

можливий відповідно до вимог санітарного кодексу наземних тварин Міжнародного епізоотичного бюро, що підтверджується ветеринарним сертифікатом відносно благополуччя з блютангу. Імпортоване поголів'я обов'язково утримують у 30-добовому карантині, з дворазовим на 7 і 21 добу серологічним контролем за ІФА на наявність специфічних антитіл і в ПЛР на виявлення генетичного матеріалу вірусу, причому обов'язково у повторностях дослідження. Тварин-вірусоносії забивають безкровним методом та спалюють, а всіх інших тварин забивають на м'ясокомбінатах у кінці зміни.

Висновки. Напружена епізоотична ситуація з блютангу в європейських країнах, і, зокрема, у суміжних з Україною, та постійно існуючий ризик занесення хвороби на територію нашої держави диктують необхідність посилення заходів щодо епізоотологічного моніторингу цієї інфекції у прикордонній (буферній) зоні та дотримання вимог щодо придбання і ввезення тварин тільки із благополучних з блютангу країн.

Список літератури

1. Критерії включення хвороб до списку МЕБ / МЕБ. Санітарний кодекс наземних тварин. 17-е видання [Текст] – Париж. – 2008 – Т. 1. – С. 4-7.
2. Бакулов, И. А. Эпизоотологическая ситуация по особо опасным болезням животных в 2007 – 2008 гг. [Текст] / Бакулов И. А., Вологина И. В. // Материалы Международной научно-практической конференции 13 - 14 ноября 2008 года г. Покров, ГНУ ВНИИВВИМ – С. 6-13.
3. A comparison of laboratory and «wild» strains of bluetongue virus – is there any difference and does it matter? [Электронный ресурс] / Vet.Ital., 40(4), 448-455 /www.izs.it/vet_italiana/2004/04/81%20Kirklund.pdf / 23.02.2009 г. – Загл. с экрана.
4. Bluetongue 2009: Special Report [Электронный ресурс] / - Режим доступа: <http://www.thebeefsite.com/articles/1886/bluetongue-2009-special-report> – 10.06.2009 г. – Загл. с экрана.
5. Стрижаков, А. А. Эпизоотология и меры борьбы с блютангом [Текст] / А. А. Стрижаков, Н. И. Закутски // Ветеринария – 2008 №8 – С. 18-22.
6. Where Does Bluetongue Virus Sleep in the Winter? [Электронный ресурс] / PLoS Biology – Режим доступа: <http://biology.plosjournals.org/perlserv/?request/> – 21.02.2009 г. – Загл. с экрана.
7. OIE [Электронный ресурс] / Режим доступа: www.OIE.int, 09.02.09 – Загл. с экрана.
8. Bluetongue [Электронный ресурс] University of Florida Режим доступа: <http://edis.ifas.ufl.edu/IN768/> - 10.01.2009 г. – Загл. с экрана.
9. Шоопала, Д. Катаральная лихорадка овец: проблемы эпизоотологического мониторинга в энзоотичных и угрожаемых регионах [Текст] / Д. Шоопала, А. А. Коломыцев // Материалы международной научно-практической конференции (Москва, 16-17 мая 2006 г.) – С.124-127.
10. Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of Culicoides biting midges. /Vet.Ital., 40(3), 260-265/www.izs.it/vet_italiana/pdf / 25.04.2009 г. – Загл. с экрана.
11. Evidence of Natural Bluetongue Virus Infection among African Carnivores [Электронный ресурс] The American Society of Tropical Medicine and Hygiene /<http://www.ajtmh.org/cgi/content/> 10.01.2009 г. – Загл. с экрана.
12. Bluetongue in Eurasian Lynx [Электронный ресурс] / PLoS Biology Режим доступа: www.cdc.gov/eid/content/pdf - 10.01.2009 г. – Загл. с экрана.
13. Коломыцев, А. А. Смена переносчиков вируса блютанга в природных условиях [Текст] / Коломыцев А. А., Снеткова К. А. // Материалы Международной научно-практической конференции 13 - 14 ноября 2008 года г. Покров, ГНУ ВНИИВВИМ - С. 52-55.
14. Биологическая энциклопедия Режим доступа: [Электронный ресурс] / 23.02.2009 г. –http://dic.academic.ru/dic.nsf/enc_biology/420/Подотряд – Загл. с экрана.
15. Evidens for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle [Электронный ресурс] / the Veterinary Record. - Режим доступа: <http://veterinaryrecord.bva-publications.com/cgi/content/abstract/> - 15.03.2009 г. – Загл. с экрана.

BIOSAFETY MEASURES FOR BLUETONGUE IN UKRAINE

Stegniy B.T., Bilokin V.S., Kucheryavenko R.O., Stetsenko V.I., Pilipenko G.V.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

In the article are presented data about bluetongue distribution in the European countries, sources and ways of transfer, diagnostics and disease preventive maintenance are generalized, probable ways of drift and the basic strategy of preventive maintenance of an infection to Ukraine which officially is safe are shown. Global distribution of bluetongue in the countries of Europe, connect with occurrence of new vectors of a transmission of infection and expansion of ways of infection (horizontal, vertical and artificial).

