

ПРОТОКОЛ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ИЗОЛЯТОВ *RABIES VIRUS*

Есембекова Г.¹, Абенова А.¹, Амиргазин А.^{2*}, Карибасев Т.², Шевцов А.², Абдрахманов С.¹

¹Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, проспект Женис 62, Казахстан, Астана, 010011.

²Национальный центр биотехнологии, Кургальджинское шоссе 13/5, Казахстан, Астана, 010000.

**asylulan0894@gmail.com*

АБСТРАКТ

В данной работе описывается разработанный протокол полногеномного секвенирования клинических образцов РНК *Rabies virus* на платформе Illumina MiSeq. Ранее, генотипирование вируса бешенства, циркулирующего на территории Казахстана, проводилось на основе последовательности гена нуклеопротеина (N ген). В протоколе описываются методы пробоподготовки, полногеномного секвенирования и генотипирования применяемые в настоящее время для эпидемиологического анализа не только *Rabies virus*, но и для других вирусных возбудителей, таких как SARS-CoV-2, Influenza и других. Цель работы заключалась в разработке и апробации протокола полногеномного секвенирования и генотипирования изолятов вируса бешенства с целью дальнейшего использования в эпидемиологическом мониторинге. В результате исследований, впервые были получены полногеномные последовательности 31 изолята *Rabies virus* выделенные от различных инфицированных животных и областей Казахстана. Все изоляты принадлежат мажорной кладе степного типа – Cosmopolitan (30 изолятов принадлежат минорной кладе CA1, в то время как, 1 изолят принадлежит неназначенной минорной кладе). Были идентифицированы 2 локальные вспышки и 6 обособленных от них линий вируса бешенства. Рассчитаны предполагаемые даты расхождения от общего предка, как для клады Cosmopolitan, так и для минорной клады CA1.

Ключевые слова: бешенство, *Rabies*, эпидемиология, секвенирование, Казахстан, вспышка

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство – это вирусное инфекционное заболевание, природно-очагового характера, являющееся смертельным зоонозным заболеванием человека и почти всех теплокровных животных. Возбудителем классического бешенства животных и человека является *Rabies virus* (RABV) – распространенный по всему миру высоко нейротропный вирус вызывающий смертельный энцефаломиелит, и единственный из 16 членов рода *Lyssavirus*, распространяющийся множеством резервуаров-хозяев [1]. Вирион вируса состоит из 5 структурных протеинов: фосфопротеин (P), матричный протеин (M), гликопротеин (G), РНК-зависимая РНК-полимераза (L) и нуклеопротеин (N). RABV филогенетически классифицируется на 8 мажорных клад: Africa-2, Africa-3, Arctic/Arctic-like, Asian, Bats, Cosmopolitan, Indian-Sub и RAC-SK. В свою очередь, мажорные клады Arctic/Arctic-like, Asian, Bats и Cosmopolitan классифицируется на 5, 7, 20 и 24 минорные клады, соответственно [2]. На основе ранее опубликованных последовательностей N гена было определено, что на территории Казахстана циркулирует вирус бешенства, принадлежащий мажорной кладе степного типа (Cosmopolitan) [3].

Ежегодно в Казахстане регистрируются сотни случаев бешенства животных почти во всех географических районах с большей концентрацией вспышек на Северо-Западной и Юго-Восточной территориях Казахстана, граничащих с Россией, Китаем и Кыргызстаном. Среди восприимчивых животных, наблюдаемых в случаях бешенства, упоминались: крупный рогатый скот (КРС), собаки, лисы, овцы/козы, кошки, лошади, верблюды, волки и шакалы [4]. Согласно предыдущим исследованиям [4], на момент 2016 года в РК наблюдалась восходящая тенденция заболеваемости бешенством, со средним приростом 7% в год среди восприимчивых животных. Еже-

годная регулярная вакцинация сельскохозяйственных и диких животных не повлияла на общее число случаев заболевания [5]. Хотя наблюдаемая доля заболевания бешенством среди сельскохозяйственных животных в РК составляет 50-62,8% [5], основным естественным резервуаром и главным переносчиком инфекции безусловно являются дикие мигрирующие животные. В связи с этим, генотипирование вспышек с целью эпидемиологического анализа и отслеживания источников инфекции является актуальной задачей. Предполагается, что на территории Казахстана циркулируют генотипы степного типа, также при наблюдении крупных вспышек, мы ожидаем, что все изоляты принадлежащие соответствующим вспышкам, будут филогенетически идентичными.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение РНК

В данной работе было исследовано 117 образцов головного мозга, отобранных от различных животных из различных областей Казахстана. Работа с патогенным материалом проводилась на базе РГП «Национальный референтный центр по ветеринарии» КВКиН МСХ РК. Клинические признаки бешенства наблюдались у всех животных, но эпидемиологических данных о контактах с хищниками не было. Бешенство было подтверждено прямым флуоресцентным тестом (FAT) [6]. РНК выделялась из 10% суспензии мозговой ткани в PBS буфере, приготовленной в TissueLyser LT (Qiagen) набором RNeasy Mini Kit (Qiagen). Выделенные образцы РНК хранились в жидком азоте до начала исследования.

ПЦР-амплификация генома *Rabies virus*

Амплификация генома вируса бешенства была выполнена в двух параллельных реакциях согласно двум смесям праймеров в одношаговой ОТ-ПЦР (таблица 1).

Таблица 1 – Праймеры для амплификации генома *Rabies virus*

| Смесь праймеров 1 | | | Смесь праймеров 2 | | |
|-------------------|---------------|-------------------------------|-------------------|---------------|------------------------------|
| № | Наименование | Последовательность, 5'-3' | № | Наименование | Последовательность, 5'-3' |
| 1 | Rab-for_1 | acgcttaacaaccagatcaagaagaa | 7 | Rab-for_895 | ttcggaggaagagataaggagaatggt |
| | Rab-rev_1000 | atcctacaagtgaatgagattgaacac | | Rab-rev_2230 | gcttcttaactatgcatcagggtcat |
| 2 | Rab-for_1860 | atgttgagtgccagatgtagacacaaat | 8 | Rab-for_2910 | aggacccttatctccagtgggc |
| | Rab-rev_3040 | cctcgaatcatgttgatacacca | | Rab-rev_4250 | actcctctctttcttgaccaactcctc |
| 3 | Rab-for_4031 | tcaccaatagtagaggaagagagcatc | 9 | Rab-for_5470 | gtgcataattataagggtctgggtcat |
| | Rab-rev_5560 | aatggggcgtcatcgtagacttctcc | | Rab-rev_6430 | acttcataaccagagttccgcacat |
| 4 | Rab-for_6200 | cttggtcagggtcaaatgataaatatgg | 10 | Rab-for_7000 | tactggatgacaagtcacactcttcacc |
| | Rab-rev_7390 | tttgatgattgtccacttctcatagtc | | Rab-rev_8480 | atacagagccttctgattgcatcctt |
| 5 | Rab-for_8090 | tcagtctttgatcaagccgatgag | 11 | Rab-for_9275 | gggtcagccttgacaggttcaa |
| | Rab-rev_9390 | cataaagcatcaatggctggaacat | | Rab-rev_10250 | gcactgcctcattaaagaactca |
| 6 | Rab-for_10180 | acatactgaccctcattactaccagtc | 12 | Rab-for_10950 | cataattgtgacgcagaagtactgacat |
| | Rab-rev_11330 | agagttatgatcatctcattgtaaggatt | | Rab-rev_12040 | aaagaacaatcaaacagccagagg |

