-neutralisation demonstrating antigenic clustering of dengue virus serotypes (D1/D2 and D3/D4). Data are expressed as percentages of homologous titers for each monospecific serum

Note: *— Sera obtained from mice infected with DENV serotypes D1–D4, respectively. Cross-neutralisation percentage was calculated as the ratio of linear titers ($2^{\log_2}$) of heterologous reaction to homologous reaction for each serum

Результаты количественного анализа вируснейтрализующей активности (рисунок 2) подтверждают и детализируют обсуждаемые закономерности. Сыворотки D1 и D2 демонстрируют взаимную перекрестную нейтрализацию с титрами $\log_2$ 2,77 и 4,54 соответственно, что согласуется с их принадлежностью к одному антигенному кластеру. Сыворотка D3 проявляет высокую перекрестную активность в отношении D4 ($\log_2$ 5,10, что составляет 79 % в логарифмической шкале от гомологичного титра 6,44), подтверждая тесное антигенное родство этих серотипов.

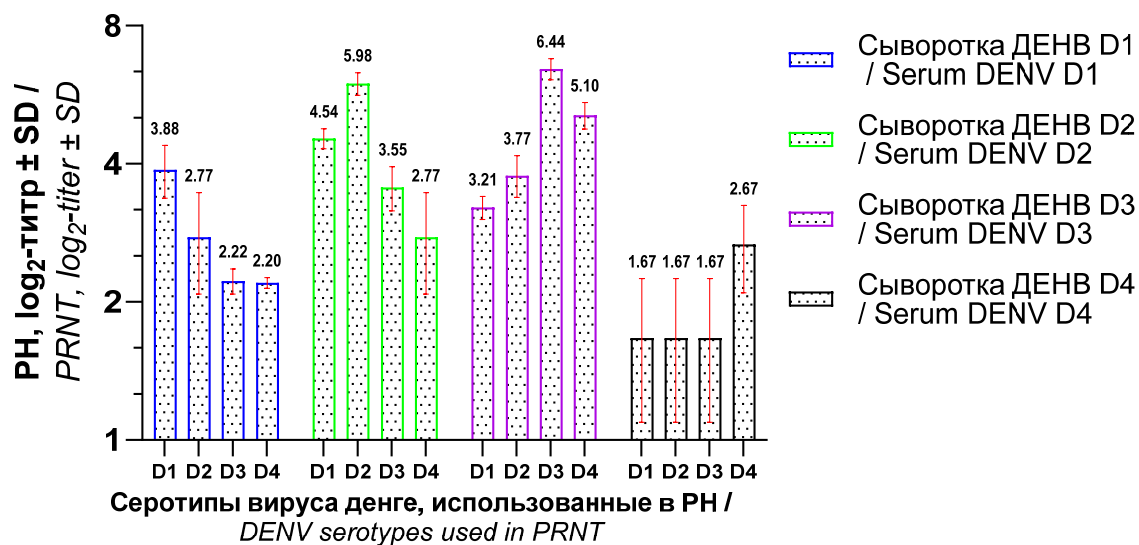


Рисунок 2. Профиль вируснейтрализующей активности ($\log_2$ -титр $\pm$ SD) сывороток мышей, полученных после инфицирования вирусом ДЕНВ (D1–D4), в отношении всех четырех серотипов ДЕНВ

Figure 2. Virus-neutralising activity profile ($\log_2$ -titer $\pm$ SD) of mouse sera obtained following infection with dengue virus (DENV) serotypes D1–D4, assessed against all four DENV serotypes

Анализ сыворотки D4 выявил специфические характеристики: абсолютные значения гетерологичных титров против всех серотипов (D1–D3) составили $\log_2 1,67$, что находится на пороге детекции метода. Несмотря на то, что в относительных единицах (процентах от гомологичного титра в линейной шкале, рассчитанной как $2^{\log_2}$) перекрестная активность достигает 50 %, биологически значимой нейтрализации не наблюдается из-за исходно низкого гомологичного ответа. Этот феномен согласуется с известными данными о низкой иммуногенности D4 и трудностях индукции сбалансированного тетравалентного иммунного ответа [7]. Вероятно, слабый ответ на D4 обусловлен как конформационными особенностями домена III Е-белка этого серотипа, так и конкуренцией иммунодоминантных эпитопов при формировании гуморального ответа.

