

ДОСТИЖЕНИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ ВИРУСА ДЕНГЕ: МОДЕЛИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Е.В. Пименова^{1,2}, Н.П. Храпова^{1,2}, Т.В. Замарина^{1,2}

¹ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора;

²ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

За последнее время произошло увеличение роста заболеваемости лихорадкой денге как в эндемичных, так и в неэндемичных регионах по данному заболеванию. В настоящее время мало что известно о механизме развития болезни и отдельных ее проявлений, поэтому потребность в изучении вопросов этиологии, патогенеза остается актуальной. В связи с этим был проведен анализ литературы, который показал, что для выделения, обнаружения и разработки стратегий по созданию вакцин-кандидатов против вируса денге используют клеточные линии, которые зачастую не уступают по чувствительности и рациональности методу заражения лабораторных животных. В обзоре обобщены экспериментальные данные последних лет по применению клеточных линий, используемых в качестве клеток-мишеней для изучения этиологии существования вируса денге, отмечены их преимущества и недостатки.

Ключевые слова: диагностика, клеточные линии, лихорадка денге, *in vitro* модель, обзор.

DOI 10.19163/1994-9480-2020-1(73)-14-19

ADVANCES IN THE STUDY OF DENGUE VIRUS: MODELS OF CELL LINES AND THE POSSIBILITY OF THEIR USE

E.V. Pimenova^{1,2}, N.P. Khrapova^{1,2}, T.V. Zamarina^{1,2}

¹FPHI «Volgograd Research Anti-Plague Institute» of Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare;

²FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation

Recently the growth of dengue fever in both endemic and non-endemic regions of the disease was noticed. At present we don't know enough about the mechanism of the disease and its individual manifestations, so we need to study the issues of etiology, pathogenesis. In this regard, a literature analysis was conducted. It was shown that cell lines are used for identification, detection and development strategies for the creation of candidate vaccines against the dengue virus. The cell lines are often not inferior in sensitivity and rationality to the method of infection of laboratory animals. The review summarizes the recent experimental data about the use of cell lines as target cells to study different aspects of the dengue virus, we also noted their advantages and disadvantages.

Key words: diagnosis, cell lines, dengue fever, *in vitro* model, overview.

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о ситуации по лихорадке денге в мире информирует, что в странах тропического и субтропического климата в течение последних лет сохраняется эпидемиологически неблагоприятная ситуация по данному заболеванию.

Лихорадка денге распространена в Юго-Восточной Азии (Таиланд, Индонезия, Китай, Малайзия, Япония, Вьетнам, Мьянма, Сингапур, Филиппины), Индии, Африке (Мозамбик, Судан, Египет), в тропическом и субтропическом поясе Северной, Центральной и Южной Америки (Куба, Мексика, Гондурас, Коста-Рика, Пуэрто-Рико, Панама, Бразилия и др.). В настоящее время эпидемиологическое неблагополучие регистрируют в Республике Куба, особенно в провинции Камагуэй, где было зарегистрировано 7 случаев заболевания, в том числе 3 случая с летальным исходом [2, 7].

За последние годы в РФ стали выявлять завозные случаи лихорадки денге: по данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты

прав потребителей и благополучия человека в 2012 г. было зарегистрировано 63 случая, в 2013 г. – 170, в 2014 г. – 105 случаев, в 2015 г. – 136, в 2016 г. – 145, в 2017 г. – 196 и за 5 месяцев 2018 г. – 230 случаев [1].

За последние 7 лет в РФ произошло трехкратное увеличение роста заболеваемости лихорадкой денге, хотя Россия не входит в список эндемичных регионов по данной инфекции.

Установлено, что вирус денге представлен разнообразными генетическими вариантами штаммов, которые сгруппированы в четыре антигенно отличных серотипа, каждый из которых может вызывать тяжелые заболевания и быть угрозой здоровью населения по всему миру.

