https://doi.org/10.17116/molgen20234104138

Исторические изоляты вирусов леса Семлики и чикунгунья, их вирусологическая характеризация, полногеномные последовательности и филогения

© Т.П. МИКРЮКОВА[1], Е.В. ПРОТОПОПОВА[1], А.С. МЕЖЕВАЛОВА[1], Р.Б. БАЯНДИН[1], Ю.А. ХОРОШАВИН[1], А.Н. ШВАЛОВ[1], О.С. ТАРАНОВ[1], Т.В. ТРЕГУБЧАК[1], В.А. ТЕРНОВОЙ[1], В.Б. ЛОКТЕВ[1—3]

[1]ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"» Роспотребнадзора, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Россия;
[2]ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия;
[3]ФГБУН «ФИЦ "Институт цитологии и генетики СО РАН"», Новосибирск, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Цель исследования состояла в исследовании изолятов альфавирусов, изолированных в Уганде и Танзании в период, предшествующий их глобальному распространению и относящихся к середине прошлого века. Мы предполагали, что анализ их геномов позволит уточнить особенности и направленность молекулярной эволюции альфавирусов в современных условиях.

Материал и методы. Архивные образцы вирусов чикунгунья (CHIKV) и леса Семлики (SFV) были восстановлены культивированием на клетках Vero E6. Изоляты идентифицировались методом ОТ-ПЦР с последующим секвенированием. Полногеномные последовательности определяли NGS-секвенированием и использовали для филогенетического анализа.

Результаты и обсуждение. Идентифицировано наличие в исследуемом архивном образце CHIKV двух представителей рода *Alphavirus,* а именно CHIKV и SFV. В архивном образце 1942 г. был обнаружен только SFV. Все изоляты оказались способны высокоэффективно реплицироваться на клеточных культурах C6/36, Vero E6, 293 и СПЭВ с развитием цитопатогенного действия и вызывать патоморфологические изменения у мышей, характерные для этих альфавирусов. Определены их полногеномные последовательности и проведен их анализ. Выделенные изоляты кластеризуются с типичными африканскими штаммами CHIKV и SFV. Эти изоляты могут быть отнесены к старейшим известным штаммам SFV и CHIKV, датируемыми 1942 и 1953 годами, сохранившимися в лабораторных коллекциях. Архивный изолят CHIKV генотипируется как ECSA-вариант, с современными представителями которого ассоциируется глобальное распространение CHIKV и возникновение крупных вспышек лихорадки чикунгунья в последние десятилетия.

Заключение. Изоляты вирусов леса Семлики и чикунгунья восстановлены из архивных лабораторных образцов, предположительно датируемых 1942 и 1953 годами, проведена их вирусологическая характеризация, генотипирование и анализ их полногеномных последовательностей.

Ключевые слова: *альфавирусы, вирус чикунгунья, вирус леса Семлики, геномные последовательности, филогения.*

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:
Микрюкова Т.П. — https://orcid.org/0000-0003-4350-4260; e-mail: mikryukova_tp@vector.nsc.ru
Протопопова Е.В. — https://orcid.org/0000-0002-2782-8364; e-mail: protopopova_ev@vector.nsc.ru
Межевалова А.С. — e-mail: mezhevalovaa@mail.ru
Баяндин Р.Б. — https://orcid.org/0000-0002-6460-0828; e-mail: bayandin_rb@vector.nsc.ru
Хорошавин Ю.А. — https://orcid.org/0000-0003-4334-560xhoroshavin_yua@vector.nsc.ru
Швалов А.Н. — https://orcid.org/0000-0001-6890-1575; e-mail: shvalov@vector.nsc.ru
Таранов О.С. — https://orcid.org/0000-0002-6746-8092; e-mail: taranov@vector.nsc.ru
Трегубчак Т.В. — https://orcid.org/0000-0001-9608-2044; e-mail: tregubchak_tv@vector.nsc.ru
Терновой В.А. — https://orcid.org/0000-0003-1275-171X; e-mail: tern@vector.nsc.ru
Локтев В.Б. — https://orcid.org/0000-0002-0229-321X; e-mail: loktev@vector.nsc.ru
Автор, ответственный за переписку: Локтев В.Б. — e-mail: valeryloktev@gmail.com

КАК ЦИТИРОВАТЬ:
Микрюкова Т.П., Протопопова Е.В., Межевалова А.С., Баяндин Р.Б., Хорошавин Ю.А., Швалов А.Н., Таранов О.С., Трегубчак Т.В., Терновой В.А., Локтев В.Б. Исторические изоляты вирусов леса Семлики и чикунгунья, их вирусологическая характеризация, полногеномные последовательности и филогения. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2023;41(4):38—44. https://doi.org/10.17116/molgen20234104138

Historical isolates of Semliki forest and chikungunya viruses, their virological characterization, genome sequences and phylogeny

© T.P. MIKRYUKOVA[1], E.V. PROTOPOPOVA[1], A.S. MEZHEVALOVA[1], R.B. BAYANDIN[1], YU.A. KHOROSHAVIN[1], A.N. SHVALOV[1], O.S. TARANOV[1], T.V. TREGUBCHAK[1], V.A. TERNOVOI[1], V.B. LOKTEV[1—3]

[1]State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Rospotrebnadzor, Novosibirsk Region, Koltsovo, Russia;
[2]Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia;
[3]Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

ABSTRACT

Introduction. The aim of the study was to reconstruct alphaviruses isolated in Uganda and Tanzania prior to their global spread and dating back to the middle of the last century. We propose that analysis of their genomes could clarify the features and direction of the molecular evolution for these viruses in modern world.

