

Е.В.Найденова, В.Е.Куклев, Ю.И.Яшечкин, С.А.Щербакова, В.В.Кутырев

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ (ОБЗОР)

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В работе приведены современные данные о распространении, строении и классификации вирусов Денге и лабораторной диагностике вызываемых ими заболеваний с использованием классических и современных вирусологических методов, рассматривается возможность применения различных лабораторных тестов в разные сроки от начала заболевания. Участвовавшие в настоящее время случаи завоза данного инфекционного заболевания на территорию Российской Федерации показывают необходимость разработки тест-систем отечественного производства, а также внедрения в практику противочумных институтов технологий выделения вирусов на биологической модели или культуре клеток.

Ключевые слова: вирусы Денге, лихорадка денге, лабораторная диагностика.

E.V.Naydenova, V.E.Kuklev, Yu.I.Yashechkin, S.A.Shcherbakova, V.V.Kutyrev

Current State of Dengue Fever Laboratory Diagnostics (Scientific Review)

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

The paper contains the data on the distribution, morphology and classification of Dengue viruses as well as laboratory diagnostics of the diseases caused by them using conventional and modern virology methods. Discussed is the possibility of application of various laboratory techniques at different stages from the onset of the disease. In addition, up to date cases of Dengue fever importation into the territory of the Russian Federation are becoming more frequent which testifies to the need of the development of domestically produced test-system, as well as introduction of modern technologies of virus isolation on the biological model or cell culture into the practice of plague control institutions.

Key words: Dengue viruses, Dengue fever, laboratory diagnostics.

Заболевание, вызванное вирусами Денге, носит эпидемический характер с вовлечением сотен тысяч человек и широко распространено в Юго-Восточной Азии, на островах Тихого океана, в странах Карибского бассейна, в Южной и Центральной Америке, в Африке [4, 5, 41, 46]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), заболевание отмечено более чем в 100 странах. Ежегодно в мире переболевает около 50 млн человек. Под угрозой заражения находятся около 2,5 млрд жителей планеты. За последние десятилетия в мире произошло значительное увеличение случаев заболевания лихорадкой денге во многих, эндемичных по этой инфекции, регионах [3, 24, 45].

Целью настоящей работы был обзор имеющихся сведений о методах лабораторной диагностики лихорадки денге и эффективности их использования в зависимости от сроков заболевания.

Лихорадка денге – острая природно-очаговая арбовирусная инфекционная болезнь с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя [4, 8]. В результате исследований [4, 5, 45, 46] было показано, что заболевание вызывают 4 различающихся по антигенным и генетическим свойствам вируса. Возбудители лихорадки денге – вирусы Денге I–IV типов относятся к семейству *Flaviviridae*, роду *Flavivirus*, к антигенному комплексу вирусов Денге [4, 8, 45, 46]. Вирусы Денге содержат односпираль-

ную, позитивную, линейную РНК и покрыты двухслойной липидной мембраной, состоящей из фосфолипидов и холестерина. Размеры сферического вириона колеблются в пределах 40–50 нм в диаметре. В состав вириона входят 3 структурных протеина: капсидный протеин С, мажорный оболочечный протеин Е, либо ргМ (у незрелых вирионов), либо М (у зрелых вирионов). В инфицированных клетках синтезируется 7 неструктурных протеинов: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5 [29, 46, 48, 49].

В соответствии с Санитарными правилами 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)», действующими в настоящее время на территории Российской Федерации, вирусы Денге отнесены ко II группе патогенности. Лихорадка денге является нозологической формой, входящей в список инфекционных (паразитарных) болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации (Приложение 1 к СП 3.4.2318-08 «Санитарная охрана территорий Российской Федерации»), и входит в перечень нозологий, ассоциированных с чрезвычайными ситуациями в области общественного здравоохранения, имеющими международное значение (Приложение 2 Международных медико-санитарных правил (2005 г.)). Согласно Международной классификации болезней десятого пересмотра (МКБ-10) лихорадке

денге (классической) и геморрагической лихорадке, вызванной вирусами Денге (ГЛД), присвоены коды А-90 и А-91 соответственно.

Основным переносчиком возбудителя является синантропный комар *Stegomyia aegypti*. Также эпидемиологическое значение в качестве переносчика имеет и другой вид комаров – *Stegomyia albopictus*. На территории Российской Федерации в районе Большого Сочи (Краснодарский край) были обнаружены местные популяции комаров *St. aegypti* и *St. albopictus* – основных переносчиков вирусов Денге [1, 2, 9]. И после 40-летнего отсутствия популяции комаров *St. aegypti* восстановились на территории Черноморского побережья Кавказа [10]. Эти данные не исключают возможность возникновения вспышки лихорадки денге в этом регионе [1]. Похожая ситуация складывалась в 1927–1928 гг. в Греции, где была зафиксирована крупная вспышка лихорадки денге, в результате которой погибло более 1000 чел. [32]. Также в 2010 г. местная передача вирусов Денге была впервые зарегистрирована во Франции и Хорватии, а завезенные случаи заболевания выявлены в других европейских странах [19, 28, 36, 38].

