

АННОТАЦИЯ

**на диссертацию Каиржановой Алмы Дуйсенбайкызы
по теме: «Генетическое разнообразие штаммов *Francisella tularensis*
циркулирующих на территории Казахстана» на соискание степени
доктора PhD по образовательной программе 8D09101 – «Ветеринарное
благополучие животных»**

Туляремия – зооантропонозная инфекция, вызванная гамма-протеобактерией *Francisella tularensis*. У данного острого инфекционного заболевания выражена природная очаговость с периодически возникающими эпизоотиями. *F. tularensis* – высоковирулентная, грамотрицательная внутриклеточная коккобацилла, не образующая спор, аэробная или микроаэрофильная бактерия. В настоящее время существует четыре признанных подвида *F. tularensis*: *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*.

В Казахстане природные очаги туляремии выявлены в 12 из 14 областей, общая территория очагов составляет около четверти территории страны (552 тыс. км²). Для туляремии характерны широкий круг хозяев и разнообразие путей передачи. Основным источником и резервуаром *F. tularensis* являются грызуны, при котором в поддержании циркуляции возбудителя в природных очагах участвуют кровососущие насекомые. Различия в степени восприимчивости и инфекционной чувствительности определяют роль млекопитающих как источников инфекции – дальнейших распространителей возбудителя. Санитарное благополучие можно достичь только контролем заболеваемости среди животных, в том числе и домашних, так как имеется возможность частого соприкосновения с зараженными дикими млекопитающими и кровососущими насекомыми.

Знание генотипов циркулирующих штаммов важно для эпидемиологического и эпизоотического мониторинга на локальном и глобальном уровнях. На локальном уровне генотипирование позволяет проследить источник и пути распространения инфекции. На глобальном – позволяет дифференцировать естественную вспышку от искусственно созданной вспышки в результате злого умысла, позволяет проследивать эволюционные изменения.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационной работы является изучение генетического разнообразия штаммов *Francisella tularensis* циркулирующих в Казахстане с использованием высоко дискриминационных методов и составление карты распределения генотипов для усовершенствования контроля за туляремией.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Создание коллекций образцов ДНК штаммов *Francisella tularensis* пригодных для генотипирования методом MLVA и ПЦР.
2. Разработка протокола генотипирования *Francisella tularensis* методом мультилокусного анализа VNTR повторов.

3. Проведение MLVA типирования штаммов *Francisella tularensis* по гипервариабельным VNTR маркерам. Получение MLVA профилей.

4. Определение генетического разнообразия штаммов *Francisella tularensis*, проведение кластерного анализа и построение минимальных островных деревьев. Определение географического распределения генотипов в Казахстане.

5. Полногеномное секвенирование штаммов *Francisella tularensis*. Анализ полученных результатов. Построение минимальных островных деревьев на основании данных SNP.

Объекты исследования: В данной диссертационной работе материалом исследований служат образцы ДНК, выделенные из коллекционных штаммов *Francisella tularensis* РГП на ПХВ «Национальный научный центр особо опасных инфекций имени М. Айкимбаева» (ННЦООИ).

Предмет исследования: Генетическое разнообразие штаммов *Francisella tularensis* циркулирующих на территории Казахстана.

Методы исследования. В научной работе используются микробиологические, генетические и биоинформатические методы исследований.

Научная новизна выполненной работы состоит в следующем:

Впервые проведено MLVA генотипирование 148 штаммов *Francisella tularensis* циркулирующих в Казахстане, впервые получены полногеномные данные 39 штаммов *Francisella tularensis subsp. holarctica*, выделенных в Казахстане из природных водоемов, клещей, грызунов, хищников и от одной перелетной птицы. На основании MLVA типирования и полногеномных данных составлены карты распределения генотипов на территории нашей страны.

Практическая значимость заключается в разработке схемы MLVA генотипирования *Francisella tularensis* циркулирующих на территории Казахстана. Предлагаемая схема обладает более высокодискриминационной способностью и улучшает схемы генотипирования.

Теоретическая значимость заключается в получении 148 MLVA профилей и 39 полногеномных данных штаммов *F.tularensis* циркулирующих в Казахстане. Полученные результаты загружены в общедоступные международные базы данных и могут быть использованы другими учеными при изучении генетического разнообразия штаммов *F.tularensis* циркулирующих в мире и в Казахстане. Составлены карты распределения генотипов на территории нашей страны, что визуально показывает распространение штаммов *Francisella tularensis*.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. MLVA генотипирование штаммов *Francisella tularensis* по гипервариабельным VNTR маркерам.

2. Определение географического распределения генотипов штаммов *Francisella tularensis* в Казахстане.

3. Полногеномное секвенирование штаммов *Francisella tularensis* с построением минимальных островных деревьев на основании данных SNP.

Результаты исследования.

1. Создана коллекция образцов ДНК 148 штаммов *Francisella tularensis* из 8 областей нашей республики, пригодных для генотипирования методом MLVA, ПЦР и полногеномного секвенирования. При этом наибольшее количество штаммов взяты из Западно-Казахстанской области, что в процентном соотношении составило 41,89%. Во всех образцах установлена высокая степень очистки ДНК, на что указывает соотношение длин волн 260/280 в среднем диапазоне 1,8. Концентрация ДНК варьировала от 2 до 78 нг/мкл. Для исключения контаминации и видовой идентификации образцов ДНК проведен анализ нуклеотидной последовательности *16S rRNA* гена. В результате анализа полученные нуклеотидные последовательности имели максимальную идентичность 99-100% с нуклеотидными последовательностями вида *F. tularensis*. Проведена внутривидовая идентификация изученных штаммов *F. tularensis* с помощью ПЦР с использованием праймеров специфичны к гену RD1, при котором выявила 2 подвида в нашей коллекции ДНК это *F. tularensis subsp. holarctica* и *F. tularensis subsp. mediasiatica*.

