

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

«ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ВИРУСА ГРИППА
ПТИЦ И МИКРОБИОМА ПТИЦ В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ»

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Щербаковой Елизаветы Сергеевны

Научный руководитель

Канд. биол. наук


30.05.2023


М.В. Каневский

Научный консультант:

Зав. отделом микробиологии

РосНИПЧИ «Микроб»,

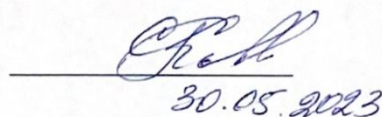
Канд. биол. наук.



Н.А. Осина

Заведующий кафедрой

Док. биол. наук, проф.


30.05.2023

С.А. Коннова

Саратов 2023

Введение.

Глобальное распространение вирусов гриппа птиц, вызывающих заболевания диких и домашних животных приводит к значительным экономическим потерям вследствие масштабности вспышек и массовой гибели домашних птиц. Способность этих вирусов преодолевать межвидовой барьер и инфицировать человека, с развитием тяжелых клинических форм заболевания обуславливает необходимость проведения мониторинга за распространением вирусов гриппа А среди диких птиц, оперативной расшифровки случаев заболевания (или гибели) домашних птиц для своевременного проведения эффективных противоэпизоотических и противоэпидемических мероприятий

Основной задачей мониторинга за гриппом птиц является выявление заносов возбудителя на территорию нашей страны и его распространение в популяциях диких птиц околотоводного комплекса

Помимо гриппа птиц, птицы переносят и ряд других микроорганизмов, многие из которых могут вызывать болезни животных и человека. Изучить возможность распространения патогенных микроорганизмов позволяет метагеномный анализ, выполняемый с использованием технологий высокопроизводительного секвенирования.

Цель исследования состояла в выявлении РНК вируса гриппа птиц в материале от диких и домашних птиц, определении его субтипов и изучении микробиома трахеи диких птиц околотоводного комплекса в Саратовской области.

Для реализации поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Выявление РНК вируса гриппа А в биологическом материале от диких и погибших домашних птиц с помощью ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени и определение субтипа обнаруженного в изученных пробах вируса гриппа А

2. Определение микробиома трахеи диких птиц на основании полногеномного секвенирования РНК и 16S рРНК

3. Биоинформационный анализ полученных результатов.

Структура бакалаврской работы. Работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов, списка использованных источников. Литературный обзор составлен на основе анализа 47 источников и включает в себя следующие вопросы: характеристика и строение вируса гриппа птиц, заболевания, вызываемые вирусом у диких и домашних птиц, мониторинг и ситуация по высокопатогенному гриппу в мире, а также использование метагеномного анализа как перспективный подход в изучении микробиома птиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В 2021 г. методом ОТ-ПЦР исследовали биологический материал (мазок из клоаки, трахея, легкие, селезенка) от 107 диких птиц (37 видов), добытых на территории Саратовской области Ровенского района, окрестности с. Береговое, берег реки Волга в июне-ноябре 2021 г. В качестве объекта исследования использовались РНК вируса гриппа А, которые были обнаружены в 4 пробах материала (мазок из клоаки, трахея) от двух птиц (серебристые чайки). Таким образом, 1,9 % птиц, включенных в исследование, были инфицированы вирусом гриппа птиц.

В 2022 г. исследовано по 678 образцов суспензий трахеи, легких, клоакальных мазков, кишечника, селезенки и мозга от 113 птиц 22 видов. РНК вируса гриппа А выявили в 1 пробе (0,9 %) клоакального мазка озерной чайки, добытой на территории Ровенский р-н., окр. с. Береговое, ерик Щерчак. Субтип вируса гриппа А с использованием имеющихся наборов реагентов установить не удалось.

В 2023 г. исследовали 20 птиц, добытых в апреле в Александрово-Гайском районе Саратовской области. Результат отрицательный.