В последние годы эта экзотическая инфекционная болезнь приобретает актуальность и для Российской Федерации. По данным В.Ф.Ларичева [3], за период 2002–2011 гг. было верифицировано 46 случаев лихорадки денге, завезенных в Россию из тропических и субтропических стран. Случаи лихорадки денге были связаны с посещением Индонезии (22), Таиланда (11), Вьетнама (3), Индии (3), Венесуэлы (2), Сингапура (1), Шри-Ланки (1), Малайзии (1), Коста-Рики (1) и Доминиканской Республики (1). Распределение 46 диагностированных случаев лихорадки денге по годам было следующим: в 2002 г. – 3, 2006 г. – 1, 2007 г. – 2, 2008 г. – 3, 2009 г. – 8, в 2010 г. – 17, 2011 г. – 12 (по сведениям за 6 первых месяцев).

Лихорадку денге дифференцируют от малярии, лихорадки чикунгунья, москитных лихорадок, желтой лихорадки, других геморрагических лихорадок, инфекционно-токсического шока при бактериальных заболеваниях (сепсис, менингококцемия и др.) [45].

Лабораторная диагностика лихорадки денге, как и других вирусных инфекций, основана на выявлении вируса или его частиц, а также исследовании динамики титра антител, и проводится с использованием вирусологических, серологических и молекулярно-генетических методов [4, 5, 7, 45, 46].

Основным вирусологическим методом является изоляция вируса из клинического материала и его идентификация [4, 5, 7, 45, 46, 49, 50]. Для выделения вирусов Денге используют кровь, сыворотку крови или плазму, обогащенную эритроцитами, так как вирус хорошо сохраняется и размножается в лейкоцитах, в случае летального исхода – пробы внутренних органов. При лихорадочной форме заболевания вероятность выделения вирусов выше, чем при геморрагической [4, 5].

Оптимальным методом выделения вирусов Денге является заражение «комариных» клеточных культур. Наиболее часто с этой целью используется клон С6/36 (*St. albopictus*), полученный из клеток личинок комаров *St. albopictus* [5, 12, 25, 27, 35, 40, 41, 44, 45, 46]. Так, в 2011 г. на клеточной культуре С6/36 в Бразилии выделили вирус Денге IV типа, циркуляция которого ранее на этой территории не отмечалась [41]. По данным некоторых авторов, хорошей чувствительностью для изоляции вирусов Денге обладают культура клеток *Vero*, выделенная из почек обезьян и *BHK-21* – культуры из почек хомячков [40, 41, 44, 46, 49]. Размножение вируса происходит в цитоплазме клеток относительно медленно, развитие цитопатического эффекта наблюдается не всегда. Наличие вируса в культурах клеток учитывают на 4–5-й день после заражения и подтверждают с помощью электронной микроскопии, иммунофлуоресцентного анализа, иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) [4, 5, 7, 45, 46].

В качестве биологической модели чаще всего используют новорожденных белых мышей, но этот метод менее эффективен и требует длительного периода адаптации вируса [4, 5, 7, 45, 46, 50]. Для выделения вируса заражают не человекообразных обезьян, в основном макак-резусов (*Macaca mulatta*). Но использование обезьян в качестве биологической модели не позволяет изучать патогенез инфекции, так как у животных при повторном заражении признаки ГЛД не наблюдаются [50].

Молекулярное типирование полученных вирусных изолятов проводят с использованием ПЦР и секвенирования [11, 14, 22, 38, 42]. Это является важной задачей для прогнозирования эпидемий и изучения географической миграции вирусных штаммов. При генотипировании вируса Денге-I может быть использован любой из 9 генов (за исключением NS4A), для вируса Денге-II удобными мишенями могут быть фрагменты генома PrM/M, E, NS1, NS3, NS4A и NS5, для вирусов Денге, относящихся к III типу, исследуют все 10 генов, а для вируса Денге IV типа подходящими объектами могут являться С, PrM/M, E, NS1, NS2A, NS2B, NS4A и NS5 [24].

Иммуносерологическая диагностика используется для определения и антигенов, и антител. На ранних стадиях заболевания выявляют вирусный антиген NS1, присутствие которого в сыворотке крови больного указывает на размножение вируса Денге в организме, и ранние антитела – IgM, которые появляются в первые несколько дней от начала болезни. К 10–14-му дню от начала заболевания в крови синтезируются антитела класса G [4, 5, 7, 12, 13, 17, 38, 40, 41]. Успех серологической диагностики вирусных инфекций зависит от специфичности реакции и соблюдения временных условий взятия крови. Для обнаружения иммуноглобулинов класса M кровь берут однократно. В большинстве случаев для выявления IgG исследуют парные сыворотки крови, взятые с

интервалом в 2–3 недели. Положительным результатом считается 4-кратное нарастание титра антител [4, 5, 7, 8]. Во время повторной инфекции, вызванной вирусом Денге другого типа, титры антител нарастают быстрее, в основном, за счет иммуноглобулинов класса G и сохраняются в течение всей жизни, титры IgM в данном случае значительно ниже, нежели при первой встрече с возбудителем. Для определения первичного и повторного случаев инфицирования вирусами Денге определяют соотношение между IgM и IgG.

