



Индикация и идентификация вирусов денге и Чикунгунья в комарах рода *Aedes spp.*, отловленных в Центральной Америке

Игнатъев Г.М.^{1✉}, Каа К.В.¹, Оксанич А.С.³, Антонова Л.П.¹, Самарцева Т.Г.², Мефед К.М.¹, Яковлева Д.А.², Жиренкина Е.Н.⁴

¹ФГБНУ «Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова», 108819, Москва, Россия;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;

³ЗАО БТК «Биосервис», 249010, Боровск, Россия;

⁴ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России, 198320, Санкт-Петербург, Россия

Целью работы было выделение арбовирусов из комаров различных видов в культуре клеток и их идентификация молекулярными и иммунохимическими методами.

Материалы и методы. Выделение вирусов проводилось на клетках C6/36. Возбудителей идентифицировали с использованием наборов для иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления антигенов вирусов денге, Чикунгунья, ВЗН и Синдбис и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) со специфическими праймерами с последующим секвенированием по Сенгеру.

Результаты. Всего было исследовано 102 комара, относящихся к трем родам: *Culex spp.*, *Culiseta spp.*, *Aedes spp.* Комары каждого вида или рода были разделены на пулы по 4–5 особей. При исследовании суспензий только 2 пулов комаров, полученных от *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*, начиная с 3-го пассажа отмечены изменения монослоя клеток C6/36. В материалах суспензии, полученной из пула *Aedes albopictus*, начиная с 4-го пассажа методом ИФА выявлялся антиген вируса Чикунгунья. В материалах, полученных из пула *Aedes aegypti*, на 5-м пассаже определялся вирус денге. Таким образом, только в 2 из 23 исследованных пулов комаров разных родов определялись антигены вирусов Чикунгунья или денге. Материалы 5-го пассажа были исследованы в ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к вирусам денге и Чикунгунья. Подтверждено, что изолят, полученный от комаров *Aedes albopictus*, содержал РНК вируса Чикунгунья и соответствовал Восточному/Центральному/Южно-Африканскому генотипу, а изолят, полученный от комаров *Aedes aegypti*, содержал РНК вируса денге 2-го типа.

Заключение. Полученные нуклеотидные последовательности вируса Чикунгунья были депонированы в международной базе данных GenBank под номерами MN271691 и MN271692.

Ключевые слова: арбовирусы; денге; Чикунгунья; комары; *Aedes spp.*; идентификация; ИФА; ПЦР; секвенирование.

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 17-15-01525).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Игнатъев Г.М., Каа К.В., Оксанич А.С., Антонова Л.П., Самарцева Т.Г., Мефед К.М., Яковлева Д.А., Жиренкина Е.Н. Индикация и идентификация вирусов денге и Чикунгунья в комарах рода *Aedes spp.*, отловленных в Центральной Америке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(3): 227–232.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4>

Поступила 27.01.2020
Принята в печать 09.02.2020

Indication and Identification of Dengue and Chikungunya Viruses in *Aedes spp.* Mosquitoes Captured in Central America

Georgy M. Ignatyev^{1✉}, Konstantin V. Kaa¹, Alexey S. Oksanich³, Lilya P. Antonova¹, Tatyana G. Samartseva², Kirill M. Mefed¹, Dinora A. Yakovleva², Ekaterina N. Zhirenkina⁴

¹M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Preparations, Moscow, 108819, Russia;

²Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia;

³"Bioservice" Biotechnology Company, Borovsk, 249010, Russia;

⁴St. Petersburg Vaccine and Sera Research Institute, Saint Petersburg, 198320, Russia

The purpose of study was to isolate arboviruses from mosquitoes of different species in the cell culture and to identify them by using molecular and immunochemical techniques.

Materials and methods. Viruses were isolated in C6/36 cell cultures. The pathogens were identified by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits for detection of antigens of dengue, Chikungunya, West Nile and Sindbis viruses as well as the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with specific primers and Sanger sequencing.