УДК 691:658.310.15:577.3.001.57

БІОТЕХНОЛОГІЇ РЕКОМБІНАНТНИХ ДНК ПРИ ВИГОТОВЛЕННІ ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОЇ ТА ГУМАННОЇ МЕДИЦИНИ, КОНТРОЛЬ ЇХ ЯКОСТІ ТА АСПЕКТИ БІОБЕЗПЕКИ

Стегній Б.Т., Герілович А.П., Герілович І.О., Вовк С.І., Унковська О.М.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Данкович Н.О.

Національний університет «Львівська політехніка», Інститут хімії та хімічних технологій, м. Львів

На сьогоднішній день стрімко розвиваються всі гілки молекулярної біології, стаючи підґрунтям для отримання фундаментальних знань та прикладних розробок нового рівня. Так, у медицині ветеринарній та гуманній існує декілька важливих з точки зору науки і практики аспектів застосування молекулярно-біологічних методів.

Першу велику їх групу складають методи молекулярної діагностики та молекулярної епізоотології (епідеміології). До числа цих методологічних підходів можна віднести ПЛР, ПЛР в режимі реального часу, секвенування, методи гібридизації, методи визначення рестрикційних та плазмідних профілів, тощо.

Другу велику групу складають методи створення рекомбінантних конструкцій – це біотехнологічна група методів, яка базується на розробці генетично-модифікованих організмів, що мають корисні чи не мають якихось негативних ознак. Завдяки цим методам отримують рекомбінантні діагностичні та вакцинні антигени, біологічно активні сполуки (інтерферон, цитокіни, інсулін та інші гормони та гормоноподібні речовини), створюють культури мікроорганізмів, що мають змінені антигенні чи патогенні властивості.

До останньої, третьої групи, можна віднести методи генної терапії, спрямовані на створення, випробування ДНК-вакцин та застосування ДНК-вакцинації [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Залучення технологій рекомбінантних ДНК в процеси виготовлення ветеринарних і медичних імунобіологічних препаратів. Останні дві групи методів потребують найбільшої уваги, оскільки вони представляють найбільший інтерес з точки зору сьогодення.

Створення рекомбінантних конструкцій та засобів генної терапії – це один з найбільш перспективних на сьогодні напрямків біотехнології. Обсяги впровадження та комерціалізації його продукції вражають, сягаючи цифри понад 100 млрд доларів на

рік. Відчутним є вплив технологій рекомбінантних ДНК на всі сфери сільського господарства та ветеринарну медицину в тому числі. У гуманній медицині ці процеси ще більш виражені, адже сума від реалізації лише рекомбінантного інсуліну перевищує 30 млрд доларів на рік.

Рекомбінантні продукти, що виробляються для гуманної та ветеринарної медицини можна розподілити на декілька груп:

- рекомбінантні антигени (вакцинні та діагностичні);
- рекомбінантні біоактивні речовини;
- рекомбінантні ДНК-контролі та стандарти;
- ДНК-вакцини.

Перед тим як оглянути системи, створені на основі технологій рекомбінантних ДНК, необхідно проаналізувати основні поняття, що стосуються цього питання.

По-перше, за типом утворюваних рекомбінантних ДНК (тобто змінених ДНК) живі організми поділяються на інсерційні та делеційні мутанти дикого генотипу. Делеційні мутанти характеризуються відсутністю одного чи кількох генів у генотипі мутанта порівняно з організмом дикого типу. Інший тип організму-продукту складають інсерційні мутанти, до геному яких відповідний ген долучається штучно. Матеріальною основою корисності рекомбінантного організму при цьому є виключення одного чи кількох негативних ознак (патогенність, низька репродукуюча активність тощо) з одночасним або неоднотимчасним набуттям позитивних ознак (можливість до секреції певних корисних речовин і т. ін.).

Іншим важливим поняттям у технології рекомбінантних ДНК є поняття «система вектор-хазяїн».

Хазяїн (або реципієнт) – це репродукуюча система, яка отримує певні генетичні детермінанти, внаслідок чого змінює свої біологічні властивості в бік синтезу тої чи іншої корисної речовини (завдяки вбудовуванню тих чи інших генів організму-донора), або змінює процеси синтезу речовин власного організму (втрачає можливість секретувати антигени чи фактори патогенності, або навпаки нарощує обсяги експресії протеїнів тощо).

Організми-хазяї мають бути досконало вивчені відносно особливостей генотипу, фенотипу, фізіологічних властивостей, патогенності та екології, що при створенні рекомбінантних продуктів на їх основі слугує підґрунтям для розробки систем контролювання кінцевих продуктів, визначенні необхідних параметрів щодо біобезпеки при поводженні з рекомбінантними мікроорганізмами та їх продуктами.

У біотехнологічному виробництві застосовують наступні типи організмів-хазяїв:

- віруси (здебільшого віруси тварин і комах);
- бактерії (здебільшого *E. coli*);
- дріжджі (*Sacc. cerevisiae*);
- культури клітин тварин.

Донор – це організм, ген, частина гена, або гени якого виступають об'єктом клонування. При клонуванні його генів мають бути досліджені особливості останніх, біологічні властивості всього донорного організму. Ці параметри при вивченні на належному рівні дають змогу успішно отримати функціональний клонований продукт.

