

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-354>

Изоляция и генетический анализ вируса Чикунгунья из комаров *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*, отловленных в Центральной Америке

Игнатъев Г.М.¹, Оксанич А.С.^{1✉}, Казакова Е.В.², Самарцева Т.Г.¹, Отрашевская Е.В.², Уйба С.В.³, Трухин В.П.²

¹Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

²Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток, Санкт-Петербург, Россия;

³Латиноамериканский институт биотехнологии «Мечников», Манагуа, Республика Никарагуа

Аннотация

Введение. Ареал обитания комаров родов *Aedes* spp., *Culex* spp., *Culiseta* spp. распространяется на Южную и Центральную Америку, включая Никарагуа. Мониторинг за распространением комаров-переносчиков и оценка их инфицированности арбовирусами могут предоставить информацию о возможности появления новых или увеличении случаев уже регистрируемых заболеваний, изменении инфекционности вирусов для человека при смене переносчика возбудителя.

Целью настоящей работы были выделение и идентификация арбовирусов, принадлежащих к родам *Flavivirus* и *Alphavirus*, из комаров видов *A. albopictus*, *A. aegypti*, *Culiseta* spp., *Culex* spp., отловленных в лесах Никарагуа.

Материалы и методы. Комары *A. albopictus*, *A. aegypti*, *Culiseta* spp., *Culex* spp. были отловлены в 2021 г. в сухой сезон в лесной зоне в Никарагуа в четырех разных локациях. Комаров объединяли в пулы по 5–8 особей (всего 236 пулов). Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией пулы анализировали на наличие вирусов Чикунгунья (ВЧ), денге, Зика и жёлтой лихорадки. Положительные пулы инокулировали в культуру клеток C6/36 с целью получения изолятов и их дальнейшего секвенирования.

Результаты. Вирус денге был выявлен только в комарах *Aedes* spp.: в 7 пулах — *A. aegypti*, в 1 — *A. albopictus*. ВЧ также был выявлен только в комарах *Aedes* spp.: в 3 пулах — *A. aegypti*, в 1 — *A. albopictus*. Секвенирование нуклеотидных последовательностей генов *6K*, *E1*, *E2* и *NS1* ВЧ, выделенного из комаров *A. albopictus*, показало, что по сравнению с аналогичными последовательностями генов из изолятов ВЧ, выделенных из комаров *A. aegypti*, в области гена белка 6K обнаружено 4 нуклеотидных и столько же аминокислотных замен, в области E1 — 16 нуклеотидных замен, 10 из которых приводили к аминокислотным заменам, в области E2 — 14 нуклеотидных и 11 аминокислотных замен, в области NS1 — 33 нуклеотидные и 19 аминокислотных замен.

Ключевые слова: Чикунгунья, денге, арбовирусы, *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, *Culiseta* spp., *Culex* spp., полимеразная цепная реакция, секвенирование, изолят, нуклеотидная замена, аминокислотная замена

Благодарность. Коллектив авторов выражает благодарность Елене Юрьевне Шустовой за помощь в графическом представлении материалов.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 22-14-00184.

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

Для цитирования: Игнатъев Г.М., Оксанич А.С., Казакова Е.В., Самарцева Т.Г., Отрашевская Е.В., Уйба С.В., Трухин В.П. Изоляция и генетический анализ вируса Чикунгунья из комаров *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*, отловленных в Центральной Америке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):310–318.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-354>

EDN: <https://www.elibrary.ru/uwgu1m>

Isolation and genetic analysis of the chikungunya virus from *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes captured in Central America

Georgy M. Ignatyev¹, Alexey S. Oksanich¹[✉], Elena V. Kazakova², Tatyana G. Samartseva¹,
Elena V. Otrasheskaya², Stanislav V. Uyba³, Victor P. Trukhin²

¹I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

²St. Petersburg Research Institute for Vaccines and Sera, St. Petersburg, Russia;

³Mechnikov Latin American Institute of Biotechnology, Managua, Nicaragua

Abstract

Introduction. The habitat of mosquitoes belonging to the genera *Aedes* spp., *Culex* spp., *Culiseta* spp. is in South and Central America, including Nicaragua. Monitoring of the spread of mosquito vectors and assessment of the infection with arboviruses can provide information on possible occurrence of new diseases or an increase in the reported cases, changes in the infectivity of viruses for humans due to changes in pathogen transmitters.

The purpose of this study was isolation and identification of arboviruses belonging to the *Flavivirus* and *Alphavirus* genera from *A. albopictus*, *A. aegypti*, *Culiseta* spp., *Culex* spp. mosquitoes captured in forests of Nicaragua.