Results. A total of 102 mosquitoes belonging to three genera, *Culex spp.*, *Culiseta spp.*, *Aedes spp.*, were studied. Mosquitoes of each species or genus were divided into pools, each containing 4–5 mosquitoes. The study of suspensions of only 2 mosquito pools obtained from *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, starting from the 3rd passage, showed changes in the C6/36 cell monolayer. Starting from the 4th passage, an antigen of Chikungunya virus was detected using ELISA test in the suspension obtained from the *Aedes albopictus* pool. Dengue virus was detected in the 5th passage from the materials obtained from the *Aedes aegypti* pool. Thus, antigens of the Chikungunya and dengue viruses were detected only in 2 of 23 examined pools of mosquitoes of different genera. Materials of the 5th passage were analyzed by RT-PCR with specific primers for dengue and Chikungunya viruses. It was confirmed that the isolate obtained from *Aedes albopictus* mosquitoes contained RNA of the Chikungunya virus and corresponded to the East/Central/South African genotype, while the isolate obtained from *Aedes aegypti* mosquitoes contained RNA of the dengue type 2 virus.

Conclusion. The obtained nucleotide sequences of the Chikungunya virus were deposited in the GenBank international database under accession numbers MN271691 and MN271692.

Keywords: arboviruses; dengue; Chikungunya; mosquitoes; *Aedes spp.*; identification; ELISA; PCR; sequencing.

Acknowledgments. This work was supported by the Russian Science Foundation (grant 17-15-01525).

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Ignatyev G.M., Kaa K.V., Oksanich A.S., Antonova L.P., Samartseva T.G., Mefed K.M., Yakovleva D.A., Zhirenkina E.N. Indication and identification of dengue and chikungunya viruses in *Aedes spp.* mosquitoes captured in Central America. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(3): 227–232. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4>

Received 27 January 2020

Accepted 9 February 2020

Введение

Комары различных родов являются переносчиками целого ряда возбудителей вирусных заболеваний, прежде всего относящихся к семействам *Flaviviridae* (род *Flavivirus*) и *Togaviridae* (род *Alfavirus*) [1, 2]. Ареал распространения комаров родов *Aedes spp.*, *Culex spp.*, *Culiseta spp.* не ограничивается странами, расположенными в тропической и субтропической зонах. Комары этих видов распространены в странах с умеренным климатом в Южном и Северном полушариях [2–4]. В связи с этим возрастает вероятность смены переносчика, что, в свою очередь, может приводить к изменениям инфекционности вирусов для человека [5].

Для вируса Чикунгунья описаны три генотипа: Восточный/Центральный/Южно-Африканский, Западно-Африканский и Азиатский [6]. Увеличение выявляемости вируса Чикунгунья в отловленных комарах и у заболевших людей привело к более подробному изучению нуклеотидных последовательностей его изолятов, из-за чего изменилось представление о генотипах данного патогена. В частности, некоторыми исследователями предлагаются генотипы линии Индийского океана и карибский [6–8]. Для вируса денге описаны только 4

серотипа [5, 9]. Учитывая растущую выявляемость вирусов, переносимых комарами, и их патогенность для человека, разработка средств профилактики и лечения заболеваний, вызываемых альфа- и флавивирусами, остается актуальной. Выделение вирусов непосредственно от переносчиков, отловленных в естественных ареалах обитания, и изучение выделенных штаммов являются составной частью этого процесса.

Целью данной работы были выделение и идентификация арбовирусов, принадлежащих роду *Flavivirus* и *Alfavirus*, из комаров видов *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, *Culiseta spp.*, *Culex spp.*

Материалы и методы

Комары были отловлены в сухой сезон в лесной зоне в Никарагуа (муниципалитет Типитапа) с координатами 12.325527N 85.974662W и 12.323326N 85.974275W. Среди отловленных комаров были представители родов *Aedes* (виды *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*), *Culiseta spp.* и *Culex spp.* После определения видов комары были разделены на пулы по 4–5 особей одного вида. Каждый пул был гомогенизирован до получения суспензии в объеме 0,4 мл фосфатно-солевого буфера pH 7,4.