Реакционная смесь включала в себя 12,5 мкл 2× смеси для ОТ-ПЦР-Экстра, 1 мкл смеси ферментов БиоМастер Экстра-микс, 2 мкл соответствующей смеси праймеров с концентрацией 15 пМ/мкл (эквивалентно смешанных), 1,25 мкл ДМСО, 8 мкл РНК и ДЕРС воды до 25 мкл. Программа термоциклирования включала: 50°C - 30 минут; 95°C - 3 минуты, затем 39 циклов: 93°C - 12 секунд, 56°C - 30 секунд, 68°C - 3 минуты и 68°C - 10 минут.

После амплификации, 5 мкл ПЦР-смеси использовали для электрофореза, и после визуального подтверждения наличия ПЦР продуктов, продукты смешивали пропорционально и очищали, используя 1×Agencourt AMPure XP beads. Очищенные ПЦР продукты использовали для приготовления ДНК-библиотек.

Полногеномное секвенирование

ДНК-библиотеки приготавливались, используя наборы Illumina DNA Prep (M) Tagmentation (96 Samples) и Nextera XT Index Kit (96 Indexes 384 Samples) согласно инструкциям производителей. ДНК-библиотеки были нормализованы разведением до концентрации 4 нМ и объединены (пулированы) по 3 мкл. На загрузку секвенирования было использовано 12 пМ финальной ДНК-библиотеки. Секвенирование проводилось на платформе Illumina MiSeq, с применением набора MiSeq Reagent Kit v3, 600 Cycles (Catalog # MS-102-3003).

Сборка последовательностей

Весь биоинформатический анализ проводился в ОС Ubuntu 20.04.4 LTS. С целью определения филогенетически близких последовательностей, обрезанные прочтения были собраны *de novo* в контиги, используя программу SPAdes v3.15.3 с длиной *k*-меров 127 и опцией «--careful». Далее, контиги с наибольшей длиной идентифицировались в интернет-ресурсе Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) относительно базы Nucleotide collection (nr/nt) *Virus rabies* (taxid:11292). Результат с наибольшим процентом идентичности, наибольшим покрытием исследуемой последовательности и наибольшей длиной назначался референсным геномом.

Картирование (выравнивание) прочтений на референсные последовательности проводилось с использованием

программы BWA v0.7.17-r1188. Определение вариантов и генерация консенсусных последовательностей проводилось программами FreeBayes v1.3.6 и BCFtools v1.15.1. Измерение глубины секвенирования проводилось, используя программу SAMtools v1.15.1.

Аннотацию консенсусных последовательностей выполняли с использованием VADR v1.4.1 на основе соответствующих эталонных последовательностей (KT728349, LN879480, KX148159 и KP997032).

Генотипирование и филогенетический анализ

Определение филогенетической клады, а также экспорт филогенетически близких последовательностей проводилось в интернет-ресурсе RABV-GLUE (<http://rabv-glue.cvr.gla.ac.uk/>). Также, для подтверждения принадлежности к филогенетическим кладам было проведено сравнение на основе полной последовательности N гена с 202 репрезентативными изолятами из Казахстана и соседних стран. Эти последовательности были выровнены по кодонам с использованием алгоритма ClustalW с параметрами по умолчанию. Для построения филогенетических деревьев был использован программный пакет MEGA X с использованием метода присоединения соседей с 1000 бутстреп-репликациями. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода *p*-расстояний и выражены в единицах количества различий нуклеотидных оснований на сайт. Полученное дерево было отредактировано и аннотировано на ресурсе iTOL (<https://itol.embl.de/>).

Для оценки линейных эволюционных скоростей, в филогенетическом анализе был использован пакет BEAST v1.10.4 с методами Монте-Карло с Марковскими цепями (MCMC), путем включения в расчёты информации о дате отбора изолятов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Происхождение вирусных изолятов

Из 117 коллекционных клинических образцов РНК, полногеномные последовательности допустимого качества были получены для 31 изолята *Rabies virus* выделенных от 22 КРС, 5 бродячих собак, 3 диких лис и 1 бродячих

чей кошки, преимущественно в апреле (92%) 2021 года (80,64%) (таблица 2).

На рисунке 1, изображена карта метоположения отбора проб от соответствующих животных.

Таблица 2 – Метаданные исследуемых изолятов: наименования, номера доступа, вид животного, дата и место отбора

