

## ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *kdr*-МУТАЦИИ F1534C В ГЕНЕ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМОГО НАТРИЕВОГО КАНАЛА (*vgsc*) *Aedes aegypti* И *Aedes albopictus* В ПОПУЛЯЦИЯХ СЕВЕРНОГО И ЦЕНТРАЛЬНОГО ВЬЕТНАМА

© 2020 г. Т. Х. Ву<sup>2</sup>, Б. В. Андрианов<sup>1, \*</sup>, Д. Ч. Ву<sup>3</sup>, И. И. Горячева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

<sup>2</sup>Московский государственный областной университет, Москва, 141014 Россия

<sup>3</sup>Национальный институт маляриологии, паразитологии и энтомологии, Ханой, ВС10200 Вьетнам

\*e-mail: andrianovb@mail.ru

Поступила в редакцию 26.04.2019 г.

После доработки 31.05.2019 г.

Принята к публикации 24.06.2019 г.

Пиретроидные инсектициды — основной инструмент контроля численности комаров-переносчиков арбовирусных лихорадок *Aedes aegypti* и *Ae. albopictus*. Широкое использование инсектицидов привело к распространению мутаций устойчивости (или *kdr*-мутаций) к ним в популяциях комаров. Популяционно-генетическое изучение *kdr*-мутаций позволяет получить информацию об изменениях генетической структуры популяций комаров в результате антропогенного воздействия и может быть полезно для составления эпидемиологического прогноза распространенности лихорадок Денге и Чикунгунья. Для идентификации *kdr*-мутаций традиционно используется мультиплексная ПЦР в сочетании с секвенированием ПЦР-фрагментов. Нами разработан более производительный метод для идентификации *kdr*-мутаций на основе анализа SNP в гене *vgsc* и ПЦР в реальном времени. Выявлена *kdr*-мутация F1534C у *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* в провинции Хатинг. У *Ae. albopictus* данная мутация на территории Вьетнама выявлена впервые.

**Ключевые слова:** лихорадка Денге, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, устойчивость к инсектицидам, пиретроиды, *kdr*-мутации, SNP.

**DOI:** 10.31857/S0016675820040153

Комары рода *Aedes* являются переносчиками арбовирусных геморрагических лихорадок человека: Денге, Зика, Чикунгунья и Желтой лихорадки. Особенно распространена в Юго-Восточной Азии лихорадка Денге [1]. Вспышки лихорадки Денге на территории Вьетнама впервые описаны в 60-е гг. XX столетия [2] и с тех пор борьба с данным заболеванием остается актуальной задачей. Основным методом борьбы с распространением эпидемий с самого начала было выбрано подавление популяций комаров с помощью химических инсектицидов. После запрета применения ДДТ на территории Вьетнама в 1995 г. в основном применялись инсектициды из группы пиретроидов [3, 4]. Пиретроиды являются нейротоксинами для насекомых, у которых они вызывают деполяризацию мембран нейронов, что приводит к летальному исходу [5]. Устойчивость комаров к пиретроидным инсектицидам объясняется несколькими биохимическими механизмами. Уровень ферментативной активности моноаминоксидазы при участии цитохрома P450, глутатион-S-трансфе-

разы и ацетилхолинэстеразы положительно коррелирует с устойчивостью к пиретроидам [6–8]. Но основное влияние на уровень устойчивости оказывают мутации в гене потенциал-чувствительного трансмембранного натриевого канала (*vgsc*). Ген *vgsc* кодирует трансмембранный белок, образующий ионные каналы в аксонах нейронов. Белок состоит из четырех гомологичных субъединиц (I–IV), каждая из которых содержит шесть гидрофобных доменов (S1–S6) [9]. Комары *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* приобретают устойчивость к пиретроидам благодаря единичной мутации или нескольким точковым нуклеотидным заменам, приводящим к аминокислотным заменам в гене *vgsc*. Такие мутации объединяют общим названием *kdr*-мутации. Разные *kdr*-мутации и их комбинации обеспечивают разный уровень резистентности. У *Ae. aegypti* *kdr*-мутации выявлены в положениях аминокислотной последовательности 989, 1011 и 1016 (домен S6 II субъединицы), а также в положении 1534 (домен S6 III субъединицы). У *Ae. albopictus* *kdr*-мутаций выявлено гораз-

**Таблица 1.** Выявленные *kdr*-мутации в популяциях комаров рода *Aedes* на территории Юго-Восточной Азии

Страна	Вид комара	Мутации	Источник
Вьетнам	<i>Aedes aegypti</i>	V1016I, I1011V, F1534C, V1016G	[10, 11]
Сингапур	<i>Aedes albopictus</i>	F1534C	[12]
Китай	То же	F1534C, F1534L, F1534S	[13–15]
Индонезия	<i>Ae. aegypti</i>	V1016G, F1534C, S989P, V1016G/S989P	[16–21]
Камбоджа	То же	F1534C, V1016G	[19, 22]
Малайзия	»	V1016G, F1534C	[23]
Мьянма	»	V1016G, S989P, F1534C, V1016G/S989P, V1016G/F1534C, V1016G/F1534C/S989P	[19, 24]
Сингапур	»	F1534C, V1016G	[25–27]
Таиланд	»	I1011V, F1534C, S989P/V1016G, V1016G, V1016G/F1534C/S989P	[17, 19, 22, 26, 28–31]

до меньше. Мутации найдены в положении 1534 (домен S6 III субъединицы). Все найденные на территории Юго-Восточной Азии *kdr*-мутации перечислены в табл. 1.