При серологической диагностике заболеваний, вызванных вирусами Денге, применяют реакцию торможения гемагглютинации (РТГА), реакцию связывания комплемента (РСК), реакцию нейтрализации (РН) [4, 5, 7], но в последнее время наибольшую популярность приобрел ИФА для выявления антигенов и антител класса M и G [4, 5, 12, 13, 15, 17, 45, 46]. При изучении чувствительности и специфичности различных иммуносерологических тестов было показано, что препараты для выявления вирусного антигена лучше всего использовать до 4-го дня от начала болезни, потом в крови начинают появляться первые антитела и чувствительность данных методов резко снижается.

В качестве методов экспресс-диагностики хорошо себя зарекомендовали тесты для иммунохроматографии, позволяющие выявить вирусные антигены и антитела разного класса к вирусам Денге в первые сутки от начала заболевания. Чувствительность тестов составила, по данным авторов, 81,5 и 82,4 % (после 15 и 30 мин инкубации соответственно), специфичность результатов была 100 % [17]. В России зарегистрированы и разрешены к использованию одностадийный твердофазный иммунохроматографический тест для качественного определения антигена NS1 вируса Денге в сыворотке, плазме и цельной крови человека «SD BIOLINE Dengue NS1 Ag» и одностадийный твердофазный иммунохроматографический тест для качественного и раздельного определения IgG и/или IgM антител к вирусу Денге в сыворотке, плазме и цельной крови человека «SD BIOLINE Dengue IgG/IgM», производства фирмы «Standard diagnostics» (Корея).

К применению в практике разрешены иммуноферментный тест для определения антител класса IgM к антигенам вируса Денге в сыворотке или плазме крови человека «Anti-Dengue virus ELISA (IgM)» и иммуноферментный тест для определения антител класса IgG к антигенам вируса Денге в сыворотке или плазме крови человека «Anti-Dengue virus ELISA (IgG)», «Euroimmun» (Германия).

В России в настоящее время зарегистрированные препараты для проведения ИФА отечественного производства отсутствуют. Экспериментальные наборы для выявления IgM и IgG ко всем типам вирусов Денге разработаны в ГБУН НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского (Москва), которые представляют собой поливалентные тест-системы, включающие

анти поли денге пероксидазный конъюгат, приготовленный из иммуноглобулина, полученного из иммунных асцитных жидкостей мышей, иммунизированных 4 типами вирусов Денге, и смесь антигенов 4 типов вирусов Денге [3].

Использование молекулярно-генетических методов диагностики (ПЦР, NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assay), LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay)) вирусных инфекций позволяет выявить РНК вируса в первые дни от начала заболевания [4, 29, 41, 42, 45, 46]. Так как вирусы Денге содержат РНК, то в начале работы проводят реакцию обратной транскрипции. Эффективность методов генной диагностики во многом зависит от выбора оптимальных объектов для исследования и правильного забора материала. Согласно рекомендациям ВОЗ при исследовании клинического материала от больных с подозрением на лихорадку денге генодиагностическими методами оптимальными сроками забора материала являются первые дни болезни (до 5–7-го дня), когда вирус циркулирует в крови. В этот период можно обнаружить его антигены и РНК [45, 46].

Зарубежными авторами опубликовано большое количество работ, посвященных разработке и созданию ПЦР-тест-систем для выявления РНК вирусов Денге. Одним из первых, кто опубликовал данные о применении ОТ-ПЦР в лабораторной диагностике лихорадки денге, был Lanciotti и соавт. в 1992 г. В результате этой работы была создана двухраундная ОТ-ПЦР-тест-система для выявления РНК вирусов Денге всех четырех типов с учетом результатов методом электрофореза в агарозном геле [29]. В последующем были созданы как универсальные тест-системы для выявления РНК вирусов Денге, так и тест-системы для дифференциации их по типам [18, 23, 25, 35, 42, 45, 46]. Например, с помощью двухраундной ОТ-ПЦР был выявлен завозной случай лихорадки денге из Таиланда в США, а в последующем проведена идентификация и сиквенс выделенного штамма вируса Денге I типа [36]. Имеются данные о создании мультиплексной ОТ-ПЦР для выявления и идентификации всех четырех типов вирусов Денге и вируса Чикунгунья [16, 35, 38]. В последние годы для детекции и дифференциации вирусов Денге по типам используют ПЦР в режиме реального времени [20, 26, 33, 48].

В РосНИПЧИ «Микроб» был разработан и внедрен в практику здравоохранения «Набор реагентов для выявления РНК вирусов Денге (I–IV типов) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (Ген Денге-РЭФ)», предназначенный для выявления и дифференциации по типам вирусов Денге в клиническом и биологическом материале [6]. Помимо этого, в России зарегистрирован и широко применяется «Набор реагентов для выявления и дифференциации РНК вируса денге (Dengue virus, DV) I–IV типов в биологическом материале методом полиме-

разной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс Dengue virus type-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис», Москва). Работа в данном направлении ведется в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово, Новосибирская обл.).