Вектор – це ДНК-молекула, здатна до репродукції в організми-хазяїні, яка складається з хазяїноспецифічних ДНК (45-70 % довжини) та вбудованої частини геному донора (30-55 % довжини).

Типи векторів, що застосовують для створення рекомбінантних конструкцій розподіляються на:

- плазмідні (касетні заміщуючі плазмідні, бактерійні плазмідні, дріжджові плазмідні);
- фагові ДНК;
- комбіновані плазмідно-фагові вектори;
- вірусні ДНК (покс-, адено-, герпес-, та бакуловіруси).

Рекомбінантні антигени і рекомбінантні вакцини є найбільш чисельними групами препаратів, створюваних як для ветеринарної, так і гуманної медицини на основі генетично модифікованих організмів [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14].

На сьогодні рекомбінантні антигени для серологічної діагностики лейкозу (IDEXX, ННЦ «ІЕКВМ»-ДіаПрофМед), бруцельозу (PIWet, ДіаПрофМед), лістеріозу (Merial), грипу птиці, ньюкаслської хвороби, хвороби Гамборо (IZPSVe, VLA, IDEXX, Biocheck), хвороби Ауескі (БТЛ), респіраторно-репродуктивного синдрому свиней (PIWet) та інші набули широкого вжитку в усьому світі, включаючи Україну. Обсяги комерціалізації цих продуктів вражаючі. Лише, наприклад, в Польщі щороку проводиться понад 10 млн аналізів на лейкоз ВРХ за допомогою ІФА [15, 16, 17].

У гуманній медицині також запропонований цілий спектр рекомбінантних антигенів для діагностики грипу людини типів А, В, С, кору, ВІЛ-інфекції, гепатиту С, лихоманки Західного Нілу, хламідіозів, мікоплазма-інфекцій, поліомієліту, пневмококових інфекцій, трипаносомозу, антитіл до бактерій родів *Helicobacter*, *Neisseria* тощо.

Рекомбінантні вакцини проти сказу (Merial), хвороби Гамборо та Марека (Merial), грипу птиці та інших інфекцій вже активно впроваджуються у ветеринарну практику. Ці препарати пройшли доклінічні та клінічні випробування в Європі, Америці та Азії й мають високий попит на ринку імунобіологічних препаратів. У гуманній медицині запропоновано ряд вакцин проти грипу людини, поліомієліту, кору, краснухи, простого герпесу різних типів, ретровірусних інфекцій (зокрема ВІЛ), гепатиту С, цервікальної бластоми тощо [18].

Іншим типом отримуваних у результаті генно-інженерних маніпуляцій продуктів є делеційні мутанти вірусів та бактерій. У результаті цієї біотехнологічної процедури вдається отримувати збудників зі зміненим генотипом, які є маркованими щодо відсутності окремих генів. На основі подібних генетично модифікованих мікроорганізмів у більшості країн світу базується система диференціації інфікованих та вакцинованих тварин (DIVA-стратегія). У такий спосіб отримані марковані вакцини проти інфекційного ринотрахеїту ВРХ (вакцинний вірус дефектний за глікопротеїном Е), хвороби Ауескі свиней (з геному збудника вилучений той же ген), хвороби Марека (віруси швидкої атенуації отримують шляхом вилучення маркерів патогенності) тощо [2, 18].

Наступним типом генно-інженерних продуктів ветеринарного значення є ДНК-вакцини. Це препарати рекомбінантних нуклеїнових кислот, здатні функціонувати в організмі тварин і людини, продукуючи специфічні антигени та створюючи імунітет проти інфекції. Діючою речовиною цих препаратів є ДНК збудника або компліментарна ДНК-копія РНК збудника, залучена до молекули-вектора. Ці комплекси є надзвичайно нестійкими, адже можуть руйнуватися ферментами бактерій та секреторними

Розділ 1. Біобезпека та біозахист

ферментами щеплюваного організму, а отже їх введення до організму може бути здійснено лише через залучення специфічних захисних речовин. Існує кілька типів таких субстратів. Найбільш відомим і широко застосовуваним у практиці методом інкапсуляції ДНК у вакцинах є створення ліпосомальних форм. Унаслідок цього ДНК-молекули вкриваються ліпідним шаром, що стимулює проникнення ДНК до цільових клітин, які відповідають за імунну відповідь при певній інфекції. Такі комплекси можна отримувати з різних ліпідних композицій. Вони мають низьку вартість та поширені на ринку. Комплекси ДНК-ліпосома, які інакше зветься віросомами, мають виражені імуностимулюючі властивості, що сприяє швидкому утворенню надійного імунітету проти захворювання. За принципом віросом запропоновано такі відомі біотехнологічні розробки, як вакцини проти вірусної діареї ВРХ, грипу людини і птиці, блутангу, лейкозу ВРХ [19, 20, 21].

