

С.Сейфуллин атындағ Қазақ агротехникалық университетінің Ғылым жаршысы(пәнаралық)  
= Вестник науки Казахского агротехнического университета им.С.Сейфуллина  
(междисциплинарный). - 2022. – № 4 (115). –Ч.2. – С. 4-15

**doi.org/10.51452/kazatu.2022.4.1194**

**УДК 578.2: 578.824.11(574.4) (045)**

## **ПРОТОКОЛ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ИЗОЛЯТОВ *RABIES VIRUS***

*Есембекова Гульжан Нурлыбековна*  
*PhD*

*Казахский агротехнический университет имени С. Сейфуллина*  
*г. Астана, Казахстан*  
*E- mail: Gulzhan\_nk@mail.ru*

*Амиргазин Асылулан Оразгалиевич*  
*Научный сотрудник лаборатории «Прикладной генетики»*  
*Национальный центр биотехнологии*  
*4-13г. Астана, Казахстан*  
*E- mail: asylulan0894@gmail.com*

*Шевцов Александр Борисович*  
*Кандидат биологических наук*  
*Национальный центр биотехнологии*  
*г. Астана, Казахстан*  
*E- mail: ncbshevtsov@gmail.com*

*Абенова Асем Жандарбековна*  
*Докторант*  
*Казахский агротехнический университет имени С. Сейфуллина*  
*г. Астана, Казахстан*  
*E- mail: asem.abenova.1993@mail.ru*

*Кабжанова Анар Магжановна*  
*Магистр ветеринарных наук*  
*Казахский агротехнический университет имени С. Сейфуллина*  
*г. Астана, Казахстан*  
*E-mail: an\_kab@bk.ru*

*Абдрахманов Сарсенбай Кадырович*  
*Доктор ветеринарных наук*  
*Казахский агротехнический университет имени С. Сейфуллина*  
*г. Астана, Казахстан*

## **Аннотация**

Цель данной работы - описание протокола полногеномного секвенирования клинических образцов РНК *Rabies lyssavirus* на платформе Illumina MiSeq. Ранее, генотипирование вируса бешенства, циркулирующего на территории Казахстана, проводилось на основе последовательности гена нуклеопротеина (N ген). В данной работе описывается способ секвенирования и генотипирования полногеномных последовательностей местных изолятов вируса бешенства. В протоколе описываются методы пробоподготовки, секвенирования и генотипирования применяемые в настоящее время для эпидемиологического анализа не только *Rabies lyssavirus*, но и для других вирусных возбудителей, таких как SARS-CoV-2, Influenza и других.

В итоге, были получены консенсусные последовательности геномов 5 изолятов *Rabies lyssavirus* отобранных в Атырауской области. Проведён филогенетический анализ и присвоены генотипы. Все изоляты принадлежат кладе – Cosmopolitan CA1. Исследуемые изоляты формируют единый кластер с филогенетически близкими изолятами из Западной России: Нижегородской области, Воронежской области, Липетской области, Владимирской области, Самарской области.

**Ключевые слова:** бешенство; ПЦР; секвенирование; филогенетическое дерево; штамм; изолят; генотип.

## **Введение**

Бешенство - это вирусное инфекционное заболевание, природно-очагового характера, являющееся зооантропонозом. Несмотря на некоторые успехи в борьбе с бешенством, не прекращается тенденция роста распространения лиссавируса по всему Казахстану и близлежащих странах, граничащих с нашей страной [1, с.32-35].

Результаты эпизоотологического мониторинга с 2020 по 2022 гг. выявили, что Республика Казахстан является неблагополучной по данной инфекции. Так лабораторно выявлено 48 положительных случаев бешенства, из них 22 случая у с/х животных, 16 случаев у диких

животных, и у 10 домашних животных. И по одному случаю у барсука и шакала.

В данный момент учитывая высокую важность глобализации бешенства не только в Казахстане, но и в мире, необходимо на постоянной основе проводить качественный эпизоотологический мониторинг этой особо опасной инфекции. В современном мире есть несколько генотипов рабдовируса, и каждый тип соответствует своему восприимчивому животному в определенной местности. С целью проведения контроля и распространения вируса крайне важно дифференцировать генетические варианты бешенства. В течении последних два десятилетия

применяются молекулярно-генетические методы генотипирования рабдовирусов [2, с.3-7].

Республика Казахстан является эндемичным по бешенству страной с тью пути распространения вируса во времени [3, с.1-5].