Метод NASBA является перспективным для ранней диагностики вирусных инфекционных болезней, включая и лихорадку денге [45, 47]. Достоинством данного метода является непосредственная амплификация РНК, что позволяет с высокой чувствительностью детектировать РНК-содержащие вирусы. В работе S.-J.L.Wu и соавт. [47] представлены результаты изучения специфичности и чувствительности NASBA для выявления РНК вирусов Денге и дифференциации их по типам. Для исследования использовали универсальные праймеры, для дифференциации вирусов Денге-специфичные зонды. Была показана 100 % специфичность метода, чувствительность составила 98,5 % по сравнению с выделением вируса на культуре клеток.

В диагностике flavivirusных инфекций, в том числе и лихорадки денге, также нашел применение метод RT-LAMP, основанный на изотермической амплификации генов-мишеней с использованием ДНК-полимеразы и набора из 4 олигонуклеотидных праймеров, что обуславливает высокую специфичность данной реакции. Этот метод хорошо себя зарекомендовал для выявления вирусов Денге и дифференциации их по типам на ранних сроках заболевания, была показана его высокая чувствительность и специфичность, сопоставимая с таковой для ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов [39]. Данный методический подход успешно апробирован в комбинированном исследовании вирусов Денге (I–IV типов), японского энцефалита и Западного Нила [31].

Таким образом, в данной работе показано, что в настоящее время лабораторная диагностика лихорадки денге осуществляется, в большинстве случаев, вирусологическими методами или с использованием диагностикумов зарубежных производителей. Однако участвовавшие случаи завоза данного инфекционного заболевания на территорию Российской Федерации диктуют необходимость разработки тест-систем отечественного производства, а также внедрения в практику противочумных институтов технологий выделения вирусов на биологической модели или культуре клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ганушкина Л.А., Дремова В.П. Комары *Aedes aegypti* L. и *Aedes albopictus* Skuse – новая биологическая угроза для юга России. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2012; 3: 49–55.
2. Ганушкина Л.А., Тяньгина Е.Ю., Безжонова О.В., Сергиев В.П. Об обнаружении комаров *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skup. на территории Российской Федерации. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2012; 1:3–4.
3. Ларичев В.Ф., Сайфуллин М.А., Акиншина Ю.А., Хуторецкая Н.В., Бутенко А.М. Завозные случаи арбовирусных инфекций в Российской Федерации. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2012; 1:35–9.
4. Львов Д.К., редактор. Медицинская вирусология: Руководство. М.: МИА; 2008. 655 с.

