



Идентификация и генотипирование вируса Чикунгунья с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Н.А. Нетесова¹, М.А. Абдурашитов², Т.Г. Самарцева³, О.В. Климович⁴,
А.С. Оксанич⁵, Е.В. Отрашевская³, Г.М. Игнатьев^{3,5}✉

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, АБК, к. 12а, Кольцово, Новосибирская область, 630559, Российская Федерация

² Общество с ограниченной ответственностью «СибЭнзайм», ул. Академика Тимакова, д. 2/12, г. Новосибирск, 630117, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Малый Казенный пер., д. 5а, Москва, 105064, Российская Федерация

⁴ Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», ул. Филимонова, д. 2, г. Минск, 220114, Республика Беларусь

⁵ Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства, ул. Свободы, д. 52, г. Красное Село, Санкт-Петербург, 198320, Российская Федерация

✉ Игнатьев Георгий Михайлович; marburgman@mail.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Генотипирование вируса Чикунгунья (ЧИКВ) проводится с помощью секвенирования участков генов белков E1, E2, nsP1 или всего генома вируса. Имеющиеся наборы реагентов или протокол проведения ПЦР не позволяют генотипировать ЧИКВ, а для секвенирования нуклеиновых кислот требуются дорогостоящее оборудование и материалы, что не всегда доступно. В связи с этим перспективным представляется применение более простого и экономичного метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), который не использовался ранее для определения генотипов ЧИКВ.

ЦЕЛЬ. Изучение возможности применения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов для идентификации и генотипирования вируса Чикунгунья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В экспериментальном исследовании использовали РНК штаммов ЧИКВ четырех генотипов: Азиатский (Asian), Западно-Африканский (WAg), Восточно-Центральный Южно-Африканский (ECSA) и Восточно-Центральный Южно-Африканский — линия Индийского океана (ECSA-IOL). Проводили полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с последующей рестрикцией и анализом длин рестрикционных фрагментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Установлено, что фрагмент гена nsP2 длиной 648 п.н. между позициями 3806 и 4453 содержит сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции PspEI, PvuII и DraI, наличие или отсутствие которых составляют различные комбинации и специфичны для каждого

из четырех генотипов ЧИКВ. Сконструированы праймеры, позволяющие амплифицировать выбранный участок гена, проведены ОТ-ПЦР и анализ ПДРФ.

ВЫВОДЫ. Для быстрого подтверждения подлинности вируса Чикунгунья и его генотипирования может быть успешно использован метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, который позволяет провести анализ в течение нескольких часов и в отсутствие высокотехнологичного оборудования.

Ключевые слова: вирус Чикунгунья; полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов; генотипирование

Для цитирования: Нетесова Н.А., Абдурашитов М.А., Самарцева Т.Г., Климович О.В., Оксанич А.С., Отрашевская Е.В., Игнатьев Г.М. Идентификация и генотипирование вируса Чикунгунья с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(3):270–278. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-559>

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 22-14-00184.

Потенциальный конфликт интересов. Г.М. Игнатьев — заместитель главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» (с 2024 г.). Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Identification and genotyping of Chikungunya virus using reverse transcription polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism methods

Nina A. Netesova¹, Murat A. Abdurashitov², Tatiana G. Samartseva³,
Olga V. Klimovich⁴, Alexey S. Oksanich³, Elena V. Otrashevskaya³,
George M. Ignatyev^{3,5} ✉

¹ State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", 12/A ABK, Koltsovo, Novosibirsk Region 630559, Russian Federation

² SibEnzyme Ltd, 2/12 Academician Timakov St., Novosibirsk 630117, Russian Federation

³ I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russian Federation

⁴ Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, 23 Filimonov St., Minsk 220114, Republic of Belarus

⁵ Saint Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations, 52 Svobody St., Krasnoe Selo, Saint Petersburg 198320, Russian Federation

✉ George M. Ignatyev; marburgman@mail.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Chikungunya virus (CHIKV) genotyping involves sequencing fractions of genes encoding E1, E2, and nsP1 proteins or the entire genome of the virus. Available reagent kits or polymerase chain reaction protocols cannot be used for CHIKV genotyping, and nucleic acid sequencing requires expensive equipment and materials, which are not always available. Therefore, it seems promising to use a simpler and more cost-effective restriction fragment length polymorphism (RFLP) method, which has not previously been used for CHIKV genotyping.

AIM. This study aimed to investigate the possibility of using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and RFLP for CHIKV identification and genotyping.

MATERIALS AND METHODS. The experimental study used RNA from CHIKV strains of four genotypes, including the Asian, West African (WAF), and East/Central/South African (ECSA) genotypes, and the Indian Ocean Lineage of the ECSA genotype (ECSA-IOL). The study used RT-PCR followed by DNA restriction and restriction fragment length analysis.