## Материалы и методы

### Подбор праймеров

Для подбора праймеров из базы GenBank было импортировано 380 последовательностей с длиной от 10000 до 12000 п.н. Импортирование последовательностей проводилось в автоматическом режиме с использованием программы EFetch из пакета E-utilities [4, с.772-774]. В выборке присутствовали: все доступные последовательности изолятов выделенных на территориях России и Китая, а также по 10 последовательностей ближнего зарубежья и по 3 последовательности дальнего зарубежья, относительно Казахстана. Предпочитаемыми последовательностями являлись с наиболее поздней датой отбора. Выравнивание проводилось, используя программу MAFFT v7.110 на основе стратегии FFT-NS-2 [5, с.8-9]. На основе полученного выравнивания были подобраны праймеры располагающиеся в наиболее консервативных регионах. Подбор праймеров рассчитывался так, чтобы продукты амплификации покрывали все кодирующие регионы и имели перекрытия не менее 100 п.н.

### Выделение РНК

В данном исследовании 5 образцов головного мозга были взяты у домашнего КРС в Атырауской области (Кзылкогинском районе, селе

генетически разными линиями вируса. С целью предотвращения бешенства, а также разработки стратегии борьбы с инфекцией необходимо понима

Миялы) в апреле 2021 года. Клинические признаки бешенства наблюдались у всех животных, но эпидемиологических данных о контактах с хищниками не было. Бешенство было подтверждено прямым флуоресцентным тестом (FAT) [6, с.4453]. Общая РНК выделялась из 10% суспензии мозговой ткани в PBS буфере, приготовленной в TissueLyser LT (Qiagen) набором RNeasy Mini Kit (Qiagen) согласно инструкции производителя. Образцы РНК хранились в жидком азоте до начала исследования.

Проверка работоспособности праймеров

Проверка работоспособности была выполнена постановкой ПЦР с каждой отдельной парой праймеров в одношаговой ОТ-ПЦР с использованием набора ОТ-ПЦР Экстра (Biolabmix, Russia). Реакционная смесь включала в себя 12,5 мкл 2× смеси для ОТ-ПЦР-Экстра, 1 мкл смеси ферментов БиоМастер Экстра-микс, по 1 мкл прямого и обратного праймеров в концентрации 10 пмол/мкл, 1,25 мкл ДМСО, 8 мкл РНК и DEPC 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. Термоциклирование было выполнено на Mastercycler Pro S (Eppendorf, Germany).

ПЦР-амплификация генома *Rabies lyssavirus*

Амплификация кодирующей части генома вируса бешенства была выполнена в двух параллельных реакциях согласно двум смесям праймеров (таблица 1) в одношаговой ОТ-ПЦР. 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 (эквимолярно смешанных), 1,25 мкл ДМСО, 8 мкл РНК и DEPC воды до 25 мкл. Режим амплификации аналогично описанному выше.

После амплификации, 5 мкл ПЦР-смеси использовали для электрофореза, и после визуального подтверждения наличия ПЦР продуктов, продукты смешивали пропорционально и очищали 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. Секвенирование проводилось на платформе Illumina MiSeq, с применением набора MiSeq Reagent Kit v3, 600 Cycles (Catalog # MS-102-3003).

Секвенирование методом Сэнгера проводили с применением BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Сборка последовательностей  
Весь биоинформатический анализ проводился в ОС Ubuntu 20.04.4 LTS. Оценка сырых данных полногеномного секвенирования проводилась с использованием программы FastQC v0.11.7 [7, с.17-18]. Обрезка сырых данных проводилась с использованием программ Seqtk v1.3-r106 и Sickle v1.33 [8, с.105-106].

С целью определения филогенетически близкой последовательности, короткие 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) *Lyssavirus rabies* (taxid:11292). Результат с наилучшим процентом идентичности, наибольшим покрытием исследуемой последовательности и наибольшей длиной назначался референсным геномом.

Картирование (выравнивание) прочтений на референсную последовательность проводилось с использованием программы BWA v0.7.17-r1188 [9, с.634-635]. Определение вариантов и генерация

консенсусных последовательностей проводилось программами FreeBayes v1.3.6 и VCFtools v1.15.1 [10, с.782-783]. Измерение глубины секвенирования и построение графиков проводилось, используя программу SAMtools v1.15.1 и Python 3 библиотеку Matplotlib v3.5.3 [11, с.31-35], соответственно.

Генотипирование и филогенетический анализ

Определение филогенетической клады, а также экспорт филогенетически близких последовательностей проводилось в интернет-ресурсах RABV-GLUE

(<http://rabv-gluе.cvr.gla.ac.uk/>) и NCBI Virus

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/>).

Множественное выравнивание проводилось, используя MAFFT v7.110 на основе стратегии FFT-NS-2. Построение филогенетического дерева проводилось в программе RAxML-NG v1.1.0 [11] с использованием значения bootstrap 200 и эволюционной модели GTR+I+G4. Визуализация филогенетического дерева проводилось в интернет-ресурсе iTOL (<https://itol.embl.de/>).

## Результаты

Подбор праймеров и проверка их работоспособности

Импортированная выборка содержала 380 последовательностей изолятов отобранных из 77 стран, длина которых варьировалась от 10015 до 11966 п.н.