Таким образом, результаты перекрестной нейтрализации характеризуют антигенные связи между серотипами вируса денге как сложную и неоднозначную систему. Выявленное сближение серотипов в пары D1/D2 и D3/D4 согласуется с данными антигенной картографии, однако, как подчеркивают современные исследования, эти группы не формируют строго изолированные серотипы, а демонстрируют перекрывающуюся антигенную вариабельность [5]. Асимметрия перекрестных реакций, а также специфика ответа на серотип D4, проявляющаяся в высокой доле перекрестно-реактивных антител при отсутствии значимой нейтрализующей активности, свидетельствует о смещении гуморального ответа в сторону консервативных эпитопов, распознавание которых не коррелирует с нейтрализующей активностью. Следовательно, при конструировании тетравалентных вакцин против лихорадки денге ориентация исключительно на филогенетическую близость или усредненные антигенные свойства штаммов не гарантирует эффективности. Формирование сбалансированного иммунного ответа требует целенаправленной оптимизации спектра иммунодоминантных детерминант и точного дозирования серотип-специфических компонентов. Такой подход может

способствовать формированию равнозначной нейтрализующей активности против всех серотипов вируса денге, включая слабоиммуногенный D4.

Оценка аналитических характеристик ИФА тест-системы на основе рекомбинантного антигена d34 для полуколичественного определения специфических IgG-антител к вирусу денге в сыворотке лабораторных мышей

Для полуколичественной оценки гуморального ответа к домену III Е-белка вируса денге был разработан набор реагентов, предназначенный для выявления специфических IgG-антител в сыворотке лабораторных мышей. В основе тест-системы лежит твердофазный иммуносорбент, сенсibilизированный рекомбинантным антигеном d34 в концентрации 2 мкг/мл – оптимальной для обеспечения высокого специфического сигнала при минимальном фоне. Эмпирические данные, полученные при подборе параметров иммобилизации антигена, в данной работе не приводятся.

Специфичность оценивалась на панели из 40 гетерологичных сывороток, полученных от мышей иммунизированных ЖЛВ, ВКЭ, ВЗН, ЧИКВ (по 10 на каждый патоген). Среднее значение ОП составило $0,069 \pm 0,030$, $CV \leq 7,1 \%$ (табл. 3). Пороговое значение ($ОП_{крит}$), рассчитанное по формуле $M + 3SD$ [17], составило 0,16. Все образцы дали сигнал ниже $ОП_{крит}$, что обеспечило специфичность 100 % (95 % ДИ: 91,2–100,0 %).

Чувствительность оценивалась на 40 гомологичных сыворотках, полученных от мышей, зараженных ДЕНВ D1, ДЕНВ D2, ДЕНВ D3, ДЕНВ D4 (по 10 для каждого серотипа ОП варьировала от 1,232 (ДЕНВ D4) до 2,025 (ДЕНВ D3), превышая $ОП_{крит}$ в 7,7–12,7 раза (табл. 3). Все образцы были корректно классифицированы как положительные, что обеспечило чувствительность 100 % (95 % ДИ: 91,2–100,0 %).

Для стандартизации анализа сформированы положительный (К+) и отрицательный (К-) контрольные образцы, методика приготовления которых описана в разделе «Материалы и методы».

Таблица 3. Оптическая плотность (ОП) контрольных образцов в ИФА (набор реагентов на основе рекомбинантного антигена d34 для полуколичественного определения специфических IgG к вирусу денге в сыворотке лабораторных мышей)

Table 3. Optical density (OD) values of control samples in the ELISA test system based on recombinant d34 antigen for qualitative detection of specific IgG antibodies against dengue virus in laboratory mouse serum

Отрицательные контрольные образцы / Negative control samples				
№	IgG к ЖЛВ Anti-YFV IgG	IgG к ВКЭ Anti-TBEV IgG	IgG к ВЗН Anti-WNV IgG	IgG к ЧИКВ Anti-CHIKV IgG
1	0,071	0,083	0,073	0,018
2	0,074	0,086	0,076	0,019
3	0,077	0,089	0,079	0,019
4	0,079	0,091	0,081	0,02
5	0,081	0,093	0,083	0,02
6	0,083	0,095	0,085	0,02
7	0,085	0,097	0,087	0,02
8	0,087	0,099	0,089	0,021
9	0,089	0,101	0,091	0,021
10	0,084	0,096	0,086	0,022

M ± SD	0,081 ± 0,0058	0,093 ± 0,0058	0,083 ± 0,0058	0,02 ± 0,0011
95 % ДИ / 95 % CI	0,077–0,085	0,089–0,097	0,079–0,087	0,019–0,021
CV, %	7,1	6,2	6,9	5,8
Положительные контрольные образцы / Positive control samples				
№	IgG κ D1 Anti-DENV D1 IgG	IgG κ D2 Anti-DENV D2 IgG	IgG κ D3 Anti-DENV D3 IgG	IgG κ D4 Anti-DENV D4 IgG
1	1,731	1,547	1,865	1,232
2	1,757	1,577	1,895	1,252
3	1,825	1,607	1,925	1,282
4	1,826	1,637	1,945	1,302
5	1,844	1,667	1,955	1,322
6	1,861	1,697	1,965	1,342
7	1,889	1,727	1,985	1,362
8	1,912	1,757	2,005	1,382
9	1,921	1,787	2,025	1,402
10	1,952	1,667	1,985	1,342
M ± SD	1,852 ± 0,071	1,667 ± 0,077	1,955 ± 0,049	1,322 ± 0,055
95 % ДИ / 95 % CI	1,801–1,902	1,612–1,722	1,920–1,990	1,283–1,361
CV, %	3,8	4,6	2,5	4,2