| Изолят | Номер доступа GenBank | Вид животного | Дата отбора, гггг-мм-дд | Область РК | Район/город |
|---------------|-----------------------|---------------|-------------------------|----------------------|----------------|
| Rab-2-1 | OP477379 | КРС | 2021-04-08 | Абайская | Аягозский |
| Rab-3-1 | OP477383 | КРС | 2021-04-08 | Абайская | Аягозский |
| Rab-4-1 | OP477385 | КРС | 2021-04-08 | Абайская | Аягозский |
| Rab-5-1 | OP477386 | КРС | 2021-04-08 | Абайская | Аягозский |
| Rab-6-1 | OP477388 | КРС | 2021-04-08 | Абайская | Аягозский |
| Rab-9-1 | OP477390 | КРС | 2021-04-08 | Абайская | Бескарагайский |
| Rab-10-1 | OP477369 | КРС | 2021-04-08 | Абайская | Бескарагайский |
| Rab-11-1 | OP477370 | КРС | 2021-04-08 | Абайская | Аягозский |
| Rab-13-1 | OP477372 | КРС | 2021-04-08 | Абайская | Аягозский |
| Rab-14-1-blue | OP477374 | КРС | 2021-04-08 | Абайская | Жарминский |
| Rab-15-1 | OP477375 | КРС | 2021-04-08 | Абайская | Жарминский |
| Rab-Asl-1 | OP477393 | лиса | 2020-01-16 | Абайская | Урджарский |
| Rab-16-6 | OP477377 | лиса | 2021-04-09 | Абайская | Аягозский |
| Rab-349 | OP477384 | кошка | 2013-10-31 | Абайская | г. Семей |
| Rab-1-5 | OP477376 | КРС | 2021-04-09 | Павлодарская | Баянаульский |
| Rab-2-5 | OP477382 | КРС | 2021-04-09 | Павлодарская | Железинский |
| Rab-5-5 | OP477387 | КРС | 2021-04-09 | Павлодарская | Железинский |
| Rab-6-2 | OP477389 | лиса | 2021-04-09 | Павлодарская | Аккулы |
| Rab-1-4 | ON366706 | КРС | 2021-04-12 | Атырауская | Кзылкогинский |
| Rab-7-4 | ON366707 | КРС | 2021-04-12 | Атырауская | Кзылкогинский |
| Rab-8-4 | ON366708 | КРС | 2021-04-12 | Атырауская | Кзылкогинский |
| Rab-35-1-4 | ON366709 | КРС | 2021-04-12 | Атырауская | Кзылкогинский |
| Rab-35-2-4 | ON366710 | КРС | 2021-04-12 | Атырауская | Кзылкогинский |
| Rab-231-1 | OP477381 | собака | 2014-10-27 | Акмолинская | Астраханский |
| Rab-12C | OP477371 | собака | 2020-01-17 | Актюбинская | г. Актобе |
| Rab-014 | OP477368 | собака | 2020-01-17 | Актюбинская | Шалкарский |
| Rab-Arman-2 | OP477392 | КРС | 2021-02-08 | Северо-Казахстанская | Мамлютский |
| Rab-1-3 | OP477373 | собака | 2021-04-14 | Северо-Казахстанская | Кызылжарский |
| Rab-1-8 | OP477378 | КРС | 2021-04-05 | Северо-Казахстанская | Акжарский |
| Rab-228 | OP477380 | собака | 2014-10-21 | Туркестанская | г. Шымкент |
| Rab-Arman-1 | OP477391 | КРС | 2021-02-04 | Карагандинская | Балхашский |

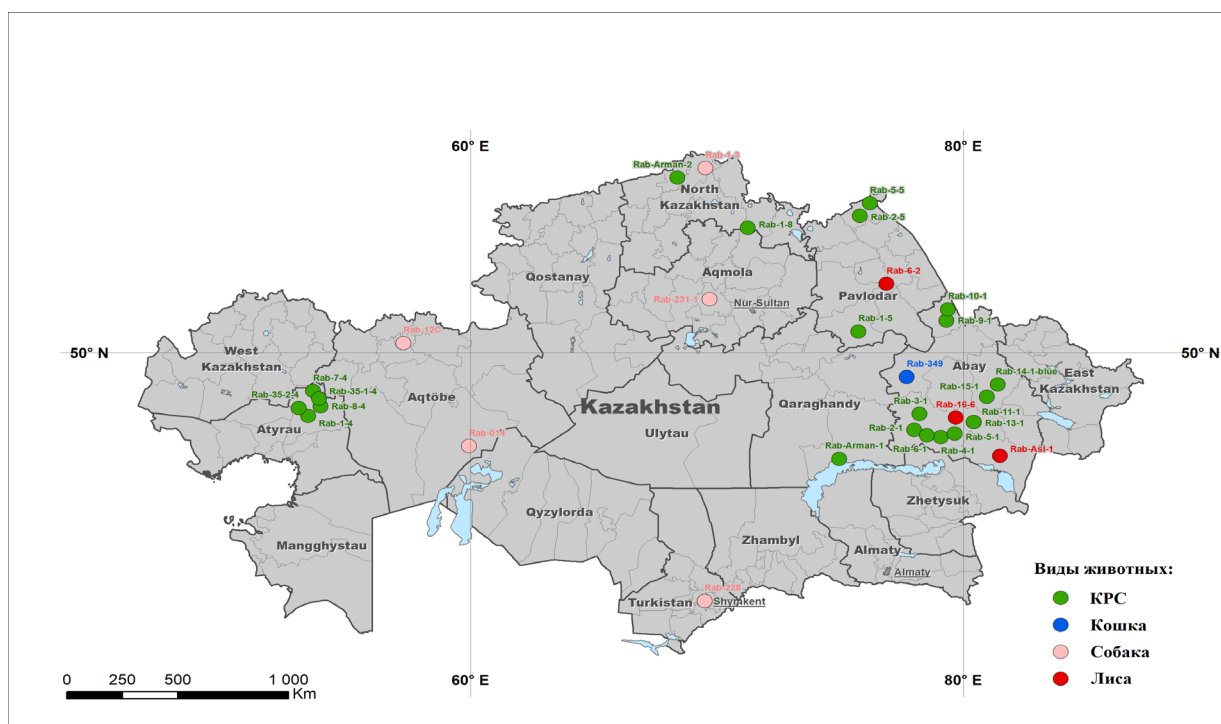


Рисунок 1 – Карта местоположения отбора проб и соответствующих животных

Секвенирование и сборка геномов

В результате полногеномного секвенирования было получено от 395200 до 620958 прочтений на образец, метрика GC% варьировалась от 45% до 47%, средняя длина прочтений варьировалась от 213 п.н. до 282 п.н. Согласно результатам сборки *de novo* были получены контиги длиной от 2326 п.н. до 5564 п.н. На основе результатов BLAST поиска были определены следующие референсные последовательности: KT728349.1, LN879480.1, KX148159.1 и KP997032.1.

В результате картирования прочтений на референсные геномы были получены консенсусы полногеномных последовательностей 31 изолята *Rabies virus*, покрывающие все кодирующие регионы, размером от 11770 п.н. до 11874 п.н., и медианной глубиной секвенирования от $1823\times$ до $7587\times$. Последовательности геномов, исследуемых изолятов были депонированы в базу данных GeneBank под инвентарными номерами OP477379-OP477391, ON366706-ON366710.

Генотипирование исследуемых изолятов

Согласно результатам генотипирования, исследуемые изоляты принадлежат мажорной кладе степного типа (Cosmopolitan): 30 изолятов принадлежат минорной кладе CA1, в то время как, для изолята Rab-228 минорная клада не была определена.

Для верификации генотипирования изолята Rab-228, была импортирована вся база интернет-ресурса RABV-GLUE, на основе которой был проведён BLAST поиск полной последовательности N гена. Результаты нисходящей сортировки значений гомологии показывают, что изолят Rab-228 высоко идентичен с последовательностями, для которых также не была присвоена минорная клада: AF045664 (97.333%, лиса, 1998 г.), LN879480 (99.261%, Азербайджан, 2002 г., собака), KY765901 (98.374%, Таджикистан, 2012 г., собака), MT079918 (98.963%, Гру-

зия, 2015 г., собака), MT079908 (98.963%, Грузия, 2015 г., собака), MT079949 (98.741%, Грузия, 2015 г., собака), MT079935 (98.741%, Грузия, 2015 г., собака), MW055108 (98.891%, Грузия, 2016 г., собака) и KT965733 (99.599% при покрытии 92%, Южный Казахстан, 2014 г., шакал), после которых была представлена группа последовательностей, принадлежащих минорной кладе CA1. Что может указывать на новую минорную кладу, которая не была назначена ранее.