Выделение вируса. Полученную суспензию комаров наносили на монослой комариных клеток линии C6/36, выращенный в культуральных флаконах («Corning», США) площадью 25 см². После 1 ч адсорбции во флаконы добавляли среду поддержки DMEM (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова» РАН) с 2% фетальной эмбриональной сывороткой («Gibco»). Флаконы находились в термостате при 32°C с 5% содержанием CO₂. Наблюдение за монослоем проводили ежедневно под микроскопом до появления цитопатического действия.

Определение антигенов вирусов. Для определения антигенов вирусов Чикунгунья, Денге, Синдбис и вируса Западного Нила в образцах культуральной жидкости использовали наборы реагентов компании «Биосервис»: «БиоСкрин-Денге» (комплект АГ), «БиоСкрин-Чикунгунья» (комплект АГ), «БиоСкрин-ВЗН» (комплект АГ), «БиоСкрин-Синдбис» (комплект АГ). Постановку реакции и учет результатов проводили согласно инструкции к наборам реагентов.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Из 100 мкл вирусосодержащей культуральной жидкости с помощью комплекта реагентов «АмплиСенс® Магно-Сорб» («ИнтерЛабСервис») выделяли РНК согласно инструкции производителя.

Далее с использованием обратных праймеров для вируса Чикунгунья: pE2CHVrev1, pE2CHVrev2, pE1CHVrev1, pE1CHVrev2, pNS1CHVrev1, pNS1CH-

Vrev2, pNS1CHVrev3 (табл. 1); для вируса денге — pDV2rt (5'-CAGCCATGGCAGCGGTAGGTC-3') и набора реагентов для обратной транскрипции (ОТ) («Синтол») на матрице вирусной РНК проводили реакцию ОТ и получали кДНК. На первом этапе смешивали 2 мкл обратного праймера (10 пкмоль/мкл) с 6 мкл выделенной РНК и прогревали смесь при 95°C 5 мин. После этого пробирки охлаждали при комнатной температуре 2 мин, добавляли в них 22 мкл смеси для ОТ (9 мкл деионизированной воды, 12 мкл 2,5-кратного буфера для ОТ, 2,5 мкл MMLV-ревертазы) и инкубировали при 42°C 30 мин. Для инактивации ревертазы смесь прогревали в течение 5 мин при 95°C.

Для получения фрагментов генов *E1*, *E2* и *NS1* вируса Чикунгунья и их секвенирования использовали олигонуклеотиды, описанные в табл. 1.

ПЦР на кДНК, полученной после ОТ, проводили с использованием следующих комбинаций праймеров для вируса Чикунгунья:

- ген *E1* — pE1CHVfor1 и pE1CHVrev1, pE1CHVfor2 и pE1CHVrev2;
- ген *E2* — pE2CHVfor1 и pE2CHVrev1, pE2CHVfor2 и pE2CHVrev2;
- ген *NS1* — pNS1CHVfor1 и pNS1CHVrev1, pNS1CHVfor2 и pNS1CHVrev2, pNS1CHVfor3 и pNS1CHVrev3.

Для вируса денге ПЦР проводили при ранее описанных условиях [10]: pDV2for (5'-CCAAAAA

Таблица 1. Праймеры, использованные для ОТ, ПЦР и секвенирования вируса Чикунгунья

Table 1. Primers used for RT, PCR and sequencing of the Chikungunya virus

Номер комплекта праймеров Ref No. of primers	Праймер Primer index	Ген белка Protein gene	Последовательность праймера Sequence of the primer	Координаты Coordinates	Размер ПЦР-продукта, п.н. Size of the PCR-product, b.p.
1	pE1CHVfor1	<i>E1</i>	5'-GAACTGACACCAGGAGCTACCGTCC-3'	9745–10600	856
	pE1CHVrev1		5'-CGCCAAATTGCTCTGGTCTTCCTG-3'		
2	pE1CHVfor2		5'-AACATGGACTACCCGCCCTT-3'	10552–11313	762
	pE1CHVrev2		5'-GTGCCTGCTRAACGACACGC-3'		
1	pE2CHVfor1	<i>E2</i>	5'-TTCAATGTCTATAAAGCCACAAGACC-3'	8560–9240	681
	pE2CHVrev1		5'-GTGATTGGTGACCGCGGCATG-3'		
2	pE2CHVfor2		5'-GYCAGACGGTGCGGTACAAGTG-3'	9125–9794	670
	pE2CHVrev2		5'-GCAGCATATTAGGCTAAGCAGGAAAG-3'		
1	pNS1CHVfor1	<i>NS1</i>	5'-ATGGATYCTGTGTACGTGGAYATAGAC-3'	80–572	493
	pNS1CHVrev1		5'-GGTGRATATAGCGACGTGGGTGC-3'		
2	pNS1CHVfor2		5'-CATGTAGACAGAGAGCAGACGTCGC-3'	498–1139	642
	pNS1CHVrev2		5'-CCTCCGGCGTGACTTCTGTAGC-3'		
3	pNS1CHVfor3		5'-CGTGCCGGCGACCATTGTG-3'	1078–1710	633
	pNS1CHVrev3		5'-GCKCCTCTMGAGTCTCTATTATCC-3'		

