

«Сейфуллин окулары – 18(2): «XXI ғасыр ғылыми - трансформация дәуірі» халықаралық ғылыми - практикалық конференция материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения - 18(2): «Наука XXI века - эпоха трансформации». - 2022.- Т.І, Ч.ІІ.- С. 199-201.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСА БЕШЕНСТВА

*Абенова А.Ж., докторант 3 – го курса
Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина, г. Астана*

Распространение бешенства среди животных является одним из важнейших международных критериев оценки биологической и экологической безопасности среды обитания человека. В мире от бешенства ежегодно умирает от 55 до 70 тысяч человек, половина из которых - дети, и до 6,5 миллионов человек подвергаются постконтактному антирабическому лечению[1].

Анализ нуклеотидных последовательностей позволит выяснить эволюционную историю вируса бешенства, циркулирующего на территории Республики Казахстан, идентифицировать геноварианты возбудителя, определить время расхождения разных эволюционных ветвей вируса бешенства. Такой подход может улучшить эпидемиологический надзор за заражением бешенством, обеспечить лучшее понимание динамики распространения бешенства и дать четкое представление.

Материалы исследования. Материалом для проекта послужили образцы мозга различных видов сельскохозяйственных, домашних и диких животных. Биологический материал отбирали у животных с клиническими признаками, характерными для бешенства. Формирование коллекции биологических образцов с вирусосодержащим материалом включает следующие этапы: сбор биологического материала и его транспортировка в лабораторию; приготовление мозговых суспензий и их аликвация; замораживание не менее двух суспензий при температуре минус 70°С; использование одной суспензии для выделения РНК и верификация диагноза.

Методы исследования:Наличие вируса было установлено методом ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием коммерческого набора «Набор для определения РНК вируса бешенства, полностью оборудованный», производства FractalBio, Россия, в соответствии с инструкциями производителя. Общую РНК выделяли из 10% суспензии головного мозга на PBS, приготовленной в электромеханическом гомогенизаторе TissueLyserLT (Qiagen) с использованием коммерческого набора «FBioNucleo» для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала, производства FractalBio, Россия, согласно инструкциям производителя. Образцы РНК хранили в низкотемпературной морозильной камере при температуре минус 70°С до начала исследования[2, 3].

Амплификацию кодирующей части генома вируса бешенства проводили с помощью двух пулов праймеров в одноэтапной ОТ-ПЦР. Термоциклирование проводили на Mastercycler Pro S (Эппендорф, Германия).

После амплификации 5 мкл использовали для электрофореза, после визуального подтверждения присутствия продуктов ПЦР продукты смешивали пропорционально и очищали с помощью 1 × гранулы Agencourt AMPure XP. Очищенные продукты ПЦР использовали для подготовки библиотеки.

Концевой фрагмент генома амплифицировали с помощью праймеров Rab-for_10950 cataattgtgacgcagaagttactgacat и Rab-rev_12040 cataattgtgacgcagaagttactgacat, дополнительно секвенировали с использованием набора для циклического секвенирования BigDyeTerminatorv3.1 (Applied Biosystems) с последующим секвенированием на автоматическом генетическом анализаторе 3730xIDNAAnalyzer (Applied Biosystems).

Подготовку библиотеки проводили с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК Nextera® XT (FC-131-1024, Illumina, США) в соответствии с инструкциями производителя. Секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina, США) с использованием химических реагентов MiSeq Reagent Kit v3, 600 циклов PE (MS-102-3003, Illumina, США).

Оценка исходных данных секвенирования всего генома проводилась с использованием программ FastQC v0.11.7 и Multiqc v1.8. Необработанные данные были обрезаны с использованием программ Seqtk v1.3-r106 и Sickle v1.33. Чтобы идентифицировать филогенетически близкие последовательности, короткие считывания были собраны в контиги с использованием программы SPAdes v3.15.3 с длиной k-mers 127 и опцией «--осторожно». Далее, контиги были идентифицированы в ресурсе BLAST с использованием базы данных Nucleotide collection (nt) с фильтрацией по таксонам вируса бешенства (taxid:11292). В результате были идентифицированы 4 эталонных генома: KT728349.1, LN879480.1, KX148159.1 и KP997032.1[4].

Сопоставление (выравнивание) считываний осуществлялось с использованием программы BWA v0.7.17-r1188 с соответствующими эталонными последовательностями. Варианты были идентифицированы, и консенсусные последовательности были сгенерированы FreeBayes v1.3.6 и VCFtools v1.15.1 соответственно [5,6,7].

Аннотацию консенсусных последовательностей проводили с использованием VADR v1.4.1 с использованием соответствующих эталонных последовательностей (KT728349.1, LN879480.1, KX148159.1 и KP997032.1).

Результаты исследования. Бешенство было подтверждено прямым флуоресцентным тестом на антитела (FAT). Тотальная РНК из головного мозга была выделена из 10% суспензии на PBS, приготовленной в TissueLyserLT (Qiagen) набором RNeasyMiniKit (Qiagen).