Materials and methods. Archival samples of Chikungunya (CHIKV) and Semliki Forest (SFV) viruses were restored by cultivation on Vero E6 cells. The isolates were identified by RT-PCR followed by sequencing. Whole genome sequences were determined by NGS sequencing and used for their phylogenetic analysis.

Results and discussion. The presence of two representatives of the genus *Alphavirus*, namely CHIKV and SFV, was identified in the studied archival sample of CHIKV. In the 1942 archival sample, only SFV was found. All isolates were able to replicate highly efficiently on cell cultures C6/36, Vero E6, 293 and SPEV with the development of CPE and cause pathomorphological changes in mice typical for these alphaviruses. Their whole genome sequences have been determined. Phylogenetic analysis showed that the isolated isolates clustered with typical African CHIKV and SFV strains. The totality of the available data suggests that the recovered and sequenced isolates can be attributed to the oldest known strains of SFV and CHIKV, dating back to 1942 and 1953, preserved in laboratory collections. The absence in the CHIKV genome of mutations V 264 A in the E 2 gene and K211 E, M269V in the E1 gene, which are associated with the occurrence of the modern global outbreak of chikungunya fever further confirms the obtained results.

Conclusion. Isolates of the Semliki forest and chikungunya viruses were restored from archival laboratory samples presumably dating back to 1942 and 1953, their virological characterization was carried out, followed by phylogenetic analysis of their complete genome sequences.

Keywords: *alphaviruses, chikungunya virus, Semliki forest virus, genomic sequences, phylogeny.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:
Mikryukova T.P. — https://orcid.org/0000-0003-4350-4260; e-mail: mikryukova_tp@vector.nsc.ru
Protopopova E.V. — https://orcid.org/0000-0002-2782-8364; e-mail: protopopova_ev@vector.nsc.ru
Mezhevalova A.S. — e-mail: mezhevalovaa@mail.ru
Bayandin R.B. — https://orcid.org/0000-0002-6460-0828; e-mail: bayandin_rb@vector.nsc.ru
Khoroshavin Yu.A. — https://orcid.org/0000-0003-4334-560xhoroshavin_yua@vector.nsc.ru
Shvalov A.N. — https://orcid.org/0000-0001-6890-1575; e-mail: shvalov@vector.nsc.ru
Taranov O.S. — https://orcid.org/0000-0002-6746-8092; e-mail: taranov@vector.nsc.ru
Tregubchak T.V. — https://orcid.org/0000-0001-9608-2044; e-mail: tregubchak_tv@vector.nsc.ru
Ternovoi V.A. — https://orcid.org/0000-0003-1275-171X; e-mail: tern@vector.nsc.ru
Loktev V.B. — https://orcid.org/0000-0002-0229-321X; e-mail: loktev@vector.nsc.ru
Corresponding author: Loktev V.B. — e-mail: valeryloktev@gmail.com

TO CITE THIS ARTICLE:
Mikryukova TP, Protopopova EV, Mezhevalova AS, Bayandin RB, Khoroshavin YuA, Shvalov AN, Taranov OS, Tregubchak TV, Ternovoi VA, Loktev VB. Historical isolates of Semliki forest and Chikungunya viruses, their virological characterization, genome sequences and phylogeny. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya (Molecular Genetics, Microbiology and Virology)*. 2023;41(4):38–44. (In Russ.).
https://doi.org/10.17116/molgen20234104138

Введение

Вирусы леса Семлики (SFV) и чикунгунья (CHIKV) относятся к семейству *Togaviridae*, род *Alphavirus* (*Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Kitrinoviricota; Alsuviricetes; Martellivirales; Togaviridae; Alphavirus* https://ictv.global/taxonomy). Семейство *Togaviridae* включает в себя небольшие РНК-содержащие вирусы, геном которых состоит из одноцепочечной (+) РНК размером 9.7—11.8 kb [1]. Род *Alphavirus* в настоящее время состоит из 32 видов вирусов, которые переносятся комарами, патогенны для позвоночных хозяев и способны вызывать заболевания как человека, так и домашних животных. Представители рода разделяются на 7 основных комплексов: восточного энцефалита лошадей, Венесуэльского энцефалита лошадей, западного энцефалита лошадей, леса Семлики, Миддельбург, леса Барма, Ндуму (https://ictv.global/report/chapter/togaviridae/togaviridae). Филогения подразделяет эти вирусы на три основных клады [2, 3]. Причем к одной из клад относятся вирусы четырех комплексов, включая комплекс вирусов леса Семлики и вирус чикунгунья.

Вирус чикунгунья первоначально был обнаружен и выделен в 1952—1953 гг. в восточной Африке на территории южной Танганьики (современная Танзания) во время вспышки денге-подобного заболева-