Розмаїття форм ДНК-вакцин включає також ДНК-синтетичні комплекси (з білковими або полісахаридними захисними оболонками) або комплекси нуклеїнової кислоти з дорожчими металами. Ці розробки більш дорогі, важко стандартизуються та нетехнологічні в плані серійного виготовлення і введення тваринам. За таким принципом створювались вакцини проти грипу людини та птиці, малярії, хвороби Марека та інші, проте вони не набули широкого впровадження або трансформувались у вакцини ліпосомального типу [2, 22].

Ще одним класом речовин, отримуваних за рахунок генно-інженерних маніпуляцій, є імуностимулятори та біоактивні речовини рекомбінантного походження. Ці препарати широко вживають у сфері лікування та профілактики інфекційних хвороб тварин. Їх використовують самостійно для коригування імунного статусу, для лікування імунопатій, при вакцинопрофілактиці для активації процесів створення імунітету проти певного захворювання тощо. Рекомбінантні продукти також залучають до створення діагностичних наборів з визначення біоактивних речовин-медiatorів імунітету, таких як інтерлейкіни, інтерферони та ряд гормональних речовин. Ці тести застосовують для визначення імунного статусу тварин і людини. Шляхом молекулярного клонування отримані й активно впроваджуються інтерферони різних видів тварин, інтерлейкін 1, 2, 6, фактор некрозу пухлин, еритропоетин, гемопоетин та найбільш відомий і значний за обсягами впровадження людський інсулін. Рекомбінантний інтерферон свині застосовують при створенні сучасних ад'ювантів для виготовлення вакцин проти вірусних хвороб свиней, як, наприклад: парвовірусна інфекція, респіраторно-репродуктивний синдром, класична чума. Рекомбінантні інтерферони та цитокіни входять до складу лікарських препаратів для профілактики і терапії вірусних і бактерійних інфекцій [18].

Контроль якості та безпеки імунобіологічних препаратів на основі рекомбінантних ДНК. Належний контроль якості та безпечності продуктів, отримуваних із залученням технологій рекомбінантних ДНК ґрунтується на засадах комплексної оцінки якості та безпечності сировини і готової продукції в лабораторних, преклінічних та клінічних тестах.

Система контролю сировини повинна включати тести, які забезпечують досконале знання характеристик та особливостей виробничих штамів, передбачуваних генетичних конструкцій та всіх матеріалів і реактивів, які долучаються до виробничих процесів.

Система контролю сировини згідно з вимогами Recombinant DNA safety consideration (*Ad Hoc Group Of Government Experts On Safety And Regulations In Biotechnology*) включає:

- контроль якості та безпеки штаму-хазяїна;
- контроль властивостей штаму-донора;
- контроль властивостей та безпеки векторної молекули.

Контроль якості та безпеки штаму-хазяїна передбачає досконале вивчення його аутентичності, контамінації сторонніми агентами, які можуть спричинити утворення продуктів з непередбачуваними властивостями генотипу, біологічних особливостей, визначення рівнів патогенності, поширення в природі та екологічні взаємозв'язки в довкіллі тощо. З метою створення вакцинних та діагностичних рекомбінантних антигенів застосовують виключно добре вивчені та, у разі створення живих вакцин, цілком апатогенні мікроорганізми в якості акцепторів генів. У разі створення інактивованих продуктів чи антигенів необхідно мати поглиблені відомості щодо фізіологічних та біохімічних властивостей акцептора, що необхідно для очищення та стандартизації готового продукту. Використовувані для створення рекомбінантних продуктів акцептори генів мають бути депоновані в спеціалізованих депозитаріях на світовому рівні (NIG, YGRC, ATCC, ECCC) або, хоча б на державному рівні та мати відповідний паспорт.

Критичним аспектом є також оцінка біологічних особливостей геному донорного організму. Це зумовлено, по-перше, необхідністю знання структури і функцій геномного апарату для успішного отримання цільового продукту, по-друге, важливістю створення необхідних умов біобезпеки при роботі з патогеном, і, по-третє, – для розробки системи контролювання ефективності процесу накопичення продукту власне в організмі донора гену та в експресуючій системі, отриманій на основі ДНК-технологій. Використовувані для створення рекомбінантних продуктів донори генів мають бути депоновані в спеціалізованих депозитаріях на державному або світовому рівні.

Контроль якості векторної ДНК-молекули полягає у ретельному вивченні її структури (теоретично – з метою визначення функціональності та практично – з метою встановлення специфічності (аутентичності) вставки, стабільності вставки (як біотехнологічної при спонтанному лігуванні, так і генетичної – за кількістю передбачуваних зон мутації та наявністю нестабільних послідовностей), кодуючих здібностей вставки та їх специфічності [2, 22].

Контролювання готової продукції здійснюється в умовах лабораторій, що мають дозвіл на роботу з рекомбінантними ДНК та патогенами відповідної групи, до якої(яких) належать донорні та акцепторні організми.

Система контролю на рівні лабораторії є продовженням процесу створення біотехнологічної розробки і полягає у валідації тої чи іншої групи препаратів.