2. Разработан протокол генотипирования *Francisella tularensis* методом мультилокусного анализа 11VNTR повторов, который включает в себя состав реакционной смеси для каждой пяти смеси праймеров, режим амплификации и фрагментный анализ. На основании разработанного протокола MLVA типирования выпущены методические рекомендации, которые могут быть рекомендованы для специалистов медицинских и ветеринарных лабораторий.

3. Проведено MLVA типирования 148 штаммов *Francisella tularensis* по гипервариабельным 11VNTR маркерам. Получены MLVA профили для всех анализируемых штаммов *Francisella tularensis*. Выявлены аллельные варианты и значения дискриминирующего индекса Хантера-Гастона для каждого проанализированного локуса. Индекс разнообразия Хантера-Гастона (HGDI) MLVA-11 для 148 штаммов *Francisella tularensis* составил 0,9295. Проведение MLVA по 11 локусам позволило идентифицировать 30 генотипов среди 148 проанализируемых штаммов, из которых 6 генотипов представлены единичными штаммами. В итоге MLVA типирования по 11 VNTR повторов, были выбраны 40 штаммов *Francisella tularensis* для проведения полногеномного секвенирования.

4. Определено генетическое разнообразие штаммов *Francisella tularensis*, проведен кластерный анализ и построены минимально остовные деревья. При помощи электронной системы QGIS разработана карта распределения генотипов штаммов *Francisella tularensis* по территории Республики Казахстан. Согласно нашим исследованиям для генотипирования *F.tularensis subsp. holarctica*, циркулирующих в Казахстане, целесообразно использовать упрощенную схему генотипирования, которая включает пять из 25 классических VNTR локусов, Ft-M3, Ft-M4, Ft-M6, Ft-M20A, Ft-M22 и два дополнительных выбранных локуса *in silico*-FT-4 и *in silico*-FT-8. Все семь локусов можно амплифицировать в одной реакции ПЦР с разными флуоресцентными красителями и проанализировать на генетическом

анализаторе за один прогон. На основе семи вышеуказанных локусов выявлено 19 генотипов у 39 штаммов подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica*.

5. Впервые в Казахстане проведено полногеномное секвенирование штаммов *F. tularensis*, использовано 40 штаммов: 39 штамма подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica* и 1 штамм подвида *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, количество прочтений которых варьировалось от 347926 до 1219022 чтений на образец. Анализируемый штамм *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 240 кластеризовался со штаммами подтипов MI. Проведен филогенетический анализ последовательности wgSNP 39 штаммов подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica* вместе с репрезентативными общедоступными данными WGS. В итоге были выявлены 2022 SNP среди 219 штаммов, включающих 39 штаммов из Казахстана и 180 общедоступных наборов данных, принадлежащих к филогенетическим группам В.4, В.6 и В.12. В настоящей коллекции ДНК филогенетическая группа В.6 не обнаружена. Построены минимально остовные деревья на основании данных SNP.

Апробация работы. Основные положения диссертации были опубликованы в материалах научно-практических конференций: Международной научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 17: «Современная аграрная наука: цифровая трансформация»», посвященной 30-летию независимости Республики Казахстан на тему: «Генетическая идентификация *Francisella tularensis*» (Нур-Султан, 2021); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и тенденции развития современной аграрной науки и ветеринарии», посвященной памяти доктора ветеринарных наук, профессора Пионтковского Валентина Ивановича на тему: «Генетическое разнообразие штаммов *Francisella tularensis*, циркулирующих на территории Казахстана» (Костанай, 2021).

Публикация результатов исследования.

По материалам диссертационной работы опубликованы три научные работы, в том числе в редакциях, рекомендованных Комитетом по контролю в образовании и науке Министерства образования и науки Республики Казахстан: Научно-практический журнал «Наука и образование» Западно-Казахстанского аграрно-технического университета имени Жангир хана (Уральск, 2020), опубликованы методические рекомендации «MLVA типирование штаммов *Francisella tularensis*» ISBN 978-601-332-968-0 (Нур-Султан, 2020), 1 публикация в журнале «Microbiology Resource Announcement», входящем в базу научных журналов Web of Science Core Collection и Scopus (Q4, 2020), 1 публикация в журнале «PLOS Neglected Tropical Diseases», входящем в базу научных журналов Web of Science Core Collection и Scopus. (Q1, 2021).

Связь диссертации с госпрограммами. Исследования проводились в рамках программы грантового финансирования Комитета науки МОН РК по проекту: «Сравнительный анализ молекулярно-генетических особенностей геномов у возбудителей сибирской язвы и туляремии в Казахстане», AP05131460, 2018-2020 гг.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 123 страницах компьютерного текста и включает обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты исследований, заключение, список использованных источников, 3 приложения. Список использованных источников состоит из 204 наименований отечественных и зарубежных авторов. Работа содержит 12 таблиц, 21 рисунок.