CCCGCCACTCTAAGG-3') и pDV2rev (5'-GTTATCACGACAGTGTATTCCA-3'). ПЦР-смесь получали смешиванием по 1 мкл прямого и обратного праймеров с концентрацией 10 пкмоль/мкл, 10 мкл универсальной 2,5-кратной реакционной смеси для ПЦР («Синтол»), 8 мкл деионизированной воды с последующим добавлением 5 мкл кДНК. Амплификацию проводили на приборе XP Cycler («Hangzhou Bioer Technology») по следующей программе: 95°C — 1 мин 30 с; 30 циклов: 95°C — 20 с, 55°C — 15 с, 72°C — 30 с; финальная элонгация: 72°C — 10 мин. Программу для амплификации вируса денге: 95°C — 1 мин 30 с; 40 циклов: 95°C — 20 с, 57°C — 15 с, 72°C — 30 с; финальная элонгация 72°C — 10 мин.

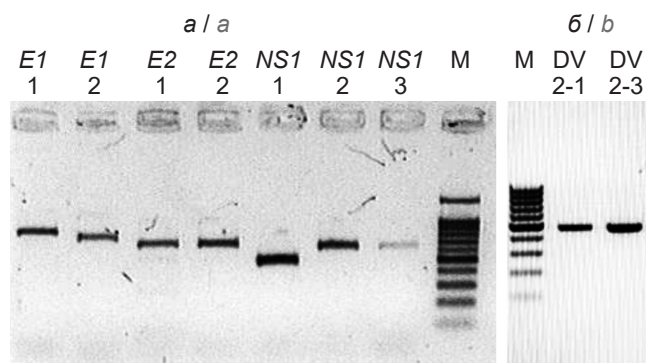
Определение инфицированности (minimum infection rate, MIR) исследованных комаров проводили, как описано ранее [11, 12].

Результаты

Всего обследовано 102 комара трех родов (табл. 2). Наибольшее количество комаров относилось к роду *Aedes*, представленному видами *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*. Каждый образец суспензии прошел 4 последовательных «слепых» пассажа на клетках С6/36. Контроль за состоянием монослоя клеток проводили под микроскопом в течение 5 дней после пассажа.

В результате подтверждено, что изолят, полученный из комаров *Aedes albopictus*, содержал РНК вируса Чикунгунья и не содержал РНК вируса денге. Изолят, полученный от комаров *Aedes aegypti*, содержал РНК вируса денге и не содержал РНК вируса Чикунгунья. Изолят денге по результатам секвенирования был отнесен ко 2-му типу. ПЦР-продукты генов *E1*, *E2* и *NS1*, полученные при амплификации изолята вируса Чикунгунья, также были отсекувенированы.

Полученные последовательности представлены в GenBank под номерами MN271691 и MN271692. С помощью компьютерной программы BLAST нуклеотидные последовательности изолята



Электрофорез фрагментов генов вируса Чикунгунья (а) и денге (б) в 1% агарозном геле.

а — ПЦР-продукты фрагментов генов *E1*, *E2* и *NS1* вируса Чикунгунья. 1–3 — номера комплекта праймеров (табл. 1); б — ПЦР-продукты фрагмента гена поверхностного белка вируса денге, полученного на 4-м (DV2-1) и 5-м (DV2-3) пассажах. М 100 бп — весовой ДНК-маркер, 100 п.о.

