



Применение метода детекции антителозависимого усиления инфекции *in vitro* на примере вируса Чикунгунья

Е.В. Отрашевская , Т.Г. Самарцева , А.С. Оксанич , С.С. Гогина ,
В.В. Зверев , Г.М. Игнатъев

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Малый Казенный пер., д. 5А, Москва, 105064, Российская Федерация

✉ Игнатъев Георгий Михайлович; marburgman@mail.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Механизм антителозависимого усиления инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE), опосредуемый через Fcγ-рецептор иммунных клеток, принято считать основным. Комплекс вируса со специфическим иммуноглобулином G (IgG) взаимодействует с данным рецептором, обеспечивая вирусу лучшее проникновение в клетку. Развитие ADE возможно и у вакцинированных, что предполагает его изучение при оценке безопасности разрабатываемых вакцин.

ЦЕЛЬ. Применение метода детекции антителозависимого усиления *in vitro* с использованием клеток линий K562 и Vero, а также штамма вируса Чикунгунья Nika21.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В исследовании использовали вирус Чикунгунья (ЧикВ) штамм Nika21 и сыворотки, содержащие специфические анти-ЧикВ IgG. Специфические сыворотки использовались в разных разведениях. Для оценки ADE клетки линий K562 и Vero заражали «смесью» ЧикВ со специфическими антителами (АТ). На четвертые сутки после заражения определяли биологический титр ЧикВ и содержание вирусной РНК. Титр ЧикВ определяли с помощью стандартного метода титрования вируса *in vitro*, а количество РНК — с помощью флуоресцентного метода ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Наличие ADE считали подтвержденным, если значения биологического титра ЧикВ в присутствии исследуемой сыворотки в данном разведении были >3 SD относительно среднего титра ЧикВ в контроле, который представлял собой «смесь» ЧикВ с сывороткой здорового добровольца.

РЕЗУЛЬТАТЫ. В клетках линии Vero с помощью обоих методов было отмечено усиление репликации ЧикВ при увеличении разведения иммунных сывороток, которое, однако, не превышало значений титров ЧикВ в контроле. В клетках линии K562 исследуемые сыворотки в одном разведении продемонстрировали статистически достоверное усиление репликации ЧикВ относительно соответствующего контроля. Таким образом, в нашем исследовании ADE было обнаружено в присутствии промежуточных разведений иммунных сывороток с относительно средним или низким титром анти-ЧикВ АТ.

ВЫВОДЫ. Репликация ЧикВ в FcR-негативных клетках линии Vero подтвердила высокую чувствительность данной линии клеток к вирусу и возможность использования ее исключительно для оценки нейтрализующей активности специфических АТ. Клетки FcR-экспрессирующей линии K562 позволили анализировать обе функции АТ: и нейтрализующую вирус, и активирующую инфекцию. Результаты работы подтвердили возможность проведения исследований ADE *in vitro*, что значительно упрощает исследование феномена ADE при оценке безопасности разрабатываемых вакцин.

Ключевые слова: вирус Чикунгунья; антителозависимое усиление инфекции; *in vitro* анализ

Для цитирования: Отрашевская Е.В., Самарцева Т.Г., Оксанич А.С., Гогина С.С., Зверев В.В., Игнатьев Г.М. Применение метода детекции антителозависимого усиления инфекции *in vitro* на примере вируса Чикунгунья. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(2):183–195. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-761>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Г.М. Игнатьев – заместитель главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2024 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Application of an *in vitro* method for detecting antibody-dependent enhancement of Chikungunya virus infection

Elena V. Otrasheskaja , Tatyana G. Samartseva , Aleksey S. Oksanich ,
Sofya S. Gogina , Vitaly V. Zverev , George M. Ignatyev 

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russian Federation

✉ *George M. Ignatyev; marburgman@mail.ru*

ABSTRACT

INTRODUCTION. The mechanism of antibody-dependent enhancement (ADE) caused by the Fcγ receptor on immune cells is a key factor. When the virus binds to specific immunoglobulin G (IgG), it enhances cell penetration. ADE can also occur in vaccinated individuals, making its study crucial for evaluating vaccine safety.

AIM. This study aimed to apply the method of detection of antibody-dependent enhancement *in vitro* using cells of the K562 and Vero lines, as well as the Chikungunya virus strain Nika21.

MATERIALS AND METHODS. Chikungunya virus (ChikV) Nika21 strain and different dilutions sera containing anti-ChikV IgG were used. To evaluate ADE, K562 and Vero cells were challenged with a ChikV with specific IgG mixture. On the fourth day after infection, the biological ChikV titer and viral RNA content were determined. ChikV titer was determined by standard *in vitro* virus titration and RNA amount was determined by real-time fluorescence reverse transcription PCR. ADE was considered confirmed if the values of the biological ChikV titer in the presence of the tested serum were >3 SD relative to the mean ChikV titer in the control, which represented ChikV with serum of a healthy volunteer.

RESULTS. In Vero cells, both methods showed increased ChikV replication with an increase in the dilution of immune sera, which, however, did not exceed the values of ChikV titers in the control. In K562 cells, serum with anti-ChikV IgG in one dilution demonstrated statistically significant enhancement of ChikV replication relative to the corresponding control. Thus, in our study, ADE was detected in the presence of intermediate dilutions of immune sera with a relatively medium or low titer of anti-ChikV AT.

CONCLUSION. ChikV replication in FcR-negative Vero cell line confirmed the high sensitivity to the virus and the possibility of using it exclusively for assessing the neutralizing activity of specific IgG. FcR-expressing K562 cell line allowed to analyze both virus neutralizing and activating infection functions of IgG. Our results confirmed the possibility of conducting ADE studies *in vitro*, which greatly simplifies the study of the ADE phenomenon when assessing the safety of vaccines under development.

Keywords: Chikungunya virus; antibody-dependent enhancement of infection; *in vitro* analysis

For citation: Otrasheskaja E.V., Samartseva T.G., Oksanich A.S., Gogina S.S., Zverev V.V., Ignatyev G.M. Application of an *in vitro* method for detecting antibody-dependent enhancement of Chikungunya virus infection. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(2):183–195. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-761>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. George M. Ignatyev has been a Deputy Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2024. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Среди вирусов, которые могут вызывать антителозависимое усиление инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE), есть представители нескольких семейств *Flaviviridae*, *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Retroviridae*, *Pneumoviridae* [1–7], *Filoviridae* [8, 9]. Общепринято, что для ADE необходим «сенсibiliзирующий» первичный иммунный ответ, каковыми могут быть предшествующие инфекции гомологичными или близкородственными вирусами. ADE является комплексным феноменом, и то, как наличие предшествующих антител (АТ) влияет на течение вирусной инфекции, зависит от множества факторов, среди которых штамм вируса, доза заражения, взаимодействие между АТ и рецепторами клеток, комплементарным компонентом, а также стехиометрия «вирус–антитело», класс и специфичность АТ [2, 10]. Феномен ADE впервые был описан для арбовирусных инфекций в 1960-х годах [11], а детальное изучение феномена было начато S.B. Halsted с соавт. для инфекции, вызываемой вирусом денге (ДенВ) [1, 12]. В ранних исследованиях было продемонстрировано, что увеличение продукции вируса связано с взаимодействием иммунных комплексов и Fc-рецепторов (FcR) клетки [1, 13]. По мнению S.B. Halsted с соавт., именно этот механизм приводит к превращению легкого самоограниченного заболевания в синдром повышенной проницаемости сосудов, который, в свою очередь, является основным патофизиологическим механизмом развития геморрагической лихорадки / синдрома шока при инфекции, вызываемой ДенВ [14].