Примечание: результаты измерений при $\lambda = 450$ нм; каждый образец сыворотки анализировался в 3-х повторах

Note: Measurements performed at $\lambda = 450$ nm; each serum sample was analysed in triplicate

Оценка контрольных компонентов (K^+ и K^-)

ИФА тест-системы

Контрольные образцы изготавливали в соответствии с методикой, описанной в разделе «Материалы и методы». Их пригодность в качестве компонентов разрабатываемой тест-системы подтверждали комплексно: наличие функционально активных антител – реакцией нейтрализации, а аналитические параметры сигнала определяли в ИФА.

Функциональную активность контролей проверяли в реакции нейтрализации против всех четырех серотипов ДЕНВ (табл. 4). В образцах отрицательного контроля (K^-) вируснейтрализующая активность не проявлялась: средние $\log_2$ -титры по всем серотипам оставались ниже 2, что соответствует порогу обнаружения метода и подтверждает отсутствие

неспецифических нейтрализующих антител. В то же время положительный контроль (K^+) показал стабильно высокие значения $\log_2$ -титров нейтрализации против каждого серотипа, что указывает на присутствие функционально активных антител с выраженной перекрестной реактивностью.

При тестировании в разработанной ИФА тест-системе на основе антигена d34 K^+ формировал выраженный специфический сигнал (среднее значение ОП > 1,7), превышающий критический порог (ОП_{крит} = 0,16). Контроль K^- регистрировался на фоновом уровне (среднее ОП < 0,07). Коэффициент вариации для обоих контролей находился в пределах аналитического допуска (CV < 10 %), что подтверждает высокую воспроизводимость результатов в рамках анализа.

Таблица 4. Характеристика положительного и отрицательного контролей (K^+ и K^-)

Table 4. Characterisation of positive (K^+) and negative (K^-) controls

Тип контрольного компонента Control component type	Серотипы вируса денге, использованные в РН (Средний $\log_2$ -титр ± SD) DENV Serotypes used in PRNT (Mean $\log_2$ -titer ± SD)				Результаты ИФА при $\lambda = 450$ нм (тест-система на основе рекомбинантного антигена d34) ELISA Results (recombinant d34 antigen-based test system)		
	D1	D2	D3	D4	M ± SD	95% ДИ 95% CI	CV, %
Положительный контроль K^+ Positive control (K^+)	3,84 ± 0,45	4,21 ± 0,32	5,13 ± 0,55	2,69 ± 0,41	1,702 ± 0,11	1,424–1,980	6,6
Отрицательный контроль K^- Negative control (K^-)	<2	<2	<2	<2	0,069 ± 0,01	0,057–0,081	7,2

Примечание: каждый контрольный компонент анализировался в 3-х повторах; титр в РН < 2 $\log_2$ – свидетельствует о том, что в контрольном образце отсутствуют вируснейтрализующие антитела

Note: each control component was analysed in triplicate; PRNT titer < 2 $\log_2$ indicates that the control sample contains no virus-neutralising antibodies

Таким образом, контрольные компоненты K^+ и K^- могут быть использованы для стандартизации и рутинного контроля качества разработанной ИФА тест-системы на основе рекомбинантного антигена вируса денге d34.

Стабильность тест-системы

Функциональная стабильность твердой фазы оценивалась методом ускоренного старения при $37,0 \pm 1^\circ\text{C}$, моделирующим срок хранения 12 месяцев при $2-8^\circ\text{C}$. ОП измеряли в трех лунках на каждом из трех независимых стрипов одного ИФА-планшета ($n=9$).

Средние значения оптической плотности (ОП) положительных контрольных образцов (см. раздел «Характеристика панели контрольных образцов сыворотки крови мышей.») снизились с $1,702 \pm 0,114$ до $1,622 \pm 0,126$ через 14 дней ускоренного старения при $37,0 \pm 1^\circ\text{C}$ (см. табл. 5), что соответствует уменьшению сигнала на 4,7 % (95 % ДИ: -11,3 %; +1,9 %). Коэффициент вариации увеличился с 6,7 % до 8,2 %, оставаясь в пределах аналитического допуска ($CV < 10\%$).