ния [4—6]. Вирус вызывает у человека лихорадку, сопровождающуюся кожной сыпью, болями в мышцах и артральгиями. Инкубационный период составляет 4—7 дней. Заболевание могло продолжаться до месяца [7, 8]. Исход, как правило, доброкачественный, но у пожилых людей, имевших сопутствующие заболевания, регистрировались летальные исходы [9—12]. Вспышки лихорадки CHIKV у человека начали регистрироваться с 1958 г. в странах Африки. В качестве переносчиков выступали несколько видов комаров *Aedes: A. taylori, A. furcifer, A. dalzieli, A. vittatus, A. africanus,* и *A. luteocephalus*. До 2004 г. CHIKV привлекал мало внимания, поскольку было известно, что он вызывал небольшие локальные вспышки заболеваний. Позднее случаи заболевания лихорадкой чикунгунья стали регистрироваться в Индии, Юго-Восточной Азии и островах Индийского океана, где их возникновение предположительно ассоциировалось с комарами *A. aegypti*, а затем и с *A. albopictus*. Крупная вспышка лихорадки CHIKV была зарегистрирована на островах Индийского океана и Индийского субконтинента в 2005—2006 гг., и именно после этой вспышки возникло повышенное внимание к этому вирусу. В настоящее время случаи заболевания регистрируются фактически глобально в странах Африки, Юго-Восточной Азии, Южной и Центральной Америки, в том числе и на Карибских островах. В Северной Америке и Европе преимущественно регистрируются завозные случаи [3, 13—15]. Первые вспышки лихорадки чикунгуньи в Азиатском регионе в 1963 и 1973 гг., вероятно, были связаны с появлением новых геновариантов вируса, способных более эффективно реплицироваться в комарах [16]. Вторая волна заболеваний в 2005—2006 гг. ассоциируется с появлением новых мутаций, обеспечивших репликацию вируса в комарах *A.albopictus* и *A.aegypti,* что привело к практически глобальному распространению азиатского генотипа CHIKV [14, 17]. В последние десятилетия комары рода *Aedes* стали обнаруживаться в ряде стран Черноморского бассейна (Болгария, Грузия, юг Российской Федерации, Румыния, Турция).

Вирус леса Семлики был выделен в 1942 г. в Уганде из пула комаров рода *Aedes* [18—20]. При этом было продемонстрировано наличие антител к этому вирусу у местных жителей, однако первоначально выявить случаи заболевания у человека не удалось. Несколько позднее были описаны первые случаи заболевания человека со смертельным исходом [21]. Тем не менее SFV считается относительно безопасным вирусом для человека и широко используется для проведения научных исследований с целью создания диагностических препаратов, вакцин, противоопухолевых препаратов, а также в качестве вектора для генной терапии.

Цель настоящей работы — попытка восстановить архивные штаммы CHIKV и SFV, датируемые серединой прошлого века, исследовать их культуральные свойства и патогенность для лабораторных животных, провести определение полногеномных последовательностей этих изолятов, выполнить анализ их филогенетических взаимоотношений с современными изолятами CHIKV и SFV. Эти данные могут быть полезны для понимания особенностей эволюции альфавирусов и их геномов в современном мире, а также оценки потенциальных угроз для общественного здравоохранения.

Материал и методы

Вирусы. Вирус леса Семлики, штамм Smithburn, выделенный в 1942 г. в Уганде в лесу Семлики (Semliki Forest) от комаров, и вирус Chikungunya, штамм Ross late (4669), выделенный в 1953 г. в южной провинции Танганьики (Танзания с 1964 г.) от человека, были любезно предоставлены Dr. J. Casals (США) в 1960 и 1964 гг. соответственно. Ампулы с лиофильно высушенными вируссодержащими материалами были приготовлены в 1961 и 1965 гг. после пассажа на сосунках белых мышей массой тела 6—7 г. Далее ампулы хранились без их вскрытия в низкотемпературном холодильнике. С 1991 г. их хранение проводилось при температурном режиме −70 °С до момента проведения настоящего исследования в ГНЦ ВБ «Вектор».

Клеточные культуры. Культивирование вирусного материала осуществлялось на клетках С6/36, Vero E6, 293 и СПЭВ из коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор» с использованием среды DMEM (Gibco, UK), содержащей 10% сыворотки плода коровы (Gibco, UK) и 80 мкг/мл сульфата гентамицина. Инфекционная активность вирусных препаратов определялась на клетках С6/36 через 2 сут, как описано нами ранее [22].

Животные. Мыши линии BALB/c массой тела 20—25 г были подкожно инфицированы различными дозами вирусов с использованием 5 животных для каждого разведения вирусного препарата. Животные были получены из вивария ГНЦ ВБ «Вектор». Все манипуляции с животными проводили с использованием общей анестезии в соответствие с решением биоэтического комитета (ГНЦ ВБ «Вектор», протокол 02—05 от 15 мая 2020 г.)

Проведение ОТ ПЦР. Выделение РНК проводилось из 100 мкл вируссодержащего материала с использованием комплекта реагентов для выделения ДНК/РНК (НПФ «Литех», Россия). Реакция обратной транскрипции была выполнена с помощью набора «Реверта-L» («АмплиСенс», Россия) согласно инструкции производителей. ПЦР проводилась с помощью Taq-ДНК-полимеразы (BIORON, Германия) в соответствующем буфере. Для выявления вирусной РНК использовались оригинальные олигонуклеотидные праймеры, специфичные для генома SFV и CHIKV **(таблица)**. Реакция проводилась в амплифи-