В настоящее время механизм ADE, опосредуемый через FcR на поверхности клеток, принято считать основным [2, 15–17], не исключая роль комплимента и других менее значимых факторов. Для взаимодействия с Fc-частью иммуноглобулина G (IgG) наиболее важным является Fcγ рецептор (FcγR) иммунных клеток [3, 15, 18, 19]. На поверхности клеток человека присутствуют три типа FcγR: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), на клетках мышей еще распознается и FcγRIV [17].

При вирусных инфекциях ADE имеет два основных пути, которые приводят к увеличению продукции вируса. Первый путь представляет собой усиленное поглощение вируса фагоцитарными клетками, что приводит к увеличению количества инфицированных клеток (extrinsic ADE). Второй путь представляет собой усиленное внутриклеточное размножение вируса в результате

модулирования эффекторных функций клетки и блокировки противовирусной защиты (intinsic ADE) [14, 20, 21]. В обоих случаях, по мнению многих исследователей, FcγR является ключевым рецептором на поверхности клеток, включая макрофаги, эозинофилы, нейтрофилы, дендритные клетки, В-клетки и тучные клетки, который способствует усилению инфекции.

Феномен ADE при ДенВ достаточно давно изучается *in vitro* с применением линий клеток, экспрессирующих FcγR [22–25]. Так, например, линия клеток K562 является FcγRII-экспрессирующей и достаточно широко применяется для исследования феномена ADE не только при инфекции ДенВ, но и при инфекции вирусом Чикунгунья (ЧикВ) [26] и вирусом Зика [6]. Используемые для оценки нейтрализующих анти-ДенВ АТ клетки Vero (рекомендации Всемирной организации здравоохранения¹) не позволяют оценить эффекторные функции Fc, так как клетки линии Vero являются FcR-негативными. Это объясняет, почему использование только метода реакции нейтрализации недостаточно, чтобы определить, является ли иммунный ответ исключительно протективным [19]. Так, проведенные сравнительные исследования вируснейтрализующих анти-ДенВ АТ в сыворотке крови с применением FcR-негативных клеток линии Vero и FcR-экспрессирующих линий клеток демонстрируют существенную разницу в результатах [14, 27–29]. Исследования подтвердили специфичность феномена ADE для разного типа клеток и зависимости от генетики хозяина [13, 27]. Разработка методов оценки *in vitro* риска развития ADE подтвердила возможность проведения анализа у пациентов со вторичной ДенВ-инфекцией как по уровню инфицирования [23], по инфекционному титру [1, 22], так и по количеству инфекционных центров [23]. У вакцинированных риск развития ADE впервые был оценен при проведении клинических исследований тетравалентной вакцины против ДенВ. Анализ был проведен *in vitro* с использованием сывороток от вакцинированных по уровню инфицирования клеток линии K562 с помощью цитофлуориметрического метода [30].

Цель работы – применение метода детекции антителозависимого усиления *in vitro* с использованием клеток линий K562 и Vero, а также штамма вируса Чикунгунья Nika21.

В работе использовали охарактеризованные сыворотки пациентов, перенесших инфекцию ЧикВ. Титр ЧикВ определяли с помощью стандартного метода титрования вируса *in vitro*,

¹ <http://www.who.int/immunization/documents/date/en/index.html>

а количество РНК ЧикВ – с помощью флуоресцентного метода (ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени). Параллельно проводили сравнительное изучение репликации ЧикВ в клетках FcR-негативной линии Vero.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы. В работе был использован штамм Nika21 (генотип ECSA), полученный из коллекции вирусов ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова». Нуклеотидная последовательность штамма Nika21 представлена в GenBank (OQ320495). Характеристики ЧикВ, используемого для экспериментов, представлены в *таблице S1* (онлайн-приложение опубликовано на сайте журнала²). Все работы проводили с соблюдением действующих санитарных норм и правил³ и в соответствии с протоколом, одобренным локальным этическим комитетом ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» № 17/2025 от 25.11.2020.

Клетки. В экспериментах использовались клеточные линии Vero и K562. Клетки линии Vero получены из банка посевных клеток ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова». Клетки линии Vero использовали на уровне 145-го пассажа. Клетки линии K562 (хроническая миелогенная лейкемия человека) получены из банка клеток ООО «БиолоТ» (Россия). В качестве среды поддержки для клеток Vero использовали среду DMEM (ООО «БиолоТ») с 5% эмбриональной телячьей сывороткой – ЭТС (ООО «БиолоТ»). Для клеток линии K562 в качестве среды поддержки использовали RPMI 1640 с 10% ЭТС в соответствии с паспортом производителя (ООО «БиолоТ»).

Клетки линии K562 обладают слабыми адгезивными свойствами [23], и их обычно культивируют суспензионным способом, однако небольшая часть этих клеток проявляет полуадгезивные свойства. Нами была повторена ранее описанная процедура селективного пассирования полуадгезивных клеток K562 [23]. В дальнейшем при проведении исследований для увеличения прикрепления этих клеток к поверхности культуральных планшетов использовали поли-L-лизин («ПанЭко», Россия) в соответствии с протоколом⁴ компании Ibbidi GmbH (Германия). Клетки двух линий культивировались при 37±1 °C с содержанием 5% CO₂.

Сыворотки. В исследовании использовали сыворотки, содержащие анти-ЧикВ АТ (IgG), но не содержащие АТ к вирусам ДенВ, ЗикВ

и вирусу желтой лихорадки (ЖЛВ). Получение сывороток, а также определение в них специфических АТ методами иммуноферментного анализа (ИФА) и реакции нейтрализации (РН) по 50% подавлению бляшек описано ранее [31]. РН проводили по ранее описанному методу [32]. В качестве контроля использовались сыворотки крови здоровых добровольцев, не содержащие АТ к вышеперечисленным вирусам. Все используемые сыворотки были проверены на наличие специфических РНК к ЧикВ, ДенВ, ЗикВ и ЖЛВ методом ПЦР, как описано ранее [31, 33]. Результаты анализа сывороток представлены в *таблице S2* (онлайн-приложение опубликовано на сайте журнала⁵).

Определение биологического титра ЧикВ проводили с использованием линии клеток Vero по ранее описанному методу [32]. Кратко: для проведения титрования использовали 24-луночные планшеты со сформированным монослоем клеток. Готовили десятикратные разведения ЧикВ от 10⁻¹ до 10⁻⁹ в питательной среде DMEM; на анализ одного разведения ЧикВ использовали 3 лунки; в каждую лунку вносили по 100 мкл каждого разведения ЧикВ. В контрольные лунки вносили по 100 мкл среды DMEM. Далее планшеты инкубировали в условиях термостата при 37±1 °C и 5% CO₂ в течение 1 ч. Затем неадсорбированный вирус удаляли и на клетки наносили первое покрытие в объеме 0,5 мл, которое содержало 1,5% Noble Agar (Difco, США) и 10% ЭТС в среде Игла MEM с двойным набором витаминов и аминокислот («ПанЭко», Россия). Планшеты инкубировали в условиях термостата при 37±1 °C и 5% CO₂ в течение 4 сут. На 4 сут проводили второе покрытие в объеме 1 мл, которое содержало 1,5% Noble Agar (Difco) в среде Игла MEM с двойным набором витаминов и аминокислот («ПанЭко») с 0,01% нейтральным красным (Sigma, США). Плашки культивировали при ранее описанных условиях еще в течение 1 сут. Бляшки считали *ad oculus*. Результат титрования учитывали по бляшкообразующим единицам (БОЕ) и выражали его в lg/мл [32].

Определение содержания РНК ЧикВ проводили методом ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ), как было описано ранее [34]. Для выделения РНК из образцов использовали комплект реагентов «АмплиСенс® Магно-Сорб» (ФБУН ЦНИИ

² <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-761-annex>

³ СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Постановление Главного Государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4.