На территории Вьетнама устойчивые к инсектицидам комары впервые найдены в Центральном нагорье [32], а затем в Северном, Центральном и Южном Вьетнаме [33]. С использованием нокдаун-теста на личинках четвертого возраста показано, что устойчивость популяций *Ae. aegypti* Вьетнама увеличивается по географическому клину с севера на юг [34]. Устойчивость комаров *Ae. aegypti* Вьетнама объясняется в основном распространением *kdr*-мутации F1534C и в гораздо меньшей степени мутаций V1016G, V1016I и I1011V [10, 11]. Состояние устойчивости комаров к инсектицидам требует постоянного мониторинга. Схема выявления *kdr*-мутаций у *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* на основе секвенирования нескольких ПЦР-фрагментов, включающих вариабельные области гена *vgsc*, была предложена в работе [12]. Впоследствии были предложены более быстрые и более дешевые методы скрининга популяций комаров на конкретные *kdr*-мутации. Аллель-специфичный ПЦР-тест предложен для обнаружения мутации V1016G [35]. Для обнаружения мутации F1534C в перметрин-резистентной популяции *Ae. aegypti* были разработаны методы на основе зондов TaqMan и аллель-специфичный ПЦР-тест [29]. Для обнаружения мутаций V1016G и F1534C разработан мультиплексный ПЦР-тест [19]. Разработка таких упрощенных методов поиска *kdr*-мутаций имеет смысл, так как число этих мутаций в популяциях определенного региона очень ограничено. Особенно это верно для *Ae. albopictus*.

В настоящей работе мы разработали метод выявления SNP в сайте 1534 гена *vgsc* на основе ПЦР в реальном времени и применили его для характеристики уровня резистентности популяций кома-

ров рода *Aedes* в пяти провинциях Северного и Центрального Вьетнама. *Kdr*-мутация F1534C у *Ae. albopictus* на территории Вьетнама выявлена нами впервые.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Сборы комаров

Характеристика сборов личинок комаров рода *Aedes* приведена в табл. 2. Комаров собирали индивидуально в ходе маршрутных учетов на расстоянии точек сбора не менее 10 м друг от друга для репрезентативного представления их изменчивости в данной местности. Места сборов комаров во Вьетнаме приведены на рис. 1.

### Выделение ДНК и ПЦР

Тотальную ДНК из личинок выделяли фенол-хлороформным методом [36]. После очистки ДНК растворяли в деионизованной воде. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом с использованием Implen NanoPhotometer NP80. Чистоту препарата ДНК тестировали по величине отношения 260/280 нм. Концентрацию ДНК в препаратах выравнивали до 4 нг/мкл. ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл с использованием наборов для амплификации EncycloPlus PCR Kit в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Подбор праймеров проводили в программе Primer 3 [37]. Используемые в работе праймеры приведены в табл. 3.

Условия ПЦР для амплификации фрагмента митохондриального гена *cox1* длиной 228 пн: первичная денатурация 95°C 5 мин, затем 35 циклов: денатурация 30 с 95°C, отжиг 30 с 65°C, синтез 60 с 72°C, терминальный синтез 5 мин 72°C.

Условия ПЦР для амплификации фрагмента гена *vgsc* длиной 163 пн: первичная денатурация

**Таблица 2.** Места сборов личинок комаров и объем проанализированных выборок

Название провинции Вьетнама и дата сбора	Географические координаты места сбора	Экологическая характеристика места сбора	Число проанализированных личинок
Хатинг, 2017	18.40 N 105.97 E	Временные водоемы антропогенного происхождения с твердыми стенками	33
ТханьХоа, 2017	19.85 N 105.85 E	То же	34
Шонла, 2016	21.29 N 103.97 E	»	30
Йенбай, 2016	21.88 N 104.68 E	»	30
Куаньнинь, 2016	21.07 N 106.60 E	»	27
			$\Sigma = 154$

95°C 5 мин, затем 36 циклов: денатурация 30 с 95°C, отжиг 10 с 65°C, синтез 30 с 72°C, терминальный синтез 5 мин 72°C. Условия ПЦР для амплификации фрагментов гена *vgsc* длиной 748 и 413 пн, отмеченных в табл. 3, взяты из оригинальной работы [12].

Стратегия идентификации *kdr*-мутации F1534C в гене *vgsc* *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti* приведена на рис. 2. С целью предотвращения паразитной амплификации с последовательностей псевдогенов *vgsc*, существование которых вероятно, праймер U1534f локализован частично в интроне гена *vgsc*,



**Рис. 1.** Провинции Вьетнама, где были собраны проанализированные в работе выборки личинок комаров. Й – Йенбай, К – Куаньнинь, Ш – Шонла, Т – ТханьХоа, Х – Хатинг. Географические координаты мест сборов приведены в табл. 2.