Импортированные последовательности были отобраны из следующих стран: Россия, Китай, Афганистан, Гренландия, Польша, Грузия, Швейцария, Германия, Франция, Англия, Турция, Монголия, Эстония, Ирак, Азербайджан, Сербия, Таджикистан, Австрия, Венгрия, Иран, Бельгия, Словения, Финляндия, США, Канада, Мексика, Индия, Бангладеш, Южная Корея, Пакистан, Эфиопия, Непал, Шри-Ланка, Марокко, Южная

Африка, Таиланд, Бразилия, Гренада, Израиль, Лаос, Аргентина, Намибия, Нигер, Нигерия, Танзания, Центральноафриканская Республика, Тайвань, Уганда, Зимбабве, Египет, Черногория, Бенин, Чили, Гайана, Французская Гвиана, Филиппины, Катар, Кения, Алжир, Сомали, Габон, Буркина-Фасо, Мавритания, Гвинея, Камбоджа, Индонезия, Саудовская Аравия, Оман, Объединенные Арабские Эмираты, Мозамбик, Руанда, Мадагаскар, Сенегал, Чад, Камерун, Ботсвана и Тунис.

На основе выравнивания репрезентативной выборки было подобрано 12 пар праймеров покрывающих весь геном вируса бешенства. Разработанные праймеры представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры для амплификации генома *Rabies lyssavirus*

Смесь праймеров 1		Смесь праймеров 2	
Наименование	Последовательность, 5'-3'	Наименование	Последовательность, 5'-3'
Rab-for_1	acgcctaacaaccagatcaagaagaa	Rab-for_895	ttcgaggaagagataaggagaatgtt
Rab-rev_1000	atcctacaagaatgaatgagattgaacac	Rab-rev_2230	gcttctttaactatgcatcaaggttcat

Rab-for_1860	atgttggagtcagatagtcagacaaat	Rab-for_2910	aggacccttatcttccagtgggc
Rab-rev_3040	cctcgaattcatgttgatacacca	Rab-rev_4250	actcctctcttttcttgaccaactcctc
Rab-for_4031	tcaccaatagtagaggaaagagagcatc	Rab-for_5470	gtgcataattataaagggtgggcat
Rab-rev_5560	aatggggtcatcgtagactctcc	Rab-rev_6430	acttcataaccagagtttccgcacat
Rab-for_6200	cttggtcagggtcaaatgcaaatatgg	Rab-for_7000	tactggatgacaagtcacactctttcacc
Rab-rev_7390	tttgatgattgtccactctcatagtc	Rab-rev_8480	atacagagcctttctgattgcatcctt
Rab-for_8090	tcagtctttgatcaagccgatgag	Rab-for_9275	gggtcagccttgacaggtcaa
Rab-rev_9390	cataaagcatcaatggctggaacat	Rab-rev_10250	gcacctgcctcattaagaactca
Rab-for_10180	acatacctgaccctcattactaccagtc	Rab-for_10950	cataattgtgacgcagaagttactgacat
Rab-rev_11330	agagttatgatcatctcattgtaaggatt	Rab-rev_12040	aaagaacaatcaaacagccagagg

*In silico* амплификация подобранными праймерами предсказывало ПЦР продукты длиной от ~750 до ~1500 п.н, с перекрытием около 100 п.н.

На этапе проверки работоспособности, каждая пара праймеров амплифицировала ПЦР продукт ожидаемого размера. На рисунке 1, представлены продукты ПЦР для каждой пары праймеров в соответствии с нумерацией в таблице 1.

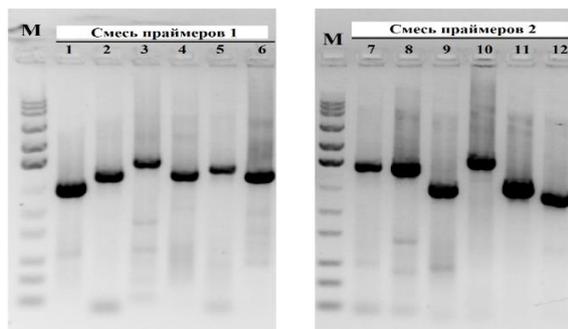


Рисунок 1 - Электрофореграмма ПЦР продуктов амплификации изолята Rab-1-4, где М - маркер молекулярного веса (Fermentas, #SM1293) (100 – 10000 п.н.), 1-12 обозначены соответствующие пары праймеров из таблицы 1

#### Таргетная амплификация и сборка геномов

В связи с тем, что клинические образцы РНК вируса бешенства ограничены в объёме, которого может не хватить для амплификации всех 12 пар праймеров, в предложенном нами протоколе все пары праймеров амплифицируются в двух параллельных реакциях согласно упомянутым смесям. Разработанный протокол был апробирован на 5 образцах РНК выделенных у домашнего КРС в Атырауской области (Кзылкогинском районе, селе Миялы) в апреле 2021 года. Полученные ПЦР продукты были очищены и секвенированы на платформе Illumina MiSeq.