The electrophoresis of gene fragments of Chikungunya (a) and dengue (b) viruses in 1% agarose gel.

а — PCR products of the *E1*, *E2* and *NS1* gene fragments of the Chikungunya virus. 1–3 — the reference numbers of primers (Table 1);

б — PCR products of the gene fragment of the surface protein of the dengue virus, which was obtained on the 4th (DV2-1) and 5th (DV2-3) passages. M 100 bp — the DNA molecular weight marker, 100 bp.

вируса Чикунгунья были отнесены к Восточному/Центральному/Южно-Африканскому генотипу.

При исследовании суспензий только в 2 пулах комаров, полученных от *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*, начиная с 3-го пассажа были отмечены изменения монослоя клеток. На 4-м пассаже пула *Aedes aegypti* цитопатическое действие отмечалось на 4-е сутки, а для пула *Aedes albopictus* — на 3-и сутки. После дополнительного, 5-го пассажа на клетках С6/36 материалы указанных пулов были исследованы в ИФА (наборы реагентов «Биосервис») на определение наличия антигенов вирусов денге, Чикунгунья, Западного Нила и Синдбис.

В пулах *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus* в материалах всех исследованных пассажей антигены вирусов Западного Нила и Синдбис не выявлены (табл. 2). В то же время в материалах суспензии, по-

Таблица 2. Род комаров, общее количество и количество исследованных пулов

Table 2. Mosquito genus and total number of mosquitoes; number of studied pools

Род комаров Mosquito genus	Количество комаров Number of mosquitoes	Количество пулов Number of pools	ИФА / ELISA		ПЦР / PCR	
			денге dengue	Чикунгунья Chikungunya	денге dengue	Чикунгунья Chikungunya
<i>Culex spp.</i>	16	4	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>Culiseta spp.</i>	21	5	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>Aedes spp.</i>	65	16	1/16	1/16	1/16	1/16
<i>Aedes aegypti</i>	28	7	1/7	0/7	1/7	0/7
<i>Aedes albopictus</i>	37	9	0/9	1/9	0/9	1/9

лученной из пула *Aedes albopictus*, начиная с 4-го пассажа выявлялся антиген вируса Чикунгунья. В материалах, полученных из пула *Aedes aegypti*, на 5-м пассаже определялся вирус денге (рисунки). Таким образом, только в 2 из 25 исследованных пулов комаров разных родов определялись антигены вирусов Чикунгунья или денге.

Инфицированность (MIR) составила для *Aedes aegypti* 0,0357, для *Aedes albopictus* — 0,0270. Таким образом, пулы, содержащие антигены Чикунгунья и денге, на 4-м и 5-м последовательных пассажах вызвали цитопатическое действие на клетках С6/36. Материал 5-го пассажа обоих пулов комаров был исследован в ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к вирусам денге и Чикунгунья.

Обсуждение

В странах Центральной Америки распространение вирусов денге и Чикунгунья связано с комарами вида *Aedes*. Сбор насекомых проводится, как правило, в местах проживания человека [2–5, 9, 12]. В нашем исследовании комары 3 видов были отловлены вне населенных пунктов, в лесной зоне. При определении инфицированности комаров этого вида тем или иным вирусом важным фактором является количество комаров в исследуемом пуле. Оптимальным является пул, состоящий из 4 комаров [2, 11, 12]. Для детекции вирусов в пулах комаров используется ПЦР, в случае положительного результата проводится секвенирование полученного ампликона. Данных об использовании ИФА в опубликованных статьях нет.