На этапе лабораторной диагностики для изучения вопросов патогенеза и иммунитета, а также для последующей разработки экспериментальных образцов и получения диагностических и вакцинных препаратов против вируса денге и защиты от него используют клеточные линии различного происхождения.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Анализ данных литературных источников по различным аспектам применения клеточных линий для изучения вируса денге.

Ввиду того, что в настоящее время нет лицензированной вакцины против вируса денге, актуальным является направление по созданию стратегий в разработке эффективных вакцин-кандидатов.

Так, Muhamad M. с соавт. в своем исследовании использовали клеточную линию HepG2 для изучения ингибиторных свойств флаваноидных соединений против вируса денге 2-го типа. Результаты опытов показали, что эти соединения полностью предотвращали инфицирование клеток HepG2 вирусом в концентрации, не превышающей максимальной нетоксичную дозу, о чем свидетельствует отсутствие цитопатических эффектов в культуре клеток HepG2. При концентрации ниже максимальной нетоксической дозы соединения проявляли ингибирующую активность в отношении вируса в диапазоне от 72 до 100 %. Высокоэффективная активность флаваноидных соединений против данной инфекции свидетельствует об их потенциале в качестве противовирусного агента при разработке вакцины против вируса денге [18].

Первичные клеточные линии можно использовать для изучения генетических детерминант токсигенности вируса на молекулярном уровне. Так, Alvarez M. с соавт. изучали штамм денге (A15), выделенный из плазмы больного с неосложненной лихорадкой во время эпидемии 1981 г. на Кубе. При последовательном пассировании вируса денге в первичных клетках почки собаки (PDK) наблюдали изменения биологических признаков, таких как: образование небольших бляшек по сравнению с контролем, изменение температурных факторов (отсутствие репликации вируса при высоких температурах), снижение нейровирулентности в отношении мышей и уменьшение цитопатического эффекта в клеточных линиях LLC-MK2 и C6/36-HT, по сравнению с родительским штаммом данного вируса. На основе этих данных были сделаны выводы о возможности использования клеточных линий для получения аттенуированной вакцины [4].

Последовательное пассирование семи различных штаммов вируса лихорадки денге дикого типа в первичных клетках почки собаки (PDK) было изучено Halstead S.B. и Marchette N.J. [8]. Результаты подтвердили данные, полученные Alvarez M. et al. [4]. Культивирование в клеточных линиях PDK привело к таким же изменениям фенотипа вируса, как и в вышеназванной работе: образование более мелких бляшек, отсутствие цитопатического эффекта в культуре клеток LLC-MK2, неспособность образования бляшек в клетках Vero, температурная чувствительность и снижение вирулентности. У двух штаммов 1-го типа фенотипические изменения появлялись к 15-му пассажу, у одного из двух штаммов 2-го типа – к 50-му пассажу, три штамма денге

4-го типа показали аналогичные биологические изменения в более поздних пассажах [8].

Kinney R.M. et al. изучили в культуре клеток способность ингибировать репликацию вируса денге с помощью пептид-конъюгированных фосфоридамидат морфолиноолигомеров (P4-PMO).

Четыре штамма вируса денге (штамм 16007 – 1-й серотип, 16681 – 2-й серотип, 16562 – 3-й серотип, 1036 – 4-й серотип) были культивированы в клетках Vero вместе с P4-PMO. Через 6 дней эксперимента наблюдали относительно небольшое подавление вируса по сравнению с контролями в присутствии двух соединений P4-PMO: 5'SL и 3'CS (нацеленных на 5'- и на 3'-концы нуклеотидного генома вируса соответственно). Дальнейшие эксперименты показали, что 5'SL и 3'CS ингибировали репликацию вируса в зависимости от дозы и времени контакта вируса с P4-PMO в клетках-мишенях. Эти данные показывают, что дальнейшее изучение соединений 5'SL и 3'CS в качестве потенциальной терапии против вируса денге является оправданным [10].

Abbate T. et al. оценивали параметры вирусной амплификации в культуре клеток Vero и осуществляли отбор вариабельных участков РНК, предназначенных для производства вакцины против денге [3].

Многие исследователи ставили перед собой задачу изучения взаимодействия вируса денге с клетками-мишенями человека.