5. Львов Д.К., Клименко С.М., Гайдамович С.Я. Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М: Медицина; 1989. 336 с.
6. Найденова Е.В., Яшечкин Ю.И., Щербакова С.А. Набор реагентов для выявления РНК вирусов Денге (I–IV типов) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. *Национальные приоритеты России*, Спец. выпуск. 2011; 2(5):153.
7. Онищенко Г.Г., редактор. Специфическая индикация патогенных биологических агентов: Практическое руководство. М.:ЗАО «МП Гигиена»; 2006. 288 с.
8. Покровский В.И., редактор. Инфекционные болезни: Руководство для врачей. М.: «Медицина»; 1996. 528 с.
9. Рябова Т.Е., Юничева Ю.В., Маркович Н.Я., Ганушкина Л.А., Орабей В.Г., Сергиев В.П. Обнаружение комаров *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. в г. Сочи. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2005; 3:3–5.
10. Юничева Ю.В., Рябова Т.Е., Маркович Н.Я., Безжонова О.В., Ганушкина Л.А., Семенов В.Б. Первые данные о наличии размножающейся популяции комаров *Aedes aegypti* в районе Большого Сочи и в отдельных городах Абхазии. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2008;3:40–43.
11. Alfonso H.L., Amarilla A.A., Gonçalves P., Barros M.T., de Almeida F., Silva T.R., Nunes M.T., Vasconcelos P.F.C., Vieira D.S., Batista W.C., Bobadilla M.L., Vazquez C., Moran M., Figueiredo L.T.M., Aquino V.H. Phylogenetic relationship of dengue virus type 3 isolated in Brazil and Paraguay and global evolutionary divergence dynamics. *Virology*. 2012; 9:124.
12. Avilés G., Paz M.V., Rangeon G., Ranaivoarisoa M.Y., Verzeri N., Roginski S. Laboratory surveillance of dengue in Argentina, 1995–2001. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9:738–42.
13. Blacksell S.D., Jarman R.G., Gibbons R.V., Tanganuchitcharnchai A., Mammen M.P. Jr., Nisalak A., Kalayanarooj S., Bailey M.S., Premaratna R., de Silva H., Day N.P.J., Lalloo D.G. Comparison of seven commercial antigen and antibody detection ELISAs for acute dengue infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19(5):804–10.
14. Bona A.C.D., Twerdochlib A.L., Navarro-Silva M.A. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the State of Paraná, Brazil, based on a fragment of the capsid/premembrane junction region. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2012; 45(3):297–300.
15. Cordeiro M., Braga-Neto U., Nogueira R.M., Ernesto T.A., Marques Jr. Reliable classifier to differentiate primary and secondary acute Dengue infection based on IgG ELISA. *Virology*. 2008; 2(8):280.
16. Dash P.K., Parida M., Santhosh S.R., Saxena P., Srivastava A., Neeraja M., Neeraja M., Lakshmi V., Rao L. Development and evaluation of a 1-step duplex reverse transcription polymerase chain reaction for differential diagnosis of chikungunya and dengue infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 62(1):52–7.
17. Dussart P., Petit L., Labeau B., Bremond L., Leduc A., Moua D., Matheus S., Baril L. Evaluation of Two New Commercial Tests for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection Using NS1 Antigen Detection in Human Serum. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2008; 2(8):e280.
18. Gittens-St Hilaire M., Clarke-Greenidge N. An analysis of the subtypes of dengue fever infections in Barbados 2003–2007 by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Virology*. 2008; 5:152.
19. Gjenero-Margan I., Aleraj B., Krajcar D., Lesnikar V., Klobucar A., Kurecic-Filipovic S., Komparak S., Martić R., Duričić S., Betica-Radić L., Okmadžić J., Vilibić-Cavlek T., Babić-Erceg A., Turković B., Avsić-Županc T., Radić I., Ljubić M., Sarac K., Benić N., Mlinarić-Galinović G. Autochthonous dengue fever in Croatia, August–September 2010. *Euro Surveill.* 2011; 16. pii 19805.
20. Gurukumar K.R., Priyadarshini D., Patil J.A., Bhagat A., Singh A., Shah P.S., Cecilia D. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virology*. 2009; 6:10.
21. Hang V.T., Nguyet N.M., Trung D., Tricou V., Yoksan S., Dung N.M., Van Ngoc T., Hien T.T., Farrar J., Wills B., Simmons C. Tests for Dengue Sensitivity, Specificity and Relationship to Viraemia and Antibody Responses Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral Flow Rapid. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009; 3(1): e360.
22. Huhtamo E., Uzcátegui N.Y., Siikamäki H. Molecular epidemiology of dengue virus strains from Finnish travelers. *Emerg. Infect. Dis.* 2008;14(1):80–3.
23. Ito M., Takasaki T., Yamada K., Nerome R., Tajima S., Kurane I. Development and evaluation of fluorogenic TaqMan reverse transcriptase PCR assays for detection of dengue virus types 1 to 4. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(12):5935–7.
24. Klungthong C., Putnak R., Mammen M.P., Zhang C. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. *J. Virol. Methods.* 2008; 154:175–81.
25. Klungthong G., Gibbons R.V., Thaisomboonsuk B., Nisalak A., Kalayanarooj S., Thirawuth V. Dengue virus detection using whole blood for reverse transcriptase PCR and virus isolation. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 8:2480–5.
26. Kong Y.Y., Thay C.H., Tin T.C., Devi S. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 2006; 138:123–30.