Для изолятов Rab-1-4, Rab-7-4, Rab-8-4, Rab-35-1-4 и Rab-35-2-4 было получено 553542, 605538, 300256, 564354 и 479574 сырых прочтений, соответственно. Согласно результатам сборки *de novo* были получены контиги длиной от 2326 до 5564 п.н. Лучшим совпадением в отчёте BLAST была последовательность KP997032.1 длиной 11873 п.н. имеющая: покрытие 99% и процент идентичности 99,3%. В результате картирования прочтений на

референсную последовательность для изолятов Rab-1-4, Rab-7-4, Rab-8-4, Rab-35-1-4 и Rab-35-2-4 было идентифицировано 74, 82, 85, 76 и 77 мутаций, при 2564×, 1823×, 3323×, 2441× и 2358× медиальной глубине секвенирования, соответственно (рисунок 2).

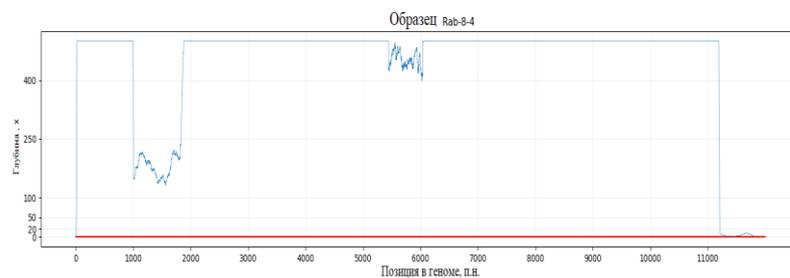


Рисунок 2 – График глубины секвенирования изолята Rab-8-4

Как видно на рисунке 2, праймеры в регионах 1000-2000, 5100-6000 и в особенности 11183-11767, имеют меньшую эффективность амплификации. В связи с этим, конечная часть кодирующей последовательности L гена (от 11183 до 11767) была секвенирована методом Сэнгера (пара праймеров Rab-for\_10950 и Rab-rev\_12040). Консенсусы, полученные методами Illumina и Сэнгера, были объединены.

В итоге, были получены консенсусные последовательности геномов 5 изолятов *Rabies lyssavirus* покрывающие все кодирующие регионы. Для изолятов Rab-1-4, Rab-7-4, Rab-8-4, Rab-35-1-4 и Rab-35-2-4 были получены консенсусы размером 11781, 11711, 11796, 11784 и 11796 п.н, соответственно.

#### Генотипирование и филогенетический анализ

Согласно отчёту интернет-ресурса RABV-GLUE, исследуемые изоляты принадлежат мажорной кладе Cosmopolitan и минорной кладе CA1, с ближайшей референсной последовательностью JQ944705.

Для дальнейшего филогенетического анализа из баз данных RABV-GLUE и NCBI Virus было импортировано 838 полногеномных последовательностей (принадлежащих мажорной кладе Cosmopolitan) и 5781 полных и частичных последовательностей N гена (не менее 1000 п.н.), соответственно. На рисунке 3, представлено филогенетическое дерево, реконструированное для визуализации расположения исследуемых изолятов на основе полногеномных последовательностей. Размер гомологичного региона, на основе которого было построено дерево, составило 11722 п.н.

Пять исследуемых изолятов группируются в два кластера одной клади (рисунок 3).