В связи с ограниченным объемом первичной суспензии комаров в нашем исследовании проведение детекции вирусов после «слепых» последовательных пассажей на клетках С6/36 полностью оправданно. Использование для детекции вируса ИФА, как и проведение ОТ-ПЦР, позволяет провести детекцию двумя независимыми методами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kraemer M.U.D., Sinka M.E., Duda K.A., Mylne A., Shearer F.M., Brady O.J., et al. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* occurrence. *Sci. Data*. 2015; 2: 150035. DOI: <http://doi.org/10.1038/sdata.2015.35>
2. Ponce P., Morales D., Argoti A., Cevallos V.E. First report of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae), the Asian tiger mosquito, in Ecuador. *J. Med. Entomol.* 2018; 55(1): 248-9. DOI: <http://doi.org/10.1093/jme/tjx165>
3. Cevallos V., Ponce P., Waggoner J.J., Pinsky B.A., Coloma J., Quiroga C., et al. Zika and Chikungunya virus detection in naturally infected *Aedes aegypti* in Ecuador. *Acta Trop.* 2018; 177: 74-80. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.029>
4. Waggoner J.J., Gresh L., Vargas M.J., Ballesteros G., Tellez Y., Soda K.J., et al. Viremia and clinical presentation in Nicaraguan patients infected with Zika virus, Chikungunya virus, and Dengue virus. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 63(12): 1584-90. DOI: <http://doi.org/10.1093/cid/ciw589>

5. Vega-Rua A., Zouache K., Caro V., Diancourt L., Delaunay P., Grandadam M., et al. High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit Chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France. *PLoS One*. 2013; 8(3): e59716. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0059716>
6. Intayot P., Phumee A., Boonserm R., Sor-Suwan S., Bua-thong R., Wacharapluesadee S., et al. Genetic characterization of Chikungunya virus in field-caught *Aedes aegypti* mosquitoes collected during the recent outbreaks in 2019, Thailand. *Pathogens*. 2019; 8(3): 121. DOI: <http://doi.org/10.3390/pathogens8030121>
7. Chen R., Puri V., Fedorova N., Lin D., Hari K.L., Jain R., et al. Comprehensive genome scale phylogenetic study provides new insights on the global expansion of Chikungunya virus. *J. Virol.* 2016; 90(23): 10600-11. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01166-16>
8. Villero-Wolf Y., Mattar S., Puerta-González A., Arrieta G., Muskus C., Hoyos R., et al. Genomic epidemiology of Chikungunya virus in Colombia reveals genetic variability of strains and multiple geographic introductions in outbreak, 2014. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 9970. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-019-45981-8>
9. Guzman M.G., Halstead S.B., Artsob H., Buchy P., Farrar J., Gubler D.J., et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8(12 Suppl.): S7-S16. DOI: <http://doi.org/10.1038/nrmicro2460>
10. Букин Е.К., Отрашевская Е.В., Воробьева М.С., Игнатьев Г.М. Сравнительное изучение показателей гемостаза и продукции цитокинов при экспериментальной инфекции вирусом денге. *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(2): 32-6.
11. Gu W., Unnasch T.R., Katholi C.R., Lampman R., Novak R.J. Fundamental issues in mosquito surveillance for arboviral transmission. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102(8): 817-22. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.03.019>
12. Medeiros A.S., Costa D.M.P., Branco M.S.D., Sousa D.M.C., Monteiro J.D., Galvão S.P.M., et al. Dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in urban areas in the state of Rio Grande do Norte, Brazil: Importance of virological and entomological surveillance. *PLoS One*. 2018; 13(3): e0194108. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0194108>

REFERENCES

1. Kraemer M.U.D., Sinka M.E., Duda K.A., Mylne A., Shearer F.M., Brady O.J., et al. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* occurrence. *Sci. Data*. 2015; 2: 150035. DOI: <http://doi.org/10.1038/sdata.2015.35>
2. Ponce P., Morales D., Argoti A., Cevallos V.E. First report of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae), the Asian tiger mosquito, in Ecuador. *J. Med. Entomol.* 2018; 55(1): 248-9. DOI: <http://doi.org/10.1093/jme/tjx165>
3. Cevallos V., Ponce P., Waggoner J.J., Pinsky B.A., Coloma J., Quiroga C., et al. Zika and Chikungunya virus detection in naturally infected *Aedes aegypti* in Ecuador. *Acta Trop.* 2018; 177: 74-80. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.029>
4. Waggoner J.J., Gresh L., Vargas M.J., Ballesteros G., Tellez Y., Soda K.J., et al. Viremia and clinical presentation in Nicaraguan patients infected with Zika virus, Chikungunya virus, and Dengue virus. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 63(12): 1584-90. DOI: <http://doi.org/10.1093/cid/ciw589>
5. Vega-Rua A., Zouache K., Caro V., Diancourt L., Delaunay P., Grandadam M., et al. High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit Chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France. *PLoS One*. 2013; 8(3): e59716. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0059716>
6. Intayot P., Phumee A., Boonserm R., Sor-Suwan S., Bua-thong R., Wacharapluesadee S., et al. Genetic characterization of Chikungunya virus in field-caught *Aedes aegypti* mosquitoes