Кодирующая часть генома была амплифицирована двумя пулами праймеров с использованием BioMasterRT-PCR-Extra (Biolabmix, Russia). После амплификации пулы пропорционально смешивались, очищались с использованием 1×AgencourtAMPureXPbead и использовались для подготовки библиотек с Nextera® XT DNA Library Preparation Kit (FC-131-1024, Illumina, USA), в соответствии с инструкциями производителя. Секвенирование проводилось на платформе MiSeq (Illumina, USA) с использованием химических реагентов MiSeq Reagent Kit v3, 600 Cycles PE (MS-102-3003, Illumina, USA).

Контроль качества проводился программой FastQC v0.11.9 (7). На каждый образец было получено от 300256 до 605538 ридов. Обрезка сырых данных проводилась с использованием программ Seqtk v1.3-r106 (8) и Sicklev1.33 (9). Сборка геномов *denovo* проводилась, используя программу SPAdes v 3.15.4 (10) с длиной *k*-меров 127 и опцией «--careful». Далее, для определения филогенетически близкой по нуклеотидной последовательности, полученные контиги идентифицировались в ресурсе BLAST. Последовательность с номером доступа KP997032.1 была взята в качестве референсного генома из Атырауской области. В связи с неэффективной амплификацией, часть кодирующей последовательности гена L (от 11183 до 11767) была секвенирована с BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Консенсусы, полученные платформами Illumina и Sanger, были объединены. Филогенетический анализ геномов проводился в ресурсе RABV-GLUE (<http://rabv-glue.cvr.gla.ac.uk/>). Аннотирование геномов проводилось программой VADR v1.4.1 (12).

Выводы. В заключении, образцы из Атырауской области Rab-1-4, Rab-35-1-4 и Rab-35-2-4 оказались идентичными между собой, идентичность образцов Rab-7-4 и Rab-8-4 оказалось 100%. В результате генотипирования выяснилось, что все изоляты принадлежат к кладу Cosmopolitan CA1, и максимально идентичны последовательностям: KP997032.1 (Россия, Приморский край) на 99,36%, KC595280.1 (Россия, Липецкая область) на 98,81%, и MF197741.1 (Польша, Подляское воеводство) на 98,46%.

Список использованной литературы

1. Султанов А.А. Методические рекомендации по организации профилактических и противоэпизоотических мероприятий против бешенства [Текст] / А.А. Султанов, С.К. Абдрахманов, Л.Б. Кутумбетов, К.К. Бейсембаев, Е.Е. Муханбеткалиев, Г.Н. Есембекова, Д.Б. Кушубаев // КазНИВИ, КАТУ им. С.Сейфуллина. - Астана, 2015. - 29 с.
2. Абдрахманов С.К. Ретроспективный анализ эпизоотической ситуации рабической инфекции в Казахстане [Текст] / С.К. Абдрахманов, К.К. Бейсембаев, А. Байказанов, Г.Н. Есембекова, К. Есенбаев // Многопрофильный научный журнал Костанайского государственного университета им. А. Байтурсынова «Zi: intellect, idea, innovation – интеллект, идея, инновация», -2016. -№1. – С. 6-11.

3. Abdrakhmanov S.K. Revealing spatio-temporal patterns of rabies spread among various categories of animals in the Republic of Kazakhstan, 2010-2013 [Текст] / S.K. Abdrakhmanov, K.K. Beisembayev, F.I. Korennoy, G.N.Yessembekova, D.B. Kushubaev - Geospatial Health. - 2016.Vol11:455.- P.199-205. (ThomsonReuters, JournalImpactFactor (2014) – 1,194).
4. Абдрахманов С.К. Пространственно-временной анализ эпизоотической ситуации по бешенству в РК [Текст] / С.К. Абдрахманов, К.К. Бейсембаев, Г.Н. Есембекова- Материалы Международной научно-практ. Конференции, посвященной 70-летию Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института. - 2016. - С.269-273.
5. Абдрахманов С.К. Организация профилактических мероприятий против бешенства в РК и странах ЕС [Текст] / С.К. Абдрахманов, Т. Якубовский, К.К. Бейсембаев, Г.Н. Есембекова // Материалы международной научно-практической конференции посвященной «Ветеринария в XXI веке – проблемы, методы, решения», посвященная 100-летию со дня рождения профессора Кадырова Н.Т. Астана: КАТУ им. С.Сейфуллина». - 2016. - С.25-29.
6. Абдрахманов С.К. Сравнительная оценка проводимых профилактических мероприятий против бешенства в странах ЕС и РК [Текст] / С.К. Абдрахманов, Т. Якубовский, К.К. Бейсембаев, Г.Н. Есембекова - Вестник СГУ им.Шакарима. - 2016. - №4(76). Т 2. – С. 27-31.
7. Abdrakhmanov S.K. The veterinary and geographical analysis of rabies spread and forecast in Kazakhstan [Текст] / S.K. Abdrakhmanov, T. Jakubowski, D.B. Kushubayev, G.N. Yessembekova // Вестник Науки КАТУ им. С.Сейфуллина (междисциплинарный). - 2017. № 1(92). - С.80-89.