27. Kuno G., Gubler D.J., Vélez M., Oliver A. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bull. World Health Organ.* 1985; 63(2):279–86.
28. La Ruche G., Souares Y., Armengaud A., Peloux-Petiot F., Delaunay P., Despres P., Lenglet A., Jourdain F., Leparc-Goffart I., Charlet F., Ollier L., Mantey K., Mollet T., Fournier J.P., Torrents R., Leitmeyer K., Hilairet P., Zeller H., Van Bortel W., Dejour-Salamanca D., Grandadam M., Gastellu-Etcheberry M. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.* 2010; 15. pii19676.
29. Lanciotti R.S., Calisher C.H., Gubler D.J., Chang G.J., Vorndam A.V. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(3):545–51.
30. Levi J.E., Tateno A.F., Machado A.F., Ramalho D.C., de Souza V.A., Guilarde A.O., de Rezende Feres V.C., Martelli C.M., Turchi M.D., Siqueira J.B. Jr, Pannuti C.S. Evaluation of a commercial real-time PCR kit for detection of Dengue Virus in samples collected during an outbreak in Goiânia, Central Brazil, in 2005. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 6:1893–97.
31. Li S., Fang M., Zhou B., Ni H., Shen O., Zhang H., Han Y., Yin J., Chang W., Xu G., Cao G. Simultaneous detection and differentiation of dengue virus serotypes 1–4, Japanese encephalitis virus, and West Nile virus by a combined reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Viol. J.* 2011; 8:360.
32. Louis C. Daily Newspaper View of Dengue Fever Epidemic, Athens, Greece, 1927–1931. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 1:78–82.
33. Menting S., Khoa T.D., Tran T.T., Hoang L.P., Klatser P., Wolthers K.C., Binh T.Q., de Vries P.J., Beld M. Internally Controlled, Generic Real-Time PCR for Quantification and Multiplex Real-Time PCR with Serotype-Specific Probes for Serotyping of Dengue Virus Infections. *Adv. Virol.* 2011; 2011:514681. doi: 10.1155/2011/514681.
34. Messer W.B., Gubler D.J., Harris E., Sivananthan K., de Silva A.M. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(7):800–9.
35. Mishra B., Sharma M., Pujhari S.K., Ratho R.K., Gopal S., Kumar N., Sarangi G., Chayani N., Varma S.C. Utility of multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction for diagnosis and serotypic characterization of dengue and chikungunya viruses in clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 71(2):118–25.
36. Mohammed H.P., Ramos M.M., Rivera A., Johansson M., Muñoz-Jordan J.L., Sun W., Tomashak K.M. Travel-associated dengue infections in the United States, 1996 to 2005. *J. Travel Med.* 2010; 17(1):8–14.
37. Narvaez F., Gutierrez G., Perez M.A., Elizondo D., Nunez A., Balmaseda A., Harris E. Evaluation of the Traditional and Revised WHO Classifications of Dengue Disease Severity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(11):1397.
38. Nicoletti L., Ciccozzi M. Chikungunya and Dengue Viruses in Travelers. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 1:177–8.
39. Parida M., Horioke K., Ishida H., Dash P.K., Saxena P., Jana A.M., Islam M.A., Inoue S., Hosana N., Morita K. Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(6):2895–903.
40. Potiwat R., Komalamisra N., Thavara U., Tawatsin A., Siritasatien P. Competitive suppression between chikungunya and dengue virus in *Aedes albopictus* c6/36 cell line. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2011; 42(6):1388–94.
41. Rocco I.M., Silveira V.R., Maeda A.Y., dos Santos Silva S.J., Spenassatto C., Bisordi I., Suzuki A. First Isolation of Dengue 4 in the State of San Paulo, Brazil, 2011. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2012; 54(1):49–51.
42. Saxena P., Kumar Dash P., Sanhosh S.R. Development and evaluation of one step single tube multiplex PT-PCR for rapid detection and typing of dengue viruses. *Viol. J.* 2008; 5:20.
43. Tavakoli N.P., Tobin E.H., Wong S.J., Dupuis A.P., Glasheen B., Kramer L.D., Bernard K.A. Identification of dengue virus in respiratory specimens from a patient who had recently traveled from a region where Dengue Virus infection is epidemic. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 5:1523–27.
44. Van der Schaar H.M., Rust M.J., Waarts B.-L., Van der Ende-Metselaar H., Kuhn R.J., Wilschut J., Zhuang X., Smit J.M. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single virus tracking. *J. Virol.* 2007; 81(21):12019–28.
45. WHO. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Geneva, Switzerland; 2009. 160 p.
46. WHO. Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, Switzerland; 1997. 86 p.
47. Wu S.-J. L., Lee E.M., Putvatana R., Shurtleff R.N., Porter K.R., Suharyono W., Watts D.M., King C.C., Murphy G.S., Hayes C.G., Romano J.W. Detection of Dengue Viral RNA Using a Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 8:2794–98.
48. Yong Y.K., Thayan R., Chong H.T. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. *Singapore Med. J.* 2007; 48:662–8.
49. Zandi K., Lani R., Wong P.F., Teoh B.T., Sam S.S., Johari J., Mustafa M.R., AbuBakar S. Flavone enhances dengue virus type-2 (NGC strain) infectivity and replication in vero cells. *Molecules.* 2012; 17(3):2437–45.
50. Zompi S., Harris E. Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses.* 2012; 4(1):62–82.