Materials and methods. *A. albopictus*, *A. aegypti*, *Culiseta* spp., *Culex* spp. mosquitoes were captured during the dry season in 2021 in forested areas of Nicaragua in four different locations. Mosquitoes were sorted into pools, each containing 5–8 mosquitoes (236 pools in total). Using the reverse transcription polymerase chain reaction, the pools were tested for the presence of chikungunya (CHIKV), dengue, Zika, and yellow fever viruses. Positive pools were inoculated into the C6/36 cell culture to obtain isolates and for their further sequencing.

Results. The dengue virus was detected only in *Aedes* spp. mosquitoes: in 7 pools — *A. aegypti*, in 1 — *A. albopictus*. CHIKV was also detected only in *Aedes* spp. mosquitoes: in 3 pools — *A. aegypti*, in 1 — *A. albopictus*. The sequencing of nucleotide sequences of 6K, E1, E2, and NS1 genes of CHIKV isolated from *A. albopictus* mosquitoes showed that compared to the similar gene sequences from CHIKV isolates recovered from *A. aegypti* mosquitoes, the 6K gene region contained 4 nucleotide and 4 amino acid substitutions, while the E1 region contained 16 nucleotide substitutions, 10 of them led to amino acid substitutions; the E2 region contained 14 nucleotide and 11 amino acid substitutions; the NS1 region contained 33 nucleotide and 19 amino acid substitutions.

Keywords: *chikungunya*, *dengue*, *arboviruses*, *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, *Culiseta* spp., *Culex* spp., *polymerase chain reaction*, *sequencing*, *isolate*, *nucleotide substitution*, *amino acid substitution*

Acknowledgements. The authors express their gratitude to Elena Shustova for her help in graphic presentation of materials.

Funding source. The study was funded by RSF grant 22-14-00184.

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., Oksanich A.S., Kazakova E.V., Samartseva T.G., Otrasheskaya E.V., Uyba S.V., Trukhin V.P. Isolation and genetic analysis of the chikungunya virus from *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes captured in Central America. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(5):310–318.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-354>

EDN: <https://www.elibrary.ru/uwguml>

Введение

Комары родов *Aedes* spp., *Culex* spp., *Culiseta* spp. являются переносчиками ряда возбудителей вирусных заболеваний: лихорадки денге, Зика, жёлтой лихорадки, Чикунгунья, Венесуэльского энцефаломиелита лошадей, Синдбис, относящихся к семействам *Flaviviridae* (род *Flavivirus*) и *Togaviridae* (род *Alphavirus*) [1–6]. Ареал обитания комаров родов *Aedes* spp., *Culex* spp., *Culiseta* spp. распространяется на Южную и Центральную Америку, включая Ника-

рагу [2, 3, 7–10]. Мониторинг за распространением комаров-переносчиков и оценка их инфицированности могут дать информацию о возможности появления новых заболеваний или увеличения случаев уже регистрируемых, а смена переносчика возбудителя может приводить к изменениям инфекционности вирусов для человека [5]. Выделение вирусов непосредственно от переносчиков, отловленных в естественных ареалах обитания, и изучение выделенных штаммов необходимы в процессе разработки средств

диагностики, профилактики и лечения заболеваний, вызываемых альфа- и флавивирусами.

Целью данной работы было выделение и идентификация арбовирусов, принадлежащих к родам *Flavivirus* и *Alphavirus*, из комаров видов *A. albopictus*, *A. aegypti*, *Culiseta* spp., *Culex* spp., отловленных в лесах Никарагуа.

Материалы и методы

Комары

Комары были отловлены в 2021 г. в сухой сезон в лесной зоне Никарагуа в четырех разных локациях с координатами:

- локация 1 — 12.325527N 85.974662W;
- локация 2 — 12.323326N 85.974275W;
- локация 3 — 11.908210N 85.932490W;
- локация 4 — 11.903555N 85.938758W.

Среди отловленных комаров были представители родов *Aedes* spp. (*A. albopictus*, *A. aegypti*), *Culiseta* spp. и *Culex* spp. После определения видов комары были разделены на пулы по 5–8 особей одного вида, отловленных в одной локации. В общей сложности было создано 236 пулов. Каждый пул был гомогенизирован до получения суспензии в объеме 300 мкл среды Лейбовица L-15 («Gibco», «Thermo Fisher Scientific») pH 7,4 с использованием керамических шариков и гомогенизатора «SpeedMill Plus» («Analytik Jena»). Из гомогената каждого пула было отобрано по 140 мкл для выделения РНК, которую экстрагировали с использованием набора реагентов «QIAamp Viral RNA» («Qiagen»). При постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ) использовали протоколы для каждого возбудителя. Те пулы, в которых были получены положитель-

ные результаты на какой-либо из тестируемых вирусов, были использованы для последующего выделения вируса на клетках.