Осенью 2021 г. на территории Саратовской области были зарегистрированы вспышки птичьего гриппа среди домашних птиц на территории трех районов: Федоровский район, с. Николаевка; Краснопартизанский район., с. Толстовка; Дергачевский район, с. Верхазовка. Методом ОТ-ПЦР исследовано 55 пробы РНК, выделенной из материала от 15

павших домашних птиц. Во всех пробах выявлена РНК грипп А субтипа Н5. В 2022 г. были зарегистрированы вспышки птичьего гриппа на птицеводческих предприятиях Дергачевского и Вольского районов. В ходе проведенного исследования, во всех пробах, доставленных из Дергачевского района (54 пробы суспензии головного мозга, трахеи, селезенки, легкого от 14 павших птиц) методом ОТ-ПЦР, выявлена РНК вируса гриппа А субтипа Н5.

При анализе 13 проб, доставленных из Вольского района (13 проб кишечника и сердца от 13 павших птиц), в 4 случаях выявлена РНК вируса гриппа А.

Для выделения нуклеиновых кислот при выявлении вируса гриппа и определение его субтипа использовали набор реагентов «Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии).

При секвенировании РНК из смывов трахеи диких птиц для выделения РНК использовали набор реагентов «SV Total RNA Isolation System» (Promega, USA).

Для получения кДНК использовали набор реагентов «Реверта-L» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии). При секвенировании РНК обратную транскрипцию осуществляли с использованием компонентов набора реагентов «Ion Total RNA-Seq v2» (Thermo Fisher Scientific, USA).

Выявляли РНК высокопатогенного вируса гриппа методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. Работу выполняли в два этапа: на первом - детектировали вирус гриппа А с использованием ПЦР-смеси -1-FEP/FRT Influenza virus A из набора «АмплиСенс Influenza virus A H5N1-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии), на втором – определяли субтип Н5N1 с использованием ПЦР-смеси -1-FEP/FRT Influenza virus A H5N1 из набора «АмплиСенс Influenza virus A H5N1-FL» или субтипы Н5, Н7, Н9 с использованием набора реагентов «АмплиСенс Influenza virus А-тип-Н5,Н7,Н9-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии).

О наличии в пробе РНК вируса гриппа А судили по наличию в пробе специфичной флуоресценции по каналу FAM/Green и образованию в таблице

результатов значения Ct (цикл, при котором кривая флуоресценции пересекает пороговую линию со значением 0,1 при устранении выбросов – 10%) меньше или равно 33.

С помощью ПЦР-смеси-1-FEP/FRT Influenza virus A H5N1 из набора «АмплиСенс Influenza virus A H5N1-FL», определяли принадлежность вируса А к типу H5N1

О наличии в пробе РНК вируса гриппа А типа H5 судили по наличию в пробе специфичной флуоресценции по каналу FAM/Green и образованию в таблице результатов значения Ct меньше или равно 33.

О наличии в пробе РНК вируса гриппа А типа N1 судили по наличию в пробе специфичной флуоресценции по каналу JOE/Yellow и образованию в таблице результатов значения Ct меньше или равно 33.

С помощью ПЦР-смеси-1-FEP/FRT Influenza virus A H5, H7, H9 из набора «АмплиСенс Influenza virus А-тип-H5, H7, H9-FL», определяли принадлежности вируса А к типам H5, H7, H9 H5, H7, H9.

О наличии в пробе РНК вируса гриппа А типа H5 судили по наличию в пробе специфичной флуоресценции по каналу FAM/Green и образованию в таблице результатов значения Ct меньше или равно 33.

О наличии в пробе РНК вируса гриппа А типа H7 судили по наличию в пробе специфичной флуоресценции по каналу JOE/Yellow и образованию в таблице результатов значения Ct меньше или равно 33.

О наличии в пробе РНК вируса гриппа А типа H9 судили по наличию в пробе специфичной флуоресценции по каналу ROX/Orange и образованию в таблице результатов значения Ct меньше или равно 33.