Так, Moi L., Lim C. et al. оценили восприимчивость перевиваемых клеточных линий (ВНК клетки, экспрессирующие и не экспрессирующие на своей поверхности рецепторы FcγR) к вирусу денге.

В работе были использованы 73 образца сыворотки крови, взятые у вирусемических больных с первичной (42 образца) и вторичной (31 образец) инфекцией. При первичной инфекции титры вируса были на одном уровне между FcγR-экспрессирующими и FcγR-не экспрессирующими клетками. При вторичной инфекции, на 1–6-й день эксперимента титры вируса были в 10 раз выше в FcγR-экспрессирующих клетках. Полученные результаты свидетельствуют о том, что основными клетками-мишенями для вирусной инфекции являются FcγR-позитивные клетки моноцитарного/макрофагального происхождения, которые могут лучше отражать фактическую вирусемию в условиях *in vivo* [17].

Kurane I. et al. исследовали восприимчивость вируса денге 2-го типа на 23 мононуклеарных клеточных линиях человека, включая десять линий миеломоноцитов, восемь линий В-клеток и пять линий Т-клеток. Результаты учитывали с помощью иммуофлуоресцентного окрашивания культуральной жидкости. Из всех миеломоноцитарных, В- и Т-клеточных линий самый высокий титр вируса наблюдали в культурах K 562, Jiyoue и Jurkat соответственно.

Персистирующая вирусная инфекция была отмечена в миеломоноцитарных клеточных линиях

(K562), в В-клетках (Raji) и в Т-клетках (HSB-2). Эти линии сохраняли высокий уровень (более 70 %) антиген-положительных клеток вируса денге 2-го типа в течение 25 недель.

Полученные результаты показали, что различные линии моноклеарных клеток человека могут быть инфицированы вирусом денге и применяться в качестве моделей для изучения взаимодействия вируса денге с клетками человека [13].

Halstead S. et al. в своей работе изучали также восприимчивость клеток-мишеней к вирусу денге.

Анализ данных показал, что клетки BS-C-1, выделенные из почек обезьян гривет, оказались более чувствительными по сравнению с другими клеточными линиями PS, LLC MK 2 и HeLa. Также было доказано, что клеточная линия BS-C-1 по чувствительности не уступает результатам экспериментов, выполненных на мышцах-сосунках с данным вирусом [9].

В тех случаях, когда нужна максимальная точность полученных результатов, используют линии клеток комаров. Доказано, что во многих случаях культуры клеток беспозвоночных более чувствительны к альфавирусам, чем культуры клеток позвоночных. В особенности это относится к первичному выделению вирусов. В настоящее время существует более 500 видов перевиваемых клеточных линий насекомых [15, 27], в том числе выделенных из основных видов переносчиков вирусной инфекции: комаров рода *Anopheles*, *Culex* и *Aedes*. В середине 1960-х Grace T. получил популяцию клеток из личинок комара рода *Aedes aegypti*, восприимчивую к вирусу денге [6]. В настоящее время данная клеточная линия *A. aegypti* получила название CCL-125 и ее используют в качестве идентификатора вируса денге в культуре клеток [28].

Так как вирус денге передается комарами *A. aegypti*, большинство исследований проводят на клеточной линии C6/36. Wikan N. с соавторами изучили возможности использования CCL-125 *A. aegypti*, которая первоначально была охарактеризована как линия клеток, не восприимчивая к вирусу денге. В данном исследовании было установлено, что клеточная линия CCL-125, инфицированная вирусом денге, не проявляла явного цитопатического эффекта, но ее можно использовать в качестве альтернативы клеточной линии C6/36 для изучения иммуноцитохимии и способности к бляшкообразованию вируса [28].

Влияние на репликацию вируса денге в культуре комариных клеточных линий в бессывороточной среде изучал Kuno G. с соавторами. По результатам опыта были сделаны выводы, что клеточные линии *A. aegypti* RML-12, *A. albopictus* C6/36, *A. pseudoscutellaris* AP-61 и *Tx. amboinensis* TRA-171 имеют разные титры репликации вируса: от более низких в C6/36 до высоких показателей в культуре клеток RML-12. На основании этих выводов было решено, что для репликации вируса денге лучше использовать культуру клеток RML-12 [11].