RESULTS. The nsP2 gene fragment of 648 bp in length (positions 3806 to 4453) contains recognition sites for the restriction endonucleases PspEI, PvuII, and DraI. The presence or absence of these sites generates a different combination specific to each of the four CHIKV genotypes. The authors designed primers for amplification of the selected gene region and performed RT-PCR and RFLP.

CONCLUSIONS. The RFLP method can be used for rapid CHIKV identification and genotyping. The method provides results within a few hours and does not require high-tech equipment.

Keywords: Chikungunya virus; reverse transcription polymerase chain reaction; restriction fragment length polymorphism; genotyping

For citation: Netesova N.A., Abdurashitov M.A., Samartseva T.G., Klimovich O.V., Oksanich A.S., Otrasevskaya E.V., Ignatyev G.M. Identification and genotyping of Chikungunya virus using reverse transcription polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism methods. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(3):270–278. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-559>

Funding. The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation under grant No. 22-14-00184.

Disclosure. G.M. Ignatyev has been a Deputy Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2024. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус Чикунгунья (ЧИКВ), переносчиком которого являются комары рода *Aedes*, распространенные в странах с тропическим и субтропическим климатом, вызывает одноименное заболевание — лихорадку Чикунгунья, характеризующуюся острой лихорадочной реакцией, сыпью, миалгией и артралгией с риском возможной хронизации [1, 2].

ЧИКВ относят к роду *Alphavirus*, семейству *Togaviridae*. Выделяют четыре генотипа вируса: Азиатский (Asian), Западно-Африканский (West African, WAF), Восточно-Центральный Южно-Африканский (East-Central-South African, ECSA) и Восточно-Центральный Южно-Африканский — линия Индийского океана (East-Central-South African — Indian Ocean Lineage, ECSA-IOL). Однако указанные генотипы не имеют четкой территориальной локализации, то есть на одной территории могут одновременно выявляться разные генотипы ЧИКВ [2–6]. Для детекции вируса в комарах или при лабораторном подтверждении клинического диагноза используют протокол, предложенный Центром по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), с использованием праймеров к различным участкам генов структурных белков E1, E2 и неструктурного белка nsP1 (non-structural protein 1) или коммерческих наборов реагентов для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени [2–10].

Генотипирование ЧИКВ проводится с помощью секвенирования участков генов, кодирующих белки E1, E2, реге nsP1, или секвенирования всего генома вируса [1–3, 6, 8, 9, 11, 12].

При эпидемиологическом исследовании важно определение генотипа штамма вируса для выявления места источника инфицирования. Имеющиеся наборы реагентов или протокол проведения ПЦР не позволяют генотипировать вирус, а для секвенирования нуклеиновых кислот требуются дорогостоящее оборудование и материалы, что не всегда доступно.

Ранее для парамиксовирусов (вирусы эпидемического паротита и кори) и вируса краснухи было показано применение метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) для генотипирования, вплоть до быстрого определения конкретного штамма вируса [13–15].

В связи с этим вероятно предположить, что метод ПДРФ может быть применен и для генотипирования вируса ЧИКВ, что проводится впервые.

Цель работы — изучение возможности применения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов для идентификации и генотипирования вируса Чикунгунья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования использовали РНК вирусов, относящихся к роду *Alphavirus* (ЧИКВ — по 3 штамма каждого из четырех

генотипов, которые были предварительно определены секвенированием: Asian, ECSA, ECSA-IOL, WAF; вирус венозного энцефаломиелита лошадей – 2 штамма; вирус Синдбис – 2 штамма) и семейству *Flaviviridae* (вирусы желтой лихорадки штамм 17D, денге 1–4 типов, японского энцефалита, Западного Нила, клещевого энцефалита – каждого по одному штамму).

Все работы проводили с соблюдением действующих санитарных норм. Штаммы, которые были использованы для получения РНК, находятся в коллекциях филиала ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России в Республике Никарагуа, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» и ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Выделение РНК из образцов проводили с использованием комплекта реагентов «АмплиСенс® Магно-Сорб» (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. Экстракцию РНК выполняли в 50 мкл элюирующего раствора и хранили образцы при минус 70 °С до дальнейшего использования.

Получение кДНК из препаратов РНК. Реакционная смесь при проведении ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в объеме 60 мкл имела следующий состав: 10-кратный SE буфер M-MuLV – 6 мкл, смесь дНТФ (40 мМ) – 0,6 мкл, M-MuLV ревертаза (50 ед/мкл) – 1,4 мкл, специфический обратный праймер (24 пкмоль) – 8 мкл, РНК образца – 16 мкл, H₂O – 28 мкл (все использованные реактивы производства ООО «СибЭнзайм», Россия). Реакцию осуществляли в течение 30 мин при 42 °С.