collected during the recent outbreaks in 2019, Thailand. *Pathogens*. 2019; 8(3): 121.

DOI: <http://doi.org/10.3390/pathogens8030121>

7. Chen R., Puri V., Fedorova N., Lin D., Hari K.L., Jain R., et al. Comprehensive genome scale phylogenetic study provides new insights on the global expansion of Chikungunya virus. *J. Virol.* 2016; 90(23): 10600-11.

DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01166-16>

8. Villero-Wolf Y., Mattar S., Puerta-González A., Arrieta G., Muskus C., Hoyos R., et al. Genomic epidemiology of Chikungunya virus in Colombia reveals genetic variability of strains and multiple geographic introductions in outbreak, 2014. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 9970.

DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-019-45981-8>

9. Guzman M.G., Halstead S.B., Artsob H., Buchy P., Farrar J., Gubler D.J., et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat. Rev.*

Microbiol. 2010; 8(12 Suppl.): S7-S16.

DOI: <http://doi.org/10.1038/nrmicro2460>

10. Bukin E.K., Otrashkevskaya E.V., Vorob'eva M.S., Ignat'ev G.M. Comparative study of hemostasis and cytokine production in experimental Dengue virus infection. *Voprosy virusologii.* 2007; 52(2): 32-6. (in Russian)
11. Gu W., Unnasch T.R., Katholi C.R., Lampman R., Novak R.J. Fundamental issues in mosquito surveillance for arboviral transmission. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102(8): 817-22. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.03.019>
12. Medeiros A.S., Costa D.M.P., Branco M.S.D., Sousa D.M.C., Monteiro J.D., Galvão S.P.M., et al. Dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in urban areas in the state of Rio Grande do Norte, Brazil: Importance of virological and entomological surveillance. *PLoS One.* 2018; 13(3): e0194108. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0194108>

Информация об авторах:

Игнатъев Георгий Михайлович — д.м.н., проф., зам. руководителя производственного направления ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», 108819, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>. E-mail: marburgman@mail.ru

Каа Константин Владимирович — асп. лаб. молекулярной биологии вирусов ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>.

Оксанич Алексей Сергеевич — к.б.н., генеральный директор АО БТК «Биосервис», Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>.

Антонова Лилия Петровна — асп. лаб. молекулярной биологии вирусов, ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1221-1134>.

Самарцева Татьяна Геннадьевна — м.н.с. ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>.

Мефед Кирилл Михайлович — к.б.н., зам. нач. отдела управления качеством ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7335-1982>.

Яковлева Динора Абдуллаевна — к.м.н., с.н.с. ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8771-4177>.

Жиренкина Екатерина Николаевна — к.м.н., зам. директора по научной работе ФГУП «СПбНИИВС», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0810-5985>.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Georgy M. Ignatyev — D. Sci. (Med.), Prof., Deputy Head, Production department, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, 108819, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>. E-mail: marburgman@mail.ru

Konstantin V. Kaa — postgraduate student, laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>.

Alexey S. Oksanich — PhD (Biol.), General Director, "Bioservice" Biotechnology Company, Borovsk, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>.

Lilya P. Antonova — postgraduate student, laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1221-1134>.

Tatyana G. Samartseva — junior researcher, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>.

Kirill M. Mefed — PhD (Biol.), Deputy Head of Quality Management, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7335-1982>.

Dinora A. Yakovleva — PhD (Med.), senior researcher, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8771-4177>.

Ekaterina N. Zhirenkina — PhD (Med.), Deputy Director for science, St. Petersburg Vaccine and Sera Research Institute, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0810-5985>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.