Олигонуклеотидные праймеры, использованные в исследовании

Наименование вируса, ген-мишень	Последовательности	Размер репликона (н. о.)
Alphaviruses SFV и VEE, nsP4	GCCATGATGAAATCNGGNATGTT AGTCCATTCAGGTYAGCCGTAGAG	563
CHIKV, 5'HTO-nsP1	ATGGCTGCGTGAGACACACGTAGC GCGACGTCTGCTCTCTGTCTACATG	519
CHIKV, nsP2	TGGTACTGGTGGGCGACTTGAC GTAGTGCGCATTTTGCCTTCG	549
CHIKV, E2	CACTCGTGCCATAGTCCCGTAGC GTAGGACAGGAGCGTTGGGTG	815
SFV, 5'UTR	ATGGCGGATGTGTGACATACACG CATRAACKGGGTGGTGTCAAASCC	640
SFV, E2	AGCGTGTCGCAACACTTCAACG TCTTATGGTCCGTCACTGAGACG	699
	ACACGTGTCTAATAGAGCAGTGCC CACACTAGCTGCGTGCGCC	622
SFV, 3'HTO	GAAAATCTCGGGTGGTCTGG GGAAATATTAAAAACCAATTGCAAAAT	326

каторе T100 ThermalCycler (Bio-Rad, США) со следующими температурными параметрами: 95 °C — 2 мин, 94 °C — 15 с, 52—60 °C — 20 с, 72 °C — 30—50 с (40 циклов), 72 °C — 5 мин. Анализ продуктов амплификации проводился в 2% агарозном геле в однократном буфере ТАЕ (40 мМТрис, 1 мМNa_2ЭДТА, уксусная кислота). Для выделения продуктов амплификации из геля использовался набор для элюции ДНК из агарозного геля (ООО «БиоСилика», Россия).

Определение нуклеотидных последовательностей ДНК. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК проводилось с использованием автоматического секвенатора ABI PRISM3500 GeneticAnalyzer (AppliedBiosystems, США) и набора реактивов BigDyeTerminatorv3.1 CycleSequencingKit (AppliedBiosystems, США). Вторую цепь ДНК готовили NEBNext набором # E7530 (NEB) и образцы анализировали NGSMiSeq с использованием технологии Illumina. Cutadapt (версия 1.18) и SAMtools (версия 0.1.18) использовали для удаления адаптеров Illumina и повторного чтения. Геномные последовательности были собраны *de novo* с использованием ассемблера MIRA (версия 4.9.6).

Нуклеотидные последовательности сравнения были взяты из базы данных GenBank. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили при помощи приложения AlignX программного пакета Vector NTI 11 (InforMax). Филогенетический анализ проводили при помощи программы Mega 7 [23].

Световая и электронная микроскопия. Для анализа использовались культуры клеток и головной мозг инфицированных животных. Микроскопия проводилась, как описано нами ранее [24]. Все исследования проводили с соблюдением правил биобезопасности, регламентированных в СанПиН 3.3686—21.

Результаты и обсуждение

Культивирование и идентификация вируса. Образец CHIKV после хранения более 55 лет был использован для инфицирования культур клеток C6/36. Наблюдался выраженный цитопатический эффект (ЦПД) через 24—48 ч после инфицирования клеток. С помощью ОТ ПЦР было подтверждено наличие в образце CHIKV. При культивировании образца на клетках Vero E6 ЦПД наблюдалось уже через 24 ч. Проведение ОТ ПЦР с праймерами для консервативной области генома альфавирусов позволило обнаружить фрагмент гена nsP4 SFV. Методом предельных разведений на культуре Vero E6 был выделен изолят SFV, названый нами штаммом Tanzania 53. Этот штамм вызывал развитие ЦПД на культурах клеток Vero E6 и СПЭВ уже через 24 ч, а после инфицирования клеток C6/36 и HEK 293 — через 48 ч.

Гистологические исследования. Выделенным изолятом SFV были заражены мыши линии BALB/c для оценки его возможной патогенности. При подкожном заражении мыши заболевали с клинической картиной, характерной для поражения центральной нервной системы, а именно с развитием парезов и параличей у инфицированных животных. Гистологическое исследование выявило умеренное поражение печени и значительные патоморфологические изменения в тканях головного мозга **(рис. 1, https://mediasphera.ru/upload/medialibrary/files/Mol_genetika_2023_04_041_add.zip)**.

В тканях мозга наблюдалась вакуолизация серого вещества, рассеянные диффузные и периваскулярные инфильтрации в различных отделах мозга. При этом обнаружены очаги некроза и деструкции ткани серого и белого веществ головного мозга. Ранее было описано, что многие альфавирусы, в том числе CHIKV и SFV, способны реплицироваться в клетках