ПЦР-амплификация фрагментов ДНК длиной 648 п.н. проводилась в объеме 125 мкл. Данный объем реакционной смеси состоял из 25 мкл кДНК, специфических праймеров – по 5 мкл каждого (3 пкмоль/мкл), 12,5 мкл SE-буфера Tag ДНК полимеразы, 25 мкл Tag ДНК полимеразы (активность 5000 е.а./мл), смесь дНТФ (40 мМ) – 1,5 мкл, H₂O – 51 мкл (все использованные реактивы производства ООО «СибЭнзайм», Россия). Термоциклирование проводили в амплификаторе ДТпрайм 5М1 («ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: предварительный

прогрев при 95 °С – 90 с, далее 35 циклов амплификации (95 °С – 20 с, 55 °С – 40 с, 72 °С – 40 с), при 72 °С – 10 мин, хранение – 10 °С. При рестрикционном анализе гидролиз осуществляли эндонуклеазами рестрикции DraI, PvuII и PspEI (ООО «СибЭнзайм», Россия). К 25 мкл смеси ПЦР после амплификации добавляли 5 мкл буфера для рестрикции ROSE (ООО «СибЭнзайм», Россия) и 20 мкл H₂O, затем делили на две аликвоты по 25 мкл и к одной из них добавляли 1 мкл эндонуклеазы рестрикции. Вторую аликвоту использовали в качестве отрицательного контроля рестрикции. После инкубации в течение 1 ч при 37 °С продукты гидролиза разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия и визуализировали на трансиллюминаторе в проходящем ультрафиолетовом свете.

При проведении ПЦР в качестве положительного контроля использовали рекомбинантную плазмидную ДНК, содержащую последовательность гена nsP2 ЧИКВ (кат. № D-1652 АО БТК «Биосервис», Россия).

Компьютерные программы. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей ЧИКВ осуществляли с использованием программы MAFFT version 7¹. Конструирование олигонуклеотидных праймеров проводили с помощью программы OLIGO 4.0².

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор фрагмента вируса Чикунгунья, пригодного для определения генотипа методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Для ЧИКВ выбор фрагментов для дальнейшего использования метода ПДРФ осуществляли следующим образом:

- проводили множественное выравнивание 731 последовательности геномов ЧИКВ, для которых указан генотип в базе данных GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information)³;
- анализировали участки РНК, наиболее консервативные для каждого из четырех генотипов ЧИКВ;
- выбирали фрагмент, оптимальный для определения генотипа по наличию/отсутствию сайтов узнавания эндонуклеазами рестрикции;
- подбирали специфические последовательности прямого и обратного праймеров для амплификации выбранного участка в геномах ЧИКВ.

¹ <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>

² <https://www.oligo.net/>

³ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Таблица 1. Структура олигонуклеотидов для выявления РНК вируса Чикунгунья с помощью ПЦР с обратной транскрипцией
Table 1. Structure of oligonucleotides for Chikungunya virus detection using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Наименование <i>Definition</i>	Обозначение <i>Designation</i>	Последовательность (5'→3') <i>Sequence (5'→3')</i>	Координаты в геноме (относительно референсного генома NC_004162, GenBank) <i>Genomic coordinates (relative to the reference genome NC_004162, GenBank)</i>	Размер ПЦР-продукта (п.н.) <i>PCR product size (bp)</i>
Прямой праймер <i>Forward primer</i>	CHIC2d	GG(G/A)GG(T/A)GACTC(A/C)(T/C) TGAGACTGCTCA (25 н.) (25 b)	3806–3831	648
Обратный праймер <i>Reverse primer</i>	CHIC2r-2	GTT(C/T)A(G/A)TGA(C/T)TG(G/A) GT(C/T)AGCCT(G/A)TCTTT (27 н.) (27 b)	4426–4453	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Анализ нуклеотидных последовательностей геномов штаммов вируса Чикунгунья, представленных в базе данных GenBank, для дифференциации генотипов

Из базы данных GenBank были выбраны нуклеотидные последовательности всех генотипов ЧИКВ длиной не менее 10000 н. Всего рассмотрена 731 нуклеотидная последовательность. В результате было установлено, что фрагмент гена неструктурного белка 2 (nsP2) длиной 648 н. между позициями 3806 и 4453 (относительно референсного генома ЧИКВ, GenBank NC_004162⁴) содержит сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции, наличие или отсутствие которых составляют различные комбинации для каждого из 4-х генотипов ЧИКВ. Из-за вариабельности структур РНК данного фрагмента были подобраны праймеры с вырождением, позволяющие амплифицировать целевой участок генома всех рассмотренных штаммов ЧИКВ путем проведения ОТ-ПЦР (табл. 1).

Анализ нуклеотидных последовательностей с помощью метода множественного выравнивания позволил установить, что в выбранном фрагменте гена nsP2 в зависимости от генотипа вируса могут содержаться сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции PspEI, PvuII и DraI (рис. 1, табл. 2).