**Таблица 3.** Характеристика праймеров, использованных в данной работе

Специфичность праймера	Длина ПЦР-фрагмента с праймерами, пн	Праймер	Нуклеотидная последовательность праймера: 5'–3'	Температура плавления праймера (Tm)	Источник
Фрагмент митохондриального гена <i>cox1</i> <i>Aedes albopictus</i> . Для подбора праймеров использована последовательность MF148292					
<i>cox1</i>	228	Alb-spf	CCCCTCTTTAACTGCTGC	65°C	Данная работа
		Alb-spr	GGTAGTCGATCAAGAGTAATACCAGC	65°C	
Фрагмент ядерного гена потенциал-зависимого натриевого канала ( <i>vgsc</i> ). Для подбора праймеров использована последовательность NW_017857054					
<i>vgsc</i>	163	U1534f	GACTCGCGGGAGGTAAGTT	65°C	Данная работа
		C1534r	GGTGAAGAACGACCCGC	65°C	
Фрагмент ядерного гена потенциал-зависимого натриевого канала ( <i>vgsc</i> )					
<i>vgsc</i>	748	aegSCF7	GAGAACTCGCCGATGAACTT	60°C	[12]
		aegSCR7	GACGACGAAATCGAACAGGT	60°C	
	413	aegSCF7	GAGAACTCGCCGATGAACTT	60°C	[12]
		aegSCR8	TAGCTTTCAGCGGCTTCTTC	60°C	

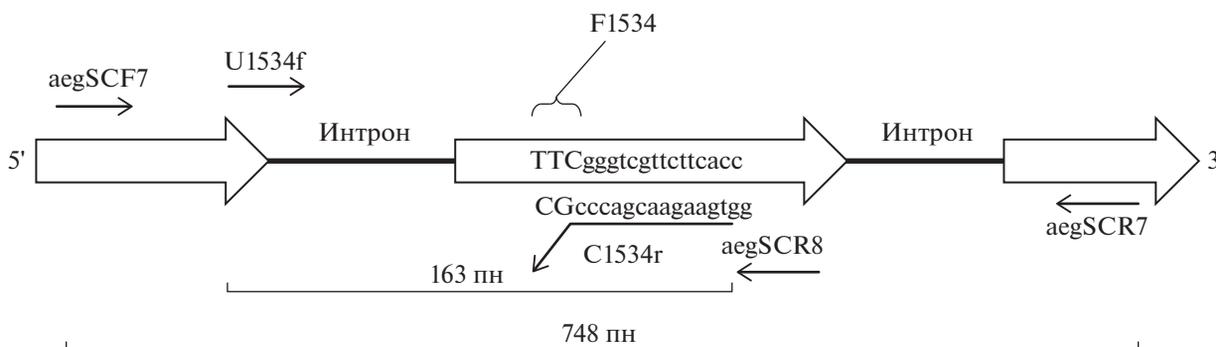
что исключает возможность амплификации последовательностей псевдогенов. Амплификация только одного ПЦР-продукта ожидаемого размера была проверена экспериментально на электрофорезе.

BOLD-фрагмент митохондриального гена *cox1* для определения вида комара получали с помощью стандартных фолмеровских праймеров: LCO1490 и HCO2198 [38]. Полученный фрагмент секвенировали и определяли вид комара, сравнивая полученную последовательность с зарегистрированными в базе данных GenBank последовательностями.

*Секвенирование*

Фрагменты, полученные в результате амплификации, очищали в 1.5%-ном агарозном геле. Элюцию фрагментов из геля проводили с использованием набора для элюции Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Нуклеотидную последовательность ПЦР-фрагментов определяли с прямого и обратного праймеров на приборе ABI PRISM 3500 с использованием реагентов BigDye® Terminator v3.1 Cycle



**Рис. 2.** Схема расположения праймеров для мультиплексной ПЦР. Широкие стрелки обозначают экзоны гена *vgsc*. Тонкими стрелками показано расположение праймеров. Отсутствие комплементарности на 3'-конце праймера C1534r с *kdr*-аллелем дикого типа обозначено изгибом стрелки вниз. Последовательность кодона 1534 выделена заглавными буквами. Тонкие линии внизу обозначают длины ПЦР-фрагментов вместе с праймерами.

Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя.

### ПЦР в режиме реального времени

Идентификацию *kdr*-аллелей проводили с помощью ПЦР-амплификатора ANK-32 real-time PCR system (Syntol, Россия). При наличии тотальной ДНК хорошего качества у всех комаров выборки ПЦР на идентификацию *kdr*-аллелей может быть поставлена с тотальной ДНК, растворенной в воде до одинаковой концентрации. В случае ДНК невысокого качества из заспиртованных или засушенных комаров необходим предварительный этап получения ПЦР-фрагмента с праймеров *aegSCF7* и *aegSCR7* длиной 748 пн, включающего анализируемую область гена *vgsc*. Использование этого ПЦР-фрагмента в качестве матрицы для анализа SNP позволяет осуществить выравнивание качества и концентрации ДНК матрицы перед проведением ПЦР на идентификацию *kdr*-аллелей.