Для оценки трех серотипов вируса денге Potiwat R. et al. использовал клеточную линию C6/36. Наличие вируса определяли с помощью полимеразной цепной реакции. Результаты, полученные на модели клеточных культур, дают информацию о взаимодействии патогенов с клетками хозяина, которые можно использовать для прогнозирования вспышек, а также для разработки методов обнаружения вирусов и в борьбе с переносчиками [23].

Для первичного выделения вируса лихорадки денге рекомендуют использовать культуру клеток членистоногих *A. pseudoscutellaris* (AP61), *A. albopictus* (C6/36) [29].

Согласно рекомендациям и общей практике оптимальной температурой для культивирования зараженных клеточных линий C6/36 принято считать 28 °C. Однако Mangada M. с соавторами инкубировали инфицированные клетки C6/36 вирусом денге в трех тестовых температурных режимах 28, 32 и 37 °C. Результаты показали, что продукция РНК вируса денге 2-го типа была выше в клетках и во внеклеточной жидкости, инкубированных при 32 и 37 °C, чем при 28 °C. Кроме того, было обнаружено присутствие вирусного антигена и геномной РНК на 1–2 дня раньше в культурах, инкубированных при повышенной температуре [16].

Независимо от этих данных Owens A. с соавторами культивировали в клетках Vero и C6/36 вирус денге 1-го типа в двух температурных режимах 28 и 33 °C. По результатам ИФА было показано, что титр вируса денге 1-го типа был выше в культуре клеток C6/36 при всех температурных режимах, в то время как повышение титра в клетках эпителия почки африканской зеленой марышки (Vero) наблюдали только при температуре 33 °C. На основе этих данных авторы сделали выводы о том, что 33 °C является оптимальной температурой для выявления вируса денге в культуре клеток как млекопитающих, так и насекомых [20].

Nawa M. разработал новую клеточную линию, полученную из ткани почки монгольских песчанок (GK), предназначенную для культивирования вируса денге. Клеточную модель тестировали в двух температурных режимах (35,5 и 31 °C) с 14 штаммами вируса, включая четыре опытных образца вируса денге и десять штаммов вирусов дикого типа. Учет результатов проводили по способности образовывать бляшки и накапливать вирус в культуре клеток. На основе полученных данных показано, что образование бляшек и накопление вируса денге в культуре клеток GK зависели от температуры инкубации, лишь три штамма вируса дикого типа имели способность накапливаться и образовывать бляшки только при температуре 31 °C. По результатам накопления всех 14 протестированных штаммов вируса денге в клетках GK был в 5000 раз ниже, чем в клетках C6/36 [19].

Pervin M. et al. исследовали сыворотки подозреваемых больных на инфицирование вирусом лихорадки денге с помощью заражения линии

комаров рода *A. aegypti* и в культуре перевиваемой клеточной линии C6/36 (клеточная линия была также адаптирована к температуре 33 °С, с концентрацией клеток $4 \cdot 10^5$ /мл на 25 см² в 3 мл).

Вирус идентифицировали с помощью прямого метода флуоресцирующих антител (МФА), а с использованием непрямого метода флуоресцирующих антител (НМФА) определяли серотип вируса. Из 97 положительных образцов вирус денге был выделен в 44 (45,4 %) случаев из комаров рода *A. aegypti* и в 24 (24,7 %) случаев в культуре клеток C6/36. Скорость выделения вируса при заражении комаров была достоверно выше, чем в перевиваемой клеточной линии. Безусловно, заражение вирусом денге комаров рода *A. aegypti* является более чувствительным и экономичным. Однако, по выводам авторов, серотипирование вируса более удобно проводить в культуре клеток перевиваемых клеточных линий C6/36 [22].