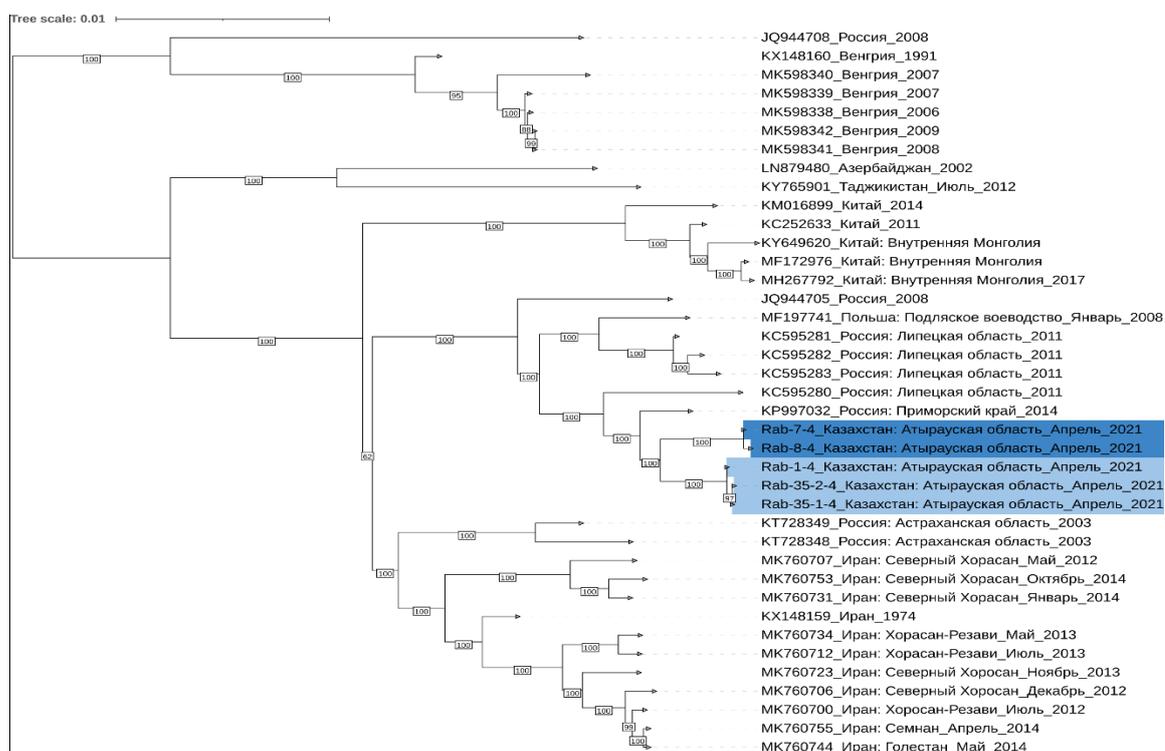


Рисунок 3 - Филогенетическое дерево исследуемых изолятов на основе полногеномных последовательностей

В первый кластер входят два изолята (Rab-7-4 и Rab-8-4), во второй кластер входят три изолята (Rab-1-4, Rab-35-1-4 и Rab-35-2-4). Эти кластеры отличаются между собой на 54 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP).

Из доступных полногеномных последовательностей наиболее генетически близкими являются изоляты, выделенные в Европейской части России (Липецкая область) в 2011 году, и изолят, выделенный в Приморском крае России. Соседствующие клады представлены штаммами из Китая и Ирана.

Для достижения большего числа покрытия доступных последовательностей в базе данных, было построено филогенетическое дерево на основе N гена (рисунок 4).



Воронежской области, Липетской области, Владимирской области, Самарской области.

Кластер №2, представлен ранее опубликованными изолятами отобранными из Актюбинской, Алматинской и Восточно-Казахстанской областей в 2014 году. Данный кластер формируется из двух ветвей. Первая ветвь ориентирована границей Северо-Запада Казахстана (Оренбургская область, Астраханская область, Актюбинская область). Вторая ветвь, делится на две подветви: «Северо-Казахстанская под ветвь» (Омская и Новосибирская области, а также Алматинская область) и «Юго-Восточная под ветвь» (Западно-Казахстанская область, и преимущественно Китай). Данный кластер интересен значительным преимуществом инфицированных

### Обсуждение

Эпидемиологическое генотипирование вирусов бешенства в основном выполняется с использованием секвенирования N гена методом Сэнгера, однако генотипирование на основе полногеномной последовательности (включающее в анализ все кодирующие регионы) характеризуется большей разрешающей способностью, позволяющей идентифицировать новые геногруппы на основе генетического расстояния [12, с.25-30].

Это первое исследование в Казахстане направленное на разработку протокола, позволяющего оценивать генетическое разнообразие

домашних животных (64,7%), над инфицированными дикими животными (11,76%), что может объяснять большое количество инфицированных людей – 23,52%.

Кластер №3, представлен 4 изолятами выделенными в 1988, 2004 и 2014 годах. Положение изолятов АУ352490.1 (Алматы, 1988), АУ352492.1 (Целиноград) и АУ352491.1 (Целиноград, 1988, не присвоенный к кластеру) указывает на то, что в то время было по крайней мере 2 линии генотипов в Целиноградской области и 1 линия в Алматинской области (АУ352490.1).

Отдельно расположенный изолят АУ352491.1 (Целиноград, 1988) расположен на ветви с дочерними изолятами выделенными из Омской области.

циркулирующих вирусов бешенства на основе полногеномной последовательности. Ранее аналогичный протокол также был успешно использован в других исследованиях.

Разработанный протокол позволил амплифицировать и секвенировать 100% кодирующих последовательностей генов N, P, M и G. Однако, низкая эффективность праймеров Rab-for\_10950 и Rab-rev\_12040 (пара № 12), может приводить к покрытию гена L минимум на 97,45%.

Согласно предыдущим исследованиям [13, с.1-10], на момент 2016 года в РК наблюдалась восходящая тенденция заболеваемости бешенством, со средним приростом 7% в год среди

восприимчивых животных. Ежегодная регулярная вакцинация сельскохозяйственных и диких животных не повлияла на общее число случаев заболевания. Хотя доля заболевания бешенством среди сельскохозяйственных животных в РК составляет 50-62,8%, основным природным резервуаром и главным переносчиком инфекции безусловно являются дикие животные.