В случае, когда субтип вируса гриппа А не удавалось определить с помощью ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени, проводили амплификацию HA, NA, NP, M генов, кодирующих гемагглютинин (H), нейраминидазу (N), нуклеопротеин, матричный ген соответственно, с использованием праймеров.

После получения ампликонов их секвенировали с помощью высокопроизводительного секвенирования.

Таким образом, в результате проведенных в 2022 г. по эпидемиологическим показаниям исследований проб от птиц в птицеводческих хозяйствах на территории Саратовской области, в 54 случаях выявлена РНК вируса гриппа А H5N1 и в 4 - вируса гриппа А.

Для освоения метагеномного анализа методики был выбран микробиом трахеи диких птиц околородного комплекса (озерная чайка, чайка хохотунья, сизая чайка, чомга, кряква, большой баклан, лысуха), добытых на территории Саратовской области.

Для выделения РНК использовали набор реагентов «SV Total RNA Isolation System» (Promega, USA). Подготовку проб для секвенирования проводили, используя набор реагентов «Ion Total RNA-Seq v2» (Thermo Fisher Scientific, USA). Секвенирование подготовленных образцов выполняли на генетическом анализаторе (секвенатор) Ion S5 XL

Анализ включал следующие этапы:

- постановка реакции фрагментации РНК и последующая очистка;
- гибридизация и лигирование проб РНК;
- выполнение обратной транскрипции с последующей очисткой продукта реакции;
- амплификация и баркодирование проб кДНК;
- очистка ампликонов для секвенса;
- запуск прибора.

Метагеномный анализ данных секвенирования проводили с помощью программного обеспечения Kraken2.

Нами были выявлены представители 12 типов бактерий: *Actinobacteria* (3 рода), *Firmicutes* (4 рода), *Proteobacteria* (16 родов), *Bacteroidota* (3 рода), *Fusobacteriota* (2 рода), *Deinococcus-Thermus* (2 рода), *Chlamydiae* (1 род), *Fusobacteria* (1 род), *Bacillota* (1 род), *Tenericutes* (1 род), *Pseudomonadota* (2 рода), *Bacteroidetes* (1 род) и эукариоты: простейшие (*Plasmodium*, *Toxoplasma*),

грибы (*Botrytis*, *Zymoseptoria*), пироплазмиды (*Babesia*), диатомовые водоросли (*Thalassiosira*). В наших исследованиях у птиц околородного комплекса также обнаружены представители *Fusobacteriota* – возбудитель орнитоза, *Deinococcus-Thermus*, *Chlamydiae* – возбудитель орнитоза, *Fusobacteria*, *Bacillota* – возбудитель пуллороза (тиф), *Pseudomonadota* – возбудитель псевдомоноза, *Bacteroidetes*.

Наибольшее количество различных родов микроорганизмов от 11 до 22 выявлено в пробах от большого баклана и сизой чайки.

В ходе проведенных исследований выявить нуклеиновые кислоты вирусов в исследуемом материале не удалось. Скорее всего, для оценки вириома требуется исследование другого вида материала (суспензии печени и селезенки, клоакальные мазки).

Так же проводили метагеномный анализ на основе полногеномного секвенирования 16S рРНК. Для этого исследования были взяты суспензии трахеи диких птиц (лысуха, грач, серошекая поганка, чомга, чирок-свистунок, гусь белолобый, красноголовый нырок, свиязь, лунь болотный, голубь сизый, скворец обыкновенный, цапля серая).

Выделяли нуклеиновые кислоты и получали кДНК. Затем проводили амплификацию фрагментов 16S рРНК бактериальных клеток, находящихся в образцах с использованием четырех универсальных пар праймеров. Каждый локус амплифицировали отдельно в реакционной смеси.

Полученные ампликоны объединяли в одну библиотеку и проводили ее секвенирование с помощью высокопроизводительного нанопорового секвенирования на платформе MinION (ONT, Великобритания).