⁴ Application Note 08. Version 6.2; ibidi GmbH, 2025.

⁵ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-761-annex>

Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя. Экстракцию РНК проводили в 50 мкл элюирующего раствора и хранили при минус 70 °С до дальнейшего использования. Амплификацию проводили на приборе «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: 95 °С – 1 мин 30 с; 40 циклов: 95 °С – 15 с, 55 °С – 40 с. Содержание РНК ЧикВ оценивали по показателю порогового цикла флуоресценции (Ct). Расчет Ct проводили с использованием программного обеспечения к амплификатору «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Расчет геном-эквивалентов (ГЭ) проводили согласно описанию в работе [34].

Методика оценки ADE. Оценку ADE проводили, как описано ранее для ДенВ, с использованием клеток FcR-позитивной линии K562 и клеток FcR-негативной линии Vero для сравнительного анализа [35]. Кратко: для получения комплекса ЧикВ + АТ предварительно все сыворотки (табл. S2) были прогреты при 56 °С в течение 30 мин. После этого были приготовлены три разведения каждой сыворотки: цельная (неразведенная), разведение 1:10 и 1:100. Далее каждое разведение сывороток смешивали с ЧикВ (титр 3 lg/мл БОЕ, что соответствовало множественности заражения, MOI, 1:10³ клеток) в объемном соотношении 1:1 (100 мкл сыворотки + 100 мкл вирусной суспензии). Контроль вируса представлял собой ЧикВ (титр 3 lg/мл БОЕ, MOI 1:10³ клеток) в объемном соотношении 1:1 со средой «Игла MEM».

Контроль «смесь» представлял собой ЧикВ и сыворотку здорового добровольца в объемном соотношении 1:1 (100 мкл сыворотки + 100 мкл вирусной суспензии). Далее все приготовленные образцы, включая контрольные, инкубировали при 37±1 °С в течение 60 мин в соответствии с ранее описанными условиями [23]. По окончании инкубации образцы переносили на клетки линий Vero и K562. При использовании клеток линии Vero образцы переносили на заранее подготовленный монослой в лунках 24-луночного планшета и помещали в термостат при 37±1 °С на 2 ч. По окончании контакта в лунки добавляли по 1 мл соответствующей среды поддержки и помещали в термостат при 37±1 °С на 3 сут.

При использовании клеток линии K562 образцы в объеме 100 мкл смешивали со 100 мкл суспензии клеток и в термошейкере (скорость вращения 300 об/мин) снова помещали в термостат при 37±1 °С на 2 ч. По окончании контакта смесь в объеме 200 мкл переносили в лунки

подготовленного, как описано выше, 24-луночного планшета, в которые добавляли соответствующую среду поддержки в объеме 1 мл, и далее помещали в термостат при 37±1 °С на 3 сут. Затем из лунок планшетов собирали жидкость объемом не менее 1 мл, переносили в пробирки и центрифугировали в течение 5 мин при 200 об/мин. После окончания центрифугирования собирали надосадочную жидкость, образцы которой использовали для исследования содержания РНК и определения биологического титра ЧикВ.

Значение суммы среднего значения БОЕ ЧикВ (*M*), полученного в контроле, и трехкратного значения стандартного отклонения (*SD*) использовали как пороговое. Усиление репликации ЧикВ, т.е. наличие ADE-феномена, считали подтвержденным, если значения биологического титра ЧикВ в присутствии исследуемой сыворотки были выше 3 *SD* относительно среднего количества БОЕ в контроле, т.е. выше рассчитанной границы в соответствии с ранее описанным методом оценки [23, 36].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016». Данные представлены в виде среднего значения (*M*) и стандартного отклонения (*SD*). Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента непарного, с двусторонним распределением (*t*-test). Различия считали статистически достоверными при уровне значимости *p*<0,01.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поскольку репликация ЧикВ в клетках линии K562 носит ограниченный по времени характер [37], до начала исследования было проведено изучение репликации в динамике как непосредственно ЧикВ, так и в смеси с контрольной сывороткой в обеих линиях клеток. Результаты проведенных исследований представлены в таблице S3 (онлайн-приложение опубликовано на сайте журнала⁶). ЧикВ в клетках K562 статистически достоверно размножался до максимальных значений на 2 и 3 сут, при этом различия между 2 и 3 сут по всем показателям не обнаружено (*p*>0,5). На 5 сут репликация ЧикВ относительно данных на 2 и 3 сут достоверно снизилась. Поэтому в дальнейших экспериментах анализ титра ЧикВ проводили до 3 сут включительно как для клеток K562, так и клеток Vero. Все показатели, полученные на 3 сут при заражении клеток Vero, достоверно превосходили аналогичные на клетках K562 (табл. S3).

⁶ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-761-annex>

Для изучения влияния интактной сыворотки человека (контрольные образцы № 2 и 4) на репликацию ЧикВ в клетках обеих линий было проведено заражение клеток «смесью» интактной сыворотки и ЧикВ. Результаты (табл. S3) подтвердили отсутствие значимого влияния интактной сыворотки на репликацию ЧикВ ($p > 0,1$) как для клеток линии K562, так и линии Vero. В дальнейшем для сравнительного анализа

результатов ADE использовали контрольные образцы № 2 и 4 как наиболее адекватные контроли (табл. S3).

Для сравнительного анализа аналогичные эксперименты были проведены с использованием клеток линии Vero. Результаты исследования образцов сывороток с разными титрами специфических АТ к ЧикВ с использованием клеток линии Vero представлены в таблице 1.

Таблица 1. Репликация вируса Чикунгунья (ЧикВ) в присутствии исследуемых образцов сывороток в клетках линии Vero по данным метода ОТ-ПЦР-РВ и определения биологического титра

Table 1. Chikungunya virus (ChikV) replication in Vero cells in the presence of the studied serum samples according to the qRT-PCR and biological titer results

Образец сыворотки (титр в РН) <i>Serum sample (PNT titer)</i>	Разведение образца <i>Sample dilution</i>	ОТ-ПЦР-РВ (Ct) <i>qRT-PCR (Ct)</i>	ГЭ (lg/мл) <i>GE (lg/mL)</i>	Биологический титр ЧикВ (lg БОЕ/мл) <i>Biological titer ChikV (lgPFU/mL)</i>
Неиммунная сыворотка <i>Nonimmune serum</i> (Контроль № 4) ^a <i>(Control No. 4)^a</i>	Цельная <i>No dilution</i>	13,53±0,21**	8,05±0,06**	8,52±0,16**
	1:10	13,55±0,30**	8,03±0,05**	8,50±0,09**
	1:100	13,50±0,35**	8,09±0,09**	8,45±0,06**
№ 1 (1:381)	Цельная <i>No dilution</i>	29,15±0,13*	3,24±0,05*	3,48±0,07*
	1:10	24,87±0,35***	4,55±0,11***	4,50±0,05***
	1:100	17,63±0,37***	7,07±0,21***	7,49±0,04***
№ 2 (1:320)	Цельная <i>No dilution</i>	28,95±0,17*	3,28±0,05*	3,51±0,03*
	1:10	25,13±0,21***	4,47±0,06***	4,53±0,03***
	1:100	16,47±0,21***	7,45±0,45***	7,70±0,07***
№ 3 (1:320)	Цельная <i>No dilution</i>	29,13±0,06*	3,24±0,02*	3,53±0,03*
	1:10	24,77±0,23***	4,58±0,08***	4,62±0,08***
	1:100	16,63±0,44***	7,71±0,45**	7,93±0,24***
№ 4 (1:198)	Цельная <i>No dilution</i>	28,77±0,49*	3,35±0,15*	3,46±0,04*
	1:10	22,93±0,40***	5,15±0,12***	5,26±0,13***
	1:100	13,77±0,06**	7,98±0,02**	8,23±0,06***

Примечание. Множественность заражения ЧикВ для клеток обеих линий была идентичной – $1:10^3$ клеток. Неиммунная сыворотка – сыворотка здорового взрослого человека с подтвержденным отсутствием антител к вирусам денге, Чикунгунья, Зика и вирусу желтой лихорадки. Ct – показатель порогового цикла флуоресценции; ГЭ – геном-эквивалент; РН – реакция нейтрализации; БОЕ – бляшкообразующие единицы; ОТ-ПЦР-РВ – метод ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени. Данные представлены как $M \pm SD$ (среднее арифметическое значение \pm стандартное отклонение).