Выделение вируса

Оставшийся объем суспензии комаров (200 мкл) фильтровали через фильтр PES 0,45 мкм. Полученным фильтратом проводили заражение монослоя клеток С6/36, выращенных в 24-луночных планшетах. Инфицирование проводили в объеме 100 мкл с использованием цельного препарата и разведения 1 : 10. Через 7 дней после инфицирования 100 мкл супернатанта использовали для следующего пассажа. Всего от первого заражения проведено 5 последовательных пассажей. После заражения клетки ежедневно осматривали на наличие признаков цитопатического действия.

Молекулярно-генетическое исследование

Молекулярно-генетическое исследование методом ОТ-ПЦР проводили по следующей методике. Из 140 мкл суспензии комаров с помощью комплекта реагентов «QIAamp Viral RNA» («Qiagen») выделяли РНК согласно инструкции производителя. Далее с использованием обратного праймера рNS1CHVrev2-3 для вируса Чикунгунья (ВЧ; область гена *NS1*); смеси обратных праймеров к вирусу денге panDVrev1 и panDVrev2 (область 3'-UTR), общих для всех 4 типов вируса (**табл. 1**); обратного праймера для вируса Зика рZVrev [9]; обратного праймера вируса желтой лихорадки рYFVrev (**табл. 2**) [11] и набора реагентов для ОТ («Синтол») на матрице вирусной РНК проводили реакцию ОТ и получали кДНК. На первом этапе смешивали 2 мкл обратных праймеров (10 пкмоль/мкл) с 6 мкл выделенной РНК и прогревали смесь при 95°C 5 мин.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов для выявления РНК ВЧ и вируса денге в полевых образцах методом ОТ-ПЦР в реальном времени

Table 1. Nucleotide sequences of primers and probes for detection of CHIKV and dengue virus RNA in collected samples using real-time RT-PCR

Олигонуклеотид Oligonucleotide	Нуклеотидная последовательность, 5'–3' Nucleotide sequence, 5'–3'	Размер ПЦР-продукта PCR product size
ВЧ (область гена NS1) CHIKV (the NS1 gene region)		
pNS1CHVfor	GTGTGCTGTTCTCAGTAGGGTCAACG	218 п.н. bp
pNS1CHVrev	GTCTGCGTGGTGGTTACCGC	
zNS1CHVfor	FAM-GGCTACGTCGTTAAGAGAATAACGATGAGCCCC-BHQ1	
Вирус денге (область 3'-UTR) Dengue virus (the 3'-UTR region)		
panDVfor	GACTAGYGGTTAGAGGAGACCC	190 п.н. bp
panDVrev1	CGTTCGTGCGCTGGAATGATG	
panDVrev2	CGCTCTGTGCGCTGGATTGATG	
zDVfor	FAM-GCATATTGACGCTGGGARAGACCAGAG-BHQ1	

Примечание. Y — либо C, либо T; R — либо A, либо G.

Note. Y — either C or T; R — either A or G.

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров для амплификации РНК вирусов Зика и жёлтой лихорадки методом ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией

Table 2. Nucleotide sequences of primers for amplification of Zika and yellow fever virus RNA using RT-PCR and electrophoresis detection

Олигонуклеотид Oligonucleotide	Нуклеотидная последовательность, 5'–3' Nucleotide sequence, 5'–3'	Размер ПЦР-продукта PCR product size
Зика (область гена NS5) Zika (the NS5 gene region)		
pZVfor	CCGCGCCATCTGGTATATGT	450 п.н. bp
pZVrev	CTCCACTGACTGCCATTTCGT	
Жёлтая лихорадка (область гена E) Yellow fever (the E gene region)		
pYFVfor	TACCCTGGAGCAAGACAAGT	465 п.н. bp
pYFVrev	GCTTTTCATACCCAATGAA	

После чего охлаждали пробирки при комнатной температуре 2 мин и добавляли 22 мкл смеси для ОТ (9 мкл деионизированной воды, 12 мкл 2,5-кратного буфера для ОТ («Синтол»), 1 мкл MMLV-ревертазы («Синтол»)) и инкубировали при 42°C, 30 мин. Для инактивации ревертазы смесь прогревали в течение 5 мин при 95°C.

Для вирусов Зика и жёлтой лихорадки проводили ПЦР с детекцией продуктов амплификации в агарозном геле с использованием неоригинальных праймеров других авторов [9, 11], которые представлены в табл. 2. Амплификацию проводили по следующей программе: 95°C — 1 мин 30 с; 30 циклов: 95°C — 20 с, 55°C — 15 с, 72°C — 30 с; 72°C — 10 мин.

ПЦР в реальном времени проводили на ВЧ и вирус денге с использованием оригинальных праймеров и зондов. Амплификацию проводили на приборе «DTprime» («ДНК-Технология») по следующей программе: 95°C — 1 мин 30 с; 40 циклов: 95°C — 15 с, 55°C — 40 с.

