

АННОТАЦИЯ

на диссертационную работу Эбеновой Эсем Жандарбековны на тему: «Молекулярно-генетический анализ штаммов вируса бешенства, циркулирующих в Казахстане» на соискание степени доктора философии PhD по образовательной программе 8D09101 - Ветеринарное благополучие животных.

Актуальность темы. Бешенство – это природно - очаговое, особо опасное, смертельное инфекционное заболевание, вызываемое вирусом бешенства (*Rabies virus*), относящимся к роду *Lyssavirus* и семейству *Rhabdoviridae* [1].

Бешенство является вирусным заболеванием, встречающимся более чем в 150 странах и территориях мира. По данным Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН, ежегодно оно становится причиной примерно 55 000 смертей людей, из которых 95 процентов приходится на страны Африки и Азии. Недостаточность статистических данных указывает на то, что фактический масштаб этого показателя может быть выше.

Бешенство – это смертельное вирусное зоонозное заболевание, передающееся человеку преимущественно через укусы инфицированных животных. Заболевание протекает в форме нейроэнцефалита, характеризующегося 100% летальностью после появления клинических признаков. Ежегодно в мире от бешенства погибает более 55 000 человек и более 1 миллиона животных. Прямые экономические потери от бешенства ежегодно превышают 4 миллиарда евро.

Как и во многих эндемичных странах, на территории Казахстан ежегодно регистрируется бешенство среди животных. При этом проводятся программы вакцинации домашних собак и кошек, а также сельскохозяйственных животных, а также ограниченная программа вакцинации лисиц путем распространения приманок, пропитанных вакциной. Однако снижения заболеваемости среди животных не наблюдается. В связи с этим одной из целей данного исследования стало более глубокое понимание эпидемиологии бешенства в стране путем изучения его географического распространения среди животных и оценка мер борьбы [2].

Эпизоотологическая ситуация по бешенству в Казахстане остается важной социальной и экономической проблемой. В 2019 году было зарегистрировано 58 очагов, в 2020 году – 124 очага, а за первые восемь месяцев 2021 года выявлено 71 очаг. По состоянию на 31 декабря 2020 года всего зарегистрирован 131 очаг, из которых семь сохранялись без ликвидации с 2019 года. Шестьдесят пять процентов очагов приходятся на четыре из пятнадцати областей: Туркестанскую (38), Восточно-Казахстанскую (22), Павлодарскую (14) и Западно-Казахстанскую (11) области. Эти регионы на протяжении десятилетий остаются эпизоотологически неблагополучными по бешенству: в период с 2013 по

2020 годы 45 процентов всех очагов бешенства в республике было зарегистрировано именно в этих регионах.

Социальная опасность бешенства требует постоянного контроля эпизоотологической ситуации и проведения точного мониторинга. Полноценные эпизоотологические данные имеют важное значение для своевременного принятия неотложных профилактических мер. Поскольку особенности распространения болезни в различных очагах во многом связаны со свойствами изолятов вируса, эффективность ветеринарных мероприятий зависит от эпизоотологического мониторинга и глубокого анализа свойств вирусных изолятов.

Однако, несмотря на то что эпизоотические показатели характеризуют скорость распространения болезни, для точного определения происхождения и путей передачи инфекции необходимы молекулярно-генетические исследования.

В Казахстане молекулярно-генетические и антигенные особенности вируса бешенства систематически не изучались в полном геномном масштабе. Впервые для ряда изолятов вируса бешенства, выделенных от животных на территории Казахстана, были определены полные геномные нуклеотидные последовательности. Ранее проведенные исследования в основном были направлены на совершенствование профилактических мер и диагностических тест-систем. Значимость этих исследований высока, поскольку методы генотипирования вируса становятся ключевым элементом совершенствования стратегии профилактики бешенства.

Анализ нуклеотидных последовательностей позволяет определить эволюционную историю вируса, его генетические варианты и сроки распространения. Такой подход усиливает эпизоотический контроль и открывает возможность более глубокого понимания динамики распространения заболевания.

Исследование, проведенное в 2020 – 2022 годах, предоставило полные данные о географическом распределении образцов, полученных от животных, зараженных бешенством в Казахстане, нуклеотидных последовательностях вирусных изолятов и их генетических различиях. Кроме того, были определены филогенетические связи с изолятами из соседних стран.

Таким образом, недостаточность данных, характеризующих генетическое разнообразие вируса бешенства на территории Казахстана, определяет актуальность исследований в данном направлении. Полученные генетические данные позволяют совершенствовать эпизоотологический мониторинг, уточнять пути распространения заболевания и научно обоснованно оптимизировать программы профилактики бешенства.

Основной **целью** исследования является молекулярно - генетическая характеристика штаммов *Rabies lyssavirus*, изолированных на территории Казахстана, и оценка их генетического соответствия циркулирующим штаммам.

