

ВАЖНОСТЬ ИДЕНТИФИКАЦИИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ *Pasteurella multocida* К СЕРОГРУППЕ А**А.Н. Ауганов , Б.К. Тынысбеков, И.А. Ахметоллаев* **

ТОО "Национальный центр биотехнологии", Астана, Казахстан

*akhmetollayev@biocenter.kz

Аннотация. *Pasteurella multocida* — грамотрицательная бактерия, являющаяся возбудителем широкого спектра инфекционных заболеваний, таких как птичья холера, атрофический ринит и пастереллез у различных видов животных, включая крупный рогатый скот, свиней и птиц. Одним из ключевых факторов её вирулентности является капсула, состоящая из гиалуроновой кислоты, которая помогает бактерии избегать фагоцитоза и иммунного ответа хозяина. В данной работе проведен комплексный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей гена *hyaD*, кодирующего гиалуронатсинтазу (*PmHAS*) у штаммов *P. multocida* серогруппы А. Особое внимание уделено однонуклеотидным заменам, которые, несмотря на их наличие, не изменяют каталитические домены фермента, что обеспечивает его стабильную ферментативную активность. Консервативность ключевых регионов гена *hyaD* создает сложности для точной диагностики серогруппы А с помощью стандартных методов генотипирования. В рамках исследования предложена стратегия разработки специфических TaqMap зондов для детекции серогруппы А на основе переменных участков гена. Эти молекулярные тесты могут значительно повысить точность диагностики и способствовать своевременному мониторингу инфекций, вызванных *Pasteurella multocida*. Полученные данные подчеркивают важность дальнейших исследований однонуклеотидных замен и их влияния на вирулентность бактерии.

Ключевые слова: *Pasteurella multocida*; серогруппа А; гиалуронатсинтаза; однонуклеотидные замены; TaqMap зонды; молекулярная диагностика; вирулентность.

Введение

Pasteurella multocida — грамотрицательная патогенная бактерия, способная вызывать широкий спектр инфекционных заболеваний у разнообразных видов домашних и диких животных, включая птиц, свиней, крупный рогатый скот, овец, кошек и собак [1-3]. Серьезность и разнообразие заболеваний, вызываемых этим патогеном, обусловлены его высокой адаптивностью и вариативностью факторов вирулентности. Среди наиболее распространенных инфекций, связанных с *P. multocida*, — птичья холера, прогрессирующий атрофический ринит и легочный пастереллез у свиней, геморрагическая септицемия, респираторные заболевания и абсцессы у крупного рогатого скота, а также атрофический ринит и легочный пастереллез у кроликов [3]. Инфекции, вызванные этим патогеном, наносят значительный экономический ущерб в сельском хозяйстве, включая прямые потери от падежа животных, расходы на утилизацию, профилактику и лечение. Помимо этого, инфекции *P. multocida* несут риск для общественного здоровья, так как бактерия способна вызывать оппортунистические инфекции у человека, обычно после укусов или царапин, нанесенных инфицированными животными [4-6].

Проблема контроля инфекций, вызываемых *P. multocida*, особенно актуальна для сельскохозяйственной и ветеринарной отраслей. В Республике Казахстан заболевания,

вызванные этим патогеном, широко распространены среди домашнего и дикого животного мира. Частые вспышки пастереллеза крупного рогатого скота регистрируются в таких областях, как Алматинская, Западно-Казахстанская, Костанайская и Актюбинская [7]. Массовая гибель сайгаков в Казахстане также ассоциируется с инфекциями, вызванными *P. multocida*, что свидетельствует о ее высоком патогенном потенциале [8-14]. Особенно тревожным является то, что *P. multocida* обнаружена в органах погибших каспийских тюленей, что указывает на способность этой бактерии заражать даже морских млекопитающих [15]. Такое разнообразие хозяев и географических областей распространения подчеркивает необходимость разработки надежных диагностических методов, позволяющих быстро и точно выявлять патогенные штаммы *P. multocida*, чтобы своевременно предпринимать противоэпидемические меры.

P. multocida — факультативный анаэроб, грамотрицательная коккобацилла, характеризующаяся сложной структурной организацией и уникальными механизмами вирулентности. Важнейшим фактором патогенности *P. multocida* является её капсула, состоящая из полисахаридов, которые защищают бактерию от фагоцитоза и других иммунных механизмов хозяина [16, 17]. Именно наличие капсулы позволяет бактерии эффективно уклоняться от иммунной системы хозяина, что способствует её выживанию и распространению в организме. Капсула *P. multocida* также играет ключевую роль в классификации этой бактерии на капсульные серогруппы. На сегодняшний день выделено пять серогрупп: А, В, D, Е и F [18, 19]. Наибольший интерес для науки и ветеринарии представляет серогруппа А, которая широко распространена среди крупного рогатого скота, птиц и свиней, а также ассоциируется с птичьей холерой, респираторными заболеваниями и атрофическим ринитом [2, 20-22].

Капсула серогруппы А *P. multocida* состоит из гиалуроновой кислоты (ГК) — полимера, который также обнаруживается в тканях млекопитающих и является важным компонентом внеклеточного матрикса [23]. Структурное сходство между капсульной гиалуроновой кислотой бактерии и ГК хозяина обеспечивает бактерии способность к молекулярной мимикрии. Этот феномен позволяет *P. multocida* уклоняться от иммунного ответа хозяина, избегая фагоцитоза и других защитных реакций. Капсула функционирует как «молекулярный камуфляж», делая бактерию невидимой для иммунной системы. Данный процесс включает взаимодействие капсулы с рецепторами CD44 на поверхности клеток хозяина, что нарушает нормальные сигнальные пути и способствует проникновению бактерии в ткани. Кроме того, благодаря молекулярной мимикрии, капсула *P. multocida* конкурирует или заменяет гиалуроновую кислоту хозяина, влияя на физиологические процессы и способствуя инвазии бактерии. Этот механизм усложняет борьбу с инфекциями, вызванными *P. multocida*, поскольку иммунная система не распознает патоген как чужеродный объект.

Гены, участвующие в синтезе капсулы *P. multocida*, расположены в кластерах и разделены на три функциональные области: R1, R2 и R3 [24, 25]. На рисунке 1 представлена схематическая модель организации генов участвующих в биосинтезе капсулы *P. multocida*.