Для получения фрагментов генов *6K*, *E1*, *E2* и *NS1* ВЧ и их секвенирования использовали олигонуклеотиды собственной разработки и методику, описанные ранее [12].

Все ПЦР-продукты перед секвенированием очищали из геля с использованием набора реагентов «Cleanup Standard» (#BC022, «Евроген») и клонировали в векторе «pGEM-T Easy» («Promega») в соответствии с инструкцией производителя. Затем отбирали клоны, выделяли из них плазмиды и секвенировали по Сэнгеру с использованием стандартных праймеров для секвенирования T7 и SP6. Полученные нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы «MEGA11»¹.

Филогенетический анализ

Филогенетический анализ проводили с использованием метода молекулярного датирования с по-

мощью пакета программ «BEAST v. 1.10.4» и приложения «Beauty v. 1.10.4»². При построении деревьев применяли алгоритм нуклеотидных замен НКУ³ со строгими молекулярными часами. Анализ проводили с построением 10 млн деревьев и отбирали каждое 1000-е дерево с использованием программного обеспечения «MEGA11». Множественное выравнивание проводили с использованием генетических последовательностей фрагментов геномов ВЧ (*E2*, *6K*, *E1*), изолированных в разных регионах мира из комаров (30 последовательностей). Позиция в геноме фрагмента, по которому проводили филогенетический анализ, составила 8574–11 303 нт (позиции указаны по прототипному штамму 1959 г., номер GenBank KX262990). Также в филогенетическое дерево было добавлено 8 нуклеотидных последовательностей ВЧ, изолированных от человека, 3 из которых были получены от больных в Никарагуа в 2014 и 2015 гг. и 4 представляли собой референсные последовательности вируса.

Инфицированность комаров определяли, как описано ранее [10, 13].

Результаты и обсуждение

В результате отлова в четырех локациях были собраны комары трех родов *Aedes* spp., *Culex* spp., *Culiseta* spp. Как следует из представленных в табл. 3 данных, в наибольшем количестве были представлены комары рода *Aedes* spp. — 954 особи: 604 (67%) особи *A. aegypti*, 314 (33%) особи *A. albopictus*. При исследовании 105 пулов комаров *A. aegypti* в 7 пулах была определена РНК вируса денге, в 3 пулах — РНК ВЧ. РНК вирусов Зика и жёлтой лихорадки не обнаружена. Не было отмечено одновременной детекции РНК ВЧ и вируса денге. При исследовании 54 пулов комаров *A. albopictus* в 1 пуле была выяв-

¹ Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021;38(7):3022–3027. DOI: 10.1093/molbev/msab120

² Drummond A.J., Rambaut A., Shapiro B., Pybus O.G. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.* 2005;22(5):1185–1192. DOI: 10.1093/molbev/msi103

³ Hasegawa M., Kishino H., Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 1985;22(2):160–174. DOI: 10.1007/BF02101694

Таблица 3. Род и количество отловленных комаров**Table 3.** Genus and number of captured mosquitoes

Вид комаров Mosquito species	Количество особей Number of mosquitoes	Количество пулов Number of pools	Результаты ПЦР (положительные/отрицательные) PCR results (positive/negative)			
			вирус Денге dengue virus	ВЧ CHIKV	вирус жёлтой лихорадки yellow fever virus	вирус Зика Zika virus
<i>Aedes</i> spp.	954	159	8/151	4/155	0/159	0/159
<i>A. aegypti</i>	640	105	7/98	3/102	0/105	0/105
<i>A. albopictus</i>	314	54	1/53	1/53	0/54	0/54
<i>Culex</i> spp.	278	46	0/46	0/46	0/46	0/46
<i>Culiseta</i> spp.	188	31	0/31	0/31	0/31	0/31

лена РНК вируса денге, в 1 пуле — РНК ВЧ. РНК вирусов Зика и жёлтой лихорадки также не была обнаружена. Одновременной детекции РНК ВЧ и вируса денге не отмечено. В 46 пулах комаров рода *Culex* spp. и в 31 пуле комаров рода *Culiseta* spp. РНК детектируемых вирусов не выявлено.

Для ВЧ комары положительного пула *A. albopictus* были отловлены в локации 1, а положительных пулов комаров *A. aegypti* — в локации 4. РНК вируса денге была определена в пулах комаров *A. aegypti*, отловленных в локации 2, и *Aedes albopictus*, отловленных в локации 2.

Минимальный уровень инфицирования комаров *A. aegypti* по вирусу денге составил 10,0, по ВЧ — 4,6. Минимальный уровень инфицирования комаров *A. albopictus* по вирусу денге и ВЧ составил 3,0. На основании полученных результатов можно предположить, что комары рода *Aedes* spp. инфицированы вирусом денге и ВЧ.