Также, в R гене, изолята Rab-014, была идентифицирована мутация изменившая стоп-кодон TAA на кодирующий глутамин, кодон CAA. Таким образом, увеличив фосфорпротеин на 4 аминокислотных остатка.

Эволюция изолятов *Rabies virus* выделенных на территории Казахстана

Был проведён байесовский анализ на основе полных последовательностей N гена 202 репрезентативных изолятов из Казахстана и соседних стран, в результате которого была определена средняя скорость нуклеотидных замен, которая составила $3,07\times 10^{-4}$ замен на сайт в год (95% интервал наивысшей апостериорной плотности распределения составила $2,06-4,06\times 10^{-4}$ замен на сайт в год). Оценка степени достоверности замен нуклеотидов позволила нам определить среднее время до общего предка (tMRCA) для каждой клады, подклады и линии RABV. Было построено дерево максимального правдоподобия клад (рисунок 2), которое показывает, что все 31 исследуемый изолят RABV и 94 филогенетически близких последовательностей, принадлежащие минорной кладе CA1, имеют общего предка (tMRCA), расхождение от которого, по нашим расчётам, произошло в период с 1910 по 1966 годы (с медианным значением равным 1942 году). В свою очередь, вся мажорная клада Cosmopolitan имела общего предка, существовавшего в период с 1734 по 1915 годы (с медианным значением равным 1839 году).

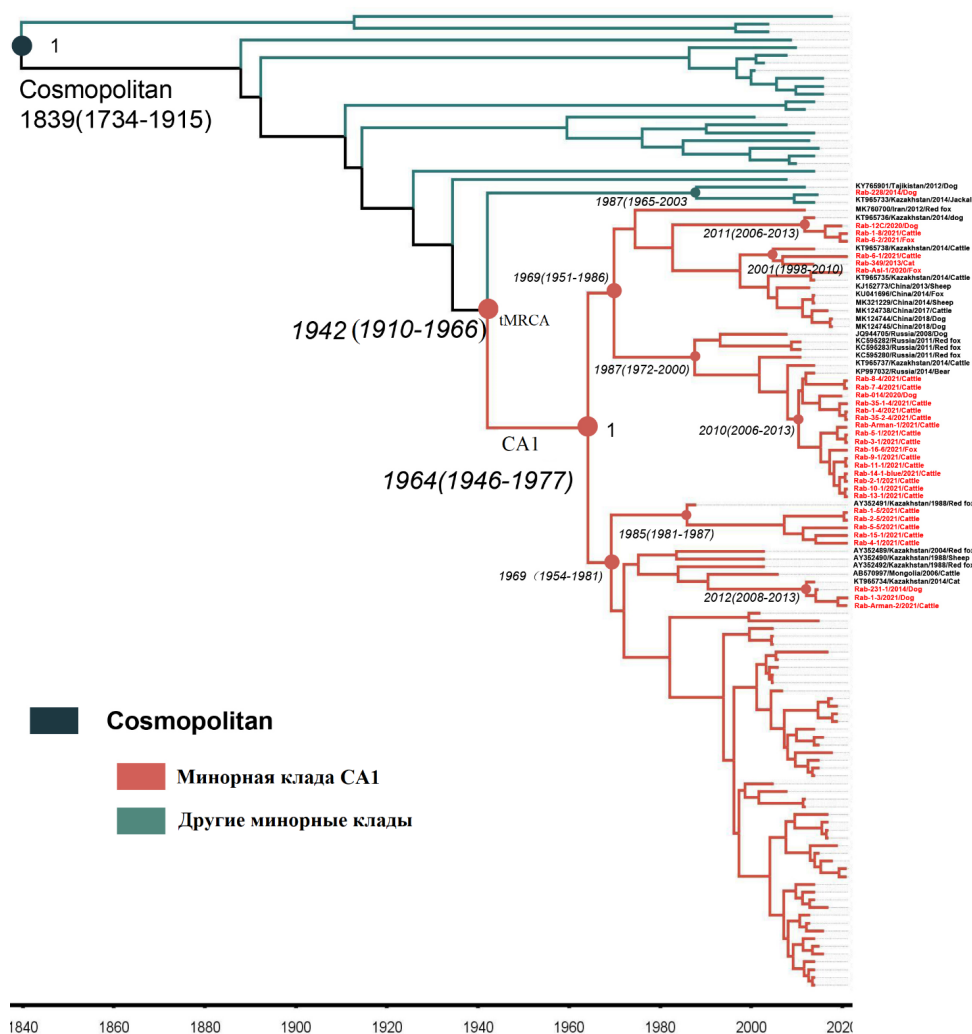


Рисунок 2 – Дерево максимального правдоподобия клад на основе 202

репрезентативных последовательностей N гена кланды Cosmopolitan

Наблюдаемые случаи бешенства связанные с исследуемыми изолятами

Анализируя виды животных, даты и места отбора проб (таблица 1 и рисунок 1), а также руководствуясь филогенетическими взаимоотношениями между исследуемыми изолятами (рисунок 3), наблюдаются 2 предполагаемые локальные вспышки и несколько связанных и обособленных от них случаев заболевания бешенством, описываемые далее.

В трёх районах Абайской области в апреле 2021 года была зарегистрирована вспышка бешенства, из которой было выделено 11 образцов от КРС (Жарминский - 2, Бескарагайский - 2, Аягозский - 7) и днём позже 1 образец от дикой лисы (Аягозский район, изолят Rab-16-6). На филогенетическом дереве можно увидеть, что 9 (из 12) изолятов данной вспышки группируются на отдельной ветви с дополнительным изолятом Rab-Arman-1 выделенным от КРС в Балхашском районе Карагандинской области в феврале 2021 года, что на 2 месяца раньше упомянутых выше. Однако, изоляты Rab-4-1, Rab-15-1 и Rab-6-1 выделенные из данной вспышки, но из разных районов (Аягозский и Жарминский), на филогенетическом дереве расположены удалённо от остальных упомянутых изолятов.

Дальние изоляты Rab-4-1 и Rab-15-1 группируются вместе с изолятами Rab-1-5, Rab-2-5 и Rab-5-5, выделенными от КРС в Павлодарской области (Баянаульском и Железинском районах). В свою очередь, изолят Rab-6-2 выделенный от дикой лисы, в той же Павлодарской области, филогенетически близок с исследуемыми изолятами Rab-1-8 (КРС, Северо-Казахстанская область), Rab-12C (собака, Актюбинская область, январь 2020 г.) и с опубликованным ранее изолятом KT965736 (собака, Актюбинская область, 2014 г.).

