

*В. И. Гражневская, В. А. Соломевич*  
**КОНТРОЛЬ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО СЫРЬЯ НА НАЛИЧИЕ НИЗКИХ  
КОНЦЕНТРАЦИЙ АНОМАЛЬНОГО ПРОТЕАЗОУСТОЙЧИВОГО  
ПРИОННОГО БЕЛКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

*Научный руководитель: канд. биол. наук, доц. С. П. Капитулец  
Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии  
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

*V. I. Grazhevskaya, V. A. Solomevich*  
**CONTROL OF PHARMACEUTICAL RAW MATERIALS ON THE AVAILABIL-  
ITY OF LOW CONCENTRATIONS OF ANOMALOUS PROTEAZ-RESISTANT  
PRIONAL PROTEIN USING THE METHOD OF IMMUNO-ENZYM ANALY-  
SIS**

*Tutor: assistant of professor S. P. Kapitulets  
Department of Microbiology, Virology, Immunology  
Belarusian State Medical University, Minsk*

**Резюме.** Исследование проводили с целью определения содержания низких концентраций инфекционного прион-протеина PrP<sup>Sc</sup> методом иммуноферментного анализа в образцах головного мозга крупного рогатого скота отобранных из различных мясокомбинатов Республики Беларусь. В исследуемых образцах не было выявлено ни одного положительного и/или сомнительного результата.

**Ключевые слова:** аномальный протеазоустойчивый прионный белок, прион-протеин, иммуноферментный анализ, трансмиссивная губкообразная энцефалопатия, фармацевтическое сырье.

**Resume.** Study was performed to determine the content of low concentrations of infectious prion-protein PrP<sup>Sc</sup> by ELISA analysis in cattle brain samples taken from various meat processing plants of the Republic of Belarus. No positive and/or dubious results were found in the samples studied.

**Keywords:** anomalous protease-resistant prion protein, prion-protein, enzyme immunoassay, transmissible spongiform encephalopathy, pharmaceutical raw materials.

**Актуальность.** Фармацевтическое сырье из жвачных животных и лекарственные средства, полученные на его основе, могут нести риск передачи трансмиссивной губкообразной энцефалопатии (ТГЭ) – группы фатальных нейродегенеративных заболеваний человека, вызываемых аномальным протеазоустойчивым прионным белком PrP<sup>Sc</sup> с молекулярной массой 33-35 кДа (далее, прион-протеин). По современным представлениям, прион-протеины – это высокостабильные формы самореплицирующихся белков, обладают чрезвычайной устойчивостью к физико-химическим воздействиям, инактивирующим все известные бактерии и вирусы. При стандартном процессе стерилизации инфекционные прион-протеины не разрушаются. В основу контроля ТГЭ положен принцип минимизации риска её передачи, а не полного исключения этого риска. Вполне приемлемым средством является оценка риска с демонстрацией того, что присутствие PrP<sup>Sc</sup> в фармацевтическом сырье минимизировано.

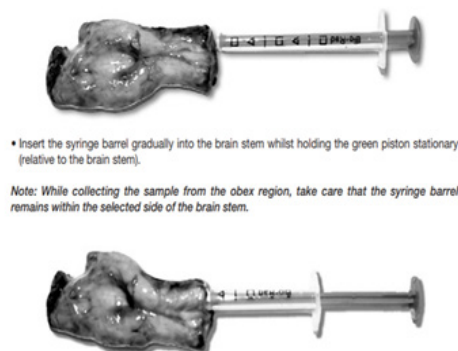
**Цель:** провести контроль фармацевтического сырья животного происхождения на наличие низких концентраций прион-протеина методом иммуноферментного анализа.

**Задачи:**

1. Провести исследования образцов мозговой ткани (область обих) методом иммуноферментного анализа.

2.Обработать полученные результаты анализа с помощью программного обеспечения «CombiStat 6.0».

**Материалы и методы.** Исследования проводились на базе лаборатории контроля качества иммунобиологических лекарственных средств ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии». Всего исследовано 76 образцов головного мозга крупного рогатого скота (КРС), представленных в течение 2017-2019 гг. различными мясокомбинатами Республики Беларусь (Борисовский, Глубокский, Гродненский, Минский, Миорский, Могилевский, Слуцкий, Столбцовский, Пинский и др.). Пробоподготовку образцов мозговой ткани (область обех) и проведение испытаний проводили в соответствии с инструкцией по применению иммуноферментной тест-системы «TeSeE™ SAP Combi Kit» (Bio-Rad), утвержденной в странах Европейского Союза в качестве экспресс-теста для диагностики ТГЭ у КРС, овец и коз, разработанной в соответствии с приложение III, Глава А к Регламенту (ЕС) №999/2001. Специфической анатомической областью для обнаружения PrPSc является ствол мозга, точнее, в области ядра блуждающего нерва. Это область ствола мозга, где PrPSc наиболее сконцентрирован. Для отбора проб применяли специальный шприц с помощью которого можно легко и быстро отобрать пробную площадь безопасным способом (рисунок 1).