Показатель минимальной инфицированности комаров, безусловно, является важным показателем, но зависит от количества отловленных комаров (объём исследуемой выборки) и количества комаров в пуле, что влияет на чувствительность используемого метода. В ряде работ по исследованиям минимальной инфицированности комаров альфа- и флавивирусами этот показатель колебался от 0 до 12, что могло свидетельствовать только о потенциальной опасности заражения именно этим вирусом от этого комара [10, 13]. Возможность одновременного протекания лихорадки денге и Чикунгунья была показана ранее, а исследование серологических маркеров флави- и альфавирусов продемонстрировало наличие антител к вирусу денге и ВЧ [9, 14]. Для выделения вирусов использовали положительные по результатам ОТ-ПЦР пулы комаров — 8 пулов с вирусом денге и 4 пула с ВЧ.

Для выделения вирусов из полученных пулов комаров использовали клетки С6/36. Для каждого пула было проведено 5 последовательных пассажей. В клетках, заражённых образцами, содержащими ВЧ (по результатам ОТ-ПЦР), нарушение монослая клеток — развитие цитопатического дей-

ствия — регистрировалось на 2–3-м пассаже. При проведении 5-го пассажа 100% цитопатический эффект регистрировался на 72 ч. Для образцов, содержащих вирусы денге (по результатам ПЦР), цитопатический эффект не был столь выраженным. На каждом пассаже контроль за подлинностью изолятов и отсутствием перекрёстной контаминации проводился с использованием ОТ-ПЦР. По окончании выделения изолятов их секвенировали. В результате были получены изоляты, содержащие ВЧ, вирусы денге 1-го и 2-го типов. В отношении вирусов денге определяли только тип вируса из-за коротких фрагментов ПЦР-продуктов.

Как видно из электрофореграммы ампликонов (рис. 1), полученных с использованием универсальных праймеров ко всем 4 типам вируса денге, при

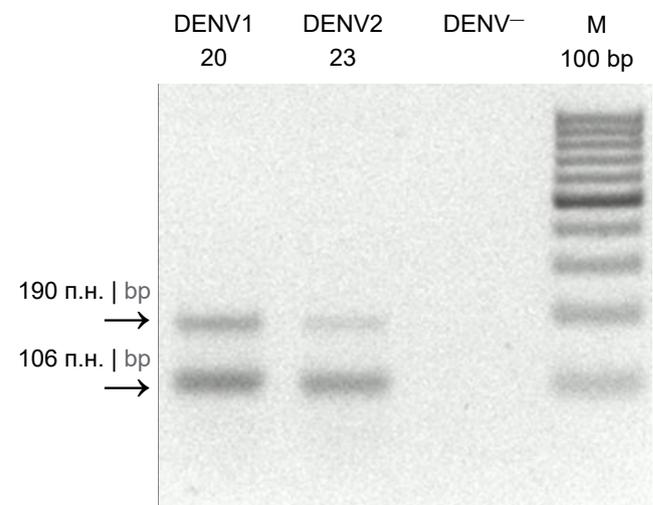


Рис. 1. Электрофорез ПЦР-продуктов в 2% агарозном геле.

DENV1 20 и DENV2 23 — ампликоны вирусов денге 1-го и 2-го типов, полученные в 20 и 23 пулах соответственно;

DENV⁻ — отрицательный контроль ПЦР на вирус денге; M 100 bp — весовой ДНК-маркер.

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis (2%) of PCR products.

DENV1 20 and DENV2 23 — amplicons of dengue viruses types 1 and 2 from 20 and 23 pools, respectively;

DENV⁻ — negative PCR controls for the dengue virus; M 100 bp — DNA molecular weight marker.

амплификации образуются 2 продукта длиной 190 и 106 п.н. Как показало секвенирование фрагментов, они оба являются специфическими [15].

Секвенирование нуклеотидных последовательностей генов *6K*, *E1*, *E2* и *NS1* ВЧ из комаров *A. albopictus* (1 пул, локация 1) показало, что это был тот же штамм, который был изолирован в 2018 г. в этой же локации [12]. По сравнению с аналогичными последовательностями генов из изолятов ВЧ, выделенных из комаров *A. aegypti* (3 пула, локация 4), в области гена белка 6K было обнаруже-

но 4 нуклеотидных и столько же аминокислотных замен, в области *E1* — 16 нуклеотидных замен, 10 из которых приводили к аминокислотным заменам, в области *E2* — 14 нуклеотидных и 11 аминокислотных замен и в области *NS1* — 33 нуклеотидные и 19 аминокислотных замен (табл. 4). Три изолята, выделенные из комаров *A. aegypti*, не имели аминокислотных замен относительно друг друга. Выделенный штамм был депонирован в базе данных генетических последовательностей GenBank (NCBI) под номером OQ320495.