References

1. Ganushkina L.A., Dremova V.P. [Mosquitoes *Aedes aegypti* L. and *Aedes albopictus* skuse – emerging biological threat to the public health of the population in the southern Russia]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 2012; 3:49–55.
2. Ganushkina L.A., Tanygina E.Yu., Bezzhonova O.V., Sergiev V.P. [Concerning mosquito detection (*Aedes (Stegomyia) albopictus* skup.) in the territory of the Russian Federation]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 2012; 1:3–4.
3. Larichev V.F., Sayfullin M.A., Akinshina Yu.A., Khutoretskaya N.V., Butenko A.M. [Imported cases of Arboviral infections in the Russian Federation]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2012; 1:35–9.
4. L'vov D.K., editor [Medical virology: practice guidelines]. M.: MIA; 2008. 655 p.
5. L'vov D.K., Klimenko S.M., Gaydamovich S.Ya. [Arboviruses and Arboviral Infections]. M.: Meditsina; 1989. 336 p.
6. Naydenova E.V., Yashechkin Yu.I., Shcherbakova S.A. [Reagent panel for Dengue virus RNA detection (I–IV types) by means of reverse transcription and polymerase chain reaction] *Natsional. Prioritetnyy Rossiya. Special Issue.* 2011; 2(5): 153.
7. Onishchenko G.G., editor [Specific Indication of Pathogenic Biological Agents: Practice Guidelines]. M.: ZAO “MP Gigiena”; 2006. 288 p.
8. Pokrovsky V.I., editor [Infectious Diseases: Guidelines for Physicians]. M.: Meditsina; 1996. 528 p.
9. Ryabova T.E., Yunicheva Yu.V., Markovich N.Ya., Ganushkina L.A., Orabey V.G., Sergiev V.P. [Mosquito detection (*Aedes (Stegomyia) aegypti* L.) in Sochi]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 2005; 3: 3–5.
10. Yunicheva Yu.V., Ryabova T.E., Markovich N.Ya., Bezzhonova O.V., Ganushkina L.A., Semenov V.B. [First records of the proliferating mosquito population (*Aedes aegypti*) in the vicinity of the Greater Sochi and in several towns of Abkhazia]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 2008; 3: 40–43.
11. Alfonso H.L., Amarilla A.A., Gonçalves P., Barros M.T., de Almeida F., Silva T.R., Nunes M.T., Vasconcelos P.F.C., Vieira D.S., Batista W.C., Bobadilla M.L., Vazquez C., Moran M., Figueiredo L.T.M., Aquino V.H. Phylogenetic relationship of dengue virus type 3 isolated in Brazil and Paraguay and global evolutionary divergence dynamics. *Viol. J.* 2012; 9:124.
12. Avilés G., Paz M.V., Rangeon G., Ranaivoarisoa M.Y., Verzeri N., Roginski S. Laboratory surveillance of dengue in Argentina, 1995–2001. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9:738–42.
13. Blacksell S.D., Jarman R.G., Gibbons R.V., Tanganuchitcharnchai A., Mammen M.P. Jr., Nisalak A., Kalayanaroj S., Bailey M.S., Premaratna R., de Silva H., Day N.P.J., Lalloo D.G. Comparison of seven commercial antigen and antibody detection ELISAs for acute dengue infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19(5):804–10.
14. Bona A.C.D., Twerdochlib A.L., Navarro-Silva M.A. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the State of Paraná, Brazil, based on a fragment of the capsid/premembrane junction region. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2012; 45(3):297–300.
15. Cordeiro M., Braga-Neto U., Nogueira R.M., Ernesto T.A., Marques Jr. Reliable classifier to differentiate primary and secondary acute Dengue infection based on IgG ELISA. *Virology.* 2008; 2(8):280.
16. Dash P.K., Parida M., Santhosh S.R., Saxena P., Srivastava A., Neeraja M., Neeraja M., Lakshmi V., Rao L. Development and evaluation of a 1-step duplex reverse transcription polymerase chain reaction for differential diagnosis of chikungunya and dengue infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 62(1):52–7.
17. Dussart P., Petit L., Labeau B., Bremand L., Leduc A., Moua D., Matheus S., Baril L. Evaluation of Two New Commercial Tests for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection Using NS1 Antigen Detection in Human Serum. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2008; 2(8):e280.
18. Gittens-St Hilaire M., Clarke-Greening N. An analysis of the subtypes of dengue fever infections in Barbados 2003–2007 by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Viol. J.* 2008; 5:152.
19. Gjenero-Margan I., Aleraj B., Krajcar D., Lesnikar V., Klobucar A., Kurecic-Filipovic S., Komparak S., Martić R., Duričić S., Betica-Radić L., Okmadžić J., Vilibić-Cavlek T., Babić-Ercceg A., Turković B., Avsić-Županc T., Radić I., Ljubić M., Sarac K., Benić N., Mlinarić-Galinović G. Autochthonous dengue fever in Croatia, August–September 2010. *Euro Surveill.* 2011; 16. pii 19805.
20. Gurukumar K.R., Priyadarshini D., Patil J.A., Bhagat A., Singh A., Shah P.S., Cecilia D. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Viol. J.* 2009; 6:10.
21. Hang V.T., Nguyet N.M., Trung D., Tricou V., Yoksan S., Dung N.M., Van Ngoc T., Hien T.T., Farrar J., Willis B., Simmons C. Tests for Dengue Sensitivity, Specificity and Relationship to Viraemia and Antibody Responses Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral Flow Rapid. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009; 3(1): e360.
22. Huhtamo E., Uzcátegui N.Y., Siikamäki H. Molecular epidemiology of dengue virus strains from Finnish travelers. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(1):80–3.
23. Ito M., Takasaki T., Yamada K., Nerome R., Tajima S., Kurane I. Development and evaluation of fluorogenic TaqMan reverse transcriptase PCR assays for detection of dengue virus types 1 to 4. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(12):5935–7.
24. Klunghong C., Putnak R., Mammen M.P., Zhang C. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. *J. Virol. Methods.* 2008; 154:175–81.
25. Klunghong G., Gibbons R.V., Thaisomboonsuk B., Nisalak A.,