**Рис. 1** - Пробоподготовка образцов мозговой ткани - область обех

Подготовка образца включает гомогенизацию образца, предварительное расщепление PrPSc, затем очистку и концентрацию PrPSc. Определение PrPSc проводили с помощью классической процедуры ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ, сэндвич-формат) с использованием двух моноклональных антител для захвата и обнаружения PrPSc. Полистирольный планшет состоит из 12 стрипов по 8 лунок покрытых первым моноклональным антителом анти-PrP (рисунок 2).

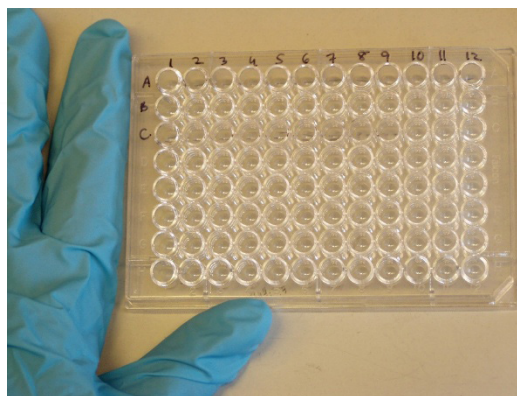


Рис. 2 - 96-луночный микропланшет

Второе моноклональное антитело связано с пероксидазой. Оптическую плотность в лунках определяли с использованием микропланшетного фотометра «Apollo 11» (Австрия) при длине волны 450 нм не позднее чем через 30 минут после остановки реакции (планшет хранили в защищенном от света месте). Результаты анализа обрабатывали с помощью программного обеспечения «CombiStat 6.0».

**Результаты и их обсуждение.** При исследовании 76 образцов головного мозга КРС (область obex) методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы «TeSeE™ SAP Combi Kit» в исследуемых образцах не было выявлено ни одного положительного и/или сомнительного результата. При этом все положительные контроли тест-системы сработали как положительные, а отрицательные – как отрицательные. Тем не менее, абсолютно гарантировать отсутствие инфекционного прион-протеина в испытуемом фармацевтическом сырье невозможно, поскольку полученные результаты определяются показателями диагностической чувствительности и диагностической специфичности рекомендованной ВОЗ тест-системы.

#### **Выводы.**

1. В нашем исследовании, проведенном с использованием иммуноферментной тест-системы «TeSeE™ SAP Combi Kit» (Bio-Rad), все проанализированные образцы головного мозга КРС (область obex), полученные из различных отечественных мясокомбинатов, показали отрицательный результат на наличие инфекционного прион-протеина PrP<sup>Sc</sup>.

2. Для совершенствования диагностики ТГЭ необходимо использовать методы индикации и идентификации PrP<sup>Sc</sup> с диагностическими показателями, максимально обеспечивающими минимизации риска содержания инфекционных прион-протеинов в фармацевтическом сырье, используемом для производства лекарственных средств.

#### **Литература**

1. Галимова, Н.Р. Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота. Характеристика возбудителя и распространение/ Н.Р. Галимова // Сборник: Наука и инновации в АПК XXI века Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 145-летию академии.—2018.—С. 130-133.

2. Полещук Н.Н. Прионы: характеристика возбудителей, основные методы обнаружения и разработка новых способов прижизненной диагностики трансмиссивных губчатых энцефалопатий / Н.Н. Полещук, [и др.] // Медицинские новости.—2005.—№3.—С. 29-34.

3. Риск передачи ТГЭ и ТГЭЖ при производстве фармацевтических препаратов [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://pharm-community.com/2017/6683/>

4. Note for guidance on minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products (EMA/410/01 rev.3) (2011/C 73/01) Official Journal

of the European Union IV (Notices)

5. Reagent kits for in vitro purification and detection of PrP<sup>Sc</sup> User's manual.

6. WHO Guidelines on Transmissible Spongiform Encephalopathies in relation to Biological and Pharmaceutical Products [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.who.int/biologicals>

Репозиторий БГМУ