

кодирующий фермент MGL, из микроорганизмов *Citrobaacter freundii*, *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*. Гибридные плазмиды трансформированы в штамм *Escherichia coli* BL21(DE3).

Разработана эффективная технология биосинтеза фермента и процедура очистки для дальнейшего проведения доклинических и клинических испытаний. Получены штаммы с эффективностью 0.9, 0.5, 0.4 грамма фермента с литра питательной среды соответственно для генов *megL* из *C. freundii*, *C. tetani*, *C. sporogenes*. В ходе работы были получены кинетические параметры ферментов. Выявлена наиболее высокая удельная активность MGL из *C. sporogenes*, 12.8 у.е., $k_{cat}=9.9 \text{ c}^{-1}$, $K_m=0.43 \text{ мМ}$.

Проведено секвенирование трех генов *megL*. Выбраны аминокислоты, которые могут влиять на активность фермента. С целью увеличения эффективности МГЛ конструируются плазмиды, содержащие мутантные гены.

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ ЛАТЕКСА ДЛЯ БЫСТРОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО НЕКРОЗА ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНИ ЛОСОСЕВЫХ (IHNV)

Доронин М.И.¹, Пыльнов В.А.¹, Бровка Ф.А.²

¹ФГБУ Федеральный центр охраны здоровья животных, Владимир; ²Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия
doronin@arriah.ru

Инфекционный некроз гемопоэтической ткани (IHNV) – высококонтагиозное вирусное заболевание лососевых рыб (сем. *Salmonidae*), вызываемое РНК-вирусом семейства *Rhabdoviridae*. Заболевание протекает по типу эпизоотии и характеризуется тяжелым поражением органов гемопоэза, развитием септического процесса и массовой гибелью молоди. По данным Всемирной Организации здоровья животных (ОЕ, МЭБ), в течение последних десяти лет было зарегистрировано около 100 вспышек IHNV в разных странах мира. Эпизоотическая ситуация по данному заболеванию в нашей стране является довольно неблагоприятной, поэтому в соответствии с приказом Минсельхоза России IHNV отнесен к особо опасным болезням лососевых рыб, подлежащим мониторингу.

Лабораторную диагностику IHNV проводят с применением комплекса вирусологических, серологических и молекулярных методов. В настоящее время разрабатывают методы экспресс-диагностики данного заболевания, одним из которых является реакция агглютинации латекса (РАЛ), основанная на агглютинации латексных частиц, сенсibilизированных поликлональными антителами к антигенам IHNV.

В процессе синтеза латексных препаратов микросферы с разными функциональными группами (-COOH, -NH₂, -SO₄) иммобилизовали поликлональными антителами к IHNV. С целью оптимизации процесса и улучшения диагностических возможностей латексных тестов осуществляли поиск оптимальных условий для приготовления препаратов и проведения анализа. Наибольшая степень адсорбции биолиганда (827,33±0,72 мкг/мл) достигалась при использовании аминированных латексных частиц с диаметром микросфер 340 нм, которые сенсibilизировали поликлональными антителами с концентрацией 1 мг/мл в глицин-солевом буферном растворе с ионной силой 5 мМ и рН 7,0. Препараты, синтезированные в этих условиях, позволяли выявлять антигены IHNV с концентрацией более 100 нг/мл, титром инфекционной активности 3,0 Ig ТЦД₅₀/мл и выше. Диагностическая чувствительность полученных латексных тестов составила 96%, а специфичность – 100%.

В результате проведенных исследований были определены рекомендуемые условия синтеза латексных диагностикумов для быстрого выявления антигенов IHNV, разработаны методы контроля качества приготовленных препаратов и критерии оценки результатов РАЛ.

Разработанный метод является доступным по цене, простым и быстрым в исполнении, его можно применять в качестве скринингового метода диагностики IHNV.