Таблица 4. Перечень нуклеотидных и аминокислотных замен в областях генов *6K*, *E1*, *E2* и *NS1* у изолятов ВЧ, выделенных из комаров *A. albopictus* и *A. aegypti*, отловленных в разных локациях Никарагуа

Table 4. Nucleotide and amino acid substitutions in *6K*, *E1*, *E2*, and *NS1* gene regions in CHIKV isolates recovered from *A. albopictus* and *A. aegypti* mosquitoes captured in different locations in Nicaragua

Замены <i>A. albopictus</i> > <i>A. aegypti</i> Substitutions <i>A. albopictus</i> > <i>A. aegypti</i>							
ген белка 6K 6K protein gene		ген белка E1 E1 protein gene		ген белка E2 E2 protein gene		ген белка NS1 NS1 protein gene	
H N	A	H N	A	H N	A	H N	A
A37G	E13K	G28A	T10A	C145T	H49Y	C7T	P3S
A54T	F18L	T79A	M27L	A406G	K136E	T21C	–
C107T	L36P	G150A	–	T541G	C181G	C253T	R85C
T176C	A59V	C441T	–	T543C	C181G	A293G	K98R
		T443C	A148V	A545G	Q182R	G307A	A103T
		C579G	–	C558T	–	T389C	M130T
		G633A	–	G662A	R221K	T489C	–
		T683C	T228M	A760G	M254V	T498G	–
		C852T	–	G775A	G259R	A540G	–
		G955A	K319E	C914T	A305V	T581C	L194S
		G968T	I323S	C944T	A315V	A699G	–
		G979A	K327E	G1019A	R340H	A890G	Y297C
		A1081G	A361T	T1082C	V361A	C1014T	–
		C1106T	V369A	G1146A	–	A1047G	–
		C1217T	V406A			A1067G	Q356R
		T1308C	–			T1085C	L362P
						G1114A	A372T
						T1176C	–
						C1249T	R417C
						T1366A	W456R
						G1489A	A497T
						G1491A	A497T
						A1493T	E498V
						G1512A	–
						A1580T	E527V
						C1587T	–
						A1619C	N540T
						G1622C	R541P
						A1623G	R541P
						T1625G	I542R
						T1626A	I542R
						C1627G	P543G
						C1628G	P543G
Σ H: 4	Σ A: 4	Σ H: 16	Σ A: 10	Σ H: 14	Σ A: 11	Σ H: 33	Σ A: 19

Примечание. Н — нуклеотидная замена; А — аминокислотная замена. Позиция нуклеотидной или аминокислотной замены указана от начала гена.

Note. N — nucleotide substitution; A — amino acid substitution. The position of a nucleotide or amino acid substitution is shown from the beginning of a gene.

