

**ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ИНАКТИВАЦИИ *P. MULTOCIDA*  
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ДИМЕРА ЭТИЛЕНИМИНА И ФОРМАЛЬДЕГИДА**

**Стегний Б.Т.**  
ННЦ «ИЭКВМ», г. Харьков

**Сосницкий А.И.**  
Луганский НАУ

Термин «инактивация» означает утрату биологическим агентом способности к репродукции при сохранении иммуногенных и антигенных свойств. Для этого используют физические и химические воздействия. Процесс инактивации микроорганизмов является облигатным при изготовлении убитых вакцин [2, 3, 5].

Из химических соединений, наиболее часто применяемых для инактивации инфекционной активности микроорганизмов для сохранения их антигенных и иммуногенных свойств, можно выделить формальдегид (ФА). Однако чрезмерная денатурация белков приводит к снижению иммуногенности и антигенности формолантигенов, а избыток инактиванта – к повышенной токсичности биопрепаратов [1, 3, 2].

Исследования Brown F. et al. (1963) привлекли внимание ученых к азиридинам, так как ацетилэтиленимин (АЭИ) превосходил ФА в скорости инактивации и сохранении иммуногенных свойств на модели вирусов. Азиридины деполимеризуют нуклеиновые кислоты, переводя их в пул нуклеотидов, лишенный генетической информации, при этом не оказывают деградирующего воздействия на белковые молекулы. Fellowes O.N. (1966) показал превосходство азиридинов над бетапропиолактоном (БПЛ). Нестабильность АЭИ стимулировала поиск более стойких азиридинов. Bauer K. с сотр. (1969, 1973) получили патент на этилэтиленимин (ЭЭИ), а затем на этилимин (ЭИ). Bahnemann H.G. (1975) получил димер этилеимина (ДЭИ), который он назвал бинарный этиленимин (БЭИ). Данные литературы по механизму инактивации микроорганизмов препаратами азиридинового ряда (АЭИ, ЭЭИ, ЭИ и ДЭИ с. АЭЭИ с. БЭИ) свидетельствуют о том, что эти вещества инактивируют инфекционность по типу реакций первого порядка без существенного снижения иммуногенности возбудителя. Линейное снижение инфекционности (вегетоспособности) дает возможность рассчитать уровень специфической безопасности биопрепарата [1-5].

Цель работы. В сравнительном аспекте изучить кинетику инактивации возбудителя в бульонной культуре, полученной в стационарных условиях культивирования при 37-38°C в течение суток, при использовании ДЭИ и ФА.

**Материалы и методы.** Исследование кинетики инактивации проводили на эпизоотических культурах *P. multocida*: серовар А штамм № 12, серовар D штамм № 3 и серовар В штамм № 31.

Исходя из экспоненциальной кривой выживания возбудителя и результатов экспериментальных испытаний химической девитализации, константу скорости инактивации определяли по формуле  $k = 2,3 / (t \cdot C) \cdot \lg(P_0/P_t)$ , а время необходимое для достижения гарантированного предела биологической безопасности биопрепарата, принятое на уровне  $P_t = 0,00001$  ж.м.к./см<sup>3</sup> или  $10^{-4}$  лг НВЧ/см<sup>3</sup>. Время (t), необходимое для достижения принятого предела инактивации ( $P_t$ ), рассчитывали по формуле  $t = \ln(P_0/P_t) / (k)$ .

ДЭИ использовали в концентрации 0,5 % по АДВ с рН=7,4-7,6 (коррекция концентрированной соляной кислотой) при термостатировании при 37-38°C в течение 12 часов, с механическим перемешиванием через каждый час.

ФА применяли по традиционной технологии, в концентрации 0,3 % с экспозицией в течение суток при термостатировании при 37-38°C, с механическим перемешиванием через каждый час.

**Результаты исследований.** Бульонные культуры *P. multocida* сероваров А, D и В выращивали в матровых колбах с литровым наполнением МПБ на ОПХ под ватно-марлевыми пробками при 37-38°C в течение суток. После проверки бактериальной чистоты в колбы внесли инактиванты, плотно закрыли резиновыми пробками и провели процесс инактивации согласно принятой схемы. Через каждые 2 часа отбирали пробы бактериальной суспензии и квантально-альтернативным титрованием определяли количество оставшегося возбудителя. Получили следующий набор количественных характеристик динамики инактивации пастерелл во временном континиуме в зависимости от химического состава инактиванта. Экспериментальные данные по выживанию возбудителя приведены в таблице.