Сайты рестрикции PspEI, PvuII и DraI не одинаково представлены у разных генотипов ЧИКВ (табл. 2). В позиции 350 данного фрагмента в случае штаммов генотипов Asian, ECSA и ESCA-IOL находится последовательность GGTACC, которая расщепляется рестриктазой PspEI (сайт узнавания GGTTACC) и отсутствует у штаммов генотипа Waf. При этом у штаммов генотипа ESCA-IOL в позиции 252 обнаружена единичная нуклеотидная замена цитозина (C) на тимин (T), что привело к образованию второго сайта узнавания рестриктазой PspEI. Таким образом,

расщепление ПЦР-продукта ферментом PspEI в случае штаммов генотипов Asian и ECSA должно привести к образованию двух фрагментов длиной 350 и 298 п.н., а для ESCA-IOL – к образованию трех фрагментов длиной 298, 252 и 98 п.н. В то же время расщепление ПЦР-продукта рестриктазой PspEI для штамма Waf не должно происходить. При анализе штаммов генотипов Waf, ECSA и ESCA-IOL обнаружена замена в положении 527 гуанина (G) на аденин (A), которая приводит к образованию последовательности CAGCTG и сайта узнавания для рестриктазы PvuII. При этом для генотипа Waf в результате замены A в позиции 226 на гуанин G в ДНК-фрагменте появляется еще один сайт узнавания PvuII. Генотип Asian не содержит сайтов узнавания PvuII. Таким образом, в случае штаммов Asian ПЦР-фрагмент гена nsP2 длиной 648 н. не может расщепляться PvuII, а для штаммов ECSA и ESCA-IOL гидролиз PvuII должен привести к образованию двух фрагментов длиной 527 и 121 п.н. В случае штаммов генотипа Waf ожидается образование трех фрагментов длиной 301, 226 и 121 п.н.

В геномах некоторых анализированных штаммов ЧИКВ генотипа ECSA (включая референсный NC_004162, GenBank) сайт PvuII в позиции 527 отсутствует. В этом случае различие генотипов ECSA и Asian может быть установлено с помощью расщепления ампликона ферментом DraI. Анализ методом множественного выравнивания позволил установить, что в позиции 403 данного фрагмента генотипа Asian находится сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции DraI, что должно привести к разделению ПЦР-продукта на два фрагмента – длиной 403 и 245 п.н. В случае трех других генотипов ЧИКВ в ДНК-фрагменте в позиции 408 вместо А находится G, в связи с чем ПЦР-продукт не может расщепляться эндонуклеазой рестрикции DraI.

⁴ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_004162.2

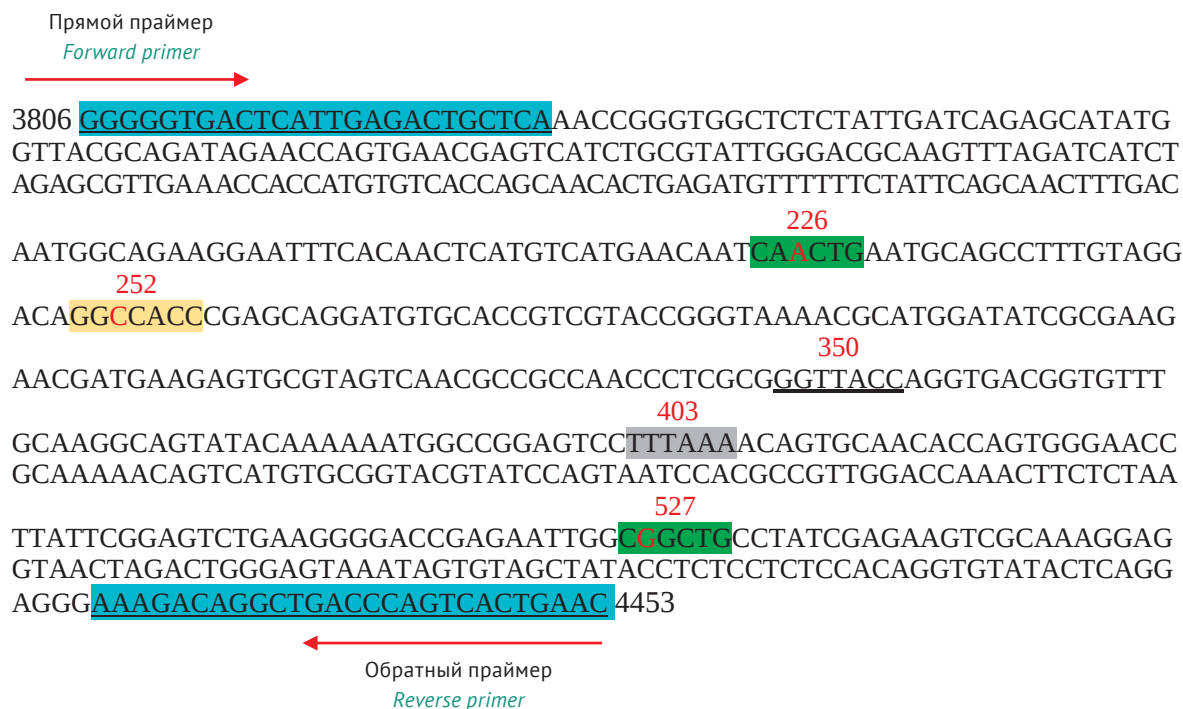


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Расположение сайтов рестрикции в выбранном фрагменте гена nsP2 вируса Чикунгунья (сконструированный участок генома всех штаммов).