* $p < 0,05 - 0,001$, при сравнительном анализе результатов репликации ЧикВ в исследуемых образцах статистическую достоверность оценивали относительно соответствующих данных контрольного образца K4.

** $p < 0,001$ относительно показателей ЧикВ в присутствии этого же образца цельной сыворотки.

^a данные представлены повторно для удобства сравнения.

Note. Multiplicity of infection of ChikV for the cells of both lines was identical – $1:10^3$ cells. Non-immune serum was the serum of a healthy adult with a confirmed absence of antibodies to the following viruses: Dengue, Chikungunya, Zika and yellow fever. Ct, threshold fluorescence cycle; GE, genome equivalent; PNT, plaque neutralization test; PFU, plaque-forming unit; qRT-PCR, real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.

The data is presented as $M \pm SD$ (arithmetic mean \pm standard deviation).

* $p < 0.05 - 0.001$, in a comparative analysis of the ChikV replication results in the studied samples, statistical reliability was assessed relative to the corresponding control sample K4 data.

** $p < 0.001$ in a comparative analysis of the ChikV replication rates in the presence of the same not diluted serum sample.

^a the data are presented again for ease of comparison.

Из представленных в *таблице 1* данных следует, что нейтрализующая активность у исследуемых сывороток статистически достоверно сохранялась даже при максимальном разведении (1:100) и титр ЧикВ был статистически ниже, чем в соответствующем образце К4. Каждое последующее разведение иммунных сывороток приводило к соответствующему усилению репликации ЧикВ. Образцы сывороток № 2 и 3, имеющие одинаковые титры анти-ЧикВ АТ по результатам ИФА и РН, также не имели статистически значимых различий при разведении по всем показателям репликации ЧикВ. Для всех сывороток корреляция между показателями Ст и БОЕ была сильной отрицательной, $r =$ минус 0,995.

Результаты исследования репликации ЧикВ в присутствии образцов сывороток с разными титрами специфических АТ к ЧикВ с использованием клеток линии K562 представлены в *таблице 2*.

Результаты, представленные в *таблице 2*, свидетельствуют о том, что все специфические сыворотки, независимо от титра в РН, в неразведенном состоянии обладали выраженными нейтрализующими свойствами, что подтверждено статистически достоверным снижением всех показателей репликации ЧикВ относительно соответствующих показателей образца К2. Образцы сывороток № 2 и 3, имеющие одинаковые титры анти-ЧикВ АТ по результатам РН, не имели статистически значимых различий по всем показателям репликации ЧикВ во всех разведениях. Сыворотка № 1 с максимальным титром анти-ЧикВ АТ сохраняла свои нейтрализующие свойства при всех разведениях. Следует отметить, что каждое последующее разведение сыворотки № 1 приводило к усилению репликации. Наиболее интересными были результаты исследования образцов сывороток № 2, 3 и 4 в промежуточном разведении 1:10. В данном разведении полученные результаты продемонстрировали максимальные показатели репликации ЧикВ, которые достоверно превышали таковые у соответствующих образцов контроля К2; также полученные показатели достоверно превышали показатели репликации ЧикВ последующего разведения сыворотки 1:100. При максимальном разведении 1:100 показатели репликации ЧикВ в присутствии всех сывороток были близки к соответствующим показателям К2 ($p > 0,01$), что можно расценить как значительное снижение нейтрализующей активности, вплоть до ее отсутствия. Для всех сывороток корреляция между показателями Ст и БОЕ была сильной отрицательной: $r =$ минус 0,899.

Усиление репликации ЧикВ в присутствии специфических сывороток, т.е. появление эффекта ADE, оценивали относительно пограничного уровня ($M+3$ SD), рассчитанного в соответствии с описанием в разделе «Методы», для биологического титра ЧикВ. Результаты оценки репликации ЧикВ по данным биологического титра в клетках линии Vero в присутствии специфических сывороток в разных разведениях представлены на *рисунке 1А*, а для клеток линии K562 – на *рисунке 1В*. Горизонтальные линии на рисунках обозначают пороговые значения, относительно которых анализировали активность исследуемых сывороток. Для клеток линии K562 диапазон пороговых значений репликации ЧикВ был рассчитан с учетом данных К2 для неразведенного образца, $4,61 \pm (3 \times 0,05)$ lg БОЕ/мл (*табл. 2*). Для клеток линии Vero диапазон пороговых значений репликации ЧикВ был рассчитан с учетом данных К4 для неразведенного образца, $8,50 \pm (3 \times 0,05)$ lg БОЕ/мл (*табл. 1*). Разграничение между усиливающей репликацию вируса (усиливающей инфекцию) и нейтрализующей вирус активностью сыворотки проводили, как описано ранее [23].

Титр ЧикВ выше верхней (пороговой) линии указывал на усиление репликации вируса, т.е. усиление инфекционной активности сыворотки. Титр ЧикВ ниже нижней пороговой линии указывал на нейтрализующую активность сыворотки. В экспериментах на клетках линии Vero (*рис. 1*) биологический титр ЧикВ в присутствии сывороток с разным титром АТ и в разных разведениях всегда оставался ниже нижнего порогового значения, несмотря на то что при каждом последующем разведении сыворотки титр вируса ЧикВ ожидаемо увеличивался. Таким образом, в клетках линии Vero эффект ADE не был зафиксирован. В клетках линии Vero присутствие сыворотки в любом разведении позволяло выявить только нейтрализующую активность специфических АТ.

В клетках линии K562 присутствие специфических АТ по-иному повлияло на репликацию ЧикВ. Сыворотка № 1 оказывала нейтрализующее действие во всех разведениях, т.е. все показатели биологического титра ЧикВ были ниже нижнего порогового значения. Все остальные сыворотки, № 2, 3 и 4, в неразведенном варианте проявили нейтрализующую активность; показатели биологического титра ЧикВ были ниже нижнего порогового значения. В разведении 1:10 образцы сывороток № 2, 3 и 4 статистически достоверно усиливали репликацию ЧикВ, что было подтверждено данными биологического титра, а также данными ОТ-ПЦР-РВ.