Последний, дальний изолят Rab-6-1, группируется с изолятами Rab-349 (кошка, Абайская область, г. Семей, 2013 г.) и KT965738 (КРС, Алматинская область, 2014 г.). Соседняя с ними ветвь представлена изолятами из Китая, выделенными с 2013 по 2018 годы, и изолятами из Казахстана: KT965735 (КРС, Восточно-Казахстанская область, 2014 г.) и Rab-Asl-1 (лиса, Абайская область, 2020).

Вторая вспышка, локализованная в Кызылкогинском районе Атырауской области, состояла из изолятов выделенных от КРС, филогенетически близким, к которым оказался изолят Rab-014 (собака, Актюбинская область, 2020 г.). Данная группа изолятов образует соседнюю ветвь, для изолятов выделенных в Абайской области. Обе ветви соседствуют с изолятами выделенными в России с 2008 по 2011 годы.

Изоляты Rab-Arman-2, Rab-1-3 и Rab-231-1 (собака, Акмолинская область, 2014 г.) группируются на одной ветви с изолятом КТ965734 (кошка, Восточно-Казахстанская область, 2014 г.) и образуют одну кладу с изолятом из северной Монголии (КРС, 2016 г.) и ранее опубликованными изолятами из Казахстана: АУ352492 (лиса, Акмолинская область, 1988 г.), АУ352490 (овца, Алматинская область, 1988 г.) и АУ352489 (лиса, Алматинская область, 2004 г.).

Как видно из филогенетического дерева, изолят Rab-228, выделенный от бродячей собаки в Туркестанской области в 2014 году, расположен на отдельной кладе, вместе с изолятом КТ965733, выделенным от шакала в том же 2014 году на территории Южного Казахстана, и изолятом КУ765901, выделенным от собаки в Таджикистане в 2012 году.

ОБСУЖДЕНИЕ

Классический эпидемиологический анализ изолятов вируса бешенства проводится на основе секвенирования и генотипирования N гена [7, 8]. Однако генотипирование на основе полногеномной последовательности (включающее в анализ все кодирующие регионы) характеризуется большей разрешающей способностью [9], позволяющей идентифицировать новые геногруппы рода *Lyssavirus* [10], а также, более достоверно отслеживать изоляты связанные со вспышками или с обособленными единичными случаями инфекции. Ранее аналогичные протоколы также были успешно использованы в других исследованиях [11-14].

На территории Российской Федерации (РФ) циркулируют две мажорные клады вируса бешенства: Арктического (Arctic/Arctic-like) и степного (Cosmopolitan) типов. Степной тип является самым распространенным в РФ (84,6% [7]), циркулирующий в степных и лесостепных экологических районах Евразии, основными резервуарами которого являются лисицы (*Vulpes vulpes* и *Vulpes corsac*). В исследовании Девяткина А. с соавторами [7], датировали общего предка (MRCA), как для мажорной клады Cosmopolitan, равным 1849 году (1796-1894), так и для минорной клады SA1, равным 1948 году (1929-1964). Что соответствует полученным нами значениям (с погрешностью 10 лет): 1839 год (1734-1915) для мажорной клады Cosmopolitan и 1942 год (1910-1966) для минорной клады SA1 (рисунок 3). К сожалению, для сравнения, аналогичные исследования изолятов из Северной и Северо-Западной части Китая на данный момент отсутствуют [15].

Наиболее крупной и комплексной была представлена вспышка в Абайской области. Учитывая, отношение к данной вспышке изолятов Rab-Arman-1 (КРС, выделенный за 2 месяца до регистрации вспышки) и Rab-16-6 (лиса), долгий инкубационный период бешенства у КРС, способность псовых в агрессивной фазе инфекции бешенством пробегать 50 км в день, отсутствие выявленных случаев бешеных собак и далёкое расположение между Жарминским, Бескарагайским и Аязозским районами, вероятно, инфекция мигрировала от Балхашского района Карагандинской области до Бескарагайского района Абайской области, а резервуаром являлись дикие лисы.

Также стоит отметить присутствие в данной вспышке ещё трёх филогенетически различных линий вируса бешенства. Первая, представлена изолятами Rab-4-1 и Rab-15-1 филогенетически близкими с изолятами Rab-1-5, Rab-2-5 и Rab-5-5, выделенными от КРС в Павлодарской области (Баянаульском и Железинском районах). Вторая, представлена изолятом Rab-6-1, филогенетически близким с ранее выделенными изолятами Rab-349 (кошка, 2013 г.) и КТ965738 (КРС, 2014 г.). Третья, представлена изолятом Rab-Asl-1, выделенным от дикой лисы в 2020 году, филогенетически близким с изолятом КТ965735 (КРС, ВКО, 2014 г.) и изолятами выделенными с 2013 по 2018 годы на территории Синьцзян-Уйгурского автономного района [16], что говорит о продолжительной циркуляции данных линий в Восточном Казахстане, а также о параллельной циркуляции филогенетически близкой линии на Северо-Западе Китая. Таким образом, складывается впечатление, что в Абайской области, на момент отбора проб, циркулировало 4 филогенетически различные линии вируса бешенства.

Вторая вспышка была представлена в Атырауской области состоящая из изолятов, выделенных от КРС, филогенетически близкими с изолятами из вспышки в Абайской области. На филогенетическом дереве среди данных изолятов расположен изолят Rab-014 выделенный от собаки в Актюбинской области в 2020 г. Однако, как упоминалось нами ранее, данный изолят имеет маркерную мутацию в стоп-кодоне Р гена, поэтому отсутствие аналогичной мутации у изолятов данной вспышки исключает изолят Rab-014 в качестве родительской линии. Таким образом, для данной вспышки животного-переносчика идентифицировано не было.

Линия, представленная изолятами Rab-6-2 (лиса, 2021 г.), Rab-1-8 (КРС, 2021 г.) и Rab-12С (собака, 2020 г.), несмотря на свою малочисленность, покрывает наибольшую территорию РК, в сравнении с остальными исследуемыми изолятами, охватывая по меньшей мере 4 области (Павлодарская, граница между Северо-Казахстанской и Акмолинской областями, и Актюбинская, соответственно).

Ещё одна линия представлена изолятами Rab-Arman-2 (КРС, февраль 2021 г.) и Rab-1-3 (Собака, апрель 2021 г.) располагаясь на одной ветви с изолятами Rab-231-1 (собака, Акмолинская область, 2014 г.) и изолятом КТ965734 (кошка, Восточно-Казахстанская область, 2014 г.). Вся кладка в целом, представлена отдельными длинными ветвями, что соответствует их далёкому географическому (север и юг Казахстана, Монголия) и временному (с 1988 по 2014 годы) расположению.