- Kalayanarooj S., Thirawuth V. Dengue virus detection using whole blood for reverse transcriptase PCR and virus isolation. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 8:2480–5.
26. Kong Y.Y., Thay C.H., Tin T.C., Devi S. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 2006; 138:123–30.
27. Kuno G., Gubler D.J., Velez M., Oliver A. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bull. World Health Organ.* 1985; 63(2):279–86.
28. La Ruche G., Souares Y., Armengaud A., Peloux-Petiot F., Delaunay P., Despres P., Lenglet A., Jourdan F., Leparc-Goffart I., Charlet F., Ollier L., Mantey K., Mollet T., Fournier J.P., Torrents R., Leitmeyer K., Hilairat P., Zeller H., Van Bortel W., Dejour-Salamanca D., Grandadam M., Gastellu-Etchegorry M. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.* 2010; 15. pii19676.
29. Lanciotti R.S., Calisher C.H., Gubler D.J., Chang G.J., Vorndam A.V. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(3):545–51.
30. Levi J.E., Tateno A.F., Machado A.F., Ramalho D.C., de Souza V.A., Guilarde A.O., de Rezende Feres V.C., Martelli C.M., Turchi M.D., Siqueira J.B. Jr., Pannuti C.S. Evaluation of a commercial real-time PCR kit for detection of Dengue Virus in samples collected during an outbreak in Goiânia, Central Brazil, in 2005. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 6:1893–97.
31. Li S., Fang M., Zhou B., Ni H., Shen O., Zhang H., Han Y., Yin J., Chang W., Xu G., Cao G. Simultaneous detection and differentiation of dengue virus serotypes 1–4, Japanese encephalitis virus, and West Nile virus by a combined reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Virol. J.* 2011; 8:360.
32. Louis C. Daily Newspaper View of Dengue Fever Epidemic, Athens, Greece, 1927–1931. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 1:78–82.
33. Menting S., Khoa T.D., Tran T.T., Hoang L.P., Klatser P., Wolthers K.C., Binh T.Q., de Vries P.J., Beld M. Internally Controlled, Generic Real-Time PCR for Quantification and Multiplex Real-Time PCR with Serotype-Specific Probes for Serotyping of Dengue Virus Infections. *Adv. Virol.* 2011; 2011:514681. doi: 10.1155/2011/514681.
34. Messer W.B., Gubler D.J., Harris E., Sivananthan K., de Silva A.M. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(7):800–9.
35. Mishra B., Sharma M., Pujhari S.K., Ratho R.K., Gopal S., Kumar N., Sarangi G., Chayani N., Varma S.C. Utility of multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction for diagnosis and serotypic characterization of dengue and chikungunya viruses in clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 71(2):118–25.
36. Mohammed H.P., Ramos M.M., Rivera A., Johansson M., Muñoz-Jordan J.L., Sun W., Tomashek K.M. Travel-associated dengue infections in the United States, 1996 to 2005. *J. Travel Med.* 2010; 17(1):8–14.
37. Narvaez F., Gutierrez G., Perez M.A., Elizondo D., Nunez A., Balmaseda A., Harris E. Evaluation of the Traditional and Revised WHO Classifications of Dengue Disease Severity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(11):1397.
38. Nicoletti L., Ciccozzi M. Chikungunya and Dengue Viruses in Travelers. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 1:177–8.
39. Parida M., Horioka K., Ishida H., Dash P.K., Saxena P., Jana A.M., Islam M.A., Inoue S., Hosaka N., Morita K. Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(6):2895–903.
40. Potiwat R., Komalamisra N., Thavara U., Tawatsin A., Siritasatien P. Competitive suppression between chikungunya and dengue virus in *Aedes albopictus* c6/36 cell line. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2011; 42(6):1388–94.
41. Rocco I.M., Silveira V.R., Maeda A.Y., dos Santos Silva S.J., Spenassatto C., Bisordi I., Suzuki A. First Isolation of Dengue 4 in the State of São Paulo, Brazil, 2011. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2012; 54(1):49–51.
42. Saxena P., Kumar Dash P., Sanhosh S.R. Development and evaluation of one step single tube multiplex PT-PCR for rapid detection and typing of dengue viruses. *Virol. J.* 2008; 5:20.
43. Tavakoli N.P., Tobin E.H., Wong S.J., Dupuis A.P., Glasheen B., Kramer L.D., Bernard K.A. Identification of dengue virus in respiratory specimens from a patient who had recently traveled from a region where Dengue Virus infection is epidemic. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 5:1523–27.
44. Van der Schaar H.M., Rust M.J., Waarts B.-L., Van der Ende-Metselaar H., Kuhn R.J., Wilschut J., Zhuang X., Smit J.M. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single virus tracking. *J. Virol.* 2007; 81(21):12019–28.
45. WHO. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Geneva, Switzerland; 2009. 160 p.
46. WHO. Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, Switzerland; 1997. 86 p.
47. Wu S.-J. L., Lee E. M., Putvatana R., Shurtliff R.N., Porter K.R., Suharyono W., Watts D.M., King C.C., Murphy G.S., Hayes C.G., Romano J.W. Detection of Dengue Viral RNA Using a Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 8:2794–98.
48. Yong Y.K., Thayan R., Chong H.T. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. *Singapore Med. J.* 2007; 48:662–8.
49. Zandi K., Lani R., Wong P.F., Teoh B.T., Sam S.S., Johari J., Mustafa M.R., AbuBakar S. Flavone enhances dengue virus type-2 (NGC strain) infectivity and replication in vero cells. *Molecules.* 2012; 17(3):2437–45.
50. Zompi S., Harris E. Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses.* 2012; 4(1):62–82.

Authors:

Naydenova E.V., Kuklev V.E., Yashechkin Yu.I., Shcherbakova S.A., Kuttyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Найденова Е.В., Куклев В.Е., Яшечкин Ю.И., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 23.01.13.