В 2011 г. в Бразилии из образцов сывороток, взятых от вирусных больных в первый день после появления симптомов, был выделен вирус денге IV типа в культуре клеток C6/36. Циркуляция данного серотипа на этой территории ранее не была выявлена. Результаты были подтверждены с помощью НМФА и с помощью ПЦР в реальном времени [25].

Другие исследователи при поиске вируса денге в сыворотках крови больных также использовали культуру клеток комаров (TRA-284). В результате, из 171 пробы вирус был обнаружен в 56 случаев, то есть в 32,7 %. Остальные пробы были проведены через «слепой пассаж» в этой же культуре, но вирус также не был обнаружен. Однако при инкубации отрицательных сывороток в присутствии актиномицина D (ингибитор транскрипции дезоксирибонуклеиновой кислоты) 20 из 115 образцов (17,4 %) стали положительными. Эта процедура способствовала увеличению числа обнаружения вируса до 44,4 %.

На основании полученных результатов отмечено, что при добавлении актиномицина D в культуру клеток TRA-284 можно повысить процент обнаружения вируса денге в сыворотках крови человека [24].

Г. Купо с соавторами в своем исследовании сравнивали чувствительность трех клеточных линий C6/36, AP-61 и TRA-284 по признакам обнаружения, накопления и выделения вируса денге. По результатам иммунофлуоресцентного анализа, авторами были сделаны выводы о том, что при выделении вируса из сыворотки крови больного человека самым высоким титром репликации вируса была замечена в культуре клеток TRA-284, в то время, как в клеточной линии C6/36 были зафиксированы самые низкие титры в иммунофлуоресцентном анализе, несмотря на то, что C6/36 показали лучшие результаты в области обнаружения инфицированных клеток с помощью

МФА, по сравнению с другими перевиваемыми клеточными линиями.

Авторы рекомендуют использовать в лабораторных целях бессывороточную клеточную линию TRA-284, основываясь на ее высокой чувствительности при изоляции вируса денге, простоте его культивирования и экономичности процедуры [12].

С помощью культур клеток также можно изучать фенотипические характеристики вируса денге. В частности, по результатам работы Chen W.-J. et al. было установлено, что вирус денге 2-го типа при инфицировании клеток клона C6/36 имел тенденцию изменять размер бляшек в культуре при последующем пассировании вируса. Для этого клетки постоянно инфицировали в течение 20 недель. Цитопатический эффект (ЦПЭ) отсутствовал на протяжении всего срока наблюдения, однако в культуре появились гигантские клетки в 2- или 3-кратном увеличении в диаметре по сравнению с контролем. При прохождении вируса через восьмой пассаж в клетках наблюдались относительно меньшего размера бляшки, чем те, которые производит вирус первого пассажа, а при последовательном 18-м пассаже бляшки были несколько мозаичными, по сравнению с диким типом. Также авторы обнаружили, что вирусы, выделенные из пассажей 8 и 18, были более чувствительными к температурным мутациям, чем вирусы других пассажей. На основе этих данных были сделаны выводы, что некоторые вирусные частицы, проходя через последовательные пассажи, превратились в неинфекционные дефектные интерферирующие частицы [5].

Shafee N., AbuBakar S. ставили перед собой цель сравнить и охарактеризовать клеточные линии, инфицированные вирусом денге, по морфологическим изменениям и по апоптотической активности. В работе использовали популяцию клеток от трех различных хозяев C6/36 (комар), Vero (почка африканской зеленой обезьяны) и MRC-5 (фибробласт легкого человека). Инфицирование клеток проводили с помощью штамма денге 2-го типа, выделенного в Новой Гвинее.

Морфологические изменения в культуре C6/36 были замечены к 7–9-му дню эксперимента. Инфицированные клетки увеличивались в размерах и сливались с соседними участками цитоплазмы, образуя синцитии. Морфология клеток Vero заметно изменилась: начиная с 8-го дня опыта, клеточная мембрана сокращалась и визуально наблюдалась вторая фаза дегенерации клетки – фаза «кровотечения» (bleeding). В клетках MRC-5 изменения происходили только к 11-му дню в виде сжатия и отделения клеток от поверхности субстрата.