Таблица 5. Показатели стабильности иммуносорбента d34 при ускоренном старении

Table 5. Stability parameters of the d34 immunosorbent under accelerated aging conditions

Интервал ускоренного старения, сут при 37°C Accelerated aging interval, days at 37°C	Эквивалент при $+4^\circ\text{C}$, сут Equivalent storage time at $+4^\circ\text{C}$, days	ОП положит. ($M \pm SD$) $OD_{pos}(M \pm SD)$	Δ к исходному, % Δ vs. original, %	CV, %	ОП отрицат. ($M \pm SD$) $OD_{neg}(M \pm SD)$
0 (исходное) 0 (original)	—	$1,702 \pm 0,114$	—	6,7	$0,054 \pm 0,009$
3	79	$1,688 \pm 0,121$	-0,8	7,1	$0,053 \pm 0,010$
7	183	$1,661 \pm 0,118$	-2,4	7,3	$0,055 \pm 0,011$
10	261	$1,642 \pm 0,133$	-3,5	8,0	$0,056 \pm 0,012$
14	365	$1,622 \pm 0,126$	-4,7	8,2	$0,057 \pm 0,011$

Значения ОП отрицательных контрольных образцов (см. раздел «Характеристика панели контрольных образцов сыворотки крови мышей») в ходе всех интервалов ускоренного старения варьировали в диапазоне 0,053–0,057 и статистически не отличались от исходных ($p > 0,05$). Пересчитанное критическое значение ОП изменилось на 2,9 %, что соответствует допустимому уровню отклонения ($\leq 10\%$). Диагностический разрыв между положительными и отрицательными образцами сохранялся на уровне более чем 8-кратного превышения, что полностью удовлетворяет требованиям к иммуноферментным тест-системам качественного профиля.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии деградации иммобилизованного антигена ДЕНВ-d34 и подтверждают, что тест-система сохраняет функциональную пригодность не менее 12 месяцев хранения при температуре $2-8^\circ\text{C}$.

Сравнительная оценка связывающей (ИФА) и нейтрализующей (РН) активности IgG-антител

Для функциональной интерпретации данных, полученных с помощью разработанной ИФА тест-системы, проведено сопоставление титров специфических IgG-антител и их нейтрализующей активности. Анализ охватывал панели моносывороток, содержащих IgG-антитела к серотипам вируса денге отдельно (D1–D4), сыворотки животных, иммунизированных рекомбинантным штаммом MVA-d34 (21-я неделя после завершения курса), а также контрольную группу, получавшую исходный штамм MVA (табл. 6).

В группе моносывороток отмечено закономерное расхождение между показателями (см. табл. 6): титры связывающих IgG-антител в ИФА

стабильно превышали гомологичные титры в РН. Указанная тенденция обусловлена принципиальными различиями в регистрируемых параметрах. Рекомбинантный антиген d34, иммобилизованный на твердой фазе, предоставляет доступ для связывания широкому спектру эпитопов, включая конформационные участки, которые на поверхности нативного вириона могут быть структурно экранированы или не участвовать в процессе клеточной адсорбции [3; 18]. Поскольку в разработанной ИФА тест-системе для детекции иммунных комплексов применялся конъюгат, специфичный к Fc-фрагменту мышиных антител класса IgG, твердофазный анализ фиксирует совокупность всех специфических IgG-антител, распознающих иммобилизованный антиген. Реакция нейтрализации, напротив, выявляет исключительно функционально активную фракцию, способную блокировать проникновение вируса в чувствительные клетки.

Наиболее выраженное отклонение результатов наблюдалось для серотипа D4 вируса денге: при умеренном сигнале в ИФА ($\log_2 6,64$) нейтрализующие $\log_2$ -титры против гетерологичных серотипов не превышали порога детекции ($\log_2 1,67$), а гомологичная активность оставалась на минимальном уровне ($\log_2 2,67$). Это согласуется с данными литературы о низкой иммуногенности домена III D4 и сложностях индукции протективного ответа на этот компонент при моноинфекции или в условиях конкуренции эпитопов [3; 18].

Принципиально иную картину продемонстрировала панель сывороток, полученных от животных, иммунизированных конструкцией MVA-d34. К 21-й неделе поствакцинального периода $\log_2$ -титры IgG-антител достигли значения 10,64, что сопровождалось стабильно высокими показателями

нейтрализации по всем четырем серотипам вируса денге ($\log_2 9,55-9,77$). Сближение абсолютных значений методов в этой группе указывает на качественное созревание гуморального ответа: вакцинный кандидат MVA-d34 обеспечил не только количественный прирост антител, но и формирование пула с высокой долей

серотип-перекрестных нейтрализующих детерминант. Подобная динамика характерна для сбалансированных тетравалентных формул, где устойчивость протективности определяется не суммарной концентрацией иммуноглобулинов, а пропорцией функционально активных клонов [4; 19].