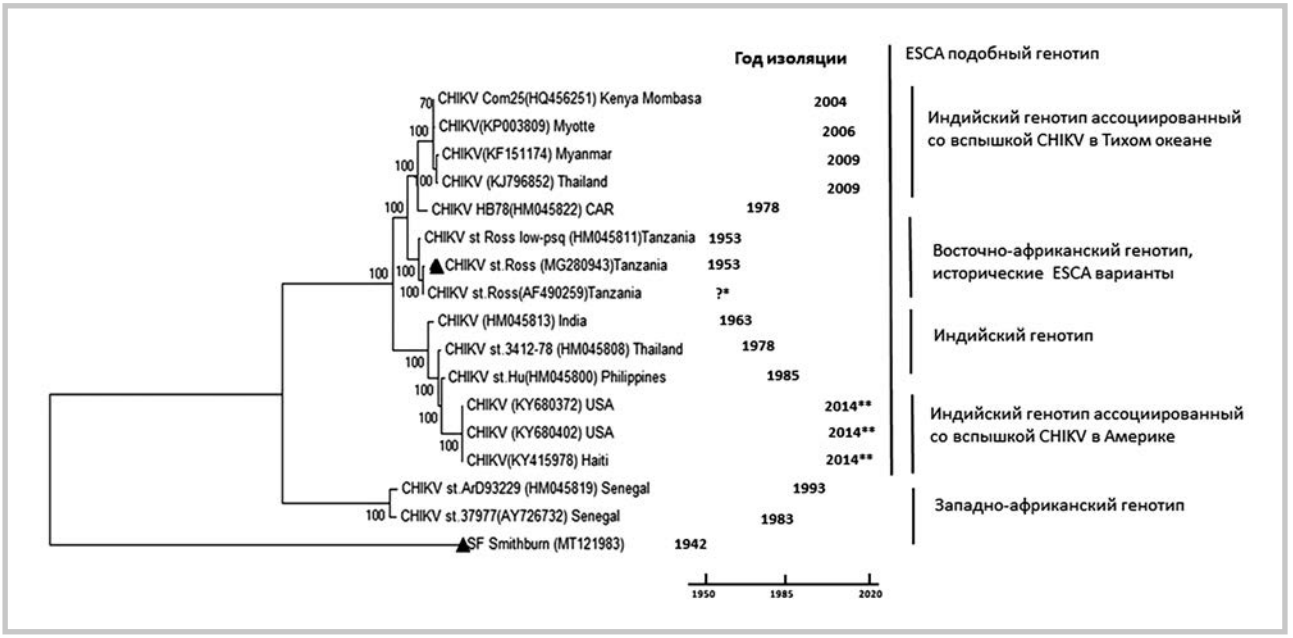

Рис. 2. **Филогенетическое дерево, построенное по полногеномным последовательностям CHIKV методом объединения ближайших соседей с использованием 2-параметрической модели Кимура.**
Секвенированный нами штамм CHKIV обозначен символом ▲. Номера депонированных в GenBank последовательностей представлены в скобках. ?* — последовательность депонирована в 2002 г., обновлена в 2011 г.; ** — штаммы CHIKV, изолированные во время последней вспышки лихорадки.

нервной ткани млекопитающих [10, 11]. При этом некоторые штаммы SFV вызывают тяжелые энцефалиты при инфицировании животных и людей [21]. Наблюдаемые поражения головного мозга мышей соответствовали описанной ранее картине заболевания для этой инфекции.

Определение нуклеотидных последовательностей и их анализ. Наличие генетического материала CHIKV в исследуемом архивном образце было первоначально подтверждено ОТ ПЦР. Полученные ампликоны частично секвенировали методом Сэнгера, а полный геном NGS секвенированием (MG280943). Анализ полногеномной последовательности показал фактическую идентичность со штаммами Ross-секвенированными в Великобритании (AF490259) и США (HM045811). История английского изолята не опубликована, а американский вариант был выделен в 1953 г. от больного человека и прошел небольшое количество пассажей в лаборатории [25]. Характерной особенностью генома этих изолятов является наличие внутреннего поли-А-сайта на 3'-UTR генома различной протяженности для различных клонов одного штамма вируса. Внутренний поли-А-сайт также был найден в изоляте S27 (AF369024), выделенного от больного человека с использованием C6/C36 клеток комара, и изолята A301 (HM045821), который был изолирован 1963 г. от рукокрылых [25, 26]. У изолята A301 CHIKV его длина составляет 51 нуклеотид, а максимальная его длина может составлять 106 н.о. Уровень гомологии этих изолятов составлял 98,2—99,82%, что говорит о высоком консерватизме генома CHIKV, учитывая при этом возможную вариабельность длины внутреннего поли-А-сайта. Интересно отметить, что поиск внутреннего поли-А-сайта на 3'-UTR генома показал его отсутствие для 80 выделенных позднее изолятов CHIKV [25]. Нам также не удалось выявить мутаций в генах *E1* (*K211E, A226V*) и *E2* (*V264A*) с которыми ассоциируется появление у CHIKV способности более эффективно реплицироваться в комарах *A. albopictus* и *A. aegypti*. Была высказана гипотеза, что именно эти мутации обеспечили быстрое распространение CHIKV в бассейне Индийского океана и в странах Азии, прилегающих к нему [3].

Результаты проведенного филогенетического анализа представлены на **рис. 2**. Секвенированный изолят CHIKV был получен от больного человека в 1953 г. [6]. Его полногеномная последовательность кластеризуется с несколькими ранними африканскими изолятами периода 50—60 годов прошлого столетия и, безусловно, относится к африканскому генотипу CHIKV [3, 25, 27]. Африканский генотип подразделяется на две основные группы изолятов: западно-африканский и юго-восточный африканский генотип (ECSA, East/Central/South African) CHIKV. Секвенированный нами архивный изолят CHIKV генотипируется как один из ранних вариантов ECSA генотипа. Именно с этой группой ECSA изолятов филогенетически близко связана группа более ранних изолятов индийского генотипа, датируемая началом шестидесятых годов прошлого века.