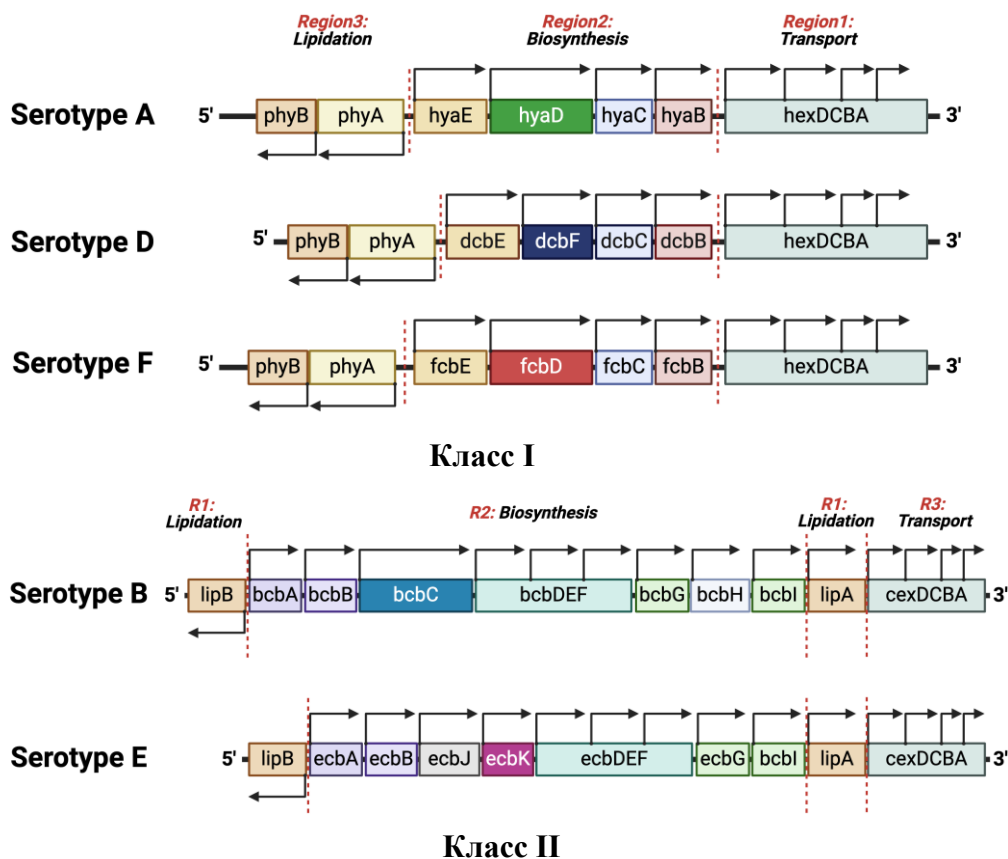


Рисунок 1 – Два класса биосинтетических локусов капсулы для серогрупп *P. multocida* A, D, F, B и E. Капсулы типов A, D и F включают гиалуроновую кислоту, гепарозан и хондроитин соответственно. Генетический кластер капсулы *P. multocida* делится на три области: Region1 (R1), Region2 (R2) и Region3 (R3). Гены, обозначенные одинаковым цветом, кодируют белки с похожими функциями. Названия экспериментально подтвержденных синтаз ГАГ (гликозаминогликанов) указаны над соответствующими стрелками; *PmHAS* обозначает синтазу гиалуроновой кислоты у *P. multocida*, *PmHS1* – гепарозан-синтазу I, а *PmCS* – хондроитин-синтазу. Стрелки, направленные вправо, указывают на гены, транскрибируемые слева направо, а стрелки, направленные влево, – справа налево.

Области R1 и R3 высоко консервативны среди всех пяти серогрупп, что осложняет процесс генотипирования и диагностики. Центральная область R2 специфична для каждой серогруппы и определяет структурные особенности капсулы, влияющие на её антигенные свойства. Серогруппы A, D и F относятся к классу I, а серогруппы B и E — к классу II [26]. Биосинтетический локус класса I имеет длину около 16 кб и содержит 10 открытых рамок считывания (ORF), в то время как локус класса II достигает 21 кб и включает 15 ORF [GenBank AF067175.2, CP003313, AF302467]. Специфичность центральной области R2 для каждой серогруппы и уникальность структуры капсулы делают R2 ключевой мишенью для генетического анализа и идентификации серогрупп.

Для серогруппы A область R2 содержит гены *hyaABCDE*, которые кодируют фермент гиалуронатсинтазу (*pmHAS*) — ключевой компонент в синтезе капсульного гиалуронана [27]. Гиалуронатсинтаза состоит из 972 аминокислотных остатков и обладает двумя независимыми гликозилтрансферазными сайтами. Каждый из этих сайтов имеет критический для его функционирования DXD-мотив [28] [29]. Интересной особенностью *pmHAS* является её

функциональная устойчивость: даже укороченные формы фермента, в которых удалены до 117 аминокислот с N-конца, сохраняют способность к синтезу гиалуроновой кислоты. Это указывает на высокую функциональную пластичность фермента и создает дополнительные сложности при попытках выявления серогруппы А на основе генетических анализов. Необходимо тщательно подбирать консервативные участки гена для создания специфических праймеров, способных точно идентифицировать серотип А.

Точная идентификация серогруппы А представляет серьезные трудности в связи с высокой степенью консервативности некоторых генов и уникальной структурой капсулы. Генотипирование *P. multocida* требует использования специфических праймеров для амплификации областей, которые обладают достаточной вариабельностью для различения серогрупп, но в то же время стабильны в пределах одного типа. Особенности функционирования гиалуронатсинтазы (*pmHAS*) серогруппы А — способность сохранять активность даже в укороченных формах — усложняют задачу определения уникальных мишеней для ПЦР-диагностики. В связи с этим, особое внимание следует уделять ключевым регионам гена, отвечающим за функциональность фермента и специфичность к субстратам.

Активность гиалуронатсинтазы регулируется двумя независимыми гликозилтрансферазными сайтами, которые содержат DXD-мотивы. Мутации в этих сайтах приводят к изменению специфичности фермента: замены D247N и D249N сохраняют активность GlcUA-трансферазы, тогда как замены D527N и D529N обеспечивают активность GlcNAc-трансферазы. Анализ подобных аминокислотных замен имеет решающее значение для разработки специфических праймеров, поскольку эти замены определяют ферментативную активность и способность бактерии синтезировать капсулу. Область между остатками 222–265 в структуре фермента отвечает за селективное связывание субстрата UDP-GlcNAc и представляет собой перспективную мишень для создания высокоспецифичных диагностических инструментов. Однако, при этом следует учитывать возможную вариабельность этой области и ее влияние на функциональность фермента.

Кроме того, генетические исследования должны учитывать наличие других факторов, влияющих на экспрессию генов капсулы и функциональность гиалуронатсинтазы. Например, изменения в регионах R1 и R3 также могут влиять на процесс образования капсулы и её антигенные свойства. Ранее разработанные специфические праймеры для генотипирования *P. multocida* на основе генов *hyaD*, *bcbD*, *dcfF*, *ecbJ* и *fcfD* позволили идентифицировать штаммы и определить их принадлежность к конкретным серогруппам. Тем не менее, проблема перекрестной реактивности и ложноположительных результатов остается актуальной, особенно для серогруппы А, которая характеризуется высокой структурной и генетической сложностью.