Fig. 1. Restriction site location in the selected nsP2 gene fragment of Chikungunya virus (genome segment assembled for all the study strains).

Примечание. Сайты узнавания для рестриктаз: PspEI – GGtNACC; DraI – TTTAAa; PvuII – CAgCTG. Красным цветом отмечена замена нуклеотида в сайте рестрикции.

Note. Recognition sites for the restriction enzymes: PspEI, GGtNACC; DraI, TTTAAa; PvuII, CAgCTG. Nucleotide substitutions at the restriction sites are marked in red.

Таблица 2. Расчетная длина фрагментов рестрикции при типировании вируса Чикунгунья (ЧИКВ) методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Table 2. Estimated restriction fragment lengths in Chikungunya virus (CHIKV) typing by the restriction fragment length polymorphism method

Генотип ЧИКВ CHIKV genotype	Количество / ожидаемая длина фрагментов рестрикции (п.н.) Number / estimated length of restriction fragments (bp)		
	PspEI	PvuII	DraI
Waf	Один/648 <i>One/648</i>	Три/301; 226; 121 <i>Three/301; 226; 121</i>	Один/648 <i>One/648</i>
Asian	Два/350; 298 <i>Two/350; 298</i>	Один/648 <i>One/648</i>	Два/403; 245 <i>Two/403; 245</i>
ECSA	Два/350; 298 <i>Two/350; 298</i>	Два/527; 121* <i>Two/527; 121*</i>	Один/648 <i>One/648</i>
ECSA-IOL	Три/298; 252; 98 <i>Three/298; 252; 98</i>	Два/527; 121 <i>Two/527; 121</i>	Один/648 <i>One/648</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. Генотипы ЧИКВ: Азиатский (Asian), Западно-Африканский (West African, Waf), Восточно-Центральный Южно-Африканский (East-Central-South African, ECSA) и Восточно-Центральный Южно-Африканский – линия Индийского океана (East-Central-South African – Indian Ocean Lineage, ECSA-IOL).

* сайт PvuII в позиции 527 в геномах некоторых штаммов генотипа ECSA (включая референсный NC_004162, GenBank) может отсутствовать.

Note. CHIKV genotypes: Asian; Waf, West African; ECSA, East/Central/South African; ECSA-IOL, ECSA Indian Ocean Lineage.

* There may be no PvuII site at position 527 in the genomes of some ECSA strains (including the reference genome NC_004162, GenBank).

Как следует из представленных в *таблице 2* обобщенных данных, эндонуклеазы рестрикции PvuII и PspEI могут быть использованы для генотипирования ЧИКВ методом ПДРФ, а фермент DraI — для дифференциации генотипов ECSA и Asian.

Оценка специфичности праймеров

Для определения специфичности выбранных праймеров проводили ОТ-ПЦР с контрольной рекомбинантной плазмидой, несущей последовательность гена nsP2 вируса Чикунгунья. В ходе реакции был амплифицирован фрагмент длиной, соответствующей расчетной, — 648 п.н. При проведении ОТ-ПЦР с использованием в качестве матрицы РНК гетерологичных вирусов (раздел «Материалы и методы») продукт амплификации выявлен не был. Напротив, при постановке ОТ-ПЦР с РНК ЧИКВ всех четырех генотипов амплифицирован фрагмент длиной, соответствующей расчетной, что свидетельствовало о специфичности выбранных праймеров в отношении всех существующих генотипов ЧИКВ.

Результаты ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией эндонуклеазами PspEI, PvuII и DraI

Для апробации разработанного способа типирования ЧИКВ на основе ОТ-ПЦР и метода ПДРФ была использована РНК штаммов, относящихся к разным генотипам. При проведении гидролиза

фрагмента гена nsP2 размером 648 п.н. с использованием эндонуклеаз рестрикции PspEI и PvuII в зависимости от генотипа ЧИКВ были получены фрагменты длиной, соответствующей расчетной (*рис. 2*).

Результаты рестрикции (*рис. 2*) четко визуализировались при электрофоретической детекции. При этом в случае штамма ЧИКВ генотипа Waf амплифицируемый фрагмент не расщеплялся рестриктазой PspEI, но при гидролизе рестриктазой PvuII образовывал три фрагмента, что соответствует двум сайтам рестрикции. Это позволило дифференцировать генотип Waf от других генотипов. В случае генотипа Asian исследуемый фрагмент не имел сайтов рестрикции PvuII, что в большинстве случаев позволяло отличить его от генотипа ECSA. Анализ ПЦР-продуктов генотипов ECSA и ECSA-IOL показал наличие одинаковых фрагментов при рестрикции ферментом PvuII, но при этом имелись четкие отличия при расщеплении рестриктазой PspEI.

