

Қазақстан Республикасы Тәуелсіздігінің 30 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары – 17: «Қазіргі аграрлық ғылым: цифрлық трансформация» атты халықаралық ғылыми – тәжірибелік конференцияға материалдар = Материалы международной научно – теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 17: «Современная аграрная наука: цифровая трансформация», посвященной 30 – летию Независимости Республики Казахстан.- 2021.- Т.1, Ч.1 - С.144-146

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ *FRANCISELLA TULARENSIS*.

Каиржанова А.Д.^{1,2}, докторант 2 курса

Абдрахманов С.К.², декан факультета Ветеринарии и технологии
животноводства, д. в.н., профессор.

Шевцов А.Б.^{1,2}, заведующий лаборатории прикладной генетики, к.б.н.

¹РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, г. Нур-
Султан.

Туляремия – это острое зоонозное природно-очаговое инфекционное заболевание, встречающееся на всех континентах Северного полушария. Возбудитель туляремии - *Francisella tularensis* факультативная внутриклеточная бактерия-паразит. Среди диких животных отряды мелких грызунов и зайцеобразных считаются ключевыми природными резервуарами данной бактерии. Возбудитель туляремии принадлежит к семейству *Francisellaceae*, роду *Francisella* [1]. Согласно принятой в настоящее время зарубежной классификации, в пределах вида *F. tularensis* выделяют четыре подвида: *tularensis* (то же, что и *nearctica*) – тип А, *holarctica* (то же, что и *palaeartica*) – тип В, *mediasiatica* и *novicida*.

Заболеваемость туляремией регистрируется в виде спорадических случаев, с нерегулярными вспышками. Природные очаги туляремии существуют в Северной Америке, Европе, Австралии и значительной части Азии, которые характеризуются своей стойкостью и способностью аккумулировать данный вид бактерии, таким образом, образуя потенциальную угрозу для жителей, проживающих в эндемичных районах.

Традиционно выявление бактерий в лаборатории клинической микробиологии с помощью фенотипических тестов, в том числе исследование нативного мазка, окрашенного по Граму и биохимических анализов с учетом условиями культивирования и характеристики роста. Однако перечисленные выше методы бактериальной идентификации имеют серьезные ограничения. Во-первых, изредка встречаются микроорганизмы с биохимическими характеристиками, не укладывающиеся в рамках известного рода и вида. Во-вторых, традиционные методы не могут быть использованы для некультивируемых организмов. В-третьих, для идентификации некоторых конкретных групп бактерий, таких как анаэробы и

микобактерии, требуется дополнительное оборудование и экспертиза, которые недоступны в большинстве клинических лабораторий. Эти недостатки можно преодолеть с помощью использования секвенирования гена *16S rRNA*, при этом также способствует открытию новых родов и видов [2].

В работе были использованы 50 штаммов *Francisella tularensis* депонированные в Национальном научном центре особо опасных инфекций имени Мяскута Айкимбаева. Амплификация фрагмента *16S rRNA* гена. Реакция ПЦР выполнена с универсальными праймерами [3] 8f 5' - AgAgTTTgATCCTggCTCAg-3 и 806R - 5' ggACTACCAgggTATCTAAT в общем объеме 30 мкл. ПЦР смесь содержала 10 нг ДНК, 1Ед. TaqDNA Polymerase (Fermentas), 0,2mM каждого дНТФ, 1-й ПЦР буфер (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 10 пмоль каждого праймера. Программа ПЦР амплификации включала длительную денатурацию 95°C в течение 4 минут; 30 циклов: 95°C - 30 секунд, 55°C- 40 секунд, 72°C - 1 минута; заключительная элонгация 7 минут при 72°C, ПЦР программа выполнена с применением амплификатора Simpli Amp Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Определение нуклеотидной последовательности. Очистку ПЦР продуктов проводили ферментативным методом, используя Exonuclease I (Fermentas) и щелочную фосфатазу ([Shrimp Alkaline Phosphatase](#), Fermentas) [4]. Реакцию секвенирования проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xlDNA Analyzer (Applied Biosystems).

Нуклеотидные последовательности, полученные, с применением прямого и обратного праймеров были проанализированы и объединены в общую последовательность, используя программное обеспечение SeqScape 2.6.0 (Applied Biosystems). При визуальном просмотре наложение пиков в хроматограммах отсутствовало, что указывает на отсутствие контаминации ДНК различными видами бактерий (рисунок 1).

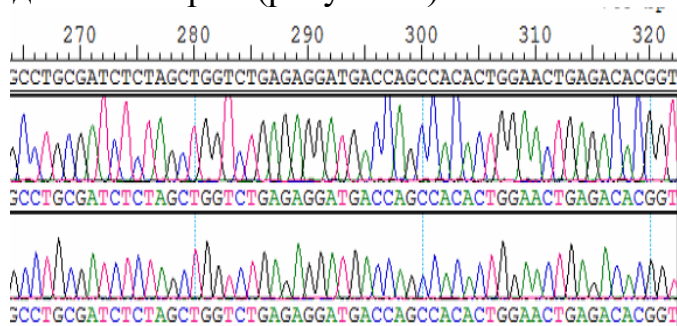


Рисунок 1 – Хроматограмма последовательности *16S rRNA* гена

Полученные нуклеотидные последовательности *16S rRNA* гена идентифицированы относительно доступных нуклеотидных последовательностей, депонированных в базах данных Gene Bank (www.ncbi.nih.gov), используя алгоритм BLAST [5]. В результате анализа полученные нуклеотидные последовательности имели максимальную идентичность 99-100% с нуклеотидными последовательностями, вида

Francisella tularensis. Высокий консерватизм нуклеотидной последовательности *16S rRNA* гена не позволяет проводить подвидовую идентификацию *F. tularensis*, однако позволяет исключить контаминацию ДНК различными видами бактерий.

Список литературы

1. Sjöstedt A.B. *Francisella* The Proteobacteria, part B. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed // Springer-Verlag, New York, N.Y. – 2005. – Vol. 2. – P. 200-210.
2. Woo P. C., Lau S. K., Teng J. L., Tse H. and Yuen K.-Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories // Clin. Microbiol. Infect. – 2008. – Vol.14. – P. 908-934.
3. Vegas E. Z. S., Nieves B., Araque M., Velasco E., Ruiz J., Vila J. Outbreak of Infection With Acinetobacter Strain RUH 1139 in an Intensive Care Unit // Infection control and hospital epidemiology. – 2006. – Vol.27. – №4. – P.397-404.
4. Werle E., Schneider C., Renner M., Volker M., Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // Nucleic Acids. Res. – 1994. – Vol. 22. – P. 4354-4355.
5. Clayton R. A., Sutton G., Hinkle P. S., Bult Jr. C., Fields C. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1995. – Vol. 45. – P. 595-599.