Капсула серогруппы А играет ключевую роль не только в патогенезе, но и в усложнении диагностики *P. multocida*. Молекулярная мимикрия, осуществляемая капсулой, позволяет бактерии избегать иммунного распознавания, что существенно затрудняет борьбу с инфекцией и проведение своевременной диагностики [23]. Интеракция капсульной гиалуроновой кислоты с рецептором CD44 на клетках хозяина нарушает нормальные сигнальные пути и способствует проникновению бактерии в ткани, вызывая заболевания. Понимание механизмов молекулярной мимикрии и их влияния на патогенез *P. multocida* необходимо для разработки новых стратегий диагностики, направленных на выявление серогруппы А. Кроме того, идентификация аминокислотных замен в гиалуронатсинтазе и их влияние на ферментативную активность открывает перспективы для создания

высокоспецифичных терапевтических агентов, направленных на ингибирование синтеза капсулы и снижение вирулентности бактерии.

Использование генетического анализа для выявления серогруппы А является одним из наиболее перспективных направлений в разработке диагностических методов для *P. multocida*. Генетическое типирование на основе ПЦР позволяет быстро и точно определять наличие патогенных штаммов, что критически важно для предотвращения распространения инфекции и своевременного введения профилактических мер. Разработка специфических праймеров для амплификации уникальных областей гена гиалуронатсинтазы, а также анализ аминокислотных замен, оказывающих влияние на синтез капсулы, могут повысить точность и эффективность диагностики.

На сегодняшний день применение ПЦР-анализов для генотипирования серогруппы А в сочетании с более глубоким молекулярным анализом позволяет идентифицировать штаммы, определить их патогенность и проводить мониторинг вспышек заболеваний [30, 31]. Точное определение принадлежности штаммов к серогруппе А также имеет важное значение для изучения эпидемиологии и разработки специфических вакцин, нацеленных на профилактику инфекций, вызванных *P. multocida*.

Разработка специфичных методов генотипирования и диагностики серогруппы А *Pasteurella multocida* — сложная, но крайне важная задача для ветеринарии и сельского хозяйства. Вариабельность генов, кодирующих гиалуронатсинтазу, а также структурные особенности капсулы и наличие аминокислотных замен, влияющих на функциональность фермента, требуют тщательного анализа и выбора консервативных участков для создания высокоспецифичных диагностических тестов. Понимание механизмов молекулярной мимикрии, структурных особенностей капсулы и генетической регуляции ее синтеза открывает новые перспективы для повышения эффективности диагностики, мониторинга и контроля инфекций, вызываемых серогруппой А *P. multocida*. Более глубокое исследование генетических и биохимических свойств этой бактерии также имеет потенциал для разработки новых терапевтических стратегий, направленных на ингибирование синтеза капсулы и снижение вирулентности патогена.

Материалы и методы

Для анализа аминокислотных замен, определяющих принадлежность *Pasteurella multocida* к серогруппе А, были использованы данные 151 последовательности ДНК гена *hyaD* пастореллы, загруженные из международной базы данных нуклеотидных последовательностей GenBank NCBI. Отбор последовательностей проводился на основе критериев, включающих полный охват гена, высокую степень идентичности с известными штаммами. Для начального анализа последовательностей использовался алгоритм BLAST, что позволило установить степень сходства между изучаемыми последовательностями и определить предварительные консервативные и вариабельные области. Множественное выравнивание последовательностей проводилось с помощью программы MEGA 6, используя алгоритм Muscle с параметрами: штраф за вставку пробелов – 400, минимальная длина совпадения – 30 нуклеотидов. Это позволило оценить общую степень генетического разнообразия гена *hyaD* среди штаммов, для которых идентифицирована первичная структура ДНК исследуемого гена. В рамках этого анализа особое внимание уделялось выявлению регионов с высокой степенью консервативности, которые впоследствии были использованы для оценки стабильности генома. Для идентификации аминокислотных замен нуклеотидные последовательности были

транслированы в белковые с использованием программы BioEdit. Были изучены как общие паттерны изменений в последовательности, так и конкретные замены, способные влиять на функциональность белка с помощью программного пакета VectorNTI. Основной акцент сделан на области, отвечающие за гликозилтрансферазную активность гиалуронатсинтазы, поскольку они являются ключевыми для процесса синтеза капсулы и, следовательно, для патогенности бактерии.

Результаты

На первом этапе нами был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *hyaD* в базе данных биотехнологической информации GenBank NCBI посредством алгоритма BLAST. Исходной последовательностью для выравнивания была использована первичная структура ДНК гена кодирующего гиалуронансинтазу (*PmHAS*), взятой из геномной последовательности штамма 33011 *Pasteurella multocida* с идентификационным номером CP097612.1. По результатам анализа схожести нуклеотидных последовательностей ДНК по сравнению с заданной последовательностью был сгенерирован alignment-файл, в котором 151 последовательностей имели 100% перекрытие по длине с исходной последовательностью ДНК. При этом минимальное сходство этих последовательностей с первичной структурой ДНК гена *hyaD* штамма 33011 пастореллы равна 83%. В таких последовательностях как: CP045724.1 штамм PM22; CP015573.1 штамм USDA-ARS-USMARC-60714; CP003022.1 штамм 36950; CP015558.1 штамм USDA-ARS-USMARC-60494 и CP015568 штамм USDA-ARS-USMARC-60248 была выявлена нуклеотидная вставка TCAGCACATCCTTCTGTAAAT кодирующая пептидную последовательность SAHPSVN во всех этих последовательностях. У 47 найденных последовательностей ДНК, имеющих сходство до 83% с последовательностью гена *hyaD* штамма 33011 *Pasteurella multocida* наблюдается делеция фрагмента TCAGCACATCCTTCTGTAAAT которая не приводит к изменениям рамки считывания для этого гена. Среди последовательностей схожих с заданной последовательностью ДНК сходство в пределах 99% на практически весь фрагмент выявлено у 104 найденных молекул ДНК. Различия между выявленными последовательностями наблюдаются в наличии однонуклеотидных замен вдоль всего гена, кроме тех молекул ДНК, которые имеют сходство с коровой последовательностью ниже, чем 92%. У этих молекул однонуклеотидные замены расположены кластерами на 5' и 3' концах гена. К этим последовательностям относятся молекулы полученные из базы данных NCBI такие как CP037865.1 штамм HN02, CP081487.1 штамм Pm64, CP081487.1 штамм Pm64, CP029712.1 штамм 3358, CP029712.1 штамм 3358, CP023972.1 штамм FDAARGOS_385, CP023516.1 штамм FDAARGOS_384, CP028926.1 штамм 20N, CP097794.1 штамм 28606, CP097618.1 штамм P2095, CP133633.1 штамм Pm1618, CP097604.1 штамм 10159, CP044077.1 штамм FDAARGOS_644, CP133636.1 штамм Past29, CP097795.1 штамм 34030, CP004392.1 штамм OH1905, CP097790.1 штамм 31971, CP026744.1 штамм 161215033201-1, CP026860.1 штамм 12591, CP026860.1 штамм 12591, CP097608.1 штамм 11205, CP097789.1 штамм 35564, CP097788.1 штамм 21317, CP049756.1 штамм KVNON-213, LC537307.1 штамм BD1643, AF195517.2, CP097791.1 штамм 41060, CP111144.1 штамм PF7, AE004439.1 штамм Pm70, CP112897.1 штамм PF19, CP097792.1 штамм 36502, CP020347.1 штамм CIRMBP-0873, CP112892.1 штамм PF14, CP112891.1 штамм PF12, CP111146.1 штамм PF10, CP143878.1 штамм LH06, CP133808.1 штамм W16-1607.1, CP133642.1 штамм Past3, CP111083.1 штамм PF4 ,