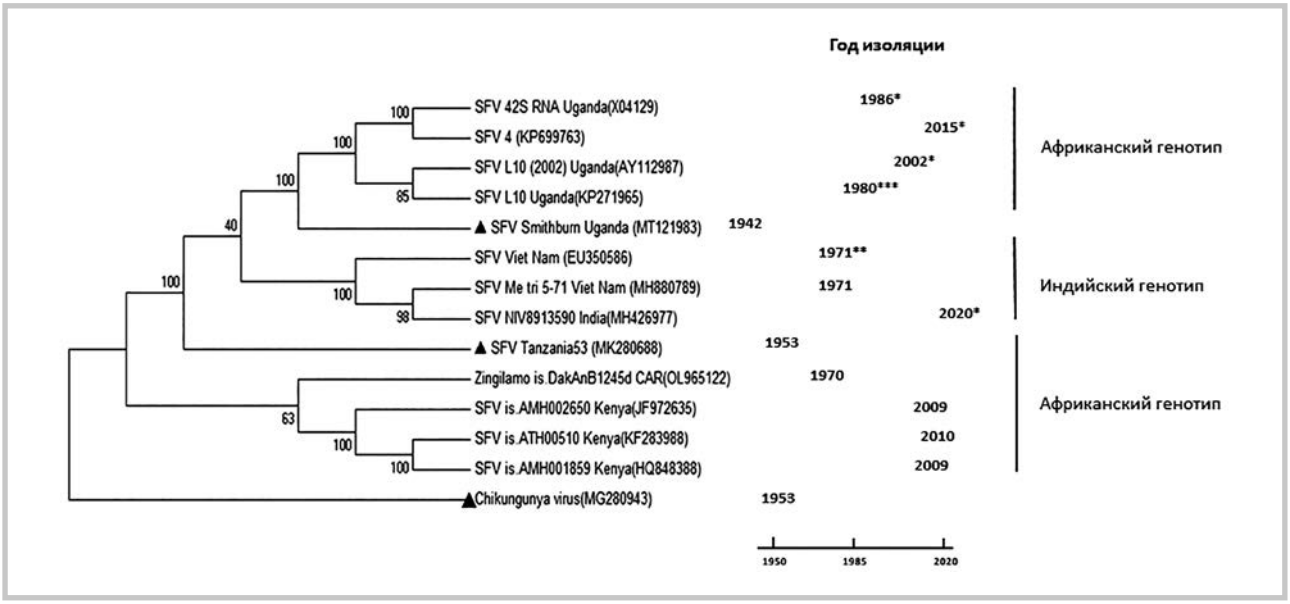

Рис. 3. **Филогенетическое дерево, построенное по полногеномным последовательностям SFV методом объединения ближайших соседей с использованием 2-параметрической модели Кимура.**
SFV, штаммы Tanzania 53 и Smithburn обозначены символом ▲, в качестве внешней группы сравнения использован CHIKV (MG280943). Номера депонированных в GenBank последовательностей представлены в скобках. * — время депонирования штамма в GenBank; ** — наличие вставки длиной 122 но в 3'-UTR; *** — M. Ferguson и соавт., 2015 [10].

Существование общего предшественника для этих двух африканских генотипов предположительно соотносят с 1713 (1573—1840) годом [25]. Методом молекулярных часов предшественник ECSA-вариантов датируется 1935 г., а в 1964 г. уже были обнаружены изоляты ECSA без внутреннего поли-А-сайта в 3'-UTR. Видимо, произошло отделение азиатского варианта CHIKV, который позднее был ассоциирован с первой большой вспышкой лихорадки CHIKV в Индии в 2005—2008 гг. [3]. Именно эти ECSA-варианты широко распространились в Африке, Азии, Европе и Америке, фактически предопределив глобальное распространение CHIKV [28]. Приблизительно 10 лет спустя в Азии возникла вторая большая вспышка лихорадки CHIKV, вызванная вариантами ECSA-генотипа [29]. Интересно отметить, что она была вызвана вариантами CHIKV, лишенными мутации A226V в гене *E1 CHIKV*.

Нами также были определены полные нуклеотидные последовательности генома SFV для штаммов Tanzania 53 (MK280688) и Smithburn (MT121983). Штамм Tanzania 53 был изолирован из архивного образца, содержащего CHIKV после более чем 55-летнего хранения, а штамм Smithburn через 59 лет хранения без проведения пассажей. Филогенетический анализ полногеномных последовательностей SFV показал, что эти штаммы относятся к двум различным филогенетическим ветвям внутри африканского генотипа SFV **(рис. 3)**. При этом полногеномные последовательности SFV, выделенные в восточной Африке (Кения) в 2009—2010 гг., также формируют отдельную филогенетическую группу в пределах африканского генотипа SFV. Это позволяет предположить наличие не менее трех различных филогенетических групп в пределах африканского генотипа SFV, циркулирующих в странах центральной и восточной Африки. Выделенный нами штамм Tanzania 53 SFV филогенетически обособлен от других известных вирусов и наиболее близок к предполагаемым вирусам-предшественникам, которые циркулировали на территории Восточной Африки в середине прошлого века. Этот изолят, по всей вероятности, может претендовать на роль вероятного вируса-предшественника для азиатского генотипа SFV. Это позволяет заключить, что два секвенированных африканских штамма SFV являются оригинальными и могут претендовать на роль вирусов-предшественников для африканского и азиатского генотипов SFV.

Заключение

В ходе данной работы было проведено восстановление архивного штамма Ross late CHIKV после более чем 55-летнего хранения без проведения пассажей. Вирус был изолирован во время первой описанной вспышки лихорадки чикунгунья в восточной Африке в 1953 г. Установлено, что образец содержал два различных альфавируса: CHIKV и SFV. Вирусы были способны реплицироваться в культурах клеток C6/36, Vero E6, СПЭВ, HEK 293 с развитием ЦПД и сохранили свою патогенность для мышей BALB/c. Методом предельных разведений штамм SFV Tanzania 53 был отделен от штамма Ross late CHIKV. Типичная картина заболевания, вызываемая SFV

у лабораторных животных, была подтверждена гистологическими исследованиями.