Тотальная ДНК комаров использовалась для получения ПЦР-фрагмента гена *vgsc* длиной 748 пн, включающего область предполагаемой мутации, как показано на рис. 2. Полученный ПЦР-фрагмент элюировали из агарозного геля и концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре. Затем концентрация всех препаратов была нормализована до величины 4 нг/мкл и аликвота каждого препарата была разбавлена в 2000 раз перед проведением второй реакции ПЦР с праймерами U1534f и C1534r для получения аллель-специфичного фрагмента длиной 163 пн.

ПЦР проводили в объеме 25 мкл с добавлением к стандартной ПЦР-смеси красителя SYBR Green I (Invitrogen). Концентрация каждого из праймеров 0.5 мкМ. Первичная денатурация 95°C 5 мин, затем 36 циклов: денатурация 30 с 95°C, отжиг 10 с  $T_m = 65^\circ\text{C}$ , синтез 30 с 72°C, терминальный синтез 5 мин 72°C. Оптимальная концентрация красителя SYBR Green I в реакционной смеси для разных партий красителя может отличаться и ее следует подбирать до опыта в серии контрольных ПЦР.

Амплификации с препаратов ДНК, содержащих *kdr*-мутацию F1534C в гомозиготном или гетерозиготном состоянии или только аллели дикого типа, различаются по величине контрольного цикла ( $C_t$ ). По этой причине для надежной идентификации *kdr*-аллелей в популяционных выборках необходимо иметь контрольные образцы, достоверно содержащие и не содержащие изучаемую мутацию.

### Биоинформационный анализ

Анализ хроматограмм проводили с помощью программы Chromas-Pro 13.3 (Technelysium, Австралия). Выравнивание последовательностей, полученных в результате секвенирования, с последовательностями, размещенными в базах данных, было выполнено с использованием ресурсов NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Для тестирования новых ускоренных методов идентификации *kdr*-мутации F1534C в популяциях *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* мы провели изучение одной выборки комаров из провинции Хатинг как классическими методами согласно [12], так и новыми методами и провели сравнение полученных результатов (табл. 4).

Из 33 личинок комаров, собранных в провинции Хатинг, три определены как *Ae. aegypti* и 30 как *Ae. albopictus* на основании анализа BOLD-фрагмента митохондриального гена *coxI*.

Мы предлагаем ускоренный метод определения вида комаров по наличию или отсутствию видоспецифичного для *Ae. albopictus* ПЦР-фрагмента длиной 228 пн (табл. 3). Специфический фрагмент можно обнаружить электрофорезом или с помощью ПЦР в реальном времени. Ускоренный и стандартный методы показали идентичные результаты. Доля *Ae. albopictus* в выборке из провинции Хатинг составила 91%, в выборке из Тханьхоа — 100%, в выборке из Шонла — 60%. В этих провинциях сборы проводили в сельскохозяйственных районах, граничащих с лесом. Сборы на территории поселков дали меньший процент *Ae. albopictus*: в выборке из Куаньнинь — 48% и из Йенбай — 7%. Мутацию *kdr* F1534C в выборке из провинции Хатинг выявляли стандартным методом секвенирования участка гена *vgsc* с праймера *aegSCR8* по [12]. Мутация выявлена у двух комаров из трех, относящихся к *Ae. aegypti*, причем в одном из этих случаев мутация была в гомозиготном состоянии. Из 30 комаров, относящихся к *Ae. albopictus*, мутация была найдена в двух случаях в гетерозиготном состоянии. Это первый случай идентификации *kdr*-мутации у *Ae. albopictus* на территории Вьетнама. Мы предлагаем ускоренный метод выявления данной мутации у комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*. На рис. 3 показан результат ПЦР в реальном времени по амплификации аллель-специфичного фрагмента 163 пн на той же выборке. Ускоренный и стандартный методы показали идентичные результаты. Ускоренный метод не позволяет различать гомозиготное и гетерозиготное состояние мутации. Интересно, что *kdr*-мутации обнаружены нами у комаров только в провинции Хатинг,

**Таблица 4.** Соответствие результатов видовой идентификации комаров и идентификации *kdr*-мутации F1534C в выборке комаров из провинции Хатинг с помощью традиционного и упрощенного методов