CP111142.1 штамм_PF5, CP059703.1 штамм_RCAD0726, CP020345.1 штамм_CIRMBP-0884, CP090521.1 штамм_AH09, CP112894.1 штамм_PF16, CP111147.1 штамм_PF11, CP112898.1 штамм_PF1, CP112895.1 штамм_PF17, CP007040.1 штамм_HN07, CP084165.1 штамм_s4, CP112896.1 штамм_PF18, CP111081.1 штамм_PF2, CP113236.1 штамм_PF8, CP028927.1 штамм_9N, CP111082.1 штамм_PF3, CP111143.1 штамм_PF6, CP111145.1 штамм_PF9, CP090520.1 штамм_SD11, CP113522.1 штамм_PF13, AY604234.1 штамм_J-4103, CP112893.1 штамм_PF15, CP013291.1 штамм_F и AF302467.1 штамм_P4218.

Выравнивание последовательностей ДНК схожих с первичной структурой гена *hyaD* штамма 33011 показало, что однонуклеотидные замены распределены в основном одинаково по большей части выявленных молекул ДНК. Так в позиции 49 имеется замена G на C у 88% схожих последовательностей ДНК. Приблизительно у такого же количества молекул в позиции 72 определяется замена G на A. В позиции 1089 у большей половины молекул наблюдается замена C на T. Замена C на T также определяется у большей части схожих молекул ДНК, полученных с помощью алгоритма BLAST. Остальные однонуклеотидные замены в группе молекул, имеющих сродство более 99% распределены вдоль всей последовательности ДНК, не имея единой локализации. Основные замены нуклеотидной последовательности ДНК у 48 молекул, имеющих сродство с первоначальной последовательностью менее чем 92% локализованы в пределах от 80 нуклеотида и до 1410 положения исходного гена *hyaD*, а также от 1810 нуклеотида до 2750 нуклеотида гена кодирующего гиалуронансинтазу (*PmHAS*).

Несмотря на существенные замены у 47 молекул ДНК, полученных при выравнивании последовательности гена *hyaD* штамма 33011 перевод первичной структуры нуклеиновой кислоты в аминокислотную последовательность согласно правилам генетического кода, разница между аминокислотными последовательностями характеризуется как минимальная. При этом во всех выявленных молекулах формируются достаточно протяженные пептидные последовательности, которые одинаковы у всех 151 молекул, полученных с помощью алгоритма BLAST в базе данных GenBank NCBI. Из 151 последовательностей ДНК схожих по структуре с геном *hyaD* штамма 33011 все приведенные последовательности кроме одной (CP040918.1:20808412083756_Pasteurella_multocida_strain_PM_86) имели полную рамку считывания, без стоп-кодонов. Штамм PM86 *Pasteurella multocida* имеет в первичной последовательности фрагмента схожего с геном *hyaD* штамма 33011 сразу 8 стоп кодонов начиная с 723 аминокислотного остатка. Анализ аминокислотной последовательности по наличию каталитических доменов показал, что из 151 выявленных молекул ДНК гликозилтрансферазной активностью обладают 150 белковых структур, транслируемых с этих последовательностей. Даже в тех последовательностях ДНК, которые отличаются от исходного гена *hyaD* штамма 33011 на 83% каталитические области имеют идентичную аминокислотную последовательность. Выявленные однонуклеотидные замены показали значительное влияние на функционирование капсулы и стабильность фермента, что позволяет сделать выводы о важности этих замен для диагностики серогруппы А.

Обсуждение

Исследование нуклеотидных и аминокислотных последовательностей гена *hyaD* у различных штаммов *Pasteurella multocida* показало, что даже при наличии значительных однонуклеотидных замен, ключевые каталитические участки гиалуронатсинтазы (*PmHAS*) остаются высоко консервативными. Это объясняет высокую функциональную устойчивость

фермента и его критическую роль в патогенезе *P. multocida*. Вариабельные области, выявленные в анализируемых последовательностях, представляют собой перспективные мишени для разработки TaqMan зондов, которые могли бы точно детектировать штаммы серогруппы А. Одним из ключевых моментов является то, что функциональные участки, несмотря на их консервативность, могут не подходить для создания диагностических зондов из-за невозможности различения серотипов, что требует использования вариабельных участков для более точного генотипирования [32, 26].

Каталитически активные области, такие как DXD-мотивы, представляют собой консервативные элементы, необходимые для синтеза гиалуроновой кислоты в капсуле бактерии. Важность этих участков заключается в их неизменности даже при значительных однонуклеотидных заменах в других частях гена *hyaD*. Мутации D247N и D249N, например, сохраняют активность GlcUA-трансферазы, что указывает на их критическую роль в ферментативной активности. Однако изменения в других участках, таких как D527N и D529N, могут оказывать значительное влияние на активность GlcNAc-трансферазы [33]. Это важное наблюдение подчеркивает необходимость дальнейшего исследования вариабельных областей для разработки специфичных диагностических методов.

Особое внимание в нашем исследовании уделено региону между нуклеотидами 80 и 1410, где были обнаружены кластеры однонуклеотидных замен. Эти области потенциально являются идеальными мишенями для разработки молекулярных диагностических тестов, таких как TaqMan зонды. Их использование позволит точно идентифицировать серотип А, что является критически важным для мониторинга вспышек заболеваний, вызванных *P. multocida* [16]. Однако, несмотря на вариации в этих участках, ферментативная активность гиалуронатсинтазы остается неизменной, что говорит о высокой пластичности фермента и его способности поддерживать синтез капсулы даже при значительных генетических изменениях.