### **Заключение**

Эпизоотический анализ выявленных случаев бешенства за период 2020-2022 гг. установил, что Республика Казахстан является эндемически неблагополучной территорией с растущей тенденцией. Предпринятые ранее меры борьбы с распространением инфекции, в виде вакцинации диких и домашних животных, не привели к положительным результатам. Как было выяснено ранее, очаги вспышек в основном локализуются в приграничных территориях. В связи с этим, эпидемиологические исследования, позволяющие отслеживать источники и пути движения инфекции, позволят улучшить эпизоотическую ситуацию сконцентрировав усилия по борьбе с бешенством на ключевых факторах.

В данной работе мы представили первое исследование в Казахстане направленное на разработку протокола, позволяющего оценивать генетическое разнообразие циркулирующих вирусов бешенства на основе полногеномной последовательности. Разработанный протокол позволил

Как говорилось ранее большинство вспышек бешенства характерны для приграничных районов Казахстана. В связи с этим, генотипирование вспышек с целью эпидемиологического анализа и отслеживания источников инфекции является актуальной задачей [14, с.138-141]

амплифицировать и секвенировать 100% кодирующих последовательностей генов N, P, M и G. Однако, низкая концентрация клинической РНК, может приводить к неэффективному отжигу нескольких праймеров, приводящих к покрытию гена L минимум на 97,45%.

Исследуемые нами изоляты на основе полногеномной последовательности группируются в два кластера отличающиеся между собой на 54 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). На основе последовательности N гена изоляты группируются в 1 кластере, с изолятом выделенным из Западно-Казахстанской области в 2014 году. Ближайшими изолятами к данному кластеру являются изоляты отобранные в Западной России: Нижегородской области, Воронежской области, Липетской области, Владимирской области, Самарской области.

Исследуемые изоляты были депонированы в базу данных GenBank под номерами: ON366706, ON366707, ON366708, ON366709 и ON366710.

## **Благодарность**

Статья была выполнена по бюджетной программе 217 «Развитие науки», подпрограмма 102 «Грантовое финансирование научных исследований» МОН РК, грантового финансирования молодых ученых по научным и (или) научно-техническим проектам на 2020-2022 годы (проект ИРН №08053353 «Молекулярно-биологический анализ вируса бешенства циркулирующих на территории Республики Казахстан»).

## **Список литературы**

1 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, F.I. Korennoy, G.N. Yessembekova, K.K. Beisembayev // Geospatial health. -2016. - №11(2). -P.32-35.

2 Даугалиева, А.Т. Молекулярно-генетическое исследование возбудителя бруцеллеза, циркулирующего на территории РК. [Текст] / А.Т. Даугалиева, А.К. Мусаева, А. Айткулова // 3i: intellect, idea, innovation – интеллект, идея, инновация. - 2021. -№2. - С.3-9.

3 Кабжанова, А.М. Изучение влияния природно-климатических факторов на эпизоотический процесс бешенства [Текст] / А.М. Кабжанова, С.К. Абдрахманов, Г.Н.Есембекова // 3i: intellect, idea, innovation – интеллект, идея, инновация. - 2021. -№1. - С.1-5.

4 Katoh, K. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. [Текст] / K. Katoh, D.M. Standley // Molecular biology and evolution. - 2013. - №30(4). - P.772-780.

5 Danecek, P. Twelve years of SAMtools and BCFtools. [Текст] / P.Danecek // Gigascience. - 2021. -№10(2). - P.8-9.

6 Kozlov, A.M. RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. [Текст] / A.M. Kozlov // Bioinformatics. - 2019. - №35(21). - P. 4453-4455.

7 Deviatkin, A.A. The phylodynamics of the rabies virus in the Russian Federation. [Текст] / A.A. Deviatkin // PLoS One. - 2017. - №12(2). - P.17-18.

8 Pimentel, M.F. Genotyping of rabies positive samples isolated from animals in Mato Grosso and Rondônia-Brazil. [Текст] / M.F. Pimentel // Infection, Genetics and Evolution. - 2019. - №103(2). - P.105-106.

9 Calvelage, S. 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. [Текст] / S. Calvelage // Viruses. - 2021. - №13(4). - P.634-635.

10 Hu, S.C. Lyssavirus in Japanese Pipistrelle, Taiwan. [Текст] / S.C. Hu // Emerging Infectious Disease. -2018. - №24(4). - P.782-785.

11 Al-Eitan. Whole-genome sequencing and phylogenetic analysis of rabies viruses from Jordan. [Текст] / Al-Eitan // PLoS neglected tropical diseases. - 2021. - №15(5). - P.31-36.