Таблица 2. Репликация вируса Чикунгунья (ЧикВ) в присутствии исследуемых образцов сывороток в клетках линии K562 по данным метода ОТ-ПЦР-РВ и определения биологического титра**Table 2.** Chikungunya virus (ChikV) replication in K562 cells in the presence of the studied serum samples according to the qRT-PCR and biological titer results

Образец сыворотки (титр в РН) <i>Serum sample (PNT titer)</i>	Разведение образца <i>Sample dilution</i>	ОТ-ПЦР-РВ (Ct) <i>qRT-PCR (Ct)</i>	ГЭ (lg/мл) <i>GE (lg/mL)</i>	Биологический титр ЧикВ (БОЕ, lg/мл) <i>Biological titer ChikV (lgPFU/mL)</i>
Неиммунная сыворотка <i>Nonimmune serum</i> (Контроль № 2) ^а <i>(Control No. 2)^а</i>	Цельная <i>No dilution</i>	24,47±0,15**	4,68±0,05**	4,61±0,05**
	1:10	24,56±0,09**	4,72±0,06**	4,66±0,07**
	1:100	24,52±0,14**	4,67±0,04**	4,70±0,07**
№ 1 (1:381)	Цельная <i>No dilution</i>	26,7±0,27*	3,99±0,08*	3,43 ±0,09*
	1:10	25,0±0,35*	4,50±0,08*	4,06 ±0,50*
	1:100	24,7±0,10**	4,60±0,04**	4,73±0,12**
№ 2 (1:320)	Цельная <i>No dilution</i>	26,17±0,25*	4,15±0,08*	3,82±0,07*
	1:10	23,53±0,15***	4,97±0,05***	4,91±0,02***
	1:100	24,60±0,10**	4,64±0,04**	4,63±0,03**
№ 3 (1:320)	Цельная <i>No dilution</i>	26,96±0,21*	3,91±0,07*	3,61±0,07*
	1:10	23,40±0,20***	5,01±0,07***	4,97±0,06***
	1:100	25,13±0,21**	4,46±0,07**	4,73±0,06**
№ 4 (1:198)	Цельная <i>No dilution</i>	26,67±0,23*	4,00±0,07*	3,65±0,02*
	1:10	23,17±0,06***	5,08±0,02***	4,93±0,07***
	1:100	24,97±0,21**	4,55±0,12**	4,70±0,06**

Примечание. Множественность заражения ЧикВ для клеток обеих линий была идентичной – 1:10³ клеток. Неиммунная сыворотка – сыворотка здорового взрослого человека с подтвержденным отсутствием антител к вирусам денге, Чикунгунья, Зика и вирусу желтой лихорадки. Ct – показатель порогового цикла флуоресценции; ГЭ – геном-эквивалент; РН – реакция нейтрализации; БОЕ – бляшкообразующие единицы; ОТ-ПЦР-РВ – метод ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени. Данные представлены как *M*±SD (среднее арифметическое ± стандартное отклонение).

* *p*<0,005, при сравнительном анализе результатов репликации ЧикВ в исследуемых образцах статистическую достоверность оценивали относительно соответствующих данных контрольного образца K2.

** *p*<0,005 относительно показателей репликации ЧикВ в присутствии этого же образца цельной сыворотки.

^а данные представлены повторно для удобства сравнения.

Note. Multiplicity of infection of ChikV for the cells of both lines was identical – 1:10³ cells. Non-immune serum was the serum of a healthy adult with a confirmed absence of IgG to the following viruses: Dengue, Chikungunya, Zika and yellow fever. Ct, threshold fluorescence cycle; GE, genome equivalent; PNT, plague neutralization test; PFU, plaque-forming unit; qRT-PCR, real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.

The data is presented as *M*±SD (arithmetic mean ± standard deviation).

* *p*<0.005, in a comparative analysis of the ChikV replication results in the studied samples, statistical reliability was assessed relative to the corresponding control sample K2 data.

** *p*<0.005 in a comparative analysis of the ChikV replication rates in the presence of the same not diluted serum sample.

^a the data are presented again for ease of comparison.

Биологический титр ЧикВ превысил верхнее пограничное значение, т.е. был достоверно выше, чем у контрольного образца K2, а также титра ЧикВ соответствующего неразведенного образца (*p*<0,01), что в совокупности было расценено как эффект ADE. Следует отметить, что последующее разведение данных сывороток 1:100 привело к достоверному снижению титра ЧикВ, который оказался внутри диапазона

пороговых значений, что свидетельствовало как об отсутствии усиления репликации ЧикВ, так и об отсутствии нейтрализующей активности специфической сыворотки. Для оценки уровня усиления репликации ЧикВ было рассчитано соотношение показателя биологического титра ЧикВ для K2 к показателю биологического титра ЧикВ для образцов сывороток № 2, 3 и 4 в разведении 1:10, как было предложено ранее [23, 38].

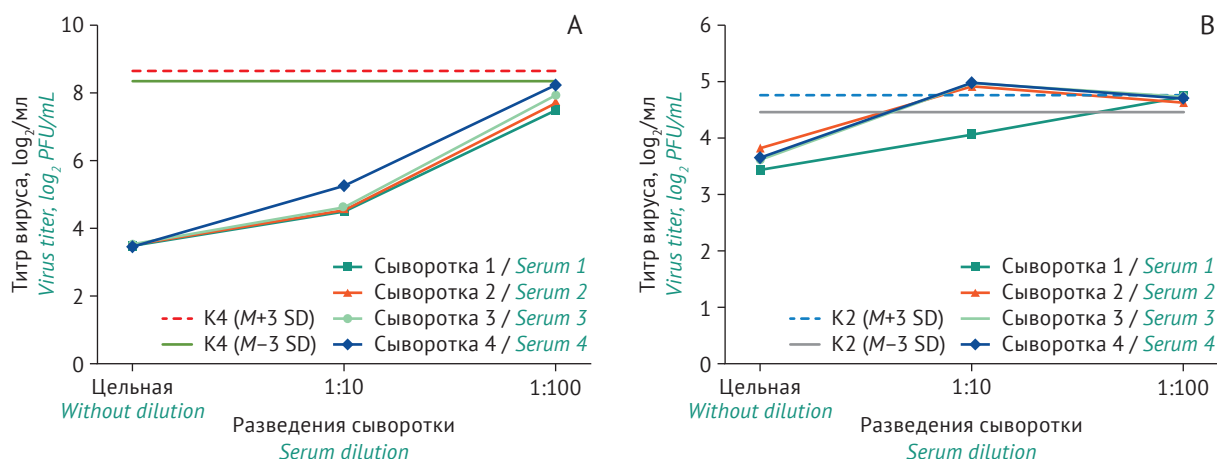


Рис. 1. Биологический титр ЧикВ в присутствии исследуемых образцов сывороток в разных разведениях: А – клетки линии Vero относительно пороговых значений соответствующего контроля К4 (ЧикВ плюс неиммунная сыворотка); В – клетки линии K562 относительно пороговых значений соответствующего контроля К2 (ЧикВ плюс неиммунная сыворотка). *M* – среднее арифметическое значение; *SD* – стандартное отклонение.

Fig. 1. Biological titer of ChikV in the presence of the testing samples of sera at different dilutions A, Vero cells, relative to the threshold values of the corresponding K4 control (ChikV plus non-immune serum). B, K562 cells, relative to the threshold values of the corresponding K2 control (ChikV plus non-immune serum). *M*, mean value; *SD*, standard deviation; PFU, plaque-forming unit.

Данные биологического титра были переведены в антилогарифмы; получены следующие результаты: для образца № 2 усиление биологического титра ЧикВ составило 142%, образца № 3 – 162% и образца № 4 – 166%.

Данные репликации ЧикВ, полученные методом ОТ-ПЦР-РВ, и соответственно данные ГЭ как зависимого показателя полностью повторяли изменения биологического титра ЧикВ во всех экспериментах.

ОБСУЖДЕНИЕ

Вирусы, для которых характерен феномен ADE, имеют общие признаки, а именно: частичная или исключительная репликация в макрофагах; индуцирование продукции большого количества АТ с низкой нейтрализующей активностью даже относительно гомологичного вируса и способность вызывать персистирующие инфекции, которые характеризуются длительно продолжающейся вирусемией. Антигенное разнообразие среди изолятов также является общей особенностью таких вирусов, что и делает их частично устойчивыми к нейтрализации АТ, вырабатываемыми против гетерологичных изолятов [39, 40]. ЧикВ, как и ДенВ, относится к такой группе вирусов.