Последняя линия представлена изолятами Rab-228 (собака, 2014 г.), КТ965733 (шакал, 2014 г.) и КУ765901 (собака, Таджикистан, 2012 г.) располагающимися отдельно от минорной клады SA1. Учитывая высокие значения гомологии вирусов данной линии с выделенными изолятами на территориях сначала Грузии, Азербайджана, а затем Таджикистана и Казахстана, наиболее вероятно, что данная линия мигрировала из Западной Азии (Ближний Восток).

Как видно, изоляты вируса бешенства, выделенные на территории Казахстана, несмотря на малочисленную выборку исследуемых изолятов, характеризуются большим

генетическим разнообразием, территориальным и временным распределением. Подобное распространение степной группы бешенства на просторах Евразийской степи и лесостепи, объясняли интенсивной миграцией населения на территории бывшего СССР [7]. Таким образом, полученная нами датировка основного расхождения минорной клады CA1 - 1964 год (1946-1977) (рисунок 3), подтверждается датами освоения целинных земель 1954-1965.

Хотя нами были получены полногеномные последовательности высокого качества, для того, чтобы обеспечить наибольшее географическое и количественное (статистическое) покрытие, применяемые в данной работе биоинформатические анализы были сосредоточены только на N гене. К сожалению, в связи с тем, что аналоги описываемого в данной работе протокола только входят в лабораторную практику, на территории СНГ практически не проводились работы по полногеномному секвенированию вирусов бешенства, и ближайшими странами, проводившими данного рода исследования, являются Россия [17] и Китай [18]. Несомненно, накопление большого количества полногеномных данных изолятов выделенных на территориях Казахстана и соседних стран, позволит добиться большего покрытия генотипов и способствует отслеживанию и ликвидации случаев бешенства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Это первое исследование в Казахстане направленное на разработку протокола, позволяющего проводить полногеномное секвенирование и анализ генетического разнообразия циркулирующих вирусов бешенства. Из исследованных 117 образцов головного мозга бешеных животных, полногеномные последовательности допустимого качества были получены для 31 изолята *Rabies virus* выделенных от 22 КРС, 5 бродячих собак, 3 диких лис и 1 бродячей кошки, в 2021 (25 изолятов, 80,645%), 2020 (3 изолята, 9,677%), 2014 (2 изолята, 6,451%) и 2013 (1 изолят, 3,225%) годах.

Выяснилось, что все изоляты принадлежат мажорной кладе степного типа – Cosmopolitan (30 изолятов принадлежат минорной кладе CA1, в то время как, изолят Rab-228 принадлежит неназначенной минорной кладе). Были определены 2 локальные вспышки и 6 обособленных от них филогенетических линий вируса бешенства. Вспышка в Абайской области была самой многочисленной, связанной с 4 различными линиями бешенства.

На основе анализа последовательностей N гена изолятов выделенных на территориях Казахстана, России, Китая и других соседствующих стран, были рассчитаны предполагаемые даты расхождения от общих предков, для клады Cosmopolitan и для минорной клады CA1 – 1839 год (1734-1915) и 1942 год (1910-1966), соответственно.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Статья выполнена в рамках научного проекта «Молекулярно-биологический анализ вируса бешенства циркулирующих на территории Республики Казахстан» (AP08053353).

ЛИТЕРАТУРА

1. Wunner W. H., Jackson A. C. Rabies: scientific basis of the disease and its management // Elsevier Science. – 2010. Vol. 4, № 4. – P. 43–44. ISBN: 0080550096
2. Troupin C., Dacheux L., Tanguy M., Sabeta C., Blanc H., Bouchier C., Vignuzzi M., Duchene S., Holmes E. C., Bourhy H. Large-scale phylogenomic analysis reveals the complex evolutionary history of rabies virus in multiple carnivore hosts // PLoS pathogens. – 2016. – Vol. 12, № 12. – P. e1006041 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006041>
3. Kuzmin I. V., Botvinkin A. D., McElhinney L. M., Smith J. S., Orciari L. A., Hughes G. J., Fooks A. R., Rupprecht C. E. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union // Journal of wildlife diseases. – 2004. – Vol. 40, № 4. – P. 617–631. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.617>
4. Abdrakhmanov S. K., Beisembayev K. K., Korennoy F. I., Yessembekova G. N., Kushubaev D. B., Kadyrov A. S. Revealing spatio-temporal patterns of rabies spread among various categories of animals in the Republic of Kazakhstan, 2010-2013 // Geospatial Health. – 2016. – Vol. 11:455, № 2. – P. 199–205. <https://doi.org/10.4081/gh.2016.455>
5. Sultanov A. A., Abdrakhmanov S. K., Abdybekova A. M., Karatayev B. S., Torgerson P. R. Rabies in Kazakhstan // PLoS neglected tropical diseases. – 2016. – Vol. 10, № 8. – P. e0004889. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004889>
6. Rupprecht C. E., Fooks A. R., Abela-Ridder B. Laboratory techniques in rabies // World Health Organization. – 2018. – Vol 1. № 5. – P. 289. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/310836>
7. Deviatkin A. A., Lukashev A. N., Poleshchuk E. M., Dedkov V. G., Tkachev S. E., Sidorov G. N., Karganova G. G., Galkina I. V., Shchelkanov M. Y., Shipulin G. A. The phylogenetics of the rabies virus in the Russian Federation // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, № 2. – P. e0171855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171855>
8. Pimentel M. F. A., Nassarden S. M., Cândido S. L., Dutra V., Nakazato L. Genotyping of rabies positive samples isolated from animals in Mato Grosso and Rondônia–Brazil // Infection, Genetics and Evolution. – 2022. – Vol. 103. – P. 105336. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105336>
9. Calvelage S., Freuling C. M., Fooks A. R., Höper D., Marston D. A., McElhinney L., Rasmussen T. B., Finke S., Beer M., Müller T. Full-genome sequences and phylogenetic analysis of archived Danish European bat lyssavirus 1 (EBLV-1) emphasize a higher genetic resolution and spatial segregation for sublineage 1a // Viruses. – 2021. – Vol. 13, № 4. – P. 634. <https://doi.org/10.3390/v13040634>
10. Hu S.C., Hsu C.L., Lee M.S., Tu Y.C., Chang J.C., Wu C.H., Lee S.H., Ting L.J., Tsai K.R., Cheng M.C. Lyssavirus in Japanese Pipistrelle, Taiwan // Emerging Infectious Diseases. – 2018. – Vol. 24, № 4. – P. 782. <https://doi.org/10.3201/eid2404.171696> PMID: 29553328
11. Al-Eitan L. N., Wu G., Golding M., Tang Y., Goharriz H., Marston D. A., Fooks A. R., McElhinney L. M. Whole-genome sequencing and phylogenetic analysis of rabies viruses from Jordan // PLoS neglected tropical diseases. – 2021. – Vol. 15, № 5. – P. e0009431. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009431>

pntd.0009431

12. Hyeon J.-Y., Risatti G. R., Helal Z. H., McGinnis H., Sims M., Hunt A., Chung D. H., Kim J., Desiato J., Lee D.H. Whole Genome Sequencing and Phylogenetic Analysis of Rabies Viruses from Bats in Connecticut, USA, 2018–2019 // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, № 12. – P. 2500. <https://doi.org/10.3390/v13122500>