Для дифференциации генотипов ECSA и Asian при проведении гидролиза фрагмента гена nsP2 размером 648 п.н. была использована эндонуклеаза DraI.

Анализ результатов (*рис. 3*) свидетельствует о том, что при проведении реакции были получены фрагменты длиной, соответствующей расчетной. В случае генотипов Asian и ECSA рестриктаза PspEI расщепляла ампликон на два

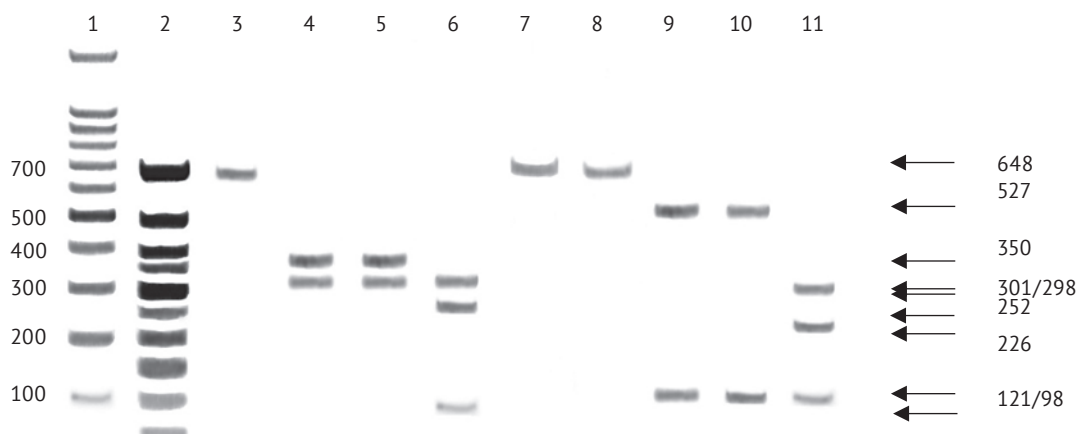


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Результаты электрофоретической детекции ПЦР-фрагментов гена nsP2 штаммов вируса Чикунгунья (ЧИКВ) разных генотипов, полученных после гидролиза при использовании рестриктаз PspEI и PvuII. Дорожки на электрофореграмме: 1, 2 — маркеры молекулярного веса; 3 — амплифицированный фрагмент гена nsP2 ЧИКВ (расчетная длина 648 п.н.); 4–7 — фрагменты после рестрикции эндонуклеазой PspEI последовательностей штаммов, относящихся к генотипам: Азиатский (Asian) — 4, Восточно-Центральный Южно-Африканский (ECSA) — 5, ECSA линия Индийского океана (ECSA-IOL) — 6, Западно-Африканский (Waf) — 7; 8–11 — фрагменты после рестрикции эндонуклеазой PvuII последовательностей штаммов генотипов: Asian — 8, ECSA — 9, ECSA-IOL — 10, Waf — 11.

Fig. 2. Electrophoretic detection results for PCR fragments of the nsP2 gene of Chikungunya virus (CHIKV) strains of different genotypes, obtained upon hydrolysis with the restriction endonucleases PspEI and PvuII. Electropherogram lanes: 1–2, molecular weight markers; 3, amplified CHIKV nsP2 gene fragment (estimated length: 648 bp); 4–7, fragments of CHIKV genotypes restricted by PspEI (4, Asian; 5, East/Central/South African (ECSA); 6, ESCA Indian Ocean Lineage (ECSA-IOL); 7, West African (Waf)); 8–11, DNA fragments of CHIKV genotypes restricted by PvuII (8, Asian; 9, ECSA; 10, ECSA-IOL; 11, Waf).