Анализ аминокислотных последовательностей показал, что консервативные области, отвечающие за гликозилтрансферазную активность, остаются неизменными во всех штаммах, за исключением небольшого числа мутаций. Эти мутации, однако, не оказывают значительного влияния на общую активность фермента, что подтверждает высокую стабильность этого фермента. Тем не менее, даже такие небольшие изменения могут стать важными для разработки специфичных зондов, способных различать штаммы на основе тонких изменений в аминокислотных последовательностях [17, 29].

Одной из главных сложностей, выявленных в ходе анализа, является высокая степень консервативности генов, кодирующих капсульные структуры *P. multocida*. Например, регионы R1 и R3, которые являются ключевыми для синтеза капсулы, практически не подвергаются мутациям, что затрудняет использование этих участков для дифференциации серогрупп. Напротив, регион R2, который содержит гены, специфичные для серотипов, особенно серогруппы А, может представлять собой перспективную мишень для разработки диагностических тестов [27]. Эти данные подчеркивают важность дальнейшего изучения вариабельных областей гена *hyaD* для разработки высокоспецифичных методов генотипирования.

Еще один важный аспект исследования касается влияния мутаций на функциональные свойства фермента. Несмотря на наличие однонуклеотидных замен в некоторых штаммах, каталитическая активность фермента сохраняется. Это подтверждает его критическую роль в вирулентности бактерии и подчеркивает важность консервативных участков, таких как DXD-мотивы, которые остаются неизменными даже при значительных изменениях в других

частях гена [34]. Эта устойчивость делает каталитически активные участки менее пригодными для разработки диагностических тестов, но она также открывает возможности для изучения альтернативных мишеней в более вариабельных участках гена.

Кроме того, важную роль играет взаимодействие капсулы с рецепторами хозяина, такими как CD44, что позволяет бактерии избегать фагоцитоза и других защитных механизмов. Это взаимодействие является ключевым фактором, способствующим патогенезу *P. multocida*, и подтверждает важность разработки диагностических тестов, которые смогут учитывать эти молекулярные взаимодействия. Анализ последовательностей показал, что мутации в гликозилтрансферазных сайтах могут оказывать влияние на структуру и функцию капсулы, что делает эти участки важными для диагностики и терапии.

Прогнозирование функциональных изменений на основе однонуклеотидных замен в последовательностях гена *hyaD* также дает важные данные для разработки молекулярных тестов. В частности, замены в критических участках могут оказывать влияние на специфичность фермента и его способность синтезировать гиалуроновую кислоту. Это открывает перспективы для создания диагностических инструментов, которые могут учитывать эти изменения и обеспечивать более точную детекцию серотипов [35, 12].

Разработка TaqMap зондов, направленных на выявление вариабельных участков гена *hyaD*, представляется перспективным направлением для улучшения диагностики *P. multocida*. Эти зонды смогут точно идентифицировать штаммы серогруппы А, что критически важно для мониторинга вспышек заболеваний и проведения профилактических мероприятий. Дополнительные исследования, направленные на изучение аминокислотных замен и их влияния на каталитическую активность фермента, позволят создать более точные и эффективные диагностические инструменты [36].

Заключение нашего исследования подчеркивает необходимость комплексного подхода к разработке диагностических тестов для серогруппы А *Pasteurella multocida*. Учет как консервативных, так и вариабельных участков гена *hyaD* позволит повысить точность и эффективность диагностики, а также улучшить понимание механизмов патогенеза бактерии. Эти данные важны для создания новых терапевтических и профилактических стратегий, направленных на снижение вирулентности *P. multocida*.

Заключение

Проведенное исследование позволило выявить значительную консервативность каталитических участков гиалуронатсинтазы (*PmHAS*) у штаммов *Pasteurella multocida* серогруппы А, несмотря на наличие однонуклеотидных замен в гене *hyaD*. Этот факт подчеркивает важность каталитических регионов для сохранения ферментативной активности бактерии, что делает их неподходящими для создания диагностических тестов. Однако вариабельные участки гена *hyaD* были определены как перспективные мишени для разработки специфичных TaqMap зондов, что может улучшить точность диагностики серогруппы А и мониторинг вспышек заболеваний, вызванных этим патогеном. На основе полученных данных предложена стратегия дальнейшей работы, которая включает углубленное исследование влияния аминокислотных замен на вирулентность бактерии, а также разработку диагностических и терапевтических методов, направленных на снижение патогенности *P. multocida*.

Финансирование: BR218004/0223 «Совершенствование мер обеспечения биологической безопасности в Казахстане: противодействие опасным и особо опасным инфекциям» на 2023-2025

Литература

1. Peng, Z., Wang, X., Zhou, R., Chen, H., Wilson, B. A., & Wu, B. (). *Pasteurella multocida*: Genotypes and Genomics // Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. –2019. – Vol.83(4). –P.e00014-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-19>– 2013.
2. Wilkie, I.W., Harper, M., Boyce, J.D., Adler, B. *Pasteurella multocida*: Diseases and Pathogenesis. In: Aktories, K., Orth, J., Adler, B. (eds) *Pasteurella multocida* // Current Topics in Microbiology and Immunology– 2012.– Vol. 361. https://doi.org/10.1007/82_2012_216 2013.
3. Wilson B.A., Ho M.. *Pasteurella multocida*: from Zoonosis to Cellular Microbiology // Clin. Microbiol. Rev.– 2013. – Vol. 26. – P. 631-655. <https://doi.org/10.1128/cmr.00024-13>
4. Ryan, J. M., Feder, H. M. Dog licks baby. Baby gets *Pasteurella multocida* meningitis // Lancet. –2019. – Vol. 393(10186), –P.e41. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30953-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30953-5)
5. Dryden M. S., Dalglish D. *Pasteurella multocida* from a dog causing Ludwig's angina // Lancet –1996. – Vol. 347,8994. – P.123. doi:10.1016/s0140-6736(96)90250-0
6. Godey B Fau - Morandi X., Morandi X Fau - Bourdinière J., Bourdinière J Fau - Heurtin C., Heurtin C. Beware of dogs licking ears // Lancet. –1999. – 354:1267–8.
7. Дерновая В. Ф. Биологические свойства пастерелл и вопросы лабораторной диагностики пастереллеза: Дисс... канд. мед. наук. 03.00.07. // МЗ РК. Каз. противочумный науч.-исслед. ин-т. – Алматы, 1996. – С. 174 с.
8. Miller MW. Pasteurellosis. In: Williams ES, Barker IK, editors. Infectious diseases of wild mammals, vol. 2001. 3rd ed. p. 331–9.
9. LI. B. The case of isolation of the causative agent of hemorrhagic septicemia from sick gerbils. J Micro // Epidem and Immun. – 1961. – T. Vol. 4. – С. P. 122–123.
10. Гордиенко О. Пастереллез больших песчанок в моекмах. // Материалы V научной конференции противочумных учреждений Средней Азии и Казахстана, посвященной 50-летию Великой Октябрьской социалистической революции. – 1967. – № Алма-Ата, февраль – С. 353–354
11. Айкимбаев А.М., Мартиневский И.Л., Алтухов А.А., Иванов С.И., Суров В.Ф. О случаях выделения возбудителя пастереллеза из сайгака в феврале-марте 1984 г. на Урале. Математика Академии наук Казахской ССР. –1985. – Т. 4:39. – С.39-41.
12. Мартиневский И.Л., Айкимбаев А.М. О причинах массовой гибели сайгаков. Вторая межгосударственная конференция по взаимодействию государств – участников СНГ в области санитарной защиты территорий. Алматы –2001. –С.143–146.
13. Orynbayev M. B., Rystaeva, R. A., Kerimbayev, A. A., Kopeyev, S. K., Kospanova, M. N., & Kydyrbaev, Z. K. Cases of mass death of Ural saiga population in Kazakhstan // Actual problems of veterinary biology. – 2013. – Vol. 1(17). – P. 20-26.
14. Коспанова М.Н., Омарбекова У.Ж., Сансызбай А.Р., Рыстаева Р.А., Керимбаев А.А., Орынбаев М.Б. Выделение бактериальной культуры *Pasteurella* из биологического материала сайгака. Материалы международной молодежной научно-практической конференции «Биомедицина, биотехнология и экологическая безопасность: достижения молодых ученых и специалистов Евразии», Казань, 2014:77.