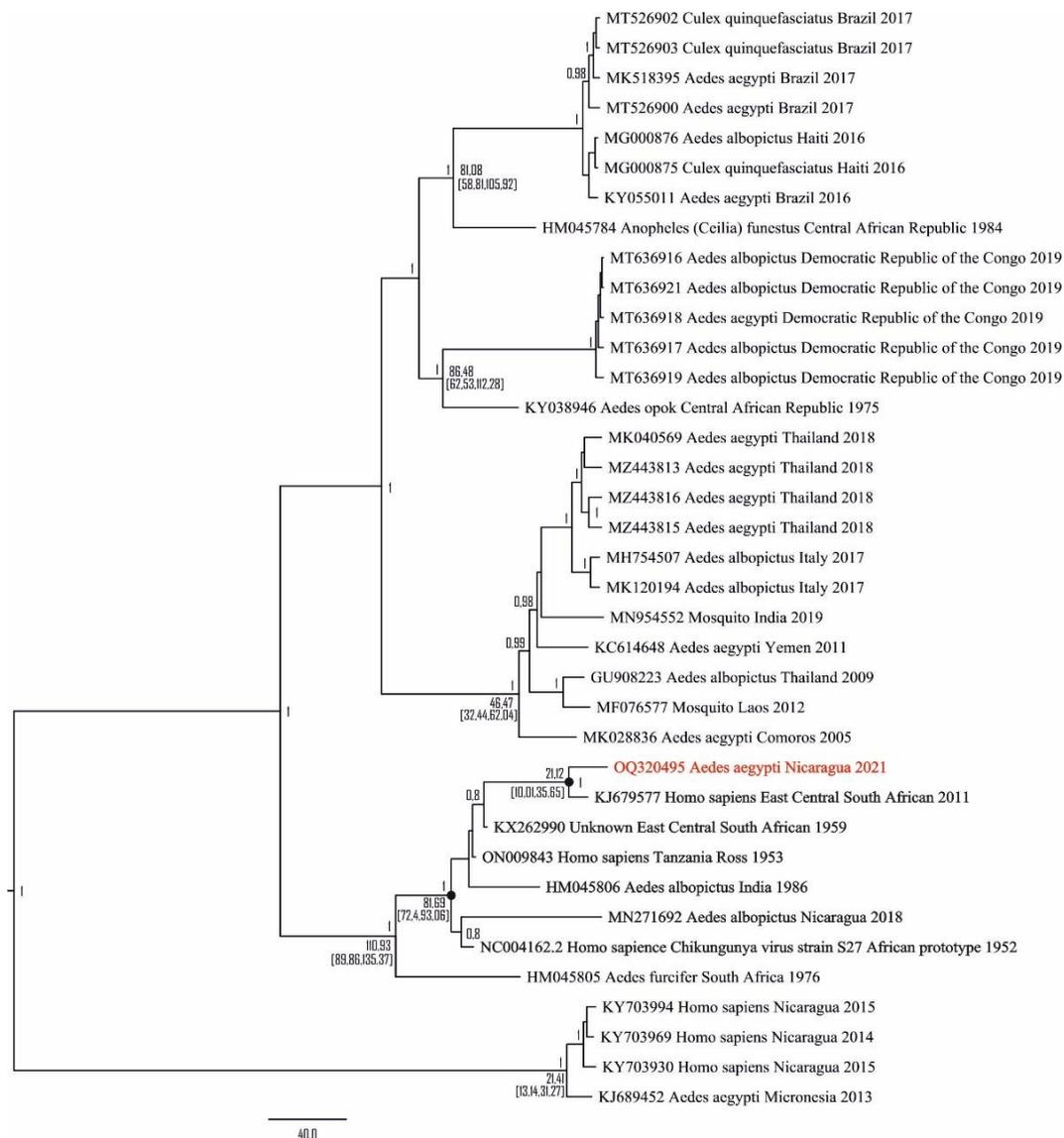


Рис. 2. Филогенетическое дерево фрагментов генома E2, 6K, E1 ВЧ.

В узлах дерева отмечена апостериорная вероятность $> 0,75$ и возраст группы. Выделен исследуемый вирус. Шкала показывает длину ветвей в годах.

Fig. 2. Phylogenetic tree of CHIKV E2, 6K, E1 genome fragments.

The nodes of the tree indicate the posterior probability > 0.75 and the age of the group. The virus under study is highlighted. The scale shows the branch length representing years.

При анализе нуклеотидных и аминокислотных замен они в большей мере не соответствовали обычно изучаемым заменам, характерным для изучаемого региона [7]. Такие существенные различия могут быть связаны с тем, что основная масса изолятов ВЧ была выделена другими авторами из сывороток крови больных людей и в редких случаях — из комаров. Кроме того, основные изоляты, выделенные из комаров, были отловлены в городских агломерациях и редко — в удалённых от городов локациях, что было реализовано в настоящей работе. Различия в нуклеотидных последовательностях изолятов ВЧ во всех 4 генах можно объяснить также разной

локацией отловленных комаров и разным видом комаров, в которых был выявлен вирус.

Таким образом, при выделении изолятов вирусов из комаров видов *Aedes* spp., *Culex* spp. и *Culiseta* spp., отловленных в лесах Никарагуа, были обнаружены ВЧ и вирусы денге 1-го и 2-го типов. Анализ некоторых генов ВЧ показал высокое генетическое разнообразие между вирусом, выделенным из комаров вида *A. albopictus* и *A. aegypti*.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей (рис. 2) показал, что наиболее близким родственником изолированного ВЧ является вирус, выделенный от человека в Африке в