Для діагностичних та вакцинних препаратів валідаційні характеристики полягають у визначенні аутентичності та відповідності паспортним характеристикам продукуючої системи, тобто клону мікроорганізму, що отриманий при створенні рекомбінантного продукту. При цьому за допомогою молекулярно-біологічних методів визначають специфічність вставки, експресуючу активність, динаміку експресії, а для вакцинних клонів – ще визначають можливість експресії в невластивих для вектора системах, нешкідливість, реактогенність, у деяких випадках – протективну ефективність. Цей комплекс досліджень включає як дослідження *in-vitro*, так і *in vivo*, з залученням лабораторних тварин.

Після валідації виробничого штаму перевіряється створений препарат. Для діагностичних тестів на основі рекомбінантних антигенів встановлюють наступні валідаційні параметри:

- чутливість (діагностична + аналітична);
- специфічність (діагностична + таксономічна);
- точність;
- лінійність (для кількісних);
- повторюваність та відтворюваність;
- стабільність компонентів при зберіганні.

Для вакцин на основі рекомбінантних антигенів та ДНК-вакцин встановлюють наступні валідаційні параметри:

- специфічність;
- доза введення;
- нешкідливість;
- реактогенність;
- антигенна активність;
- імуногенна активність;
- протиепізоотична ефективність (для вет. препаратів);
- протективні властивості в умовах контрольного зараження;
- експресуюча активність;
- стабільність в організмі (для ДНК-вакцин) та при зберіганні.

До біоактивних речовин рекомбінантного походження існують наступні вимоги:

- специфічність;
- активність;
- доза введення;
- нешкідливість;
- реактогенність;
- активність в організмі;
- стабільність в організмі та при зберіганні.

Після створення та лабораторного випробування препарату проводяться доклінічні та клінічні випробування [21, 22].

Доклінічні випробування проводять у закритих системах. При цьому відбувається щонайменше річне спостереження за щепленими лабораторними тваринами, досліджується стабільність векторних ДНК-молекул (при використанні живих форм виробничих штамів та ДНК-вакцин), динаміка утворення та елімінації антитіл. При контрольному інфікуванні оцінюють процеси виділення збудника та моніторинг його геному щодо перебудов. Цю інформацію збирають впродовж кількох пасажів.

Після доклінічних випробувань у закритій системі, у разі невиявлення негативного впливу вакцини на довкілля, препарат випробовують у відкритій системі, після чого у ветеринарній медицині його впроваджують, а у гуманній випробовують на волонтерах.

Регламентация біобезпеки при застосуванні рекомбінантних технологій. Робота з рекомбінантними ДНК має відбуватись з дотриманням засад біобезпеки. Рівень біобезпеки, який має супроводжувати дослідження з розробки, випробування та валідації рекомбінантних продуктів, напряму залежить від потенційної небезпеки, яку становлять донорні та акцепторні штами.

Згідно з класифікацією Національного Інституту охорони здоров'я США, який є куратором у питаннях легалізації рекомбінантних продуктів з боку ВООЗ, штами-донори генів розподіляються на чотири групи патогенності.

Штами-хазяї відносяться до патогенів I-II, іноді – III групи патогенності.

При роботі з цими штамами використовують приміщення з відповідними рівнями біозахисту від I до III+.

До збудників першої групи патогенності відносяться непатогенні для людини, до другої – відносяться чинники терапевтично виліковних та мало контагіозних хвороб людини, до третьої – чинники летальних захворювань, для яких розроблені ефективні засоби лікування і профілактики, до четвертої – чинники летальних захворювань, для яких розроблені засоби лікування і профілактики є не завжди ефективними.

При застосуванні патогенних донорів генів роботи з одержання ДНК (кДНК) фрагментів для клонування відбуваються в умовах приміщень з рівнем біозахисту II-III+, залежно від групи ризику, до якої належить патоген, а процедури з клонування відбуваються у приміщеннях лабораторій з класом біозахисту II.

При роботі з організмами-хазяями (акцепторами) при встроюванні генів керуються вибором за рівнем патогенності вказаних організмів (I-III).

Якщо джерело ДНК є патогеном IV групи ризику, а хазяїнний штам – ні, процедури з клонування відбуваються у приміщеннях лабораторій з класом біозахисту II, а якщо геном патогена є функціональним – III+. При роботі з джерелами ДНК (РНК) вірусів тварин роботи проводять у приміщеннях з рівнем біозахисту II-III+. При роботі з трансфекцією повногеномними копіями ДНК (РНК) клітин еукаріот роботи проводять у приміщеннях з рівнем біозахисту II-III+. Процедури з геномом еукаріот проводять в приміщеннях I класу біозахисту з огляду на їх неінвазивність. Безпечні для людей вірусні вектори використовують в приміщеннях I класу біозахисту.

Досліди на тваринах з рекомбінантними конструкціями проводять у віварних приміщеннях II-III класу біозахисту. У випадках необхідності проведення контрольного зараження клас біозахисту приміщення залежить від патогенності контрольного штаму. Виключенням є випробування рекомбінантних продуктів еукаріотичного походження. Якщо їх випробування не передбачає інфікування, дослідження проводяться в віварних приміщеннях з класом біозахисту I.

Створення та випробування рекомбінантних токсинів на основі E. coli (100 нг/кг < LD50 < 1 мкг/кг) проводять у приміщеннях II класу біозахисту, а 1 мкг/кг < LD50 < 100 мкг/кг – I класу. Це стосується і лабораторних, і віварних приміщень.