Когда был определен процент антиген-положительных клеток, то самое высокое значение наблюдали у C6/36 (97 %), затем у Vero (39 %) и MRC-5 (13 %). Несмотря на большое количество антиген-позитивных клеток в культуре C6/36, только

2 % клеток распадались на отдельные апоптозные тельца, в то время как в популяции MRC-5 20 % стали апоптотическими, а в клеточных линиях Vero наблюдали 63 %. Данные показали, что в клетках C6/36 и MRC-5 апоптоз происходит более медленно по сравнению с культурой Vero. Эти результаты позволяют предположить, что вирус денге использует разные механизмы воздействия на клетки-хозяина, а высокую инфекционность в C6/36 можно объяснить тем, что клетки имеют соответствующие рецептор(ы) для данного вируса [26].

Макрофаги играют важную роль в патогенезе денге, однако начальные клетки-мишени, запускающие вирусную инфекцию, остаются малоизученными. Поскольку вирус денге проникает в кожу человека через укусы комаров рода *Aedes*, Wu S. с соавторами в своем исследовании изучили репликативную способность вируса в дендритных клетках человека (в клетках Лангерганса и интерстициальных клетках).

Эксперименты, проведенные на трупных эксплантах кожи человека, показали, что в дендритных клетках вирус денге накапливался в 10 раз быстрее в отличие от моноцитов и макрофагов человека. Наблюдения были также подтверждены гистологическими результатами кожной сыпи человека, получившего ослабленную четырехвалентную вакцину против денге. Иммуногистохимический анализ клеток кожи, меченных антителом против гликопротеина оболочки вируса денге, показал, что дендритные клетки CD1a были восприимчивы к данной вирусной инфекции.

Результаты показали, что кожа человека является доступной для вируса денге и запускает дальнейший механизм передачи вируса в организм [30].

Вирус денге при проникновении в организм человека изменяет гомеостаз клеток-хозяина. Изучение взаимодействия между вирусом и клеточными белками должно обеспечить более полное понимание того, как вирус распространяется и вызывает развитие заболевания.

Pando-Robles V. с соавторами в своей работе использовали печеночную клеточную линию Huh-7. Результаты, полученные через 24 часа после заражения, показали снижение экспрессии ферментов хозяина, участвующих в гликолитическом пути, цитратном цикле и метаболизме пирувата. Это исследование предоставляет информацию об экспрессии белка вируса денге на ранних стадиях инфицирования в клетках печени хозяина [21].

Повышенный уровень сывороточной трансаминазы у пациентов с лихорадкой денге указывает на возможное влияние вирусной инфекции на функцию печени.

Для изучения действия вируса денге в клетках печени была создана модель клеточных линий, которая имитировала состояние печени у различных пациентов. В работе использовали четыре

вида клеток с различным уровнем туморогенности и дифференциации клеток печени – гепатомы (HA22T, Huh7, Hep3B, и PLC) и доброкачественные гепатоциты (Chang liver). Результаты показали, что вирус денге 2-го типа одинаково хорошо прикреплялся к клеточным рецепторам всех пяти клеточных линий.

Однако более высокие темпы репликации и репродукции вириона были замечены в дифференцированных клетках (Huh7, PLC, Hep3B и Chang). Соответственно, более низкую скорость репликации наблюдали в менее дифференцированных клеточных линиях HA22T.

Дальнейшие исследования показали, что обработка бутиратом натрия (NaB, индуктор дифференцировки) усиливает репликацию вируса денге и в клетках HA22T. Авторами также было замечено, что тяжесть морфологических изменений и повышение уровня аспартатаминотрансферазы (АСТ) коррелируется со скоростью репликации вируса в инфицированных клетках гепатомы.

Эти данные были сопоставимы с клиническими результатами у 24 пациентов с лихорадкой денге, у которых в начальный лихорадочный период был отмечен повышенный уровень АСТ.