Определены полногеномные последовательности этих двух альфавирусов и восстановленного архивного образца SFV, датируемого 1942 г. Проведен их филогенетический анализ, который показал, что изолированные штаммы двух альфавирусов генотипируются как африканские и формируют отдельные ветки в пределах африканских генотипов на филогенетических деревьях CHIKV и SFV. Архивный CHIKV-изолят был отнесен к ECSA-генотипу.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН «ГНЦ ВБ "Вектор"» Роспотребнадзора.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Chen R, Mukhopadhyay S, Merits A, Bolling B, Nasar F, Coffey L.L. Powers A, Weaver S.C. ICTV Report Consortium ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. *J Gen Virol.* 2018;99(6):761-762. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001072
2. Cui J, Gao M, Ren X. Phylogeny and homologous recombination in Chikungunya viruses. *Infect Genet Evol.* 2011;11(8):1957-1963. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.026
3. Khongwichit S, Chansaenroj J, Chirathaworn C, Poovorawan Y.J. Chikungunya virus infection: molecular biology, clinical characteristics, and epidemiology in Asian countries. *Biomed Sci.* 2021;28(1):84. https://doi.org/10.1186/s12929-021-00778-8
4. Robinson MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952—1953. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1955;49(1):28-32. https://doi.org/10.1016/0035-9203(55)90080-8
5. Mason PJ, Haddow AJ. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952—1953. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1957;51(3):238-240. https://doi.org/10.1016/0035-9203(57)90022-6
6. Ross RW. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg* (Lond) 1956;54(2):177-191. https://doi.org/10.1017/s0022172400044442
7. Schlesinger RW. New opportunities in biological research offered by arthropod cell cultures. I. Some speculations on the possible role of arthropods in the evolution of arboviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1971;55:241-245. https://doi.org/10.1007/978-3-642-65224-0_40
8. Vancini R, Hernandez R, Brown D. Alphavirus entry into host cells. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;129:33-62. https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2014.10.002
9. Calisher CH, Karabatsos N. *Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1988;19-57.
10. Ferguson MC, Saul S, Fragkoudis R, Weisheit S, Cox J, Patabendige A, et al. Ability of the Encephalitic Arbovirus Semliki Forest Virus To Cross the Blood-Brain Barrier Is Determined by the Charge of the E2 Glycoprotein. *J Virol.* 2015;89:7536-7549. https://doi.org/10.1128/JVI.03645-14
11. Das T, Hoarau JJ, Bandjee MCJ, Maquart M, Gasque P. Multifaceted innate immune responses engaged by astrocytes, microglia and resident dendritic cells against chikungunya neuroinfection. *J Gen Virol.* 2015;96:294-310. https://doi.org/10.1099/vir.0.071175-0
12. Meshram CD, Lukash T, Philips AT, Akhrymuk I, Frolova EI, Frolov I. Lack of nsP2-specific nuclear functions attenuates chikungunya virus replication both in vitro and in vivo. *Virology.* 2019;534:14-24. https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.05.016
13. Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya: a re-emerging virus. *Lancet.* 2012;379(9816):662-671. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60281-X
14. Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med.* 2015;372:1231-1239. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60281-X
15. Khongwichit S, Chansaenroj J, Thongmee T, Benjamanukul S, Wanlapakorn N, Chirathaworn C, Poovorawan Y. Large-scale outbreak of Chikungunya virus infection in Thailand, 2018—2019. *PLoS One.* 2021;16(3):e0247314. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247314.
16. Arankalle VA, Shrivastava S, Cherian S, Gunjikar RS, Walimbe AM, Jadhav SM, et al. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963—2006) with special reference to the 2005—2006 explosive epidemic. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt7):1967-1976. https://doi.org/10.1099/vir.0.82714-0
17. Patterson J, Sammon M, Garg M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *West J Emerg Med.* 2016;17(6):671-679. https://doi.org/10.5811/westjem.2016.9.30904
18. Smithburn KC. Semliki Forest virus; propagation of the virus in developing chick embryos. *J Immunol.* 1946;52:309-314.
19. Smithburn KC, Haddow AJ, Mahaffy AF. A Neurotropic Virus Isolated from Aedes Mosquitoes Caught in the Semliki Forest. *Am J Trop Med Hyg.* 1946;26:189-208. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1946.s1-26.189
20. Dick GW. Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda; Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1953;47(1):13-48. https://doi.org/10.1016/0035-9203(53)90021-2
21. Willems WR, Kaluza G, Boschek GB, Bauer H. Semliki Forest virus: cause of a fatal case of human encephalitis. *Science.* 1979;203(4385):1127-1129. https://doi.org/10.1126/science.424742
22. Svyatchenko VA, Nikonov SD, Mayorov AP, Gelfond ML, Loktev VB. Antiviral photodynamic therapy: Inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 in vitro using methylene blue and Radachlorin. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;33:102112. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102112
23. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 7.0. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870-1874. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054
24. Svyatchenko VA, Ternovoi VA, Lutkovskiy RY, Protopopova EV, Gudymo AS, Danilchenko NV, et al. Human Adenovirus and Influenza A Virus Exacerbate SARS-CoV-2 Infection in Animal Models. *Microorganisms.* 2023;11:180. https://doi.org/10.3390/microorganisms11010180
25. Volk SM, Chen R, Tsetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, et al. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J Virol.* 2010;84(13):6497-6504. https://doi.org/10.1128/JVI.01603-09
26. Khan AH, Morita K, Parquet MDC, Hasebe F, Mathenge EGM, Igarashi A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt 12):3075-3084. https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-3075
27. Hakim MS, Annisa L, Gazali FM, Aman AT. The origin and continuing adaptive evolution of chikungunya virus. *Arch Virol.* 2022;167:2443-2455. https://doi.org/10.1007/s00705-022-05570-z
28. Charrel RN, Leparc-Goffart I, Gallian P, de Lamballerie X. Globalization of Chikungunya: 10 years to invade the world. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(7):662-663. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12694
29. Rahman M, Yamagishi J, Rahim R, Hasan A, Sobhan A. East/Central/South African genotype in a Chikungunya outbreak, Dhaka, Bangladesh, 2017. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(2):370. https://doi.org/10.3201/eid2502.180188