Таблица 6. Сравнение уровней специфических IgG-антител к вирусу денге, определенных методом ИФА (значения титров ИФА (при $\lambda = 450$ нм)), и методом РН в образцах сывороток мышей представлено как средний $\log_2$ -титр $\pm$ SD

Table 6. Comparison of specific IgG antibodies levels to dengue virus, determined by ELISA (values of ELISA titers (at $\lambda = 450$ nm)), and by PRNT in mouse serum samples is presented as the average $\log_2$ -titer $\pm$ SD

Образец сыворотки Serum sample	Серотипы вируса денге, использованные в РН (титр) DENV Serotypes used in PRNT ($\log_2$ -titer)				Титр ИФА ELISA ($\log_2$ -titer)
	D1	D2	D3	D4	
ДЕНВ D1 / DENV D1	3,88 $\pm$ 0,51	2,77 $\pm$ 0,69	2,22 $\pm$ 0,14	2,20 $\pm$ 0,06	7,64
ДЕНВ D2 / DENV D2	4,54 $\pm$ 0,23	5,98 $\pm$ 0,34	3,55 $\pm$ 0,39	2,77 $\pm$ 0,69	8,64
ДЕНВ D3 / DENV D3	3,21 $\pm$ 0,19	3,77 $\pm$ 0,39	6,44 $\pm$ 0,34	5,10 $\pm$ 0,34	8,64
ДЕНВ D4 / DENV D4	1,67 $\pm$ 0,58	1,67 $\pm$ 0,58	1,67 $\pm$ 0,58	2,67 $\pm$ 0,58	6,64
Исходный штамм MVA Original MVA strain	< 2	< 2	< 2	< 2	—
21-я неделя после иммунизации MVA-d34 Week 21 post-MVA-d34 immunisation	9,77 $\pm$ 0,39	9,77 $\pm$ 0,39	9,77 $\pm$ 0,39	9,55 $\pm$ 0,39	10,64

Примечание: каждый контрольный компонент анализировался в 3-х повторах; для сывороток 21-й недели указаны средние значения, полученные при тестировании пула сывороток мышей, иммунизированных вакцинным кандидатом MVA-d34; титр в РН < 2 $\log_2$ свидетельствует об отсутствии нейтрализующей активности в отношении вируса денге; «—» означает отсутствие детектируемого сигнала в ИФА

Note: each control component was analysed in triplicate; for sera collected at week 21, values represent mean results obtained from testing pooled sera of mice immunised with the MVA-d34 vaccine candidate; PRNT titer < 2 $\log_2$ indicates the absence of neutralising activity against dengue virus; "—" indicates no detectable signal in ELISA

Отсутствие детектируемого сигнала как в ИФА, так и в РН в контрольной группе, получавшей исходный штамм MVA, подтверждает антиген-специфичность регистрируемых реакций и исключает вектор-обусловленную перекрестную реактивность или неспецифическое связывание с компонентами твердофазного иммуносorbента разработанной ИФА тест-системы.

Сопоставление данных подтверждает, что разработанная ИФА тест-система корректно отражает динамику гуморального иммунитета и согласуется с формированием функционально активных IgG-антител, что наиболее выражено в поствакцинальной группе. Закономерное превышение титров в ИФА над показателями РН обусловлено различием в регистрируемых пулах иммуноглобулинов и не снижает аналитическую надежность метода. В связи с этим оба подхода целесообразно использовать совместно: ИФА анализ обеспечивает возможность массового скрининга и отслеживания изменения концентрации специфических IgG-антител в ходе эксперимента, тогда как реакция нейтрализации необходима для подтверждения способности сывороток блокировать инфекционный цикл вируса денге и оценки баланса ответа по каждому из четырех серотипов. Применение такой комбинации методов гарантирует объективную оценку иммуногенности вакцинных кандидатов против лихорадки денге на доклиническом этапе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании впервые в отечественной практике создана и комплексно валидирована иммуноферментная тест-система на основе тетравалентного рекомбинантного антигена d34, объединяющего домены III Е-белка всех четырех серотипов вируса денге. Разработанный диагностический набор предназначен для полуколичественного определения специфических IgG-антител в сыворотке лабораторных мышей и позволяет избирательно оценивать гуморальный ответ, направленный против серотип-специфичных эпитопов.