15. Мека-Меченко Т.В. и др. Характеристика штамма *P.haemolítica* выделенного от Каспийского тюленя // Проблемы особо опасн. инфекций. – 2001. – №1, –С.164-165.
16. Harper M., Boyce, J.D., Adler, B. The key surface components of *Pasteurella multocida*: capsule and lipopolysaccharide. Curr. Top // Microbiol. Immunol. – 2012–Vol. 361.– P. 39–51. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/82-2012-202>.
17. Boyce J. D., Adler B. The Capsule Is a Virulence Determinant in the Pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2) // Infection and Immunity. – 2000. – Vol. 68(6). – P. 3463-3468. <https://doi.org/10.1128/iai.68.6.3463-3468.2000>
18. Carter G. R. The type specific capsular antigen of *Pasteurella multocida* // Canadian journal of medical sciences. – 1952. – Vol. 30(1). –P. 48-53. doi:10.1139/cjms52-008
19. Rimler R. B., Rhoades K.R. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida* // Journal of clinical microbiology –1987. –Vol. 25(4). –P. 615-618. doi:10.1128/jcm.25.4.615-618.1987
20. Ewer C., Lübke-Becker A., Bethe A., Kießling S., Filter M., Wieler L.H. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status // Vet. Microbiol. –2006. – Vol. 114(3). – P.304-317.
21. Ferreira T.S., Felizardo M.R., de Gobbi D.D., Moreno M., Moreno A.M. Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in *P. multocida* strains isolated from cats // Braz. J. Microbiol. –2015. – Vol. 46(1). –P. 271-277. Published 2015 Mar 1. doi:10.1590/S1517-838246120140084
22. Bethe A., Wieler L.H., Selbitz H.J., Ewers C. Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine // Vet. Microbiol. –2009. – Vol.139(1-2). –P. 97-105. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.04.027.
23. DeAngelis P. L. Microbial glycosaminoglycan glycosyltransferases // Glycobiology. – 2002. – Vol. 12, (1). – P. 9R-16R. <https://doi.org/10.1093/glycob/12.1.9R>.
24. Boyce J.D., Chung J.Y., Adler B. Genetic organisation of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2) // Vet. Microbiol. – 2000 – Vol. 72(1-2). – P. 121-34. doi: 10.1016/s0378-1135(99)00193-5. PMID: 10699509.
25. Chung J.Y., Zhang Y., Adler B. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1 // FEMS Microbiol Lett. – 1998– Vol. 166(2). – P.289-96. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13903.x.
26. Townsend K.M., Boyce J.D., Chung J.Y., Frost A.J., Adler B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39(3). – P.924-929. doi: 10.1128/JCM.39.3.924-929.2001.
27. DeAngelis P.L. Enzymological characterization of the *Pasteurella multocida* hyaluronic acid synthase // Biochemistry – 1996 – Vol. 35(30). – P. 9768-9771. doi: 10.1021/bi960154k. PMID: 8703949.
28. DeAngelis PL. Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses // Cell Mol Life Sci. –1999– Vol. 56(7-8). –P. 670-682. doi: 10.1007/s000180050461.
29. Rosner H, Grimmecke HD, Knirel YA, Shashkov AS. Hyaluronic acid and a (1-4)-beta-D-xylan, extracellular polysaccharides of *Pasteurella multocida* (Carter type A) strain 880 // Carbohydr. Res. – 1992. – Vol. 223. – P.329–333.
30. Soriano-Vargas, E., Vega-Sánchez, V., Zamora-Espinosa, J.L. et al. Identification of *Pasteurella multocida* capsular types isolated from rabbits and other domestic animals in Mexico

with respiratory diseases // Trop Anim Health Prod. – 2012.– Vol. 44. – P. 935–937.
<https://doi.org/10.1007/s11250-011-9995-x>

31. Liu H, Zhao Z, Xi X, Xue Q, Long T, Xue Y. Occurrence of *Pasteurella multocida* among pigs with respiratory disease in China between 2011 and 2015. // Ir Vet J. – 2017. – Vol.70(2). doi:10.1186/s13620-016-0080-7

32. DeAngelis P.L. Molecular directionality of polysaccharide polymerization by the *Pasteurella multocida* hyaluronan synthase // J. Biol. Chem. – 1996. – 35 (30). – P. 9768-9771. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.37.26557>.

33. Wei J., DeAngelis P., Dissection of the two transferase activities of the *Pasteurella multocida* hyaluronan synthase: two active sites exist in one polypeptide // Glycobiology, Vol. (10), Sep. –2000.– P.883–889, <https://doi.org/10.1093/glycob/10.9.883>

34. Kodama H, Matsumoto M, Snow LM. Immunogenicity of capsular antigens of *Pasteurella multocida* in turkeys // Am J Vet Res. – 1981. – Oct; Vol. 42(10). –P. 1838-1841. PMID: 7325454.