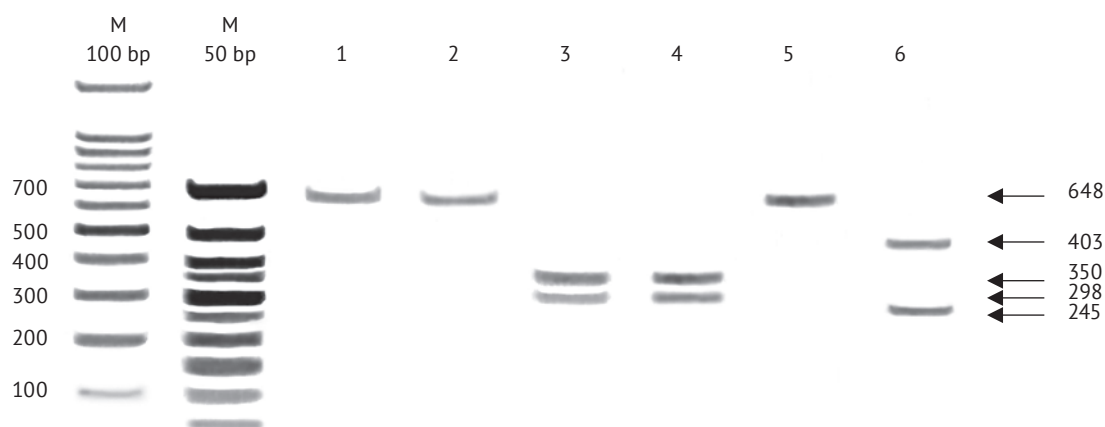


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Результаты электрофоретической детекции ДНК-фрагментов гена nsP2 штаммов вируса Чикунгунья (ЧИКВ) генотипов Азиатский (Asian) и Восточно-Центральный Южно-Африканский (ECSA), полученных после гидролиза при использовании рестриктаз PspEI и DraI. Дорожки на электрофореграмме: 1, 2 – амплифицированный фрагмент гена nsP2 ЧИКВ (расчетная длина 648 п.н.) генотипа Asian (1), генотипа ECSA (2); 3, 4 – ДНК-фрагменты после рестрикции эндонуклеазой PspEI последовательностей штаммов генотипов: Asian (3), ECSA (4); 5, 6 – ДНК-фрагменты после рестрикции эндонуклеазой DraI последовательностей штаммов генотипов: ECSA (5), Asian (6).

Fig. 3. Electrophoretic detection results for DNA fragments of the nsP2 gene of Chikungunya virus (CHIKV) strains of Asian and East/Central/South African (ECSA) genotypes, obtained upon hydrolysis with the restriction endonucleases PspEI and DraI. Electropherogram lanes: 1–2, amplified CHIKV nsP2 gene fragments (estimated length: 648 bp) (1, Asian; 2, ECSA); 3–4, DNA fragments of CHIKV strain genotypes restricted by PspEI (3, Asian; 4, ECSA); 5–6, DNA fragments of CHIKV strain genotypes restricted by DraI (5, ECSA; 6, Asian).

фрагмента – 350 и 298 п.н. В то же время в случае генотипа ECSA амплифицированный фрагмент не гидролизировался эндонуклеазой рестрикции DraI, а при анализе генотипа Asian показано расщепление ПЦР-продукта с образованием двух фрагментов, длины которых соответствовали расчетным – 403 и 245 п.н. Таким образом, метод ПДРФ позволил провести дифференциацию между всеми изученными генотипами ЧИКВ, и результаты рестрикционного анализа совпали с данными, полученными путем секвенирования, которое было осуществлено ранее.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе результаты продемонстрировали, что в гене неструктурного

белка nsP2 ЧИКВ находится фрагмент, имеющий сайты эндонуклеаз рестрикции, комбинация которых специфична для каждого генотипа вируса. Теоретически предсказано и экспериментально подтверждено, что метод ПЦР с обратной транскрипцией и последующий анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов позволяют провести определение генотипа вируса Чикунгунья. Исследование не требует продолжительного времени и использования высокотехнологического оборудования. Полученные результаты в перспективе могут быть использованы для идентификации и генотипирования при исследовании биологического материала, подозрительного на наличие возбудителя лихорадки Чикунгунья.

Литература/References

- Burt FJ, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(4):e107–17. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(16\)30385-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(16)30385-1)
- Simo FBN, Burt FJ, Makoah NA. Chikungunya virus diagnosis: a review of current antigen detection methods. *Trop Med Infect Dis.* 2023;8(7):365. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8070365>
- Cunha MS, Costa PAG, Correa IA, de Souza MRM, Calil PT, Duarte da Silva GP, et al. Chikungunya virus: an emergent arbovirus to the South American continent and a continuous threat to the world. *Front Microbiol.* 2020;11:1297. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01297>
- Tanabe ELL, Tanabe ISB, Santos ECD, Marques JPDS, Borges AA, Lima MC, et al. Report of East-Central South African Chikungunya virus genotype during the 2016 outbreak in the Alagoas State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2018;60:e19. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201860019>
- Panning M, Grywna K, Van Esbroeck M, Emmerich P, Drosten C. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(3):416–22. <https://doi.org/10.3201/eid1403.070906>
- Lessa-Aquino C, Trinta KS, Pestana CP, Ribeiro MO, Supura MVF, Boia MN, et al. Detection of East/Central/South African genotype Chikungunya virus during an outbreak in a southeastern state of Brazil. *Epidemiol Infect.* 2018;146(16):2056–58. <https://doi.org/10.1017/s0950268818002467>
- Vega-Rua A, Zouache K, Caro V, Diancourt L, Delaunay P, Grandadam M, et al. High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit Chikungunya and dengue viruses in