Результаты аналитической валидации подтвердили высокую надежность системы: специфичность и чувствительность составили 100 % (95 % ДИ: 91,2–100,0 %), коэффициент вариации при внутрिलाбораторном контроле не превышал 8,2 %, а моделирование 12-месячного хранения при 2–8 °C выявило снижение сигнала менее чем на 4,7 %, что соответствует международным рекомендациям по оценке стабильности диагностических реагентов. Функциональная оценка показала, что в группе иммунизированных рекомбинантным штаммом MVA-d34 повышение уровня специфических IgG-антител, регистрируемых в ИФА, сопровождается формированием выраженной вируснейтрализующей активности, что подтверждает формирование сбалансированного тетравалентного иммунного ответа. При этом закономерно наблюдаемое превышение показателей ИФА над титрами в реакции

нейтрализации отражает различие в детектируемых пулах иммуноглобулинов и подчеркивает целесообразность совместного применения обоих методов: твердофазный анализ обеспечивает высокопроизводительный скрининг и мониторинг концентрации специфических IgG-антител, тогда как реакция нейтрализации остается необходимым инструментом для верификации протективного потенциала и оценки баланса ответа по каждому из четырех серотипов.

Анализ перекрестной нейтрализации выявил сложную картину антигенных взаимосвязей, подтверждающую тенденцию к сближению серотипов в пары D1/D2 и D3/D4 при сохранении значительной перекрывающейся вариабельности, что согласуется с современными представлениями о непрерывной антигенной организации вируса денге. Выявленная асимметрия перекрестных реакций и устойчиво низкий нейтрализующий ответ на серотип D4, несмотря на достаточный уровень связывающих антител, указывают на смещение иммунного ответа в сторону консервативных, но слабонейтрализующих эпитопов. Эти особенности объясняют известные трудности в достижении сбалансированного тетравалентного иммунитета и требуют целенаправленной оптимизации D4-компонента в составе вакцинных препаратов.

Разработанная ИФА тест-система создает методологическую основу для доклинического контроля иммуногенности вакцинных кандидатов против лихорадки денге, в том числе платформы MVA-d34. Ее внедрение способствует стандартизации оценки качества биопрепаратов на основе домена III Е-белка и снижает технологическую зависимость от зарубежных аналогов. В перспективе адаптация методики для работы с клиническими образцами человека позволит расширить инструментарий для мониторинга поствакцинального иммунитета и усилит систему эпидемиологического надзора за арбовирусными инфекциями на территории Российской Федерации.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность А.И. Желтухиной (ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Минздрава России) за проведение генотипирования штаммов вируса денге методом высокопроизводительного секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing), что позволило верифицировать серотип-специфичную принадлежность коллекционных штаммов ДЕНВ D1–D4, использованных в исследовании, а также А.Г. Самарцевой за техническую помощь в наработке вирусных препаратов ДЕНВ.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to A.I. Zheltukhina (Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of Russia) for performing genotyping of dengue virus strains by next-generation sequencing (NGS), which enabled verification of the serotype identity of the reference DENV D1–D4 strains used in this study, and to A.G. Samartseva for technical assistance in the propagation of dengue virus preparations.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Anumanthan G., Sahay B., Mergia A. Current Dengue Virus Vaccine Developments and Future Directions // *Viruses*. 2025. V. 17. N 2. P. 212. <https://doi.org/10.3390/v17020212>
2. Limothai U., Tachaboon S., Dinhuze J., Hunsawong T., Ong-Ajchaowlerd P., Thaisomboonsuk B., Fernandez S., Trongkamolchai S., Wanpaisitkul M., Chulapornsirir C. et al. Dengue pre-vaccination screening test evaluation for the use of dengue vaccine in an endemic area // *PLoS ONE*. 2021. V. 16. N 9. e0257182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257182>
3. Halstead S.B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses // *Current Topics in Microbiology and Immunology* / Ed. by U. Koszinowski, H. Wagner. Berlin: Springer. 2003. V. 267. C. 251–266. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06094-2_13
4. Katzelnick L.C., Gresh L., Halloran M.E. et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans // *Science*. 2017. V. 358. N 6365. P. 929–932. <https://doi.org/10.1126/science.aan6836>
5. Katzelnick L.C., Fonville J.M., Sang X. et al. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes // *Science*. 2015. V. 349. N 6254. P. 1338–1343. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4204>
6. Wahala W.M.P.B., Silva A.M. Natural strain variation and antibody neutralization of dengue serotype 3 viruses // *PLoS Pathogens*. 2010. V. 6. N 3. e1000821. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000821>
7. Mintae R.R., Glazkova D.V., Orlova O.V., Ignatyev G.M., Oksanich A.S., Shipulin G.A., Bogoslovskaya E.V. Development of MVA-d34 tetraivalent dengue vaccine: design and immunogenicity // *Vaccines*. 2023. V. 11. N 4. P. 831. <https://doi.org/10.3390/vaccines11040831>
8. ГОСТ 33215-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур. М.: Стандартинформ, 2014.
9. ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. М.: Стандартинформ, 2014.
10. Игнатьев Г.М., Оксанич А.С., Казакова Е.В., Самарцева Т.Г., Отрашевская Е.В., Уйба С.В., Трухин В.П. Изоляция и генетический анализ вируса Чикунгунья из комаров *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*, отловленных в Центральной Америке // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023. Т. 100. N 5. С. 310–318. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-354>
11. Игнатьев Г.М., Каа К.В., Оксанич А.С. и др. Индикация и идентификация вирусов денге и Чикунгунья в комарах рода *Aedes* spp., отловленных в центральной Америке // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020. Т. 97. N 3. С. 227–232. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4>
12. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIII изд. Т. 1. Москва, 2015. 1470 с.
13. Беланова А.И., Ковалева Е.Л., Митькина Л.И. Сравнение подходов к изучению стабильности лекарственных средств в рамках национальной процедуры в России и Евразийском экономическом союзе // *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021. Т. 11. N 1. С. 16–23. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-1-16-23>
14. Russell P.K., Nisalak A., Sukhachana P., Vivona S. A. Plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies // *J. Immunol.* 1967. V. 99. N 2. P. 285–290.
15. Morens D.M., Halstead S.B., Larsen L.K. Comparison of dengue virus plaque reduction neutralization by macro and "semi-micro" methods in LLC-MK2 cells // *Microbiol. Immunol.*