35. Pruimboom, I. M., Rimler, R. B., Ackermann, M. R., and Brogden, K. A. Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to turkey air sac macrophages. //Avian diseases – 1996.– Vol.40(4). – P.887–893.

36. Weigel, P. H., Hascall, V. C., and Tammi, M. (). Hyaluronan synthases. The Journal of biological chemistry – 1997. – Vol. 272(22), – P. 13997–14000. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.22.13997>

References

1. Peng Z., Wang X., Zhou R., Chen H., Wilson B. A., Wu B. *Pasteurella multocida*: Genotypes and Genomics // Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. –2019. –Vol. 83(4). –P.e00014-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-19>– 2013.

2. Wilkie I.W., Harper M., Boyce J.D., Adler B. *Pasteurella multocida*: Diseases and Pathogenesis. In: Aktories, K., Orth, J., Adler, B. (eds) *Pasteurella multocida* // Current Topics in Microbiology and Immunology– 2012.– Vol. 361. https://doi.org/10.1007/82_2012_216 2013.

3. Wilson B.A., Ho M. *Pasteurella multocida*: from Zoonosis to Cellular Microbiology // Clin. Microbiol. Rev.– 2013. – Vol. 26. – P. 631-655. <https://doi.org/10.1128/cmr.00024-13>.

4. Ryan J. M., Feder H. M. Dog licks baby. Baby gets *Pasteurella multocida* meningitis // Lancet. –2019. – Vol. 393(10186), –P.e41. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30953-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30953-5).

5. Dryden M. S., Dalgliesh D. *Pasteurella multocida* from a dog causing Ludwig's angina // Lancet –1996. – Vol. 347,8994. – P.123. doi:10.1016/s0140-6736(96)90250-0.

6. Godey B. Fau - Morandi X., Morandi X. Fau - Bourdinière J., Bourdinière J. Fau - Heurtin C., Heurtin C. Beware of dogs licking ears // Lancet. –1999. – 354:1267–8.

7. Dernovaya V. F. Biological properties of pasteurella and issues of laboratory diagnostics of pasteurellosis: Diss... Cand. of Medicine. 03.00.07. // Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan. Kazakh Anti-Plague Research Institute. – Almaty, 1996. – P. 174 p.

8. Milner-Gulland A. B. B. a. I. A. G. a. E. J. The ecology and management of the Saiga antelope in Kazakhstan // Mammal Review. – 1998. – Vol. 28. – C. 1-52.

9. Li B. The case of isolation of the causative agent of hemorrhagic septicemia from sick gerbils. J Micro // Epidem and Immun. – 1961. – Vol. 4. – C. P. 122–123.

10. Gordienko O. Pasteurellosis of large gerbils in moyunkums. // Materials of V scientific conference of anti-plague institutions of Central Asia and Kazakhstan, dedicated to the 50th anniversary of the great October socialist revolution. – 1967. № Alma-Ata, February –C. 353–354

11. Aykimbaev A. M. Martinevsky I.L., Altukhov A.A., Ivanov S.I., Surov V.F. About the cases of pasteurellosis agent isolation from saiga in February-march 1984 in the Ural region. // *Math of the Academy of Science of Kazakh SSR*. . – 1985. – T. 4:39–41.
12. Martinevsky I.L., Aykimbaev A.M. About the causes of saiga mass death // *Second interstate conference on interaction of CIS member states in the field of territory sanitary protection*. – 2001. – C. 143–146.
13. Orynbayev M. B., Rystaeva, R. A., Kerimbayev A. A., Kopeyev S. K., Kospanova M. N., Kydyrbaev Z. K. Cases of mass death of Ural saiga population in Kazakhstan // *Actual problems of veterinary biology*. – 2013. – Vol. 1(17). – P. 20-26.
14. Kospanova M.N., Omarbekova O. U., Sansyzybay A.R., Rystaeva R.A., Kerimbayev A.A., Orynbayev M.B. Isolation of *Pasteurella* bacterial culture from biological material from the saiga // *Proceedings of the international youth scientific and practical conference “biomedicine, biotechnology and environmental safety: achievements of young scientists and specialists of Eurasia*. – 2014, Kazan, . – T. 77.
15. Meka-Mechenko T.V. et al. Characteristics of the *P.haemolitica* strain isolated from the Caspian seal // *Problems of especially dangerous infections*. - 2001. - No. 1, - P. 164-165
16. Harper M., Boyce J.D., Adler B. The key surface components of *Pasteurella multocida*: capsule and lipopolysaccharide. *Curr. Top // Microbiol. Immunol.* – 2012.–Vol. 361.– P. 39–51. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/82-2012-202>
17. Boyce J. D., Adler B. The Capsule Is a Virulence Determinant in the Pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2) // *Infection and Immunity*. – 2000. – Vol. 68(6). – P. 3463-3468. <https://doi.org/10.1128/iai.68.6.3463-3468.2000>
18. Carter G. R. The type specific capsular antigen of *Pasteurella multocida* // *Canadian journal of medical sciences*. – 1952. – Vol. 30(1). –P. 48-53. doi:10.1139/cjms52-008.
19. Rimler R. B., Rhoades K.R. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida* // *Journal of clinical microbiology* – 1987. – Vol. 25(4). – P. 615-618. doi:10.1128/jcm.25.4.615-618.1987.
20. Ewer C., Lübke-Becker A., Bethe A., Kießling S., Filter M., Wieler L.H. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status // *Vet. Microbiol.* –2006. – Vol. 114(3). – P.304-317.
21. Ferreira T.S., Felizardo M.R., de Gobbi D.D., Moreno M., Moreno A.M. Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in *P. multocida* strains isolated from cats // *Braz. J. Microbiol.* –2015. – Vol. 46(1). –P. 271-277. doi:10.1590/S1517-838246120140084.
22. Bethe A., Wieler L.H., Selbitz H.J., Ewers C. Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine // *Vet. Microbiol.* –2009. – Vol.139(1-2). –P. 97-105. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.04.027.
23. DeAngelis P. L. Microbial glycosaminoglycan glycosyltransferases // *Glycobiology*. – 2002. – Vol. 12, (1). – P. 9R-16R. <https://doi.org/10.1093/glycob/12.1.9R>
24. Boyce J.D., Chung J.Y., Adler B. Genetic organisation of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2) // *Vet. Microbiol.* – 2000 – Vol. 72(1-2). – P. 121-134. doi: 10.1016/s0378-1135(99)00193-5. PMID: 10699509.
25. Chung J.Y., Zhang Y., Adler B. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1 // *FEMS Microbiol Lett.* – 1998 – Vol. 166(2). – P. 289-296. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13903.x.