№	Шифр личинки комара	Идентификация вида комара		Результат идентификации мутации с помощью ПЦР в реальном времени	Результат идентификации мутации с помощью секвенирования		
		идентификация вида по сиквенсу BOLD-фрагмента митохондриального гена <i>COI</i>	наличие видоспецифичного для <i>Ae. albopictus</i> ПЦР-фрагмента митохондриального гена <i>COI</i> длиной 228 пн	замена F1534C	генотип комара		
1	G1	<i>Ae. albopictus</i> KU738429, Китай	Да	Есть	F//F		
2	G2	То же	Да		F//F		
3	G3	<b><i>Ae. albopictus</i> KU738429, Китай</b>	Да		F//C		
4	G4	<i>Ae. albopictus</i> KU738429, Китай	Да		F//F		
5	G5	<b><i>Ae. aegypti</i> HQ688292, Вьетнам 99.4%</b>	Да		Есть	C//C	
6	G6	<i>Ae. albopictus</i> KU738429, Китай			Да	F//F	
7	G7	<i>Ae. albopictus</i> HQ398900, Вьетнам			Да	F//F	
8	G8	То же			Да	F//F	
9	G9	<i>Ae. aegypti</i> HQ688292, Вьетнам 99.4%			Да	F//F	
10	G10	<i>Ae. albopictus</i> KU138047, Китай			Да	F//F	
11	G11	<b><i>Ae. aegypti</i> HQ688292, Вьетнам 99.4%</b>			Да	Есть	F//C
12	G12	<i>Ae. albopictus</i> HQ398900, Вьетнам			Да	F//F	
13	G13	<i>Ae. albopictus</i> KU738429, Китай			Да	F//F	
14	G14	То же			Да	F//F	
15	G15	»			Да	F//F	
16	G16	»			Да	F//F	
17	G17	»			Да	F//F	
18	G18	»			Да	F//F	
19	G19	<i>Ae. albopictus</i> HQ398900, Вьетнам			Да	F//F	
20	G20	То же			Да	F//F	
21	G21	»		Да	F//F		
22	G22	»		Да	F//F		

Таблица 4. Окончание

№	Шифр личинки комара	Идентификация вида комара		Результат идентификации мутации с помощью ПЦР в реальном времени	Результат идентификации мутации с помощью секвенирования
		идентификация вида по сиквенсу BOLD-фрагмента митохондриального гена <i>COI</i>	наличие видоспецифичного для <i>Ae. albopictus</i> ПЦР-фрагмента митохондриального гена <i>COI</i> длиной 228 пн	замена F1534C	генотип комара
23	G23	»	Да		F//F
24	G24	<i>Ae. albopictus</i> KU738429, Китай	Да		F//F
25	G25	<i>Ae. albopictus</i> HQ398900, Вьетнам	Да		F//F
26	G26	То же	Да		F//F
27	G30	»	Да		F//F
28	G32	<i>Ae. albopictus</i> KU738429, Китай	Да		F//F
29	G33	<i>Ae. albopictus</i> HQ398900, Вьетнам 99.7%	Да		F//F
30	G35	<i>Ae. albopictus</i> <b>HQ398900, Вьетнам</b>	Да	<b>Есть</b>	<b>F//C</b>
31	G40	<i>Ae. albopictus</i> HQ398900, Вьетнам	Да		F//F
32	G41	То же	Да		F//F
33	G44	»	Да		F//F

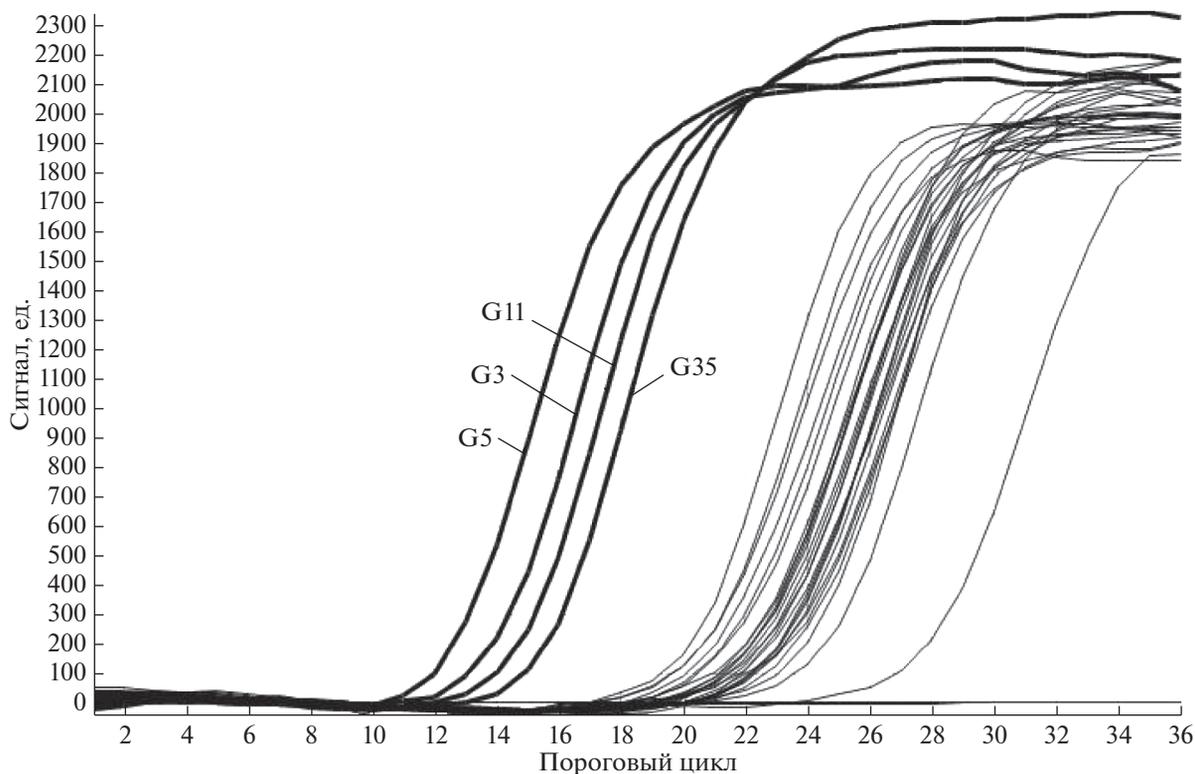
Примечание. Строки, соответствующие комарам, у которых выявлена мутация, выделены полужирным шрифтом. Да – означает наличие видоспецифичного для *Ae. albopictus* ПЦР-фрагмента митохондриального гена *COI* длиной 228 пн. Есть – положительный результат теста ПЦР в режиме реального времени.