Без дозволу ВООЗ та NIH забороняється створення клонів мікроорганізмів, що несуть потенційну небезпеку для здоров'я тварин і людини, мають штучно набуту виражену різною мірою стійкість до лікувальних засобів, та такі, що продукують токсини з LD50 100 нг/кг – 1 мкг/кг.

Рекомбінантні продукти та генетичні конструкції, призначені до введення у організм людини, мають бути перевірені Committee on Microbiological Safety.

Виключеннями з цього правила є рекомбінантні ДНК:

- що є не функціональними, тобто не містять старт-кодонів;
- не можуть бути репліковані незалежно в організмі, що щепиться, чи може раптово бути трансфікованим нею;
- окремі не хромосомні структури;
- якщо донор і акцептор ДНК належать до одного виду;
- якщо об'єкт клонування не являє екологічної небезпеки;
- еукаріотичні клони.

Реєстрація та дозвіл на широке застосування рекомбінантного продукту можуть бути надані тільки після визначення всіх його головних біологічних характеристик та доведення повної індивідуальної, популяційної та екологічної безпечності вказаного продукту [23, 24].

Нормативна база відносно створення та застосування рекомбінантних імунобіологічних препаратів у світі та Україні. Аналізуючи устрій системи моніторингу, реєстрації та контролю біобезпеки ГМ-продуктів для ветеринарної та гуманної медицини в різних країнах світу, необхідно зазначити, що в кожній державі існує комплекс законів та підзаконних актів, які контролюють цей аспект відносин між розробниками, виробниками, споживачами та державою.

Так, в медичній сфері існує комітет з обліку рекомбінантних продуктів для гуманної медицини при ВООЗ та ООН. Цей комітет розташований при Національному інституті охорони здоров'я в Сполучених Штатах. До його задач належать облік, контроль за обігом рекомбінантних продуктів та речовин, контроль за ліцензуванням виробників та розробників ГМ-продуктів у США та світі.

Існують документи стосовно цього питання від сільськогосподарських та ветеринарних організацій, а саме постанова ЕМЕА (ЕМЕА/СVMP/004/04-FINAL) та FAO (22/01/1999), які присвячені питанням біотехнології, описують галузі застосування ГММ у ветеринарній медицині, методи контролю та процедури впровадження цих продуктів, а також елементи щодо біобезпеки при їх виготовленні та застосуванні.

З метою регламентації торгових відносин, що стосуються біотехнологічних, у т.ч. рекомбінантних, продуктів ратифікований і має аналоги в інших країнах меморандум COT WTO Doc. WT/DS291,292,293/R. At. Означений документ прийнято в 32 країнах.

Якщо взяти США, то в цій країні існує Recombinant DNA Advisory Committee (RAC), національний орган реєстрації медичних та ветеринарних препаратів (також при Національному інституті охорони здоров'я). Цей орган виконує вказані функції на національному рівні. Нормативна база та контроль за обігом також знаходиться під наглядом з боку інших державних організацій: Food and Drug Administration (FDA), US Department of Agriculture (USDA) та Environmental Protection Agency (EPA). Законотворчі процеси в напрямку регламентації питань щодо ГММ мають у країні 30-річні традиції.

У Європейському союзі, чий досвід у контексті бажання України щодо вступу в цю конфедерацію є найбільш близьким, як модель, майже половина законів має відношення до сільського господарства. З цієї половини понад двох третин відноситься до ветеринарної медицини. Європейська політика щодо впровадження та застосування ГММ регламентується 8 директивами ЄС та 5 інструкціями, ратифікованими всіма членами ЄС. Крім того, кожна країна має відповідні місцеві органи, що контролюють обіг ветеринарних на медичних ГММ-препаратів, затверджені на рівні урядів країн протоколи з біобезпеки при роботі з рекомбінантними ДНК та їх похідними.

В Україні на сьогодні існує лише Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні ГМО» від 2007 року. Цей закон не повною мірою відображає порядок ліцензування процесів створення та виробництва ГМО, у тому числі ветеринарного та медичного призначення. Враховуючи, що мікроорганізми і корми та продукти харчування – це полярно різні речі, вони потребують відокремлених законодавчих баз та підзаконних актів. Механізми ліцензування, реєстрації, виробництва та контролю мають виконуватись ветеринарними та медичними фахівцями. Для ефективного впровадження дієвої системи необхідно ратифікація перерахованих директив з урахуванням національних особливостей та можливостей [24-34].

Висновок. Враховуючи вищевикладене, необхідно спрямувати зусилля на створення відповідної нормативної бази з розробки, випробувань та впровадження у виробництво рекомбінантних біопрепаратів для гуманної та ветеринарної медицини. Має бути удосконалена система Національних стандартів з функціонування генно-інженерних наукових лабораторій, виготовлення і контролю рекомбінантних вакцин і діагностиків, контролю біобезпеки та екологічної безпеки продуктів технологій рекомбінантних ДНК. Зазначені дії сприятимуть розвитку біотехнології в державі, підвищенню конкурентоспроможності вітчизняних препаратів, а також інтенсифікуватимуть процеси гармонізації Європейської нормативної бази та інтеграції України в Європейські та світові структури.