26. Townsend K.M., Boyce J.D., Chung J.Y., Frost A.J., Adler B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39(3). – P.924-929. doi: 10.1128/JCM.39.3.924-929.2001.
27. DeAngelis P.L. Enzymological characterization of the *Pasteurella multocida* hyaluronic acid synthase // Biochemistry – 1996 – Vol. 35(30). – P. 9768-9771. doi: 10.1021/bi960154k. PMID: 8703949.
28. DeAngelis P.L. Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses // Cell Mol Life Sci. –1999– Vol. 56(7-8). –P. 670-682. doi: 10.1007/s000180050461.
29. Rosner H., Grimmecke H.D., Knirel Y.A., Shashkov A.S. Hyaluronic acid and a (1-4)-beta-D-xylan, extracellular polysaccharides of *Pasteurella multocida* (Carter type A) strain 880 // Carbohydr. Res. – 1992. – Vol. 223. – P.329–333.
30. Soriano-Vargas, E., Vega-Sánchez, V., Zamora-Espinosa J.L. et al. Identification of *Pasteurella multocida* capsular types isolated from rabbits and other domestic animals in Mexico with respiratory diseases // Trop Anim Health Prod. – 2012.– Vol. 44. – P. 935–937. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-9995-x>.
31. Liu H., Zhao Z., Xi X., Xue Q., Long T., Xue Y. Occurrence of *Pasteurella multocida* among pigs with respiratory disease in China between 2011 and 2015. // Ir. Vet. J. – 2017. – Vol.70(2). doi:10.1186/s13620-016-0080-7.
32. DeAngelis P.L. Molecular directionality of polysaccharide polymerization by the *Pasteurella multocida* hyaluronan synthase // J. Biol. Chem. – 1996. – 35 (30). – P. 9768-9771. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.37.26557>.
33. Wei J., DeAngelis P., Dissection of the two transferase activities of the *Pasteurella multocida* hyaluronan synthase: two active sites exist in one polypeptide // Glycobiology, Vol. (10), Sep. –2000.– P.883–889, <https://doi.org/10.1093/glycob/10.9.883>.
34. Kodama H., Matsumoto M., Snow L.M. Immunogenicity of capsular antigens of *Pasteurella multocida* in turkeys // Am J. Vet. Res. – 1981. – Oct; Vol. 42(10). –P. 1838-1841. PMID: 7325454.
35. Pruimboom I. M., Rimler R. B., Ackermann M. R., Brogden K. A. Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to turkey air sac macrophages //Avian diseases – 1996.– Vol.40(4). – P.887–893.
36. Weigel P. H., Hascall V. C., Tammi M. Hyaluronan synthases. The Journal of biological chemistry – 1997. – Vol. 272(22), – P. 13997–14000. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.22.13997>.

PASTEURELLA MULTOCIDA А СЕРОГРУППАСЫН АНЫҚТАУДА АМИНҚЫШҚЫЛДЫҚ АЛМАСУЛАРДЫҢ РӨЛІ

А.Н. Ауганов , Б.К. Тынысбеков, И.А. Ахметоллаев* 

«Ұлттық Биотехнология Орталығы» ЖШС, Қазақстан, Астана
*akhmetollayev@biocenter.kz

Аннотация. *Pasteurella multocida* - әртүрлі жануарлар түрлерінде, соның ішінде ірі қара, шошқа және құстарда құс тырысқағы, атрофиялық ринит және пастереллез сияқты көптеген жұқпалы аурулардың қоздырғышы болып табылатын грамтеріс бактерия. Оның вируленттілігінің негізгі факторларының бірі-гиалурон қышқылынан тұратын капсула, ол

бактерияға фагоцитоздан және иесінің иммундық реакциясынан аулақ болуға көмектеседі. Бұл жұмыста *P.multocida* А серогруппасы штамдарындағы гиалуронатсинтазаны (*PmHAS*) кодтайтын *hyaD* генінің нуклеотидтер және аминқышқылдардар тізбегіне кешенді талдау жүргізіліп, ерекше назар бір нуклеотидті алмастыруларға аударылды. Олар болғанына қарамастан ферменттің каталитикалық домендерін өзгертпейді, бұл оның тұрақты ферментативті белсенділігін қамтамасыз етеді. *hyaD* генінің негізгі аймақтарының консервативтілігі стандартты генотиптеу әдістері арқылы А серогруппасының диагностикасына қиындықтар туғызады. Зерттеу шеңберінде геннің өзгермелі учаскелері негізінде А серогруппасын анықтау үшін арнайы TaqMan зондтарын әзірлеу стратегиясы ұсынылды. Бұл молекулалық сынақтар диагностиканың дәлдігін айтарлықтай жақсартады және *Pasteurella multocida* инфекцияларын уақтылы бақылауға ықпал етеді. Нәтижелер бір нуклеотидті алмастыруларды әрі қарай зерттеудің маңыздылығын және бактерияның вируленттілігіне әсерін көрсетеді.

Түйін сөздер: *Pasteurella multocida*; А серогруппасы; гиалуронатсинтаза; бір нуклеотидті алмастырулар; TaqMan зонд; молекулалық диагностика; вируленттілік.

THE IMPORTANCE OF IDENTIFYING AMINO ACID SUBSTITUTIONS FOR THE DETECTION OF *PASTEURELLA MULTOCIDA* BELONGING TO SEROGROUP A

A.N. Auganov , B.K. Tynysbekov, I.A. Akhmetollaev *

LLP “National Center for Biotechnology” Kazakhstan, Astana

*akhmetollaev@biocenter.kz

Abstract. *Pasteurella multocida* is a gram-negative bacterium that is the causative agent of a wide range of infectious diseases such as avian cholera, atrophic rhinitis and pasteurellosis in various animal species, including cattle, pigs and birds. One of the key factors of its virulence is a capsule consisting of hyaluronic acid, which helps the bacterium to avoid phagocytosis and the immune response of the host. In this work, a comprehensive analysis of the nucleotide and amino acid sequences of the *hyaD* gene encoding hyaluronate synthase (*PmHAS*) in *P. multocida* of the serogroup A strains was carried out. Special attention is paid to single-nucleotide substitutions, which, despite their presence, do not change the catalytic domains of the enzyme, which ensures its stable enzymatic activity. The conservatism of the key regions of the *hyaD* gene creates difficulties for accurate diagnosis of serogroup A using standard genotyping methods. Within the framework of the study, a strategy for the development of specific TaqMan probes for the detection of gray group A based on variable gene regions is proposed. These molecular tests can significantly improve diagnostic accuracy and facilitate timely monitoring of infections caused by *Pasteurella multocida*. The obtained data emphasize the importance of further studies of single-nucleotide substitutions and their effect on bacterial virulence.

Keywords: *Pasteurella multocida*; serogroup A; Hyaluronan synthase; single nucleotide substitutions; TaqMan probes; molecular diagnostics; virulence.