Для ДенВ проводятся многочисленные исследования эффекта ADE, особенно в свете необходимости создания эффективной и безопасной вакцины. Единственное, по нашим данным, исследование ADE при ЧикВ инфекции *in vitro* было проведено с использованием первичных клеток человека и клеточной линии макрофагов мыши

RAW264.7 в присутствии специфических сывороток, с субнейтрализующими титрами АТ [26]. В данном исследовании показано, что ЧикВ инфицировал как первичные моноциты и В-клетки человека, так и мышинные клетки RAW264.7. Полученные результаты авторы объяснили тем, что клетки человека и мыши экспрессируют разные FcγR и поэтому, вероятно, имеют разные пути развития ADE.

Экспериментальная инфекция ЧикВ у трехнедельных мышей показала, что у особей с более низкими титрами ЧикВ-специфических АТ вирусная нагрузка была выше, а воспаление суставов выражено сильнее; а у мышей в возрасте 11 сут наличие низких титров АТ сопровождалось не только более высокой вирусной нагрузкой в мышцах, но и приводило к смерти животных [26]. Таким образом, F.M. Lum с соавт. [26] впервые экспериментально продемонстрировали, что АТ могут усиливать инфекцию ЧикВ. Было предположено, что ограниченная репликация ЧикВ, наблюдаемая в моноцитах и В-клетках человека, может быть формой «подрывной» деятельности ЧикВ для достижения хронизации патологического процесса [41]. Персистирующие артралгии после перенесенной инфекции ЧикВ можно объяснить развитием при определенных условиях ADE, как и у других «артритогенных» альфа-вирусов, таких как вирус Ross River [42, 43].

Опираясь на опыт исследований феномена ADE при ДенВ *in vitro*, мы использовали клетки линии K562. Сравнительные исследования репликации ЧикВ в клетках линии Vero и K562 в нашей работе убедительно продемонстрировали

специфичность феномена ADE. Репликация ЧикВ в клетках линии Vero в нашем эксперименте подтвердила высокую чувствительность данной линии клеток к вирусу и возможность использования ее исключительно для анализа нейтрализующей активности специфических АТ. Клетки FcR-экспрессирующей линии K562 позволили анализировать обе функции АТ: нейтрализующую вирус и активирующую вирусную инфекцию, а также позволили разграничить одну функцию от другой. Возможность проведения подобного рода исследований *in vitro* упрощает исследование феномена ADE в целом.

В представленной работе ADE был обнаружен в промежуточном разведении сывороток со средним или низким титром вируснейтрализующих анти-ЧикВ АТ. Феномен ADE, т.е. усиления репликации вируса, был ранее продемонстрирован для ДенВ в присутствии именно промежуточных разведений специфических сывороток. Длительное наблюдение за детской когортой, которая неоднократно сталкивалась с инфекцией ДенВ, показало, что низкие уровни АТ не усиливали болезнь, а высокие уровни могли успешно защитить от тяжелой формы заболевания. При этом именно промежуточные уровни анти-ДенВ АТ были связаны с ADE и тяжелым течением заболевания [44]. У вакцинированных препаратом Dengvaxia эффект ADE также был обнаружен в промежуточных разведениях сыворотки [30]. Эти исследования подчеркивают неоднозначность корреляции иммунных показателей с протективностью.

В течение достаточно длительного времени методы исследования ADE с использованием FcR-экспрессирующих клеток модифицировались и совершенствовались. Так, например, А. Уатака с соавт. [24] оценивали ADE по уровню инфицированных клеток линии K562 и вместо натурального вируса использовали химерные вирусные частицы на основе четырех штаммов ДенВ. Этот метод имел преимущество высокопроизводительного скрининга, но недостаточно имитировал условия *in vivo*, так как вирус в данном методе представлял собой рекомбинантный белок [24]. В другой экспериментальной работе было продемонстрировано, что только с использованием ДенВ, выделенного непосредственно от пациента, можно *in vitro* подтвердить вероятность развития ADE, в то время как при использовании рекомбинантного вируса результаты были неубедительными [45].

Как известно, размер вирусных частиц, а также количество и плотность расположения поверхностных антигенных детерминант у рекомбинантного штамма могут сильно отличаться

от таковых у нативного вируса [16]. В нашем исследовании мы использовали нативный ЧикВ и, таким образом, исключили влияние структурных особенностей вируса на результат *in vitro*. Ряд исследователей оценивали ADE при инфекции ДенВ также по инфекционному титру, но при этом использовали специально созданную ими линию клеток ВНК, экспрессирующую FcγRIIA [22, 38, 44]. В примененном нами подходе ADE оценивали в FcγRII-экспрессирующих клетках линии K562 по инфекционному (биологическому) титру ЧикВ и дополнительно по содержанию вирусной РНК. Преимуществом предложенного нами подхода является возможность оценить риск развития ADE стандартным методом прямого титрования бляшек (биологический титр вируса). Данные репликации ЧикВ, полученные в нашем исследовании методом ОТ-ПЦР-РВ и, соответственно, данные ГЭ как зависимого показателя полностью повторяли изменения биологического титра ЧикВ во всех экспериментах. По нашему мнению, при высокой корреляции показателей биологического титра вируса и показателей ОТ-ПЦР-РВ можно разработать критерии оценки ADE по результатам, полученным методом ОТ-ПЦР-РВ, что значительно ускорит и упростит проведение анализа. Безусловно, такой подход к оценке ADE требует большой подготовительной работы.

Ранее М.Л. Мої с соавт. [38] продемонстрировали, что концентрация АТ, а не соотношение между АТ и ДенВ, оказалась ключевым параметром для оценки усиления инфекции с помощью FcR-экспрессирующих клеток. Следует иметь в виду определенные различия в фоновом росте и пороге заражения разных вирусов или их серотипов при использовании той или иной линии клеток. В проведенном исследовании мы предварительно подобрали оптимальную дозу заражения ЧикВ (MOI – $1:10^3$ на клетку) для клеточной линии K562 и проанализировали динамику репликации ЧикВ двумя методами, затем изучили инфекционную активность ЧикВ в присутствии иммунных сывороток и таким образом продемонстрировали возможности данного подхода для анализа ADE.

Используя FcγRII-экспрессирующую линию клеток K562, мы опирались не только на опыт предыдущих исследователей, но и на тот факт, что внутриклеточная часть FcγRII является основной детерминантой в развитии ADE [19]. Известно, что связь между FcγR и комплексом вирус-АТ контролирует развитие ADE посредством поглощения иммунного комплекса и влияния на баланс между активацией и ингибированием FcγRI, FcγRII и FcγRIII. FcγRII

является низкоаффинным рецептором и требует высокоаффинного соединения с комплексом «вирус-АТ». Если последнее условие по каким-то причинам невыполнимо, сформированный иммунный комплекс из-за низкого сродства с FcγRIIIa высвобождается внутри клетки, что, в свою очередь, влияет на врожденный иммунитет, который может переключиться от противовирусного состояния к иммуносупрессии. Безусловно, фагоцитирующая клеточная линия может иметь значимые отличия от первичных клеток человека. Весьма вероятно, именно поэтому ADE при исследовании чаще регистрируют *in vitro*, чем *in vivo* [16].

Следует учитывать и другие возможные механизмы развития ADE. Например, комплемент-опосредованное ADE, развитие которого может быть синергично с FcγR, но может и быть самостоятельным. В нашем исследовании мы исключили влияние комплемента во всех использованных сыворотках путем их предварительного прогревания; ADE оценивали относительно контроля, который представлял собой не ЧикВ как таковой, а «смесь» ЧикВ с сывороткой крови здорового добровольца, расценив данный вариант контроля как наиболее адекватный.