границащей с Лаосом (рис. 1). Это одновременно и самая южная точка проведенных сборов. В остальных четырех выборках комаров из Северного Вьетнама *kdr*-мутации не обнаружены.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе предложен и протестирован новый метод определения видов комаров *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti* на стадии личинки и метод скрининга *kdr*-мутаций на основе метода ПЦР в реальном времени. Предложенный метод генотипирования *kdr*-мутаций быстрее и дешевле классической схемы, но в отличие от классической схемы не позволяет различать гомозиготное и гетерозиготное состояние мутации. Мы впервые выявили *kdr*-мутацию F1534C у *Ae. albopictus* на территории Вьетнама. Ранее эти мутации были

выявлены в Китае (табл. 1). Можно сделать вывод о незначительном распространении *kdr*-мутаций у комаров *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti* на территории Вьетнама. Вопрос о происхождении этих мутаций и связанный с ним вопрос о происхождении устойчивых к инсектицидам форм комаров пока не может быть решен. Распространение *kdr*-мутаций в популяциях комаров рода *Aedes* связывают с широким применением пиретроидных инсектицидов. Хотя это утверждение бесспорно, происхождение комаров-носителей *kdr*-мутаций на территории Вьетнама остается неизвестным. *kdr*-мутации могут появляться в популяции благодаря миграции и благодаря новым мутациям. Дальнейшие популяционно-генетические исследования необходимы для определения относительно вклада этих процессов в формирование резистентности к инсектицидам. Можно утверждать,



**Рис. 3.** Результат ПЦР в реальном времени с праймерами U1534f и С1534г на выборке комаров из провинции Хатинг. Каждая кривая роста флуоресценции соответствует одному препарату ДНК комара. Указаны шифры комаров, давших положительный сигнал. Перечень всех проанализированных комаров выборки из провинции Хатинг дан в табл. 4.

что комары рода *Aedes* полиморфны и могут формировать ряд локальных популяций, частично изолированных репродуктивно, благодаря географическим, поведенческим и биохимическим барьерам с различным уровнем устойчивости к инсектицидам. Особый интерес представляет выявление синантропных популяций комаров, наиболее опасных с точки зрения распространения геморрагических лихорадок. Мутантные формы *Ae. albopictus* Вьетнама и Китая могут иметь общее происхождение, возможно и независимое возникновение *kdr*-мутаций в разных популяциях *Ae. albopictus*. Для решения этих вопросов необходимы исследования популяционной структуры вида. Выявленные *kdr*-мутации имеют низкую частоту, следовательно популяции *Ae. albopictus* Вьетнама в настоящее время чувствительны к пиретроидным инсектицидам. Выводы о чувствительности или резистентности популяций комаров, сделанные на основе генетических данных, имеют важные преимущества по сравнению с выводами, которые можно сделать на основе физиологических тестов на устойчивость, принятых в настоящее время Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) [39]. Преимущества связаны с тем, что распространение *kdr*-мутаций может быть

связано только с давлением отбора на резистентность к инсектицидам или отбора, приводящего к изменению генетической структуры популяции, тогда как суммарная резистентность комаров к инсектицидам может колебаться от случайных физиологических причин в широких пределах. Генетический мониторинг частот *kdr*-мутаций – несомненно лучший из тестов, позволяющих оценить результаты мероприятий по контролю численности комаров.

Применение инсектицидов и профилактические мероприятия, направленные на устранение мест развития личинок комаров, являются основными методами контроля численности комаров рода *Aedes*. Теоретически возможны и другие подходы. Наиболее обещающее направление связано с контролем над микрофлорой комаров. Экспериментальная инфекция комаров внутриклеточной бактерией *Wolbachia*, которая в настоящее время отсутствует в природных популяциях *Ae. aegypti* [40], может блокировать способность комаров к передаче вируса, хотя первые опыты в этом направлении пока не привели к существенным результатам [41, 42].

Работа выполнена в рамках государственного задания (№ 0112-2019-0002) по теме “Изучение изменчивости автономных генетических элемен-

тов насекомых и разработка маркеров нестабильности генома” (АААА-А16-116111610180-3).