2011 г. (номер GenBank KJ679577). Предполагаемое время жизни общего предка этих штаммов составляет 21 год (95% HPD 10–35). Также исследуемый изолят вошел в кластер с прототипными штаммами, выделенными в 1952–1986 гг. в Танзании и Африке.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Kraemer M.U.D., Sinka M.E., Duda K.A., 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. Hermanns K., Marklewitz M., Zirkel F., et al. Agua Salud alphavirus defines a novel lineage of insect-specific alphaviruses discovered in the New World. *J. Gen. Virol.* 2020;101(1):96–104. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001344>
4. Guzman M.G., Halstead S.B., Artsob H., et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010;8(12 Suppl.):S7–16. DOI: <http://doi.org/10.1038/nrmicro2460>
5. Vega-Rua A., Zouache K., Caro V., 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. Lundstrom J.O., Hesson J.C., Schafer M.L., et al. Sindbis virus polyarthritis outbreak signalled by virus prevalence in the mosquito vectors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019;13(8):e0007702. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007702>
7. Villero-Wolf Y., Mattar S., Puerta-González A., 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: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45981-8>
8. Cevallos V., Ponce P., Waggoner J.J., 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>
9. Waggoner J.J., Gresh L., Vargas M.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>
10. da Costa C.F., da Silva A.V., do Nascimento V.A., et al. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018;12(7):e0006594. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006594>
11. Eldadah Z.A., Asher D.M., Godec M.S., et al. Detection of flaviviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* 1991;33(4):260–7. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.1890330410>
12. Игнатъев Г.М., Каа К.В., Оксанич А.С. и др. Индикация и идентификация вирусов денге и Чикунгунья в комарах рода *Aedes* spp., отловленных в центральной Америке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020;97(3):227–32. Ignatyev G.M., Kaa K.V., Oksanich A.S., et al. Indication and identification of dengue and Chikungunya viruses in *Aedes* spp. Mosquitoes captured in Central America. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2020;97(3):227–32. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4> EDN: <https://elibrary.ru/ufhtab>
13. Čabanová V., Tichá E., Bradbury R.S., et al. Mosquito surveillance of West Nile and Usutu viruses in four territorial units of Slovakia and description of a confirmed autochthonous human case of West Nile fever, 2018 to 2019. *Euro Surveill.* 2021;26(19):2000063. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.19.2000063>
14. Отрашевская Е.В., Казакова Е.В., Жиренкина Е.Н. и др. Ретроспективный серологический анализ распространения флавивирусных лихорадок и лихорадки Чикунгунья в Никарагуа; авидность специфических антител, как инструмент дифференциальной диагностики. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022;99(2):215–24. Atrasheuskaya A.V., Kazakova E.V., Zhirenkina E.N., et al. The study of flaviviruses and Chikungunya virus seroprevalence in Nicaragua – virus-specific antibody avidity assay as a tool for differential diagnosis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2022;99(2):215–24. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-196> EDN: <https://elibrary.ru/tyopaj>
15. Shurtleff A.C., Beasley D.W., Chen J.J., et al. Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses. *Virology.* 2001;281(1):75–87. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0748>

Информация об авторах

Игнатъев Георгий Михайлович — д.м.н., профессор, главный сотрудник лаб. молекулярной биотехнологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Оксанич Алексей Сергеевич[✉] — к.б.н., в.н.с. лаб. молекулярной биотехнологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, oksanich@yahoo.com, <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>

Казаква Елена Владимировна — зам. директора по управлению персоналом и организационному проектированию Санкт-Петербургского НИИ вакцин и сывороток, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0218-6641>

Самарцева Татьяна Геннадьевна — н.с. лаб. молекулярной биотехнологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

Отрашевская Елена Викторовна — ведущий сотрудник лаб. молекулярной биотехнологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Уйба Станислав Валентинович — генеральный директор Латиноамериканского института биотехнологий «Мечников», Манагуа, Республика Никарагуа, <https://orcid.org/0000-0001-9246-3915>

Трухин Виктор Павлович — директор Санкт-Петербургского НИИ вакцин и сывороток, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

Участие авторов: *Игнатъев Г.М.* — разработка дизайна исследований; непосредственное участие в выполнении работ; написание статьи; *Оксанич А.С.* — дизайн, разработка и проведение молекулярно-биологических исследований, написание статьи, критический анализ текста; *Казаква Е.В.* — сбор и обработка материала; *Самарцева Т.Г.* — участие в экспериментальных исследованиях; *Отрашевская Е.В.* — анализ и интерпретация результатов исследований; статистическая обработка; *Уйба С.В.* — дизайн и организация сбора материала; *Трухин В.П.* — анализ результатов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ИСМЖЕ, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 14.07.2023;
принята к публикации 10.09.2023;
опубликована 28.10.2023

Information about the authors

Georgy M. Ignatyev — D. Sci. (Med.), Professor, main expert, Laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Alexey S. Oksanich[✉] — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, oksanich@yahoo.com, <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>

Elena V. Kazakova — Deputy director for HR and organizational design, St. Petersburg Research Institute for Vaccines and Sera, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0218-6641>

Tatyana G. Samartseva — researcher, Laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

Elena V. Otrashesvskaya — leading employee, Laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Stanislav V. Uyba — General director, Mechnikov Latin American Institute of Biotechnology, Managua, Nicaragua, <https://orcid.org/0000-0001-9246-3915>

Victor P. Trukhin — Director, St. Petersburg Research Institute for Vaccines and Sera, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

Author contribution: *Ignatyev G.M.* — substantial contribution to the study design; direct participation in the laboratory investigation; editing; *Oksanich A.S.* — design and direct performance of molecular-biological experiments; editing; critical analysis of the text content; *Kazakova E.V.* — collection and processing of material; *Samartseva T.G.* — direct participation in the experimental work; *Otrashesvskaya E.V.* — analysis and interpretation of the study results; statistical analysis; *Uyba S.V.* — design and organization of material collection; *Trukhin V.P.* — analysis of results. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 14.07.2023;
accepted for publication 10.09.2023;
published 28.10.2023