Остается неясным, будет ли высокая активность ADE коррелировать с тяжестью заболевания. Для более детального изучения этой связи требуется проспективное когортное исследование, которое поможет прояснить, насколько эффективны используемые на данном этапе методы оценки ADE *in vitro* в прогнозировании риска тяжелого течения болезни у пациентов или вакцинированных [24]. Так, например, в исследованиях тетравалентной живой вакцины Dengvaxia (Sanofi Pasteur, Франция) после однократного применения у 113 детей с использованием 4-х серотипов ДенВ и клеток K562 в единичных случаях было обнаружено «минимальный уровень ADE» при использовании сыворотки в разведении 1:12, что, по мнению авторов, соответствовало состоянию *in vivo*. При более высоких разведениях сыворотки возникала корреляция между спектром АТ и одновременным падением титра АТ и соответственно риском развития ADE. В целом у 28 детей был обнаружен ADE при использовании в анализе одного или 2–3 серотипов ДенВ [30].

После анализа результатов III фазы клинических исследований Dengvaxia было отмечено,

что только IV фаза и постмаркетинговое наблюдение смогут дать окончательный ответ, представляет ли ADE риск для реципиентов данной вакцины. В итоге в 2019 г. FDA (США) одобрило использование вакцины Dengvaxia только для детей в возрасте от 9 до 16 лет, которые ранее переболели лихорадкой денге и живут в районах, где это заболевание распространено, так как у детей, вакцинированных в возрасте от 2 до 5 лет, был выявлен риск госпитализации с тяжелой формой лихорадки денге в 8 раз чаще по сравнению с группой плацебо [46].

История применения тетравакцины против ДенВ компанией Sanofi Pasteur вызвала опасения по поводу ценности теста нейтрализации *in vitro* как прогностического показателя защиты *in vivo* и заставила менять подходы к оценке иммунологической безопасности разрабатываемых вакцин и продолжать работу над исследованием феномена ADE.

В Российской Федерации был предложен алгоритм доклинических исследований разрабатываемых вакцин с учетом оценки риска развития ADE, которому, по сути, мы и следовали в данной работе [47]. В представленном исследовании впервые в нашей стране не только предпринята попытка опробовать метод детекции ADE, используя клетки линии K562 и традиционный метод титрования вируса, но и проведена оценка риска развития ADE, используя сыворотки с разным титром специфических анти-ЧикВ АТ.

Выводы

1. Репликация вируса Чикунгуны в FcR-негативных клетках линии Vero подтвердила высокую чувствительность данной линии клеток к вирусу и возможность использования ее исключительно для оценки нейтрализующей активности специфических антител.
2. Клетки FcR-экспрессирующей линии K562 позволили анализировать обе функции антител: и нейтрализующую вирус, и активирующую инфекцию.
3. Результаты работы подтвердили возможность проведения исследований антителозависимого усиления инфекции *in vitro*, что значительно упрощает исследование данного феномена при оценке безопасности разрабатываемых вакцин.

Литература/References

1. Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med.* 1977;146(1):201–17. <https://doi.org/10.1084/jem.146.1.201>
2. Takada A, Kawaoka Y. Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and *in vivo* implications. *Rev Med Virol.* 2003;13(6):387–98. <https://doi.org/10.1002/rmv.405>

3. Yang X, Zhang X, Zhao X, et al. Antibody-dependent enhancement: "Evil" antibodies favorable for viral infections. *Viruses*. 2022;14(8):1739. <https://doi.org/10.3390/v14081739>
4. Graham BS. Vaccines against respiratory syncytial virus: The time has finally come. *Vaccine*. 2016;34(30):3535–41. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.083>
5. Polack FP. Atypical measles and enhanced respiratory syncytial virus disease (ERD) made simple. *Pediatr Res*. 2007;62(1):111–5. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3180686ce0>
6. Langerak T, Mumtaz N, Tolk VI, et al. The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2019;15(4):e1007640. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007640>
7. Junqueira C, Crespo A, Ranjbar S, et al. FcγR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. *Nature*. 2022;606(7914):576–84. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04702-4>
8. Kuzmina NA, Younan P, Gilchuk P, et al. Antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection by human antibodies isolated from survivors. *Cell Rep*. 2018;24(7):1802–15.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.035>
9. Ignatyev GM, Agafonov AP, Streltsova MA, Kashentseva EA. Inactivated Marburg virus elicits a nonprotective immune response in Rhesus monkeys. *J Biotechnol*. 1996;44(1–3):111–8. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00104-2](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00104-2)
10. Stiasny K, Medits I, Roßbacher L, Heinz FX. Impact of structural dynamics on biological functions of flaviviruses. *FEBS J*. 2023;290(8):1973–85. <https://doi.org/10.1111/febs.16419>
11. Hawkes RA. Enhancement of the infectivity of arboviruses by specific antisera produced in domestic fowls. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1964;42:465–82. <https://doi.org/10.1038/icb.1964.44>
12. Halstead SB, Chow JS, Marchette NJ. Immunological enhancement of dengue virus replication. *Nat New Biol*. 1973;243(122):24–6. PMID: 17319077
13. Peiris JS, Gordon S, Unkeless JC, Porterfield JS. Monoclonal anti-Fc receptor IgG blocks antibody enhancement of viral replication in macrophages. *Nature*. 1981;289(5794):189–91. <https://doi.org/10.1038/289189a0>
14. Halstead SB, Mahalingam S, Marovich MA, et al. Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(10):712–22. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70166-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70166-3)
15. Thomas S, Smatti MK, Ouhiti A, et al. Antibody-dependent enhancement (ADE) and the role of complement system in disease pathogenesis. *Mol Immunol*. 2022;152:172–82. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2022.11.010>
16. Burton DR. Antiviral neutralizing antibodies: from *in vitro* to *in vivo* activity. *Nat Rev Immunol*. 2023;23(11):720–34. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00858-w>
17. Bournazos S, Gupta A, Ravetch JV. The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(10):633–43. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00410-0>
18. Xu L, Ma Z, Li Y, et al. Antibody dependent enhancement: Unavoidable problems in vaccine development. *Adv Immunol*. 2021;151:99–133. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2021.08.003>
19. Mader K, Dustin LB. Beyond bNAbs: Uses, risks, and opportunities for therapeutic application of non-neutralising antibodies in viral infection. *Antibodies (Basel)*. 2024;13(2):28. <https://doi.org/10.3390/antib13020028>
20. Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, et al. Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*. 2016;536(7614):48–53. <https://doi.org/10.1038/nature18938>
21. Sawant J, Patil A, Kurlle S. A review: Understanding molecular mechanisms of antibody-dependent enhancement in viral infections. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(7):1240. <https://doi.org/10.3390/vaccines11071240>
22. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, et al. Development of an antibody-dependent enhancement assay for dengue virus using stable BHK-21 cell lines expressing Fc gammaRIIA. *J Virol Methods*. 2010;163(2):205–9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.09.018>
23. Konishi E, Tabuchi Y, Yamanaka A. A simple assay system for infection-enhancing and -neutralizing antibodies to dengue type 2 virus using layers of semi-adherent K562 cells. *J Virol Methods*. 2010;163(2):360–7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.10.026>
24. Yamanaka A, Rattanaamnuaychai P, Matsuda M, et al. Development of a rapid assay system for detecting antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol Methods*. 2023;311:114641. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2022.114641>
25. Huang X, Yue Y, Li D, et al. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection inhibits RLR-mediated type-I IFN-independent signalling through upregulation of cellular autophagy. *Sci Rep*. 2016;6:22303. <https://doi.org/10.1038/srep22303>
26. Lum FM, Couderc T, Chia BS, et al. Antibody-mediated enhancement aggravates chikungunya virus infection and disease severity. *Sci Rep*. 2018;8(1):1860. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20305-4>
27. Boonnak K, Dambach KM, Donofrio GC, et al. Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol*. 2011;85(4):1671–83. <https://doi.org/10.1128/JVI.00220-10>
28. Chotiwan N, Roehrig JT, Schlesinger JJ, et al. Molecular determinants of dengue virus 2 envelope protein important for virus entry in FcγRIIA-mediated antibody-dependent enhancement of infection. *Virology*. 2014;456–457:238–46. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2014.03.031>
29. He RT, Innis BL, Nisalak A, et al. Antibodies that block virus attachment to Vero cells are a major component of the human neutralizing antibody response against dengue virus type 2. *J Med Virol*. 1995;45(4):451–61. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890450417>
30. Guy B, Chanthavanich P, Gimenez S, et al. Evaluation by flow cytometry of antibody-dependent enhancement (ADE) of dengue infection by sera from Thai children immunized with a live-attenuated trivalent dengue vaccine. *Vaccine*. 2004;22(27–28):3563–74. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.042>
31. Отрашевская ЕВ, Казакова ЕВ, Жиленкина ЕН и др. Ретроспективный серологический анализ распространения flavivirusных лихорадок и лихорадки Чикунгунья в Никарагуа – авидность специфических антител как инструмент дифференциальной диагностики. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2022;99(2):215–24. Отрашевская ЕВ, Казакова ЕВ, Жиленкина ЕН, et al. The study of flaviviruses and Chikungunya virus seroprevalence in Nicaragua – virus-specific antibody avidity assay as a tool for differential diagnosis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(2):215–24 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-196>
32. Chusri S, Siripaitoon P, Silpapojakul K, et al. Kinetics of chikungunya infections during an outbreak in Southern Thailand, 2008–2009. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90(3):410–17. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0681>
33. Игнатьев ГМ, Каа КВ, Оксанич АС и др. Индикация и идентификация вирусов денге и Чикунгунья в комарах рода *Aedes* spp., отловленных в Центральной Америке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2020;97(5):227–32. Ignatyev GM, Kaa KV, Oksanich AS, et al. Indication and identification of Dengue and Chikungunya viruses in *Aedes* spp. mosquitoes captured in Central America. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(5):227–32 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4>
34. Оксанич АС, Самарцева ТГ, Каа КВ и др. Молекулярно-генетические методы контроля качества инактивированных вакцин на модели вируса Чикунгунья: подлинность штамма и полнота инактивации вируса. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(3):279–93. Oksanich AS, Samartseva TG, Kaa KV, et al. Molecular genetic methods for quality control of inactivated vaccines using a Chikungunya virus model: vaccine strain identification and completeness of virus inactivation. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(3):279–93 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-279-293>
35. Moi ML, Takasaki T, Kurane I. Detection of virus-antibody immune complexes in secondary Dengue virus infection. *Methods Mol Biol*. 2018;1604:331–7. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6981-4_25
36. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, et al. Detection of higher levels of dengue viremia using FcγR-expressing BHK-21 cells than FcγR-negative cells in secondary infection but not in primary infection. *J Infect Dis*. 2011;203(10):1405–14. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir053>
37. Taraphdar D, Singh B, Pattanayak S, et al. Comodulation of Dengue and Chikungunya virus infection during a coinfection scenario in human cell lines. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:821061. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.821061>
38. Moi ML, Takasaki T, Saijo M, Kurane I. Determination of antibody concentration as the main parameter in a dengue virus antibody-dependent enhancement assay using FcγR-expressing BHK cells. *Arch Virol*. 2014;159(1):103–16. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1787-3>