12 Hyeon, J.Y. Whole Genome Sequencing and Phylogenetic Analysis of Rabies Viruses from Bats in Connecticut, USA, 2018-2019. [Текст] / J.Y. Hyeon // Viruses. - 2021. - №13(12). - P.25-35.

13 Sultanov, A. A. Rabies in Kazakhstan. [Текст] / A.A. Sultanov // PLoS neglected tropical diseases. - 2016. - № 8. - P.1-15.

14 Shevtsov, A.B. Molecular genetic analysis of rabies virus in the east kazakhstan region [Текст] / A.B. Shevtsov, G.N. Yessembekova, A.Zh. Abenova, A.M. Kabzhanova, S.K. Abdrakhmanov // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный). - 2021. - №4 (111). - P.138-143.

## References

1 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, F.I. Korennoy, G.N. Yessembekova, K.K. Beisembayev // Geospatial health. - 2016. - №11(2). - P.32-35.

2 Daugalieva, A.T. Molekulyarno-geneticheskoe issledovanie vozbuditelya brucelleza, cirkuliruyushchego na territorii RK. [Текст] / A.T. Daugalieva, A.K. Musaeva, A. Ajtkulova // Zi: intellect, idea, innovation – intellekt, ideya, innovaciya. - 2021.- No.2. - P.3-9.

3 Kabzhanova, A.M. Izuchenie vliyaniya prirodno-klimaticheskikh faktorov na epizooticheskij process beshenstva [Текст] / A.M. Kabzhanova, S.K. Abdrakhmanov, G.N. Esembekova // Zi: intellect, idea, innovation – intellekt, ideya, innovaciya. - 2021.- No.1. - P.1-5.

4 Katoh, K. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. [Текст] / K. Katoh, D.M. Standley // Molecular biology and evolution. - 2013. - №30(4). - P.772-780.

5 Danecek, P. Twelve years of SAMtools and BCFtools. [Текст] / P. Danecek // Gigascience. - 2021. - №10(2). - P.8-9.

6 Kozlov, A.M. RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. [Текст] / A.M. Kozlov // Bioinformatics. - 2019. - №35(21). - P. 4453-4455.

7 Deviatkin, A.A. The phylodynamics of the rabies virus in the Russian Federation. [Текст] / A.A. Deviatkin // PLoS One. - 2017. - №12(2). - P.17-18.

8 Pimentel, M.F. Genotyping of rabies positive samples isolated from animals in Mato Grosso and Rondônia-Brazil. [Текст] / M.F. Pimentel // Infection, Genetics and Evolution. - 2019. - №103(2). - P.105-106.

9 Calvelage, S. 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. [Текст] / S. Calvelage // Viruses. - 2021. - №13(4). - P.634-635.

10 Hu, S.C. Lyssavirus in Japanese Pipistrelle, Taiwan. [Текст] / S.C. Hu // Emerging Infectious Disease. - 2018. - №24(4). - P.782-785.

11 Al-Eitan. Whole-genome sequencing and phylogenetic analysis of rabies viruses from Jordan. [Текст] / Al-Eitan // PLoS neglected tropical diseases. - 2021. - №15(5). - P.31-36.

12 Hyeon, J.Y. Whole Genome Sequencing and Phylogenetic Analysis of Rabies Viruses from Bats in Connecticut, USA, 2018-2019. [Текст] / J.Y. Hyeon // Viruses. - 2021. - №13(12). - P.25-35.

13 Sultanov, A. A. Rabies in Kazakhstan. [Текст] / A.A. Sultanov // PLoS neglected tropical diseases. - 2016. - № 8. - P.1-15.

14 Shevtsov, A.B. Molecular genetic analysis of rabies virus in the east kazakhstan region [Текст] / A.B. Shevtsov, G.N. Yessembekova, A.Zh. Abenova, A.M. Kabzhanova, S.K. Abdrakhmanov // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный). - 2021. - №4 (111). - P.138-143.

## **RABIES VIRUS ИЗОЛЯТТАРЫНЫҢ ТОЛЫҚ ГЕНОМДЫҚ РЕТТІЛІГІ ЖӘНЕ ГЕНОТИПТЕУ ХАТТАМАСЫ**

*Есембекова Гульжан Нурлыбекқызы*  
*PhD*

*С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті*  
*Астана қ., Қазақстан*  
*E-mail: Gulzhan\_nk@mail.ru*

*Амиргазин Асылулан Оразғалиұлы*  
*«Қолданбалы генетика» зертханасының ғылыми қызметкері*  
*Ұлттық биотехнология орталығы*  
*Астана қ., Қазақстан*  
*E-mail: asylulan0894@gmail.com*

*Шевцов Александр Борисович*  
*Биология ғылымдарының кандидаты*  
*Ұлттық биотехнология орталығы*  
*Астана қ., Қазақстан*  
*E-mail: ncbshevtsov@gmail.com*