Для достижения поставленной цели были определены следующие научные задачи:

1. Сбор образцов для синтеза кДНК штаммов *Rabies lyssavirus*.
2. Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов, относящихся к генам *N* и *G* вируса бешенства.
3. Проведение генотипического и филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей изолятов вируса, полученных из различных регионов Казахстана, определение их генетических взаимосвязей и построение дендрограмм.
4. Формирование базы данных, включающей изоляты *Rabies lyssavirus*, на основе полученных геномных и частичных геномных нуклеотидных последовательностей.

Материалы исследования. Исследование проводилось в 2020–2022 годах в рамках научного проекта «Молекулярно-биологический анализ вируса бешенства, циркулирующего на территории Республики Казахстан» (AP08053353), 2023 – 2025 годах в рамках проекта AP19679670 «Совершенствование профилактических мероприятий против инфекционных болезней животных (на примере бешенства), на основе применения информационно-коммуникационных технологий». В качестве исследовательского материала использованы 117 образцов мозга, полученных от животных с клиническим подозрением на бешенство, собранных в различных регионах Казахстана в период 2020–2022 годов. Образцы были получены от лисиц, волков, собак, кошек, крупного рогатого скота, мелкого рогатого скота и лошадей.

Эпизоотологическая оценка инфекционной ситуации, картографический и статистический анализ проводились на кафедре «Ветеринарная санитария» Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина. Выделение вирусной РНК осуществлялось на базе Национальный референтный центр по ветеринарии Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан (г. Астана, лаборатория «Диагностика инфекционных заболеваний»). Работа с обратно транскрибированными образцами кДНК и молекулярно-генетические исследования выполнялись в лаборатории прикладной генетики ТОО Национальный центр биотехнологии.

Методы исследования. В ходе исследования для выявления вируса бешенства и его молекулярно - генетической характеристики был использован комплекс молекулярно - биологических, высокопроизводительного секвенирования (NGS), биоинформатических, филогенетических и эпизоотологических методов.

Выделение вирусной РНК проводилось в соответствии с инструкцией производителя с использованием коммерческих тест-систем, произведенных ТОО «Фрактал Био». На основе выделенной РНК методом обратной транскрипции синтезировали комплементарную ДНК (кДНК). Первичное выявление вируса бешенства выполнялось методом полимеразной цепной реакции в реальном времени на амплификаторе *Rotor-Gene*.

Праймеры для полного ампликонного покрытия генома вируса бешенства были спроектированы *in silico* с использованием программ *MAFFT* и *Primer3* на основе последовательностей из базы данных *NCBI Virus*. Работоспособность праймеров проверялась экспериментальной амплификацией.

ДНК-библиотеки из ампликонов, полученных с использованием эффективных праймеров, готовили согласно протоколу *Illumina DNA Prep*, полногеномное секвенирование проводили на платформе *Illumina MiSeq*. Для подтверждения отдельных фрагментов применяли метод секвенирования по *Сэнгеру*.

Контроль качества первичных данных секвенирования проводили в программе *FastQC* методом оценки качества *reads*. Предварительную обработку и качественную фильтрацию *reads* выполняли на основе методов *read trimming* и *filtering* с использованием программ *Seqtk* и *Sickle*. Восстановление полных геномных последовательностей вируса осуществляли методом *de novo* сборки в программе *SPAdes*.

Сравнение полученных геномных последовательностей с референсным геномом проводили методом выравнивания *reads* с использованием программы *BWA*, а определение нуклеотидных вариантов и формирование консенсусных последовательностей осуществляли методом *variant calling* с применением инструментов *FreeBayes*, *BCFtools* и *SAMtools*.

Генотипическая принадлежность изолятов вируса бешенства определялась методом генотипирования на платформе *RABV-GLUE*. Оценку филогенетических взаимоотношений проводили с использованием филогенетического анализа на основе методов *Neighbor-Joining* и байесовского подхода в программах *MEGA X* и *BEAST*. Визуализацию и аннотирование филогенетических деревьев осуществляли методом графической интерпретации на веб-платформе *iTOL*.

Для расчета эпизоотологических показателей и проведения картографического анализа применялись стандартные статистические методы. При обработке молекулярно-генетических данных надежность филогенетических деревьев проверялась с использованием 1000 *bootstrap*-репликаций. Все статистические расчеты выполнялись с применением программного обеспечения *Microsoft Excel*, а также с использованием внутренних алгоритмов специализированных биоинформатических пакетов *MEGA X* и *BEAST*.

Объект исследования. Патологический материал, отобранный от животных с клиническим подозрением на бешенство в различных регионах Казахстана, а также выделенные из него штаммы *Rabies lyssavirus*.

Предмет исследования. Молекулярно-генетические особенности изолятов вируса бешенства, их генотипические и филогенетические характеристики, а также закономерности их распространения на территории Казахстана.

Научная новизна исследования. В ходе данного исследования генетическая структура изолятов вируса бешенства, циркулировавших на

территории Казахстана в 2020–2022 годах, впервые была охарактеризована на основе полногеномных нуклеотидных последовательностей. Полученные данные показали, что вирус относится к космополитическому мажорному кладу и минорному кладу CA1, а также что отдельные изоляты формируют генетически отличающиеся линии.