39. Halstead SB. Dengue antibody-dependent enhancement: Knowns and unknowns. *Microbiol Spectr*. 2014;2(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014>
40. Tirado SM, Yoon KJ. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral Immunol*. 2003;16(1):69–86. <https://doi.org/10.1089/088282403763635465>
41. Sallie R. Replicative homeostasis: A fundamental mechanism mediating selective viral replication and escape mutation. *Virology*. 2005;2:10. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-10>
42. Linn ML, Aaskov JG, Suhrbier A. Antibody-dependent enhancement and persistence in macrophages of an arbovirus associated with arthritis. *J Gen Virol*. 1996;77(Pt 3):407–11. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-3-407>
43. Atella MO, Carvalho AS, Da Poian AT. Role of macrophages in the onset, maintenance, or control of arthritis caused by alphaviruses. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2023;248(22):2039–44. <https://doi.org/10.1177/15353702231214261>
44. Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*. 2017;358(6365):929–32. <https://doi.org/10.1126/science.aan6836>
45. Chaichana P, Okabayashi T, Puiprom O, et al. Low levels of antibody-dependent enhancement *in vitro* using viruses and plasma from dengue patients. *PLoS One*. 2014;9(3):e92173. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092173>
46. Hadinegoro SR, Arredondo-García JL, Capeding MR, et al. Efficacy and long-term safety of a Dengue vaccine in regions of endemic disease. *N Engl J Med*. 2015;373(13):1195–206. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506223>
47. Миронов АН, Супотницкий МВ, Лебединская ЕВ. Феномен антитело-зависимого усиления инфекции у вакцинированных и переболевших. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2013;(3):12–25. Mironov AN, Supotnitskiy MV, Lebedinskaya EV. The phenomenon of antibody-dependent enhancement of infection in vaccinated and convalescents. *BIOpreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2013;(3):12–25 (In Russ.). EDN: [RDXVHD](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506223)

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены *таблицы S1–S3*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-761-annex>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Отрашевская** – разработка дизайна исследования, проведение исследований, анализ и интерпретация результатов исследований, статистическая обработка, написание рукописи; **Т.Г. Самарцева** – проведение исследований, анализ и интерпретация результатов исследования; **А.С. Оксанич** – анализ результатов, критический анализ текста; **С.С. Гогина** – проведение исследований; **В.В. Зверев** – обсуждение концепции исследования, обобщение результатов исследования, критический пересмотр текста рукописи; **Г.М. Игнатьев** – обоснование концепции исследования, разработка дизайна исследований, непосредственное участие в выполнении работ, написание рукописи.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (протокол № 17/2025 от 25.11.2020).

Supplementary information. *Tables S1–S3* are available on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-761-annex>

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.V. Otrashevskaja** developed study design, conducted experiments and statistical analysis, analysed and interpreted the results, drafted the manuscript. **T.G. Samartseva** conducted the experiments, analysed and interpreted the results. **A.S. Oksanich** analysed and interpreted the results obtained, performed critical analysis of the manuscript. **S.S. Gogina** conducted the experiments. **V.V. Zverev** discussed the study concept, generalized of the results obtained, critically revised the manuscript. **G.M. Ignatyev** conceptualized the research, developed study design, conducted the experiments, and drafted the manuscript.

Ethics approval. The study protocol was approved by the local ethics committee of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (meeting minutes No. 17/2025 dated November 25, 2020).

Об авторах / Authors

Отрашевская Елена Викторовна / Elena V. Otrashevskaja

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Самарцева Татьяна Геннадьевна / Tatyana G. Samartseva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

Оксанич Алексей Сергеевич, канд. биол. наук / Aleksey S. Oksanich, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>

Гогина Софья Сергеевна / Sofya S. Gogina

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

Зверев Виталий Васильевич, д-р биол. наук, проф., академик РАН / Vitaly V. Zverev, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Acad. RAS

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф. / George M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Поступила 24.12.2025

После доработки 11.02.2026

Принята к публикации 13.03.2026

Online first 28.04.2026

Received December 24, 2025

Revised February 11, 2026

Accepted March 13, 2026

Online first April 28, 2026