**Таблица – Количественная характеристика в лг НВЧ/см<sup>3</sup> динамики инактивации пастерелл во времени в зависимости от вида инактиванта**

Время в часах	Сероварианты <i>P. multocida</i>					
	А		D		B	
	Инактивант					
	ДЭИ	ФА	ДЭИ	ФА	ДЭИ	ФА
0	9,5	9,5	9,25	9,25	9,5	9,5
2	6,0	8,5	6,25	8,5	6,5	8,5
4	3,0	7,25	3,5	7,75	2,25	7,5
6	0	6,5	0	7,0	0	6,75
8	0	5,5	0	6,25	0	6,0
10	0	4,25	0	5,5	0	5,25
12	0	3,75	0	4,75	0	4,25
14	0	2,75	0	3,0	0	3,0
16	0	1,75	0	2,25	0	2,0
18	0	0,25	0	1,5	0	1,25
20	0	0	0	0,75	0	0,25
22	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0

На основании вышеизложенных экспериментальных данных динамики инактивации бульонных культур пастерелл ДЭИ и ФА математически, на основании расчета значения (k) определили время (t), необходимое для достижения принятого нами предела биологической безопасности инактивированной культуры возбудителя в  $-4 \lg \text{НВЧ/см}^3$ , т.е. согласно теоретических предпосылок на  $10000 \text{ см}^3$  бульонной культуры будет оставаться одна (1) ж.м.к. пастерелл.

Расчет времени инактивации бульонной культуры для *P. multocida* серовар А штамм № 12.

ДЭИ:

$$k = [2,3 / (4 \text{ ч } 60 \text{ мин } 0,005)] \cdot \ln(9,5 - 3,0) = (2,3 \text{ ч } 6,5) / 1,2 = 14,95 / 1,2 = 12,458 \text{ ln/мин}^{-1};$$

$$t = [2,3 / (-12,458 \text{ ч } 0,005)] \cdot \ln[9,5 - (-4)] = (2,3 \text{ ч } 13,5) / -0,0623 = 21,275 / -0,0623 = -498,4;$$

$$|498,4 \text{ мин} / 60 \text{ мин}| = 8,4 \text{ час.}$$

ФА:

$$k = [2,3 / (18 \text{ ч } 60 \text{ мин } 0,003)] \cdot \ln(9,5 - 0,25) = (2,3 \text{ ч } 9,25) / 3,24 = 21,275 / 3,24 = 6,5664 \text{ ln/мин}^{-1};$$

$$t = [2,3 / (-6,57 \text{ ч } 0,003)] \cdot \ln[9,5 - (-4)] = (2,3 \text{ ч } 13,25) / -0,01971 = 30,475 / -0,01971 = -1546,2;$$

$$|1546,2 \text{ мин} / 60 \text{ мин}| = 25,7695 \text{ час} \approx 26 \text{ час.}$$

Анализируя расчетные данные кинетики инактивации бульонной культуры *P. multocida* серовар А штамм № 12 видно, что ДЭИ вызывает потерю инфекционности возбудителя, равную  $12,5 \ln$  каждую минуту, ФА – соответственно  $6,6 \ln$  в минуту, что в 2 раза ниже чем при применении ДЭИ. Время достижения безопасного предела инактивации при применении ДЭИ также значительно короче и составляет 8,4 часа, а при применении ФА – 26 часов, что в 3 раза больше.

Расчет времени инактивации бульонной культуры для *P. multocida* серовар D штамм № 3.

ДЭИ:

$$k = [2,3 / (4 \text{ ч } 60 \text{ мин } 0,005)] \cdot \ln(9,25 - 3,5) = (2,3 \text{ ч } 5,75) / 1,2 = 13,225 / 1,2 = 11,0208 \text{ ln/мин}^{-1};$$

$$t = [2,3 / (-11,0208 \text{ ч } 0,005)] \cdot \ln[9,25 - (-4)] = (2,3 \text{ ч } 13,25) / -0,0551 = 30,475 / -0,0551 = -553,0853;$$

$$|553,1 \text{ мин} / 60 \text{ мин}| = 9,22 \text{ час.}$$

ФА:

$$k = [2,3 / (20 \text{ ч } 60 \text{ мин } 0,003)] \cdot \ln(9,25 - 0,75) = (2,3 \text{ ч } 8,5) / 3,24 = 19,55 / 3,6 = 5,4306 \text{ ln/мин}^{-1};$$

$$t = [2,3 / (-5,4306 \text{ ч } 0,003)] \cdot \ln[9,25 - (-4)] = (2,3 \text{ ч } 13,25) / -0,01629 = 30,475 / -0,01629 = -1870,78;$$

$$|1870,78 \text{ мин} / 60 \text{ мин}| = 31,2 \text{ час.}$$

Анализируя расчетные данные кинетики инактивации бульонной культуры *P. multocida* серовар D видно, что ДЭИ вызывает потерю инфекционности возбудителя, равную  $11,02 \ln$  каждую минуту, ФА – соответственно  $5,4 \ln$  в минуту, что в 2 раза ниже чем при применении ДЭИ. Время достижения безопасного предела инактивации при применении ДЭИ также значительно короче и составляет 9,22 час, а при применении ФА – 36,2 час, что в 3,93  $\approx$  4 раза больше.

Расчет времени инактивации бульонной культуры для *P. multocida* серовар В штамм № 31.