1985. V. 29. N 12. P. 1197–1205.
<https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1985.tb00909.x>
16. Baryshnikova V., Turchenko Y., Tchyynskaya K., Belyaletdinova I., Butenko A., Dereventsova A., Ignatiev G., Kholodilov I., Larichev V., Lyapeykova E., Rogova A., Shakaryan A., Shishova A., Gmyl A., Karganova G. Recombinant TBEV Protein E of the Siberian Subtype Is a Candidate Antigen in the ELISA Test System for Differential Diagnosis // *Diagnostics*. 2023. V. 13. N 20. P. 3277.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics13203277>
17. Нетесова И.Г., Бобкова М.Р. Внутрелабораторный контроль качества не количественных методов ИФА // Справочник заведующего КДЛ. 2017. N 8. С. 65–74.
18. Dejnirattisai W., Jumnainsong A., Onsirakul N. et al. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus // *Nature Immunology*. 2015. V. 16. N 2. P. 170–177.
<https://doi.org/10.1038/ni.3058>
19. Tennakoon M.S.B.W.T.M.N.S., Lee K.-H., Lee H.-M., Park J.-Y., Shin H.-J. Optimization of Conditions for Expression of Dengue Serotype 2 EDIII Protein in *Escherichia coli* and Immune Responses of Adjuvant-Free EDIII Ferritin Nanoparticles Against Dengue Virus in BALB/c Mice // *Viruses*. 2025. V. 17. N 1. P. 129. <https://doi.org/10.3390/v17010129>

REFERENCES

- Anumanthan G., Sahay B., Mergia A. Current Dengue Virus Vaccine Developments and Future Directions. *Viruses*, 2025, vol. 17, no. 2, p. 212. <https://doi.org/10.3390/v17020212>
- Limothai U., Tachaboon S., Dinhuzen J., Hunsawong T., Ong-Ajchaowlerd P., Thaisomboonsuk B., Fernandez S., Trongkamolchai S., Wanpaisitkul M., Chulapornsir C. et al. Dengue pre-vaccination screening test evaluation for the use of dengue vaccine in an endemic area. *PLoS ONE*, 2021, vol. 16, no. 9, article number: e0257182.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257182>
- Halstead S.B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Springer, 2003, vol. 267, pp. 251–266. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06094-2_13
- Katzelnick L.C., Gresh L., Halloran M.E. et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*, 2017, vol. 358, no. 6365, pp. 929–932.
<https://doi.org/10.1126/science.aan6836>
- Katzelnick L.C., Fonville J.M., Sang X. et al. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. *Science*, 2015, vol. 349, no. 6254, pp. 1338–1343.
<https://doi.org/10.1126/science.aaa4204>
- Wahala W.M.P.B., Silva A.M. Natural strain variation and antibody neutralization of dengue serotype 3 viruses. *PLoS Pathogens*, 2010, vol. 6, no. 3, Article number: e1000821.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000821>
- Mintaev R.R., Glazkova D.V., Orlova O.V., Ignatyev G.M., Oksanich A.S., Shipulin G.A., Bogoslovskaya E.V. Development of MVA-d34 tetravalent dengue vaccine: design and immunogenicity. *Vaccines*, 2023, vol. 11, no. 4, p. 831.
<https://doi.org/10.3390/vaccines11040831>
- GOST 33215-2014. *Rukovodstvo po soderzhaniyu i ukhodu za laboratornymi zhivotnymi. Pravila oborudovaniya pomeshchenii i organizatsii protsedur* [GOST 33215-2014. Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for equipment of premises and organization of procedures]. Moscow, Standartinform Publ., 2014. (In Russian)