*Әбенова Әсем Жандарбекқызы*  
*Докторант*  
*С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті*  
*Астана қ., Қазақстан*  
*E-mail: asem.abenova.1993@mail.ru*

*Кабжанова Анар Мағжанқызы*

*Ветеринария ғылымдарының магистрі*  
*С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті*  
*Астана қ., Қазақстан*  
*E-mail: an\_kab@bk.ru*

*Әбдірахманов Сәрсенбай Қадырұлы*  
*Ветеринария ғылымдарының докторы*  
*С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті*  
*Астана қ., Қазақстан*  
*E-mail: s \_ abdrakhmanov @ mail. ru*

## **Түйін**

Жұмыстың мақсаты-illumina MiSeq платформасында Rabies lyssavirus РНҚ клиникалық үлгілерін толық геномдық жүйелеу (секвенирлеу) хаттамасын сипаттау болып табылады. Бұрын, Қазақстан аумағында айналатын құтыру вирусын генотиптеу нуклеопротеин генінің (N ген) тізбегі негізінде жүргізілген. Бұл жұмыста құтыру вирусының жергілікті изоляттарының толық геномдық тізбегін секвенирлеу және генотиптеу әдісі сипатталған. Хаттамада қазіргі уақытта Rabies lyssavirus – ті эпидемиологиялық талдау үшін ғана емес, сонымен қатар SARS-CoV-2, Influenza және басқалары сияқты басқа вирустық қоздырғыштар үшін қолданылатын сынама дайындау, секвенирлеу және генотиптеу әдістері сипатталған.

Нәтижесінде, Атырау облысында іріктелген 5 Rabies lyssavirus изоляттарының геномдарының консенсустық тізбегі алынды. Филогенетикалық талдау жүргізіліп, генотиптер тағайындалды. Барлық изоляттар Cosmopolitan SA1 класына жатады. Зерттелген изоляттар Батыс Ресейден келетін филогенетикалық жақын изоляттармен біртұтас кластер құрайды: Нижний Новгород облысы, Воронеж облысы, Липет облысы, Владимир облысы, Самара облысы.

**Кілт сөздер:** құтыру; ПТР; секвенирлеу; филогенетикалық ағаш; штамм; изолят; генотип.

## ***PROTOCOL FOR WIDE-GENOME SEQUENCING AND GENOTYPING OF RABIES VIRUS ISOLATES***

*Yessembekova Gulzhan Nurlybekovna*  
*PhD*

*Kazakh Agro-Technical University named after S. Seifullin*  
*Astana, Kazakhstan*  
*E-mail: Gulzhan\_nk@mail.ru*

*Amirgazin Asylulan Orazgaliyevich*  
*Research associate of the laboratory of Applied Genetics»*  
*National Center for Biotechnology*  
*Astana, Kazakhstan*

*E-mail: asylulan0894@gmail.com*

*Shevtsov Alexander Borisovich  
Candidate of Biological Sciences  
Head of the laboratory of Applied Genetics  
National Center for Biotechnology  
Astana, Kazakhstan*

*E-mail: E-mail: ncbshevtsov@gmail.com  
Abenova Assem Zhandarbekovna  
Doctoral student*

*Kazakh Agro-Technical University named after S. Seifullin  
Astana, Kazakhstan  
E-mail: asem.abenova.1993@mail.ru*

*Kabzhanova Anar Magzhanovna  
Master of Veterinary Sciences  
S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University  
Astana, Kazakhstan  
E-mail: an\_kab@bk.ru*

*Abdrakhmanov Sarsenbai Kadyrovich  
Doctor of Veterinary Sciences  
S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University  
Astana, Kazakhstan  
E-mail: s\_abdrakhmanov@mail.ru*

## **Abstract**

The purpose of this work is to describe a protocol for whole genome sequencing of clinical samples of Rabies lyssavirus RNA on the Illumina MiSeq platform. Previously, genotyping of the rabies virus circulating in Kazakhstan was based on the nucleoprotein gene sequence (N gene). This paper describes a method for sequencing and genotyping whole genome sequences of local rabies virus isolates. The protocol describes the methods of sample preparation, sequencing and genotyping currently used for epidemiological analysis not only of Rabies lyssavirus, but also for other viral pathogens such as SARS-CoV-2, Influenza and others.

As a result, consensus sequences of the genomes of five Rabies lyssavirus isolates selected in the Atyrau region were obtained. Phylogenetic analysis was carried out and genotypes were assigned. All isolates belong to the clade Cosmopolitan CA1. The studied isolates form a single cluster with phylogenetically close isolates from Western Russia: Nizhny Novgorod region, Voronezh region, Lipetsk region, Vladimir region, Samara region.

**Keywords:** rabies; PCR; sequencing; phylogenetic tree; strain; isolate; genotype.