Поступила 19.06.2023
Received 19.06.2023
Принята к печати 24.10.2023
Accepted 24.10.2023

Приложение к статье *Т.П. Микрюковой и соавт.* «Исторические изоляты вирусов леса Семлики и чикунгунья, их вирусологическая характеризация, полногеномные последовательности и филогения»

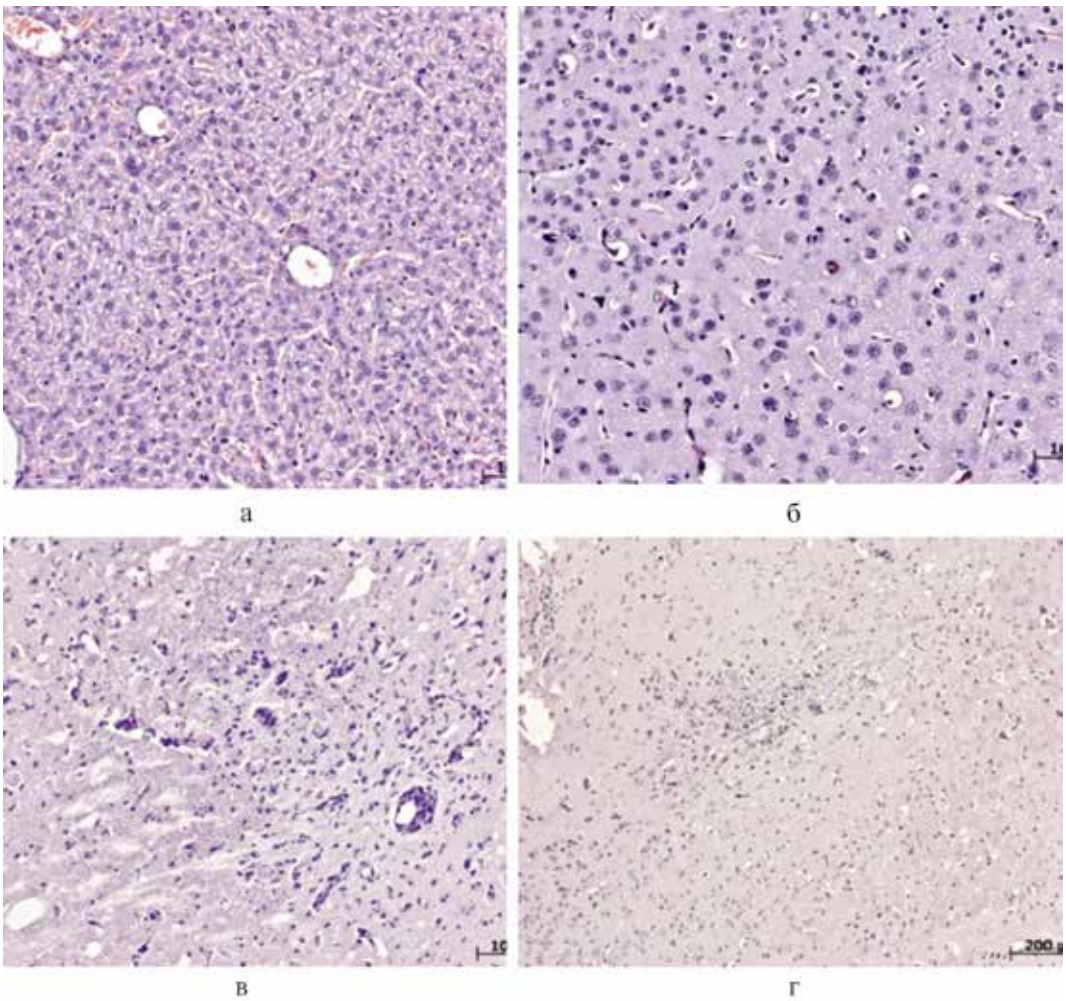

Рис. 1. **Гистологическое исследование органов мышей, инфицированных подкожно штаммом Tanzania 53 вирусом леса Семлики.** Окраска гематоксилином и эозином.

а — вакуолизация цитоплазмы в ткани печени мыши, инфицированной дозой вируса 10^7 $ТЦПД_{50/мл}$, 4 сут после заражения мышей. Использовали 400-кратное увеличение; б — вакуолизация цитоплазмы в ткани головного мозга мыши, инфицированной дозой вируса 10^6 $ТЦПД_{50/мл.}$ SFV, 7 сут. 200-кратное увеличение; в — очаги периваскулярной инфильтрации в ткани головного мозга мыши, инфицированной дозой вируса 10^6 $ТЦПД_{50/мл}$ SFV, 10 сут. 200-кратное увеличение; г — очаг некроза в ткани головного мозга мыши, инфицированной дозой вируса 10^6 $ТЦПД_{50/мл}$. SFV, 10 сут. 100-кратное увеличение.