13. Bacus M. G., Buenaventura S. G. C., Mamites A. M. C., Elizagaque H. G., Labrador C. C., Delfin F. C., Eng M. N. J., Lagare A. P., Marquez G. N., Murao L. A. E. Genome-based local dynamics of canine rabies virus epidemiology, transmission, and evolution in Davao City, Philippines, 2018–2019 // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2021. – Vol. 92. – P. 104868. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104868>

14. Forró B., Marton S., Fehér E., Domán M., Kemenesi G., Cadar D., Hornyák Á., Bányai K. Phylogeny of Hungarian EBLV-1 strains using whole-genome sequence data // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2021. – Vol. 68, № 3. – P. 1323-1331. <https://doi.org/10.1111/tbed.13789>

15. Zhang Y., Vrancken B., Feng Y., Dellicour S., Yang Q., Yang W., Zhang Y., Dong L., Pybus O. G., Zhang H. Cross-border spread, lineage displacement and evolutionary rate estimation of rabies virus in Yunnan Province, China // *Virology journal*. – 2017. – Vol. 14, № 1. – P. 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0769-6>

16. Feng Y., Wang W., Guo J., Li Y., Yang G., Su N., Zhang L., Xu W., Sheng Z., Ma L. Disease outbreaks caused by steppe-type rabies viruses in China // *Epidemiology & Infection*. – 2015. – Vol. 143, № 6. – P. 1287-1291. <https://doi.org/10.1017/S0950268814001952>

17. Poleshchuk E., Deviatkin A., Dedkov V., Sidorov G., Ochkasova J., Hodjakova I., Schukina I., Savel'ev S., Golenskih A., Shipulin G. Complete genome sequences of four virulent rabies virus strains isolated from rabid animals in Russia // *Genome announcements*. – 2013. – Vol. 1, № 3. – P. e00140-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00140-13>

18. Hao L., Guo Z. Y., Zhang J., Tao X. Y., Zhu W. Y., Qing T., Liu H. T. Whole Genome Sequencing and Comparisons of Different Chinese Rabies Virus Lineages Including the First Complete Genome of an Arctic-like Strain in China // *Biomedical and Environmental Sciences*. – 2016. – Vol. 29, № 5. – P. 340-346. <https://doi.org/10.3967/bes2016.044>

REFERENCES

1. Wunner W. H., Jackson A. C. Rabies: scientific basis of the disease and its management // Elsevier Science. – 2010. Vol. 4, № 4. – P. 43–44. ISBN: 0080550096

2. Troupin C., Dacheux L., Tanguy M., Sabeta C., Blanc H., Bouchier C., Vignuzzi M., Duchene S., Holmes E. C., Bourhy H. Large-scale phylogenomic analysis reveals the complex evolutionary history of rabies virus in multiple carnivore hosts // *PLoS pathogens*. – 2016. – Vol. 12, № 12. – P. e1006041 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006041>

3. Kuzmin I. V., Botvinkin A. D., McElhinney L. M., Smith J. S., Orciari L. A., Hughes G. J., Fooks A. R., Rupprecht C. E. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union // *Journal of wildlife diseases*. – 2004.

– Vol. 40, № 4. – P. 617–631. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.617>

4. Abdrakhmanov S. K., Beisembayev K. K., Korennyy F. I., Yessebekova G. N., Kushubaev D. B., Kadyrov A. S. Revealing spatio-temporal patterns of rabies spread among various categories of animals in the Republic of Kazakhstan, 2010–2013 // *Geospatial Health*. – 2016. – Vol. 11:455, № 2. – P. 199–205. <https://doi.org/10.4081/gh.2016.455>

5. Sultanov A. A., Abdrakhmanov S. K., Abdybekova A. M., Karatayev B. S., Torgerson P. R. Rabies in Kazakhstan // *PLoS neglected tropical diseases*. – 2016. – Vol. 10, № 8. – P. e0004889. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004889>

6. Rupprecht C. E., Fooks A. R., Abela-Ridder B. Laboratory techniques in rabies // World Health Organization. – 2018. – Vol 1. № 5. – P. 289. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/310836>

7. Deviatkin A. A., Lukashev A. N., Poleshchuk E. M., Dedkov V. G., Tkachev S. E., Sidorov G. N., Karganova G. G., Galkina I. V., Shchelkanov M. Y., Shipulin G. A. The phylogenetics of the rabies virus in the Russian Federation // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12, № 2. – P. e0171855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171855>

8. Pimentel M. F. A., Nassarden S. M., Cândido S. L., Dutra V., Nakazato L. Genotyping of rabies positive samples isolated from animals in Mato Grosso and Rondônia–Brazil // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2022. – Vol. 103. – P. 105336. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105336>

9. Calvelage S., Freuling C. M., Fooks A. R., Höper D., Marston D. A., McElhinney L., Rasmussen T. B., Finke S., Beer M., Müller T. Full-genome sequences and phylogenetic analysis of archived Danish European bat lyssavirus 1 (EBLV-1) emphasize a higher genetic resolution and spatial segregation for sublineage 1a // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, № 4. – P. 634. <https://doi.org/10.3390/v13040634>

10. Hu S.C., Hsu C.L., Lee M.S., Tu Y.C., Chang J.C., Wu C.H., Lee S.H., Ting L.J., Tsai K.R., Cheng M.C. Lyssavirus in Japanese Pipistrelle, Taiwan // *Emerging Infectious Diseases*. – 2018. – Vol. 24, № 4. – P. 782. <https://doi.org/10.3201/eid2404.171696> PMID: 29553328

11. Al-Eitan L. N., Wu G., Golding M., Tang Y., Goharriz H., Marston D. A., Fooks A. R., McElhinney L. M. Whole-genome sequencing and phylogenetic analysis of rabies viruses from Jordan // *PLoS neglected tropical diseases*. – 2021. – Vol. 15, № 5. – P. e0009431. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009431>