- GOST 33216-2014. *Rukovodstvo po soderzhaniyu i ukhodu za laboratornymi zhivotnymi. Pravila soderzhaniya i ukhoda za laboratornymi gryzunami i krolikami* [GOST 33216-2014. Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for the maintenance and care of laboratory rodents and rabbits]. Moscow, Standartinform Publ., 2014. (In Russian)
- Ignat'ev G.M., Oksanich A.S., Kazakova E.V., Samartseva T.G., Otrasevskaya E.V., Uyba S.V., Trukhin V.P. Isolation and genetic analysis of Chikungunya virus from *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes collected in Central America. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2023, vol. 100, no. 5, pp. 310–318. (In Russian)
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-354>
- Ignat'ev G.M., Kaa K.V., Oksanich A.S. et al. Detection and identification of dengue and Chikungunya viruses in *Aedes* spp. mosquitoes collected in Central America. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2020, vol. 97, no. 3, pp. 227–232. (In Russian)
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4>
- State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Ministry of Health of the Russian Federation. 13th ed., vol. 1. Moscow, 2015, 1470 p. (In Russian)
- Belanova A.I., Kovaleva E.L., Mit'kina L.I. Comparison of approaches to studying the stability of medicinal products within the national procedure in Russia and the Eurasian Economic Union. *Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medical Products*, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 16–23. (In Russian) <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-1-16-23>
- Russell P.K., Nisalak A., Sukhavachana P., Vivona S. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J. Immunol.*, 1967, vol. 99, no. 2, pp. 285–290.
- Morens D.M., Halstead S.B., Larsen L.K. Comparison of dengue virus plaque reduction neutralization by macro and "semi-micro" methods in LLC-MK2 cells. *Microbiol. Immunol.*, 1985, vol. 29, no. 12, pp. 1197–1205.
<https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1985.tb00909.x>
- Baryshnikova V., Turchenko Y., Tchyynskaya K., Belyaletdinova I., Butenko A., Dereventsova A., Ignatiev G., Kholodilov I., Larichev V., Lyapeykova E., Rogova A., Shakaryan A., Shishova A., Gmyl A., Karganova G. Recombinant TBEV Protein E of the Siberian Subtype Is a Candidate Antigen in the ELISA Test System for Differential Diagnosis. *Diagnostics*, 2023, vol. 13, no. 20, p. 3277.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics13203277>
- Netesova I.G., Bobkova M.R. Internal quality control of non-quantitative ELISA methods. *Spravochnik zaveduyushchego KDL* [Reference Book for the Head of the Clinical Diagnostic Laboratory]. 2017, no. 8, pp. 65–74. (In Russian)
- Dejnirattisai W., Jumnainsong A., Onsirakul N. et al. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nature Immunology*, 2015, vol. 16, no. 2, pp. 170–177.
<https://doi.org/10.1038/ni.3058>
- Tennakoon M.S.B.W.T.M.N.S., Lee K.-H., Lee H.-M., Park J.-Y., Shin H.-J. Optimization of Conditions for Expression of Dengue Serotype 2 EDIII Protein in *Escherichia coli* and Immune Responses of Adjuvant-Free EDIII Ferritin Nanoparticles Against Dengue Virus in BALB/c Mice. *Viruses*, 2025, vol. 17, no. 1, p. 129.
<https://doi.org/10.3390/v17010129>

КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Алексей С. Оксанич участвовал в разработке концепции исследования и корректуре рукописи до подачи в редакцию. Софья С. Гогина участвовала в

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Alexey S. Oksanich contributed to the study conception and manuscript revision before submission. Sofya S. Gogina contributed to the experimental work, data analysis and

экспериментальной части работы, в анализе и интерпретации результатов, в подборе научной литературы по тематике статьи и написании рукописи. Галина М. Цыганова участвовала в экспериментальной части работы. Богдан С. Черепович участвовал в корректуре иллюстративного материала и рукописи до подачи в редакцию. Все авторы в равной степени несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата или других неэтических проблем.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

interpretation, literature search relevant to the study topic, and drafting of the manuscript. Galina M. Tsyganova performed the experimental work. Bogdan S. Cherepovich participated in the review and editing of the illustrative materials and the manuscript prior to submission. All authors are equally responsible for plagiarism, self-plagiarism and other ethical transgressions.

NO CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Софья С. Гогина / Sofya S. Gogina <https://orcid.org/0009-0009-2889-9680>

Галина М. Цыганова / Galina M. Tsyganova <https://orcid.org/0009-0002-1527-949X>

Богдан С. Черепович / Bogdan S. Cherepovich <https://orcid.org/0000-0002-5803-6263>

Алексей С. Оксанич / Alexey S. Oksanich <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>