Авторы работы внесли равный вклад в исследование.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee J.S., Mogasale V., Lim J. et al. A multi-country study of the economic burden of dengue fever: Vietnam, Thailand, and Colombia // PLoS Negl. Trop. Dis. 2017. V. 11. № 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006037>
2. Halstead S.B., Voulgaropoulos E., Tien N.H. et al. Dengue hemorrhagic fever in South Vietnam: report of the 1963 outbreak // Am. J. Trop. Med. Hyg. 1965. V. 14. P. 819–830. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1965.14.819>
3. Nguyen V.-D., Nguenyn M.-H., Pham T.-K. et al. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Ha Noi and QuangNinh, 2011 // J. Preventive Med. 2012. V. 4. P. 63–70. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-79>
4. Tran T.-D., Nguyen V.-D., Vu D.-C., Do H.-T. Mapping insecticide resistance in dengue vectors in the Northern Viet Nam, 2010–2013 // Vector Biol. J. 2016. V. 1. P. 1. <https://doi.org/10.4172/2473-4810.1000105>
5. Narahashi T. Nerve membrane ion channels as the target site of insecticides // Mini Rev. Med. Chem. 2002. V. 2. P. 419–432. <https://doi.org/10.2174/1389557023405927>
6. Chareonviriyaphap T., Bangs M.J., Suwonkerd W. et al. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand // Parasites and Vectors. 2013. V. 6. P. 280. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-280>
7. Hemingway J., Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease // Annu. Rev. Entomol. 2010. V. 45. P. 371–391. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.371>
8. Ishak I.H., Kamgang B., Ibrahim S.S. et al. Pyrethroid resistance in Malaysian populations of dengue vector *Aedes aegypti* is mediated by CYP9 family of cytochrome P450 genes // PLoS Negl. Trop. Dis. 2017. V. 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005302>
9. Catterall W.A. From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels // Neuron. 2000. V. 26. № 1. P. 13–25. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81133-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81133-2)
10. Bingham G., Strode C., Tran L. et al. Can piperonyl butoxide enhance the efficacy of pyrethroids against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti*? // Trop. Med. Int. Health. 2011. V. 16. P. 492–500. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02717.x>
11. Kawada H., Higa Y., Komagata O. et al. Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam // PLoS Negl. Trop. Dis. 2009. V. 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000527>
12. Kasai S., Ng L., Lam-Phua S. et al. First detection of a putative knockdown resistance gene in major mosquito vector, *Aedes albopictus* // Jap. J. Infect. Dis. 2011. V. 64. № 3. P. 217–221.
13. Chen H., Li K., Wang X. et al. First identification of kdr allele F1534S in VGSC gene and its association with resistance to pyrethroid insecticides in *Aedes albopictus* populations from Haikou City, Hainan Island, China // Infect. Dis. Poverty. 2016. V. 5. № 31. P. 8. <https://doi.org/10.1186/s40249-016-0125-x>
14. Xu J., Bonizzoni M., Zhong D. et al. Multi-country survey revealed prevalent and novel F1534S mutation in voltage-gated sodium channel (VGSC) gene in *Aedes albopictus* // PLoS Negl. Trop. Dis. 2016. V. 10. № 5. e0004696. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004696>
15. Li Y., Xu J., Zhong D. et al. Evidence for multiple-insecticide resistance in urban *Aedes albopictus* populations in southern China // Parasites Vectors. 2018. V. 11. № 1. P. 4. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2581-y>
16. Wuliandari J.R., Lee S.F., White V.L. et al. Association between three mutations, F1565C, V1023G and S996P, in the voltage-sensitive sodium channel gene and knockdown resistance in *Aedes aegypti* from Yogyakarta, Indonesia // Insects. 2015. V. 6. P. 658–685. <https://doi.org/10.3390/insects6030658>
17. Brengues C., Hawkes N.J., Chandre F et al. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene // Med. Vet. Entomol. 2003. V. 17. P. 87–94. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00412.x>
18. Hamid P.H., Prastowo J., Ghiffari A. et al. *Aedes aegypti* resistance development to commonly used insecticides in Jakarta // Indonesia. PLoS One. 2017. V. 12. № 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189680>
19. Saingamsook J., Saeung A., Yanola J. et al. A multiplex PCR for detection of knockdown resistance mutations, V1016G and F1534C, in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* // Parasites and Vectors. 2017. V. 10. P. 465. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2416-x>
20. Sayono S., Hidayati A.P.N., Fahri S. et al. Distribution of voltage-gated sodium channel (Nav) alleles among the *Aedes aegypti* populations in central Java province and its association with resistance to pyrethroid insecticides // PLoS One. 2016. V. 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150577>
21. Hamid P.H., Prastowo J., Widayari A. et al. Knockdown resistance (kdr) of the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* population in Denpasar,