Подготовка проб для секвенирования осуществлялась с помощью набора Native Barcoding Kit 24 V14 (ONT, Великобритания), которая включала следующие этапы:

- очистка ампликонов после ПЦР;
- дотраивание концов фрагментов ДНК;
- легирирование баркодов;

- объединение образцов в одну библиотеку и очистка;
- легирование адаптеров для секвенирования и очистка.
- подготовка и загрузка проточной ячейки R10.4.1

С помощью программного обеспечения MinKNOW выбирались соответствующие параметры процесса секвенирования.

Для анализа полученных метагеномных данных использовалось программное обеспечение EPI2ME, которое для сравнения и идентификации имеет различные базы данных, включая базу данных рРНК NCBI 16S.

С использованием технологии полногеномного секвенирования 16S рРНК нами были выявлены практически те же типы бактерий: *Actinobacteria* (7 родов), *Firmicutes* (8 родов), *Proteobacteria* (17 родов), *Bacteroidota* (8 родов), *Tenericutes* (4 рода), *Fusobacteriota* (1 род), *Acidobacteria* (1 род), *Armatimonadetes* (1 род).

Наибольшее количество родов бактерий (21) выявлено в материале от Серощекой поганки: *Actinobacteria* (5 родов, среди которых наиболее количество *Actinomyces* (14481 видов)), *Firmicutes* (1 род), *Proteobacteria* (9 родов), *Bacteroidota* (5 родов), *Fusobacteriota* (1 род)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что на территорию Саратовской области осуществляются заносы вирусов гриппа птиц А. Занос вирусов происходит с дикими перелетными птицами, преимущественно околородного комплекса, косвенным подтверждением чему свидетельствует выявление РНК гриппа А в материале от серебристой чайки. При этом циркуляция вируса в популяции диких птиц не приводит к их гибели, о чем свидетельствует выявление РНК вируса в материале от птицы, добытой в результате отстрела. Полученные нами результаты подтверждают данные многочисленных исследований, свидетельствующие о тропности вируса к эпителию верхних дыхательных путей и кишечника, т.к. положительные результаты были выявлены в образцах РНК, выделенной из проб трахеи и

клоаки, что способствует фекально-оральному механизму распространения вируса.

Полученные нами данные также указывают на высокую патогенность вирусов гриппа птиц для домашних птиц, т.к. РНК вируса была выявлена у погибших птиц (кур и уток). Занос вируса в популяцию домашних птиц приводит к развитию вспышек, что подтверждается массовой гибелью птиц и выявлением РНК вируса во всех пробах.

Таким образом, проведение исследований материала от диких и домашних птиц с целью выявления РНК вирусов гриппа птиц позволяет определить вероятность заноса возбудителя и своевременно установить этиологию заболевания, что в свою очередь позволяет провести профилактические мероприятия с целью недопущения дальнейшего распространения вируса.

Также нами получены первые данные о вариабельности микробиома смывов с трахеи у разных видов птиц Саратовской области. Выявленные различия в составе микроорганизмов могут быть обусловлены местом обитания птиц и используемым ими кормом. У большинства изученных видов отмечено наличие патогенных для человека бактерий.

ВЫВОДЫ

1. Заболевание у диких птиц было зарегистрировано только в Ровенском районе, окр. с. Береговое.

2. Павшие домашние птицы были носителями грипп А субтипа Н5. Заболевание было выявлено в 2021 г. - в Федоровском район, Краснопартизанском районе, Дергачевском районе, в 2022 г. в Дергачевском и Вольском районах.

3. Получены первые данные о вариабельности микробиома трахеи у разных видов птиц Саратовской области. Обнаружено присутствие бактерий типов *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Fusobacteriota*,

Deinococcus-Thermus, *Chlamydiae*, *Fusobacteria*, *Bacillota*, *Tenericutes*, *Pseudomonadota*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Armatimonadetes* и также эукариоты: простейшие (*Plasmodium*, *Toxoplasma*), грибы (*Botrytis*, *Zygomycetozoa*), пироплазмиды (*Babesia*), диатомовые водоросли (*Thalassiosira*). У большинства изученных видов отмечено наличие патогенных для человека бактерий.