- the Southeast of France. *PLoS One*. 2013;8(3):e59716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059716>
8. Mattar S, Miranda J, Pinzon H, Tique V, Bolanos A, Aponte J, et al. Outbreak of Chikungunya virus in the north Caribbean area of Colombia: clinical presentation and phylogenetic analysis. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(10):1126–32. <https://doi.org/10.3855/jidc.6670>
 9. Johnson BW, Russell BJ, Goodman CH. Laboratory diagnosis of Chikungunya virus infections and commercial sources for diagnostic assays. *J Infect Dis*. 2016;214(suppl 5):S471–4. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw274>
 10. Waggoner JJ, Ballesteros G, Gresh L, Mohamed-Hadley A, Tellez Y, Sahoo MK, et al. Clinical evaluation of a single-reaction real-time RT-PCR for pan-dengue and Chikungunya virus detection. *J Clin Virol*. 2016;78:57–61. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.01.007>
 11. Carletti F, Bordin L, Chiappini R, Ippolito G, Sciarone MR, Capobianchi MR, et al. Rapid detection and quantification of Chikungunya virus by a one-step reverse transcription polymerase chain reaction real-time assay. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77(3):521–4. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.521>
 12. Cecilia D, Kakade M, Alagarasu K, Patil J, Salunke A, Parashar D, Shah PS. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of dengue and Chikungunya viruses. *Arch Virol*. 2015;160(1):323–7. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2217-x>
 13. Кулак МВ, Белафин ПА, Нетесова НА, Юнасова ТН, Голикова ЛН, Бектемиров ТА, Игнатьев ГМ. Дифференциация вакцинного штамма Л-3 от других штаммов вируса паротита методом ОТ-ПЦР. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2008;(4):7–10. Kulak MV, Belavin PA, Netesova NA, Yunasova TN, Golikova LN, Bektemirov TA, Ignatyev GM. Differentiation of the vaccine strain L-3 from other strains of the mumps virus by RT-PCR. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2008;(4):7–10 (In Russ.). EDN: SATPMF
 14. Игнатьев ГМ, Отрашевская ЕВ, Суханова ЛЛ, Сидоренко ЕС, Нетесова НА. Молекулярно-генетическое исследование штамма RA-27/3, используемого для производства вакцины против краснухи. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;96(4):38–46. Ignatyev GM, Atrashevskaya EV, Suchanova LL, Sidorenko ES, Netesova NA. Molecular-genetic study of the RA-27/3 strain used for the production of rubella vaccine. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;96(4):38–46 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-4-38-46>
 15. Игнатьев ГМ, Отрашевская ЕВ, Суханова ЛЛ, Сидоренко ЕС, Нетесова НА. Молекулярно-генетическое исследование штамма Ленинград-16, используемого для производства вакцины кори. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;(2):182–9. Ignatyev GM, Atrashevskaya AV, Sukhanova LL, Sidorenko ES, Netesova NA. Molecular genetic analysis of the strain Leningrad-16 used for the production of measles vaccine. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;(2):182–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-182-189>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Н.А. Нетесова** — обоснование концепции исследования, формулирование идеи, обобщение результатов исследования, критический пересмотр текста рукописи; **М.А. Абдурашитов** — создание модели исследования, анализ и обобщение данных литературы, расчет праймеров, критический пересмотр текста рукописи; **Т.Г. Самарцева** — подготовка образцов, проведение экспериментов, написание текста рукописи; **О.В. Климович** — подготовка образцов, проведение экспериментов; **А.С. Оксанич** — планирование исследования, редактирование текста рукописи; **Е.В. Отрашевская** — обобщение результатов исследования, редактирование текста рукописи; **Г.М. Игнатьев** — обоснование концепции исследования, планирование исследования, проведение экспериментов, написание текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **N.A. Netesova** substantiated the study concept, formulated the study idea, summarised the study results, and critically revised the manuscript. **M.A. Abdurashitov** created the research model, analysed and summarised literature data, calculated the primers, and critically revised the manuscript. **T.G. Samartseva** prepared samples, conducted experiments, and drafted the manuscript. **O.V. Klimovich** prepared samples and conducted experiments. **A.S. Oksanich** planned the study and edited the manuscript. **E.V. Otrashesvskaya** summarised the study results and edited the manuscript. **G.M. Ignatyev** substantiated the study concept, planned the study, conducted experiments, and drafted the manuscript.

Об авторах / Authors

Нетесова Нина Александровна, д-р биол. наук / **Nina A. Netesova**, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9896-5403>

Абдурашитов Мурат Абдурашитович, канд. биол. наук / **Murat A. Abdurashitov**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9402-5254>

Самарцева Татьяна Геннадьевна / **Tatiana G. Samartseva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

Климович Ольга Викторовна / **Olga V. Klimovich**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7842-2532>

Оксанич Алексей Сергеевич, канд. биол. наук / **Alexey S. Oksanich**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>

Отрашевская Елена Викторовна / **Elena V. Otrashesvskaya**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф. / **George M. Ignatyev**, Dr. Sci. (Med.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Поступила 27.12.2023

После доработки 03.04.2024

Принята к публикации 16.05.2024

Online first 17.05.2024

Received 27 December 2023

Revised 3 April 2024

Accepted 16 May 2024

Online first 17 May 2024