- Bali, Indonesia // *Parasites and Vectors*. 2017. V. 10. P. 283.  
<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2215-4>
22. Yanola J., Somboon P., Walton C. et al. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand // *Trop. Med. Int. Health*. 2011. V. 16. P. 501–509.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02725.x>
  23. Ishak I.H., Jaal Z., Ranson H. et al. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (*kdr*) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia // *Parasites and Vectors*. 2015. V. 8. P. 181.  
<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0797-2>
  24. Kawada H., Oo S.Z.M., Thaung S. et al. Co-occurrence of point mutations in the voltage-gated sodium channel of pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Myanmar // *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2014. V. 8. № 7.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003032>
  25. Kasai S., Komagata O., Itokawa K. et al. Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity, penetration, and metabolism // *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2014. V. 8.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002948>
  26. Rajatileka S., Black W.C., Saavedra-Rodriguez K. et al. Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti* // *Acta Trop*. 2008. V. 108. P. 54–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.08.004>
  27. Pang S.C., Chiang L.P., Tan C.H. et al. Low efficacy of deltamethrin-treated net against Singapore *Aedes aegypti* is associated with *kdr*-type resistance // *Trop. Biomed*. 2015. V. 32. P. 140–150.
  28. Srisawat R., Komalamisra N., Eshita Y. et al. Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) // *Appl. Entomol. Zool*. 2010. V. 45. № 2. P. 275–282.  
<https://doi.org/10.1303/aez.2010.275>
  29. Yanola J., Somboon P., Walton C. et al. A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance // *Pestic Biochem. Phys*. 2010. V. 96. P. 127.  
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.10.005>
  30. Plernsub S., Saingamsook J., Yanola J. et al. Additive effect of knockdown resistance mutations, S989P, V1016G and F1534C, in a heterozygous genotype conferring pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* in Thailand // *Parasites and Vectors*. 2016. V. 9. P. 417.  
<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1713-0>
  31. Srisawat R., Komalamisra N., Apiwathnasorn C. et al. Field-collected permethrin-resistant *Aedes aegypti* from central Thailand contain point mutations in the domain IIS6 of the sodium channel gene (*kdr*) // *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health*. 2012. V. 43. P. 1380–1386.
  32. Huong V.D., Ngoc N.T.B. Susceptibility of *Aedes aegypti* to insecticides in South Vietnam // *Dengue Bull*. 1999. V. 23. P. 85–88.
  33. Huong V.D., Ngoc N.T.B., Hien D.T. et al. Susceptibility of *Aedes aegypti* to insecticides in Vietnam // *Dengue Bull*. 2004. V. 28. P. 179–183.
  34. Kawada H., Higa Y., Nguyen Y.T. et al. Nationwide investigation of the pyrethroid susceptibility of mosquito larvae collected from used tires in Vietnam // *PLoS Negl. Trop Dis*. 2009. V. 3.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000391>
  35. Stenhouse S.A., Plernsub S., Yanola J. et al. Detection of the V1016G mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by allele-specific PCR assay, and its distribution and effect on deltamethrin resistance in Thailand // *Parasites and Vectors*. 2013. V. 6. P. 253.  
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-253>
  36. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N.Y., 1989.
  37. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T. et al. Primer3 – new capabilities and interfaces // *Nucl. Acids Res*. 2012. V. 40. № 15. e115.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
  38. Folmer O., Black M., Hoeh W. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Mol. Mar. Biol. Biotechnol*. 1994. V. 3. P. 294–297.
  39. *World Health Organization*. *Monitoring and Managing Insecticide Resistance in Aedes mosquito Populations: Interim Guidance for Entomologists*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2016.
  40. Jeyaprakash A., Hoy M.A. Long PCR improves Wolbachia DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species // *Insect. Mol. Biol*. 2000. V. 9. P. 393–405.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00203.x>
  41. Hoffmann A.A., Montgomery B.L., Popovici J. et al. Successful establishment of Wolbachia in *Aedes* populations to suppress dengue transmission // *Nature*. 2011. V. 476. № 7361. P. 454–457.  
<https://doi.org/10.1038/nature10356>
  42. Nguyen T.H., Le Nguyen H., Nguyen T.Y. et al. Field evaluation of the establishment potential of w MelPop Wolbachia in Australia and Vietnam for dengue control // *Parasites and Vectors*. 2015. V. 8. P. 563.  
<https://doi.org/10.1186/s13071-015-1174-x>

## qPCR Identification of the *kdr* Allele F1534C in Voltage-Gated Sodium Channel Gene (*vgsc*) of the Major Mosquito Vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the North and Central Viet Nam

T. X. Vu<sup>b</sup>, B. V. Andrianov<sup>a, \*</sup>, D. C. Vu<sup>c</sup>, and I. I. Goryacheva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup>Moscow Region State University, Moscow, 141014 Russia

<sup>c</sup>National Institute of Malariology Parasitology and Entomology, Ha Noi, Viet Nam

\*e-mail: andrianovb@mail.ru

Pyrethroid insecticides are currently the main tool for controlling major mosquito vectors of hemorrhagic fevers – *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. The widespread use of insecticides has led to the spread of insecticide resistance mutations (or *kdr*-mutations) in mosquito populations. A population genetic study of *kdr*-mutations provides information on changes in the genetic structure of mosquito populations as a result of anthropogenic impact and may be useful for making epidemiological prediction for the prevalence of Dengue and Chikungunya fevers. Multiplex PCR is traditionally used to identify *kdr*-mutations in combination with sequencing of PCR fragments. We have developed a more productive method for identifying *kdr*-mutations based on the SNP polymorphism analysis in the *vgsc* gene and qPCR. We identified the *kdr*-mutation F1534C in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Ha Tinh province of Viet Nam. In *Aedes albopictus* populations from Viet Nam, this mutation was identified for the first time.

**Keywords:** Dengue Fever, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, pyrethroids, insecticide resistance, *kdr*-mutations, SNP.