На основе полученных данных были сделаны выводы о том, что факторы, связанные с дифференцировкой клеток печени, играют важную роль в репликации вируса денге. И чем выше уровень дифференцировки клеток, тем выраженнее цитопатический эффект вируса в культуре [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наличие паспортизированных перевиваемых клеточных линий различного происхождения в условиях лаборатории дает возможность проведения широкого спектра исследований: для изоляции вируса и его культивирования в условиях *in vitro*, определения серотипа, для разработки диагностических и вакцинных препаратов, а также для лучшего понимания вопросов патогенеза и иммунитета вирусной инфекции благодаря значительному разнообразию возможных экспериментальных клеточных моделей.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. О ситуации по лихорадке Денге / О situatii po lihoradke Denge [On the situation of dengue fever] [Электронный ресурс] // Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека / Federal'naja sluzhba po nadzoru v sfere zashhity prav potrebitel'ej i blagopoluchija cheloveka [Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-being]. URL: https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=11165&phrase_id=1683581.
2. О ситуации по лихорадке Денге в странах тропического и субтропического климата [Электронный ресурс] / О situatii po lihoradke Denge v stranah tropicheskogo i subtropicheskogo klimata [On the situation of Dengue fever in countries of tropical and subtropical climate] // Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей

и благополучия человека / Federal'naja sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel'j i blagopoluchija cheloveka [Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-being]. URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_detail.php?ELEMENT_ID=10900&phrase_id=1683581.

3. Abbate T., Dewasme L., Wouwer A.V. Variable selection and parameter estimation of viral amplification in vero cell cultures dedicated to the production of a dengue vaccine // *Biotechnol. Prog.* – 2018. <https://doi.org/10.1002/btpr.2687>.

4. Alvarez M., Guzmán M.G., Pupo M., Morier L., Bravo J., Rodriguez R. Study of biologic attributes of Cuban dengue 2 virus after serial passage in primary dog kidney cells // *Int. J. Infect. Dis.* – 2001. – № 5 (1). – P. 35–9.

5. Chen W.J., Chen S.L., Fang A.H. Phenotypic characteristics of dengue 2 virus persistently infected in a C6/36 clone of *Aedes albopictus* cells // *Interviol.* – 1994. – № 37. – P. 25–30.

6. Grace T.D.C. Establishment of a line of mosquito (*Aedes aegypti* L.) cells grown in vitro // *Nature Lond.* – 1966. – № 211 (5047). – P. 366–367. doi: 10.1038/211366a.

7. Guzman M.G., Halstead S.B., Artsob H., et al. Dengue: a continuing global threat // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2010. – Dec., № 8 (12 Suppl.). – P. 7–16. doi: 10.1038/nrmicro2460.

8. Halstead S.B., Marchette N.J. Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2003. – № 69 (suppl. 6). – P. 5–11.

9. Halstead S.B., Sukhavachana P., Nisalak A. Assay of mouse adapted dengue viruses in mammalian cell cultures by an interference method // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1964. – Apr., № 115. – P. 1062–1068.

10. Kinney R.M., Huang C.Y.H., Rose B.C., Kroeker A.D., Dreher T.W., Iversen P.L., Stein D.A. Inhibition of dengue virus serotypes 1 to 4 in Vero cell cultures with morpholino oligomers // *J. Virol.* – 2005. – № 79. – P. 5116–5128.

11. Kuno G. Cultivation of mosquito cell lines in serum-free media and their effects on dengue virus replication // *In Vitro.* – 1983. – № 19 (9). – P. 707–713. doi: 10.1007/BF02628962/.

12. Kuno G., Gubler D.J., Velez M., Oliver A. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses // *Bull. W.H.O.* – 1985. – № 63. – P. 279–286.

13. Kurane I., Kontrny U., Janus J., Ennis F.A. Dengue-2 virus infection of human mononuclear cell lines and establishment of persistent infections // *Arch. Virol.* – 1990. – № 110. – P. 91–101.