Список літератури

1. Genetic engineering and biotechnology news [el. source] // <http://www.genengnews.com>.
2. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение [текст] / Б. Глик, Дж. Пастернак – М.: Мир, 2002. – 567 с.
3. Persing, D. In vitro nucleic acid amplification techniques [text] // *Diagnostic Molecular Microbiology*. - American Society for Microbiology, 1993. – P. 51-88.
4. Houdebine, L. *Transgenic animal models in biomedical research* [text] // *Methods Mol. Biol.* – 1994. – N 360. P. 163-202.
5. Genetic engineering [el. source] // <http://www.slic2.wsu.edu:82/hurlbert/micro101/pages/Chap10.html>.
6. Recombinant adenovirus encoding the HA gene from swine H3N2 influenza virus partially protects mice from challenge with heterologous virus: A/HK/1/68 (H3N2) [text] / Tang M., Harp J.A., Wesley R.D. // *Arch Virol.* – 2002. – N. 147 (11). – P. 2125-2141.
7. Immunogenicity and efficacy of baculovirus-expressed and DNA-based equine influenza virus hemagglutinin vaccines in mice [text] / Olsen C.W., McGregor M.W., Dybdahl-Sissoko N., et al. // *Vaccine.* – 1997. – N. 15(10). – P. 1149-1156.
8. Recombinant viral vector vaccines for the veterinary use [text] / Yokoyama N., Maeda K., Mikami T. // *J. Vet. Med. Sci.* – 1997. – N. 59(5). – P. 311-322.
9. Vaccines for emerging infections [text] / Marano N., Rupprecht C., Regnery R. // *Rev. Sci. Tech.* – 2007. – N. 26(1). – P. 203-215.
10. Influenza vaccines and vaccination strategies in birds [text] / van den Berg T., Lambrecht B., Marchij S., et al. // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* – 2008. – N. 31(2-3). – P. 121-165.
11. Vaccinating chickens against avian influenza with fowlpox recombinants expressing the H7 haemagglutinin [text] / Boyle D.B., Selleck P., Heine H.G. // *Aust. Vet. J.* – 2000. – N. 78(1). – P. 44-48.
12. Development and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza [text] / Bublot M., Pritchard N., Swayne D. E., et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2006. – N. 1081. – P. 193-201.
13. Babiuk, L.A. Adenoviruses as vectors for delivering vaccines to mucosal surfaces [text] / Babiuk L.A., Tikoo S.K. // *J. Biotechnol.* – 2000. – N. 83(1-2). – P. 105-113.
14. Development of a sensitive and specific indirect enzyme-linked immunosorbent assay based on a baculovirus recombinant antigen for detection of specific antibodies against *Ehrlichia canis* [text] / Lypez L., Venteo A., Aguirre E., et al. // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2007. – N. 19(6). – P. 635-642.
15. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine viral diarrhea antibody based on Erns glycoprotein expressed in a baculovirus system [text] / Grego E., Uslenghi F., Strasser M., et al. // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2007. – N. 19(1). – P. 21-27.
16. Experimental immunization of cats with a recombinant rabies-canine adenovirus vaccine elicits a long-lasting neutralizing antibody re-

sponse against rabies [text] / Hu R.L., Liu Y., Zhang S.F., et al. // *Vaccine*. – 2007. – N. 25(29). – P. 5301-5307. **17.** J. Kuzmak (PIWet, Pulawy, PL) BLV situation in Polish Republic [pers. commun]. **18.** Research and Markets [el. source] // China Vaccine Market Report 2007-2008 http://www.researchandmarkets.com/research/b6b783/china_vaccine_mark. **19.** Bovine herpes virus expressing envelope protein (E2) of bovine viral diarrhoea virus as a vaccine candidate [text] / Kweon C.H., Kang S.W., Choi E.J., Kang Y.B. // *J. Vet. Med. Sci.* – 1999. – N. 61(4). – P. 395-401. **20.** Kruth, S.A. Biological response modifiers: interferons, interleukins, recombinant products, liposomal products [text]. // *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* – 1998. – N. 28(2). – P. 269-295. **21.** Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein E2 [text] / Harpin S., Hurley D.J., Mbikay M., et al. // *J Gen Virol.* – 1999. – N. 80 (Pt 12). – P. 3137-3144. **22.** Генетическая инженерия и биобезопасность. Избранные лекции по курсу «Генетика с основами селекции» [текст] / Машкина О.С., Буторина А.К Учебное пособие. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 2005. – 71 с. **23.** Cytokines as adjuvants for ruminant vaccines [text] / Lofthouse S.A., Andrews A.E., Elhay M.J., et al. // *Int. J. Parasitol.* – 1996. – N. 26(8-9). – P. 835-842. **24.** Guideline on live recombinant vector vaccines for veterinary use [el. source] // <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/iwp/000404en.pdf>. **25.** European Communities (EC) (1990). – Council Directive 90/219/EC of 23 April 1990 on the contained use of genetically modified micro-organisms. **26.** European Communities (EC) (1993). – Council Regulation EC No. 2309/93 of 22 July 1993 laying down Community procedures for the authorization and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. **27.** European Communities (EC) (2001). – Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. **28.** European Communities (EC) (2001). – Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products. **29.** European Communities (EC) (2002). – Council Decision 2002/813/EC of 3 October 2002 establishing, pursuant to Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council, the summary notification information format for notifications concerning the deliberate release into the environment of genetically modified organisms for purposes other than for placing on the market. **30.** European Communities (EC) (2003). – Regulation EC No. 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labeling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. **31.** European Communities (EC) (2004). – Directive 2004/9/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004 on the inspection and verification of good laboratory practice (GLP). **32.** European Communities (EC) (2004). – Directive 2004/28/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending Directive 2001/82/EC on the Community code relating to veterinary medicinal products. **33.** European Communities (EC) (2004). – Regulation EC No. 726/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency. **34.** European Medicines Agency (2004). – EMEA/CVMP/1151/04: guideline on GMOs: updated notice to applicants guidance. EMEA, London. Website: www.emea.eu.int/pdfs/