В рамках исследования впервые была апробирована лабораторная методика, позволяющая амплифицировать и секвенировать полные кодирующие участки генов *N*, *P*, *M* и *G*. Предложенная методика имеет прикладное значение для проведения молекулярно-генетического мониторинга вируса бешенства.

В результате исследования впервые были определены 31 полная и частичная геномная нуклеотидная последовательность вируса бешенства и зарегистрированы в международной базе данных *GenBank*. Указанные последовательности были систематизированы в рамках BioProject PRJNA832888 и опубликованы под регистрационными номерами OP477379 – OP477391 и ON366706 – ON366710. В результате впервые сформирован структурированный набор данных национального уровня, включающий молекулярно - генетические характеристики штаммов *Rabies lyssavirus*, циркулирующих на территории Казахстана.

Практическая значимость. Данное исследование научно обосновывает эффективное применение молекулярно-генетических методов, используемых при диагностике бешенства. Характеристика генетической структуры вируса бешенства позволяет дифференцировать циркулирующие региональные штаммы и оценивать их эпизоотическое значение.

Результаты молекулярно-генетического анализа позволяют выявить особенности циркуляции вируса в популяциях домашних и диких животных, а также уточнить направления распространения инфекции.

Полученные данные могут быть непосредственно использованы при планировании профилактических мероприятий против бешенства в Республике Казахстан, включая научное обоснование организации вакцинации, совершенствование алгоритмов оперативного реагирования в эпизоотических очагах и определение зон риска.

Основные положения, выносимые на защиту:

1 В ходе исследования впервые проведено комплексное описание генетического разнообразия и эволюционных особенностей вируса бешенства, циркулирующего на территории Казахстана, что создает основу для совершенствования молекулярно-эпидемиологического мониторинга региональных штаммов.

2 Установлена взаимосвязь между филогенетической структурой вируса бешенства и его географическим распространением, определены основные очаги циркуляции и направления распространения вируса.

3 Полученные в результате исследования нуклеотидные последовательности внесены в международные базы данных (*GenBank* и др.), сформирована доступная для глобального научного сообщества референсная база.

4 Обосновано, что выявленные генетические варианты вируса бешенства могут быть использованы для повышения чувствительности и специфичности диагностических систем.

5 Результаты проведенных исследований позволяют научно обосновать оценку эффективности вакцин против бешенства на территории Казахстана и, при необходимости, их обновление.

6 С учетом особенностей циркуляции вируса бешенства предложены научные основы эпизоотического надзора и прогнозирования зон риска.

Публикация и апробация результатов диссертации. Основные научные результаты диссертации опубликованы в 11 публикациях. Из них 2 статьи опубликованы в журналах, индексируемых в базах *Web of Science* и *Scopus* [3, 4]. 3 публикации приняты журналами, рекомендованными Министерством науки и высшего образования Республики Казахстан [5, 6, 7], издано 1 методическое руководство (приложение Б). 2 внедрение результатов научно-исследовательской работы в учебный процесс оформлено соответствующим актом.

Основные результаты диссертационной работы ежегодно представлялись и обсуждались на заседаниях Ученого совета Казахского агротехнического исследовательского университета имени С. Сейфуллина в 2020 – 2023 годах. Кроме того, часть материалов исследования была представлена на 3 международных научных конференциях и 2 форумах:

- Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 18: «Молодежь и наука – взгляд в будущее» – 2022 [8].

- Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 18(2): «Наука XXI века – эпоха трансформации» – 2022 [9].

- XII Международная научно-практическая конференция «Сибирская деревня: 200 лет развития Омской области – от реформ М.М. Сперанского до агропромышленного центра Сибири», проведенная на базе ФГБОУ ВО Омский ГАУ 21–23 сентября 2022 года [10].

- The 1st China Kazakhstan Veterinary Medicine Science and Technology Postgraduate Academic Forum, организованный Harbin Veterinary Research Institute, Seifullin Kazakh Agro Technical University, China-Kazakhstan Belt and Road Joint Laboratory on Agricultural Sciences, Belt and Road Joint Center for Animal Infectious Diseases Prevention and Control. 28 мая 2022 года [11].

- Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 120-летию со дня основания Казахского научно-исследовательского ветеринарного института, 2025 г. [12].

Личный вклад автора. Основная часть работ, выполненных в рамках темы диссертации, была осуществлена при непосредственном участии автора. Сбор и анализ литературных данных, формирование направления исследования, определение целей и задач, проведение экспериментальных исследований, обработка и интерпретация полученных результатов, подготовка научных статей и написание текста диссертации являются

личным вкладом автора. Оформление рукописи и введение полученных результатов в научный оборот также входили в ответственность автора.

Структура и объем диссертационной работы. Работа состоит из общего объема 100 страницы. В ее состав входят нормативные ссылки, определения, обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования и их обсуждение, заключение, а также список использованной литературы, включающий 118 источника.

В основном тексте диссертации представлено 31 рисунок и 16 таблиц, а в приложениях приведено 29 рисунков. Все иллюстрационные материалы позволяют полно раскрыть проведенные в тексте анализы и наглядно представить полученные результаты.