

РАЗРАБОТКА ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМЫ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *FRANCISELLA TULARENSIS*

Даулетов, Н.Е. Турсунбай, А.Д. Кайыржанова, У.А. Избанова, А.Б. Шевцов

Национальный центр биотехнологии, Республика Казахстан, 000010, г. Астана, Кургальжинское шоссе 13/5

e.mail: dauletov.ayan0101@mail.ru

Туляремия – зоонозное заболевание, вызываемое грамотрицательной бактерией *Francisella tularensis*, факультативный внутриклеточный патоген. Десяти бактериальных клеток *F. tularensis subsp. tularensis* достаточно для развития инфекционного процесса с летальностью (без лечения) до 24%, что делает *F. tularensis* потенциальным биологическим оружием. Эпидемиологический мониторинг играет важную роль в контроле за туляремией в Казахстане. Большое разнообразие восприимчивых животных, наличие переносчиков и природных резервуаров выводят на первый план методы основанные на прямом выявлении возбудителя. Данный фактор повышает значимость разработки и использования ПЦР тест-систем при эпидемиологическом мониторинге, особенно, при работе со сложными образцами из окружающей среды. ПЦР в реальном времени является более быстрым, чувствительным и специфическим методом обнаружения патогенов.

В рамках настоящих исследований разработана ПЦР тест-система в режиме реального времени (qPCR) для идентификации *F. tularensis*. Разработаны видоспецифичные праймеры и флуоресцентно-меченный зонд TaqMan к последовательности многокопийного инсерционного элемента *ISFtu1*, частота встречаемости которого в геноме *F. tularensis* достигает 50 копий.

Результаты выравнивание последовательно-

стей *ISFtu1* 12 штаммов *F. tularensis* и 1 штамма *F. novacida* показало, что эта область высоко консервативна в анализируемых геномах. Был выбран оптимальный участок для подбора прямого праймера *ISFtu1_F_54*, обратного праймера *isftu-1_R_189* и флуоресцентного зонда *isftu-2_Probes_108*. Оценка специфичности была подтверждена на ДНК двух подвидов *F. tularensis subsp. mediasiatica* и *F. tularensis subsp. holarctica*, 27 не целевых бактериальных видах и 3 эукариотических организмов. Наблюдался специфический сигнал только на образцах целевых организмов, без появления амплификации на не целевых образцах. Проверка чувствительности проводилось 4-х кратном серийном разведении ДНК *F. tularensis subsp. mediasiatica* позволила установить минимальный порог чувствительности в 15 геномных эквивалентов в реакции. В диапазоне от 1 млн до 15 геномных копий в реакции отчетливо наблюдается регистрация флуоресцентного сигнала с пороговым циклом от 15 до 35 соответственно. Использование более низкой копийности не приводит к накоплению флуоресцентного сигнала. По своей чувствительности разработанная нами qPCR не уступает аналогам опубликованным в литературных источниках и потенциально может быть использован для тестирования ДНК выделенной от естественных резервуаров, переносчиков и объектов внешней среды.