BIOTECHNOLOGY OF RECOMBINANT DNA AT USE IN PRODUCTION OF IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS FOR VETERINARY MEDICINE AND HUMANE, QUALITY CONTROL AND BIOSAFETY ASPECTS

Stegniy B.T., Gerilovych A.P., Gerilovych I.O., Vovk S.I., Unkovs'ka O.M., Dankovych N.O.

National Science Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

The article contains analysis data on the application of biotechnology and recombinant DNA in veterinary medicine, their significance, the current state of development, the nature of existing development, and aspects of quality control and safety of drugs based on them. Special attention is paid to biosafety issues when working with recombinant DNA and the regulatory framework for the creation and application of recombinant vaccines protecting the world and Ukraine.

УДК 619:578:616-036.22

НАУКОВО-МЕТОДИЧНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ МОНІТОРИНГУ, ПРОГНОЗУВАННЯ ТА РЕАГУВАННЯ ЩОДО ЕМЕРДЖЕНТНИХ ІНФЕКЦІЙ ТВАРИН

Стегній Б.Т., Головка В.О., Бузун А.І., Герілович А.П.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Емерджентні хвороби (від англ. *emergens* – надзвичайний, непередбачуваний) – це група особливо небезпечних хвороб людини, тварин та рослин (отруйних, інфекційних та інвазійних) з маловивченою етіологією, що створюють надзвичайні епідемічні, епізоотичні або епіфітотичні ситуації, відповідно, серед населення, у сільському, лісовому господарствах чи серед дикої природи. У свою чергу, емерджентні інфекції – це хвороби людини, тварин та рослин, що спричиняються невідомими раніше мікроорганізмами або відомими інфекційними агентами з незвичайними властивостями (наприклад, стійкими до відомих ліків) – тобто «вперше ідентифікованими та незвичайними інфекційними агентами, що викликають надзвичайні епідемічні ситуації» [1, 2]. Термін «емерджентні» по відношенню до інфекційних хвороб тварин набув спеціального змісту на початку 1990-х років, з виникненням та розповсюдженням губчастої енцефалопатії ВРХ – нового варіанту хвороби Крейцфельд-Якоба людини. У медицині на міжнародному рівні емерджентною вважається інфекція, що вперше виникла чи вперше визначена і має одну й більше наступних характеристик: є важкою щодо лікування (тобто, несприйнятлива до ліків), продовжує поширюватися, широко розповсюдилася географічно чи демографічно, є клінічно важкою чи смертельною, має новий спосіб передачі, загрожує здоров'ю людей на регіональному чи світовому рівнях [3]. На цих засадах з 1407 інфекційних агентів людини 177 ідентифіковано як емерджентні – і 130 з них (73 %) є зоонотичними [4].

Емерджентні інфекційні агенти (не прогнозована поява нового збудника або зміна властивостей вже відомого збудника) відбувається, як правило через несподіване розширення кола біологічних господарів та/або чинників передачі збудників [5]. Ці події, у свою чергу, відбуваються або природно-еволюційним шляхом, або штучно – в результаті біотехнологічних маніпуляцій. Розрізнити природне й штучне походження емерджентні зарозних агентів можливо лише при застосуванні спеціальних технологій та заходів у межах компетенції державних структур, що забезпечують національну безпеку, – адже маркери штучних агентів відомі лише їх виробникам. Увага до емерджентні зарозних агентів у світі особливо загострилася після подій у США 11 вересня 2001 р., коли стало зрозумілим, що контроль за штучно модифікованими мікробами вже перестав бути монополією світових наддержав і до них долучилися певні терористичні організації. Найбільш характерними надзвичайними епізоотичними ситуаціями, що виникли в результаті появи нових, раніше невідомих збудників є вірусна геморагічна хвороба кролів (ВГХК, Далекий Схід, 1989), репродуктивно-респіраторний синдром свиней (PPCC, Нідерланди, 1990), губчаста енцефалопатія ВРХ (ГЕ, Велика Британія, 1990-і роки), цирковірусна інфекція свиней 2-го типу (ЦВС-2, Північна Америка, 1997), геморагічні про-