14. Lin Y.L., Liu C.C., Lei H.Y., et al. Infection of five human liver cell lines by dengue-2 virus // *J. Med. Virol.* – 2000. – № 60. – P. 425–431.

15. Lynn D.E. Available lepidopteran insect cell lines // *Methods Mol. Biol.* – 2007. – № 388. – P. 117–138. doi:10.1007/978-1-59745-457-56.

16. Mangada M.N.M., Mohamed H., Castillo L.C., Hasebe F., Igarashi A. Effect of incubation temperature on dengue-2 viral antigen production and viral RNA synthesis in infected *Aedes albopictus* clone C6/36 cell line // *Tissue Cult. Res. Commun.* – 1995. – № 14. – P. 213–220.

17. Moi M.L., Lim C.K., Kotaki A., Takasaki T., Kurane I. 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. – P. 1405–14. 10.1093/infdis/jir053.

18. Muhamad M., Kee L.Y., Rahman N.A., Yusof R. Antiviral actions of flavanoid-derived compounds on dengue virus type-2 // *Int. J. Biol. Sci.* – 2010. – № 6 (3). – P. 294–302.

19. Nawa M. Development of a new cell system for the infectivity assay of dengue viruses: plaque formation and virus growth of prototype and wild-type dengue virus strains in a newly established cell line, GK // *Microbiol. Immunol.* – 1984. – № 28. – P. 765–776.

20. Owens A., Shifflett J., Radhakrishnan S., Langenbach K., Baker R.O. Comparison of Dengue Virus Type 1 Growth Characteristics in Vero and C6/36 Cell Lines BEI Resources // ATCC, Manassas VA.

21. Pando-Robles V., Osés-Prieto J.A., Rodríguez-Gandarilla M., Meneses-Romero E., Burlingame A.L., Batista C.V. Quantitative proteomic analysis of Huh-7 cells infected with Dengue virus by label-free LC-MS // *J. Proteomics.* – 2014. – № 111. – P. 16–29.

22. Pervin M., Tabassum S., Sil B.K., et al. Isolation and serotyping of dengue viruses by mosquito inoculation and cell culture technique: An experience in Bangladesh // *Dengue Bull.* – 2003. – № 27. – P. 81–90.

23. Potiwat R., Komalamisra N., Thavara U., Tawatsin A., Siriyasatien P. Competitive suppression between chikungunya and dengue virus in *Aedes albopictus* c6/36 cell line // *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* – 2011. – № 42. – P. 1388–94.

24. Ramos C., Villaseca J.M., Garcia H., Hernandez D.G., Jose Ramos-Castaneda J., Imbert J.L. Detection of dengue virus from mosquito cell cultures inoculated with human serum in the presence of actinomycin D. // *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* – 1995. – № 89. – P. 189–190.

25. Rocco I.M., Silveira V.R., Maeda A.Y., Silva S.J., Spenassatto C., Bisordi I., et al. First isolation of Dengue 4 in the state of Sao Paulo, Brazil, 2011 // *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* – 2012. – № 54 (January–February (1)). – P. 49–51.

26. Shafee N., AbuBakar S. Characterization of dengue type 2 NGC virus infection in C6/36, Vero and MRC-5 cells // *International Journal of Virology.* – 2011. – № 7 (1). – P. 24–32.

27. Smagghe G., Goodman C.L., Stanley D. Insect cell culture and applications to research and pest management // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* – 2009. – № 45 (3–4). – P. 93–105. doi: 10.1007/s11626-009-9181-x.

28. Wikan N., Kuadkitkan A., Smith D.R. The *Aedes aegypti* cell line CCL125 is dengue virus permissive // *J. Virol. Methods.* – 2009. – № 157 (2). – P. 227–230.

29. World Health Organization. Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention, and control. – 2nd ed. – Geneva: The Organization; 1997. – P. 18–20.

30. Wu S.J., et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection // *Nat. Med.* – 2000. – № 6. – P. 816–820.

Контактная информация

Пименова Екатерина Владимировна – к. м. н., с. н. с. лаборатории иммунодиагностики ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, e-mail: ekaterina-304@mail.ru