12. Hyeon J.-Y., Risatti G. R., Helal Z. H., McGinnis H., Sims M., Hunt A., Chung D. H., Kim J., Desiato J., Lee D.H. Whole Genome Sequencing and Phylogenetic Analysis of Rabies Viruses from Bats in Connecticut, USA, 2018–2019 // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, № 12. – P. 2500. <https://doi.org/10.3390/v13122500>

13. Bacus M. G., Buenaventura S. G. C., Mamites A. M. C., Elizagaque H. G., Labrador C. C., Delfin F. C., Eng M. N. J., Lagare A. P., Marquez G. N., Murao L. A. E. Genome-based local dynamics of canine rabies virus epidemiology, transmission, and evolution in Davao City, Philippines, 2018–2019 // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2021. – Vol. 92. – P. 104868. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104868>

14. Forró B., Marton S., Fehér E., Domán M., Kemenesi G., Cadar D., Hornyák Á., Bányai K. Phylogeny of Hungarian EBLV-1 strains using whole-genome sequence data // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2021. – Vol. 68, № 3. – P. 1323-1331. <https://doi.org/10.1111/tbed.13789>
15. Zhang Y., Vrancken B., Feng Y., Dellicour S., Yang Q., Yang W., Zhang Y., Dong L., Pybus O. G., Zhang H. Cross-border spread, lineage displacement and evolutionary rate estimation of rabies virus in Yunnan Province, China // *Virology journal*. – 2017. – Vol. 14, № 1. – P. 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0769-6>
16. Feng Y., Wang W., Guo J., Li Y., Yang G., Su N., Zhang L., Xu W., Sheng Z., Ma L. Disease outbreaks caused by steppe-type rabies viruses in China // *Epidemiology & Infection*. – 2015. – Vol. 143, № 6. – P. 1287-1291. <https://doi.org/10.1017/S0950268814001952>
17. Poleshchuk E., Deviatkin A., Dedkov V., Sidorov G., Ochkasova J., Hodjakova I., Schukina I., Savel'ev S., Golenskih A., Shipulin G. Complete genome sequences of four virulent rabies virus strains isolated from rabid animals in Russia // *Genome announcements*. – 2013. – Vol. 1, № 3. – P. e00140-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00140-13>
18. Hao L., Guo Z. Y., Zhang J., Tao X. Y., Zhu W. Y., Qing T., Liu H. T. Whole Genome Sequencing and Comparisons of Different Chinese Rabies Virus Lineages Including the First Complete Genome of an Arctic-like Strain in China // *Biomedical and Environmental Sciences*. – 2016. – Vol. 29, № 5. – P. 340-346. <https://doi.org/10.3967/bes2016.044>

WHOLE GENOME SEQUENCING AND GENOTYPING PROTOCOL OF *RABIES VIRUS* ISOLATES

Yessembekova G¹, Abenova A.¹, Amirgazin A.^{2*}, Karibayev T.², Shevtsov A.², Abdrakhmanov S.¹

¹ S. Seifullin Kazakh AgroTechnical University, Zhenis avenue, 62, Kazakhstan, Astana, 010011.

² National Center for Biotechnology, 13/5, Korgalzhyn road, Kazakhstan, Nur-Sultan, 010000.

*asylulan0894@gmail.com

ABSTRACT

This study describes the developed protocol for whole genome sequencing of clinical *Rabies virus* RNA samples on the Illumina MiSeq platform. Previously, genotyping of the rabies virus circulating in Kazakhstan was based on the nucleoprotein gene sequence (N gene). The protocol describes the methods of sample preparation, whole genome sequencing and genotyping currently used for epidemiological analysis not only of Rabies virus, but also for other viral pathogens such as SARS-CoV-2, Influenza and others. The aim of the work was to develop and test a protocol for whole genome sequencing and genotyping of rabies virus isolates for further use in epidemiological monitoring. As a result of the research, whole genome sequences of 31 isolates of *Rabies virus* isolated from various infected animals and regions of Kazakhstan were obtained for the first time. All the isolates belong to the major steppe-type clade – Cosmopolitan (30 isolates belong to the minor clade CA1, while 1 isolate belongs to an unassigned minor clade). 2 local outbreaks and 6 separated rabies virus lineages were identified. Estimated dates of divergence from a common ancestor were calculated for both the Cosmopolitan clade and the minor clade CA1.

Key words: rabies, *Rabies*, epidemiology, sequencing, outbreak

RABIES VIRUS ИЗОЛЯТТАРЫНЫҢ ТОЛЫҚ ГЕНОМДЫҚ РЕТТІЛІГІН СЕКВЕНИРЛЕУ ЖӘНЕ ГЕНОТИПТЕУ ХАТТАМАСЫ

Есембекова Г.¹, Абеннова А.¹, Амиргазин А.^{2*}, Карибаев Т.², Шевцов А.², Абдрахманов С.¹

¹ С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті, Женис даңғылы 62, Қазақстан, Астана, 010000.

² Ұлттық биотехнология орталығы, Коргалжынжолы, 13/5, Қазақстан, Астана, 010000.

*asylulan0894@gmail.com

ТҮЙІН

Атқарылған жұмыста *Rabies virus*-тың клиникалық үлгілерін РНҚ Illumina MiSeq платформасында толық геномының секвенирлеуі сипатталған. Бұған дейін Қазақстан аумағында жүрген құтыру вирусын генотиптеу нуклеопротеин (N ген) генінің реттілігі негізінде жүргізілген. Хаттамада қазіргі уақытта *Rabies virus*-ті ғана емес, сонымен қатар SARS-CoV-2, Influenza және т.б. сол сияқты вирустық қоздырғыштарды эпидемиологиялық талдау үшін қолданылатын үлгіні дайындау, геномдық реттілік және генотиптеу әдістері сипатталған. Жұмыстың мақсаты эпидемиологиялық мониторингте одан әрі пайдалану мақсатында құтыру вирусының изоляттарын генотиптеу және генотиптеу хаттамасын әзірлеу және сынақтан өткізу болды. Зерттеу нәтижесінде алғаш рет Қазақстанның түрлі аймақтар мен облыстардағы жануарлардан *Rabies virus*-тың 31 изоляттарының толық геномдық тізбегі алынды. Барлық изоляттар Cosmopolitan дала типіндегі негізгі қладқа жатады (30 изолят CA1 кіші қладасына жатады, ал 1 изолят тағайындалмаған кіші қладқа жатады). 2 жергілікті ошақ идентификацияланып, олардан оқшауланған құтыру вирусының 6 желісі анықталды. Түрде ортақ ата - бабадан алшақтаудың болжамды күндері Cosmopolitan қлады үшін де, CA1 шағын қладасы үшін де есептелінді.

Түйін сөздер: құтыру, *Rabies*, эпидемиология, секвенирлеу, Қазақстан, аурудың өршуі