ДЭИ:

$$k = [2,3 / (4 \text{ ч } 60 \text{ мин } 0,005)] \cdot \ln(9,5 - 2,75) = (2,3 \text{ ч } 6,75) / 1,2 = 15,525 / 1,2 = 12,9375 \text{ ln/мин}^{-1};$$

$$t = [2,3 / (-12,9375 \text{ ч } 0,005)] \cdot \ln[9,5 - (-4)] = (2,3 \text{ ч } 13,5) / -0,0647 = 31,05 / -0,0647 = -479,91;$$

$$|479,91 \text{ мин} / 60 \text{ мин}| = 7,99 \text{ час} \approx 8 \text{ час.}$$

ФА:

$$k = [2,3 / (20 \text{ ч } 60 \text{ мин } 0,003)] \cdot \ln(9,5 - 0,25) = (2,3 \text{ ч } 9,25) / 3,24 = 21,275 / 3,6 = 5,9097 \text{ ln/мин}^{-1};$$

$$t = [2,3 / (-5,9097 \text{ ч } 0,003)] \cdot \ln[9,5 - (-4)] = (2,3 \text{ ч } 13,5) / -0,0177 = 31,05 / -0,0177 = -1754,24;$$

$$|1754,24 \text{ мин} / 60 \text{ мин}| = 29,24 \text{ час.}$$

Анализируя расчетные данные кинетики инактивации бульонной культуры *P. multocida* серовар В штамм № 31 видно, что ДЭИ вызывает потерю инфекционности возбудителя, равную  $12,94 \ln$  каждую минуту, ФА – соответственно  $5,91 \ln$  в минуту, что в 2,2 раза ниже чем при применении ДЭИ. Время достижения безопасного предела инактивации при применении ДЭИ также значительно короче и составляет 8 часов, а при применении ФА – 29,24 часов, что в 3,655  $\approx$  4 раза больше.

На основании вышеизложенного можно сделать следующие выводы.

1) При инактивации ДЭИ (0,5 % по АДВ) бульонной культуры *P. multocida* с накоплением возбудителя: серовара А –  $9,5 \lg \text{НВЧ/см}^3$   $k = 12,458 \text{ ln/мин}^{-1}$ ; серовара D –  $9,25 \lg \text{НВЧ/см}^3$   $k = 11,0208 \text{ ln/мин}^{-1}$ ; серовара В –  $9,5 \lg \text{НВЧ/см}^3$   $k = 12,9375 \text{ ln/мин}^{-1}$ ; t необходимое для достижения безопасного предела инактивации в  $-4 \lg \text{НВЧ/см}^3 \approx 9, 10$  и 8 часов, соответственно.

2) При инактивации ФА (0,3 % по АДВ) бульонной культуры *P. multocida* с накоплением возбудителя: серовара А –  $9,5 \lg \text{НВЧ/см}^3$   $k = 6,5664 \text{ ln/мин}^{-1}$ ; серовара D –  $9,25 \lg \text{НВЧ/см}^3$   $k = 5,4306 \text{ ln/мин}^{-1}$ ; серовара В –  $9,5 \lg \text{НВЧ/см}^3$   $k = 5,9097 \text{ ln/мин}^{-1}$ ; t необходимое для достижения безопасного предела инактивации в  $-4 \lg \text{НВЧ/см}^3 \approx 26, 32$  и 30 часов, соответственно.

#### Список литературы

1. Факторні хвороби сільськогосподарських тварин / В.П. Литвин, Л.В. Олійник, Л.С. Корнієнко та ін.; За ред. В.П. Литвина, Л.С. Корнієнко. – Біла-Церква, 2002. – С. 275-298.
2. Мейнел, Дж., Мейнел, Э. Экспериментальная микробиология (теория и практика) // М.: Мир – 1967. – 348 с.
3. Bahnemann, H.G. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine // Vaccine. – 1990. – Vol. 8, № 8. – P. 299-303.
4. Haemorrhagic septicemia / OIE Manual of Diagnostic and Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Fifth Edition, 2004. – V. 1. – P. 537-548.
5. Veterinary vaccines and diagnostics. Ed. R. D. Schultz. Acad. Press. Sun Diego. – Calif., - 1998. – 246 p.

#### A STUDY OF KINETICS INACTIVATION OF *P. MULTOCIDA* AT THE USE OF DIMERA ETILENIMINE AND FORMALDEHYDE

Stegniy B.T.

NNC «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov

Sosnickiy A.I.

Lugansk National Agrarian University

*In comparative aspect learned kinetics of inactivation, P. multocida of DEI and FA is studied. The process of inactivation was probed on the epizootic cultures of exciter. Amount of alive cages of P. multocida was determined the by cvantum titruction in MPB on OPKH. The calculation of constants of inactivation was conducted on a mathematical algorithm, offered Dzh. Meynelom. Advantage of DEI was experimentally showed over FA in speed of devitalization of P. multocida. The results of researches are applicable at making of inactivation vaccines.*