
Научная статья
УДК 619:615.5
EDN YNKOGK

**Инактивация производственных штаммов
*Erysipelothrix rhusiopathiae***

Никита Денисович Балахнин¹, аспирант, ведущий специалист лаборатории профилактики болезней свиней ВНИИЗЖ

Анна Александровна Фроловцева², ветеринарный врач лаборатории профилактики болезней свиней ВНИИЗЖ

Научный руководитель – Дмитрий Анатольевич Бирюченков³, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики болезней свиней ВНИИЗЖ

^{1,2,3}Федеральный центр охраны здоровья животных, Владимир, Россия

¹balahnin@arriah.ru, ²frolovtseva@arriah.ru, ³biruchenkov@arriah.ru

Аннотация. Представлен материал по экспериментальному изучению воздействия формальдегида, β -пропиолактона и 1-(2-аминоэтил)-азиридина (димер) на клетки бактерий *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Ключевые слова: рожа свиней, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, бактерия, инактивация, формальдегид, формалин, 1-(2-аминоэтил)-азиридина, β -пропиолактон

Для цитирования: Балахнин Н. Д., Фроловцева А. А. Инактивация производственных штаммов *Erysipelothrix rhusiopathiae* // Актуальные исследования молодых ученых – результаты и перспективы : материалы науч.-практ. конф. (Благовещенск, 8 февраля 2024 г.). Благовещенск : Дальневосточный ГАУ, 2024. С. 21–31.

Original article

Inactivation of production strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Nikita Denisovich Balakhnin¹, post-graduate student, leading specialist of the Laboratory of Swine Disease Prevention, VNIIZhZh

Anna Alexandrovna Frolovtseva², Veterinarian of the Laboratory of Swine Disease Prevention at the All-Russian Research Institute of Swine Diseases

Scientific supervisor - Dmitry Anatolyevich Biryuchenkov³, Candidate of Veterinary Sciences, Head of the Laboratory of Swine Disease Prevention, VNIIZhZh

^{1,2,3}Federal Center for Animal Health Protection, Vladimir, Russia

¹balahnin@arriah.ru, ²frolovtseva@arriah.ru, ³biruchenkov@arriah.ru

Annotation. Presents material on the experimental study of the effects of Formaldehyde, β -propiolactone and 1-(2-aminoethyl)-aziridine on the cells of bacteria *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Key words: Porcine *Erysipelothrix rhusiopathiae*, bacterium, inactivation, formaldehyde, formalin, 1-(2-aminoethyl)-aziridine, β -propiolactone

For Citation: Balakhnin N. D., Frolovtseva A. A. Inaktivatsiya proizvodstvennykh shtammov *Erysipelothrix rhusiopathiae* [Inactivation of production strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae*]. *Aktual'nye issledovaniya molodykh uchennykh – rezul'taty i perspektivy* : materialy nauch.-prakt. konf. (Blagoveshchensk, 8 fevralya 2024 g.). Blagoveshchensk, Dal'nevostochnyj gosudarstvennyj agrarnyj universitet, 2024, pp. 21–31. (in Russ.).

Введение. Микроорганизм вида *Erysipelothrix rhusiopathiae* (далее *E. rhusiopathiae*) является возбудителем рожи свиней, септического, инфекционного заболевания, угнетающего не только свинопоголовье в возрасте 3–12 мес., но и здоровье человека [1, 2, 3].

Рожа свиней, характеризуется геморрагическим гастроэнтеритом, кровоизлияниями на серозных и слизистых оболочках, увеличением селезенки. Болезнь протекает как остро, так и хронически в форме эпизоотических вспышек со значительным экономическим ущербом. Согласно современной таксономической классификации микроорганизм относится к домену *Bacteria*, типу *Bacillota*, классу *Erysipelotrichia*, порядку *Erysipelotrichales*, семейству *Erysipelotrichaceae*, роду *Erysipelothrix*, виду *Erysipelothrix rhusiopathiae*. [4, 5].

Представители рода *Erysipelothrix* широко распространены в природе, в основном, как паразиты млекопитающих, птиц и рыб [6].

При создании инаktivированных антибактериальных вакцин главной задачей является получение полноценного бактериального сырья, качество и активность которого во многом зависит от используемого инактиванта [7].

Формальдегид – один из продуктов жизнедеятельности тканей живых организмов. 40%-процентный водный раствор широко используются на практике при производстве иммунобиологических препаратов как инактивант. Особый интерес для практики представляют особенности

механизма этого явления в отношении бактерий и вирусов [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14].

β -пропиолактон – представляет собой бесцветную жидкость со сладковатым запахом, нестабильную при комнатной температуре, но стабильную при 5 °С в стеклянной таре. Склонность к нестабильности и вступлению в реакцию с другими биомолекулами, находящимися поблизости, обуславливает высокую токсичность, и практическое применение в биотехнологии [15, 16].

1-(2-аминоэтил)-азиридина (далее, **димер**) – традиционно со второй половины XX века используется в качестве инактиванта при производстве вирусных антигенов для вакцин [17].

Цель работы. В экспериментальных условиях изучить процесс инаktivации производственных штаммов бактерий *E. rhusiopathiae* тремя видами инактивантов: формальдегидом, 1-(2-аминоэтил)-азиридин и β -пропиолактоном.

Материал и методика исследований. Использовали производственные штаммы *E. rhusiopathiae*. Культивирование бактерий проводили в колбах с жидкой питательной средой, в основе которой использовался сердечно-мозговой бульон с добавлением специфических факторов роста.

Для работы применяли:

– **формальдегид** в виде 40%-процентного водного раствора, являющийся примером классического инактиванта для изготовления антигена в отечественных и зарубежных препаратах;

– **β -пропиолактон** своего рода инновационный перспективный инактивант, учитывая его разрушение в процессе хранения, до безопасных, токсических составляющих;

– **1-(2-аминоэтил)-азиридин** широко используется в изготовлении противовирусных и бактериальных средств специфической профилактики, может быть рекомендован для производства комбинированных вакцин.

Инактивацию *E. rhusiopathiae* проводили в культуральной среде, при 37 °С в режиме постоянного перемешивания при 180 об/мин с использованием шейкера-инкубатора BioSan ES-20.

Концентрацию микробных клеток в суспензии определяли оптически (по стандарту мутности) и/или путем посева последовательных разведений на плотные питательные среды и считали среднее значение, единицы измерения выражали в КОЕ. Расчет параметров инаktivации производили по формуле:

$$N = C: ((N_1 + 0,1 \times N_2) \times D)$$

где N – искомое значение КОЕ;

C – сумма подсчитанных колоний на всех чашках Петри с плотной питательной средой;

N₁ – количество чашек Петри первого разведения;

N₂ – количество чашек Петри второго разведения;

D – коэффициент первого разведения.

Результаты и их обсуждение. Бактерия *E. rhusiopathiae* по своим морфологическим и тинкториальным свойствам представляет короткие тонкие палочки, неподвижные, без капсулы, грамположительные, которые не образуют спор. Стабильная морфология бактериальных клеток наблюдается при культивировании с использованием жидкой питательной среды на основе сердечно-мозгового бульона с добавлением специфического фактора роста.

При изучении процесса инаktivации вносили в бактериальную суспензию объемом 100 см³ в количестве 0,1, 0,2 и 0,4 % каждого препарата. Концентрацию живых микробных клеток определяли до инаktivации, следующие 4 часа через каждые 60 мин, следующие 20 часов через каждые 120 минут после внесения инаktivанта.

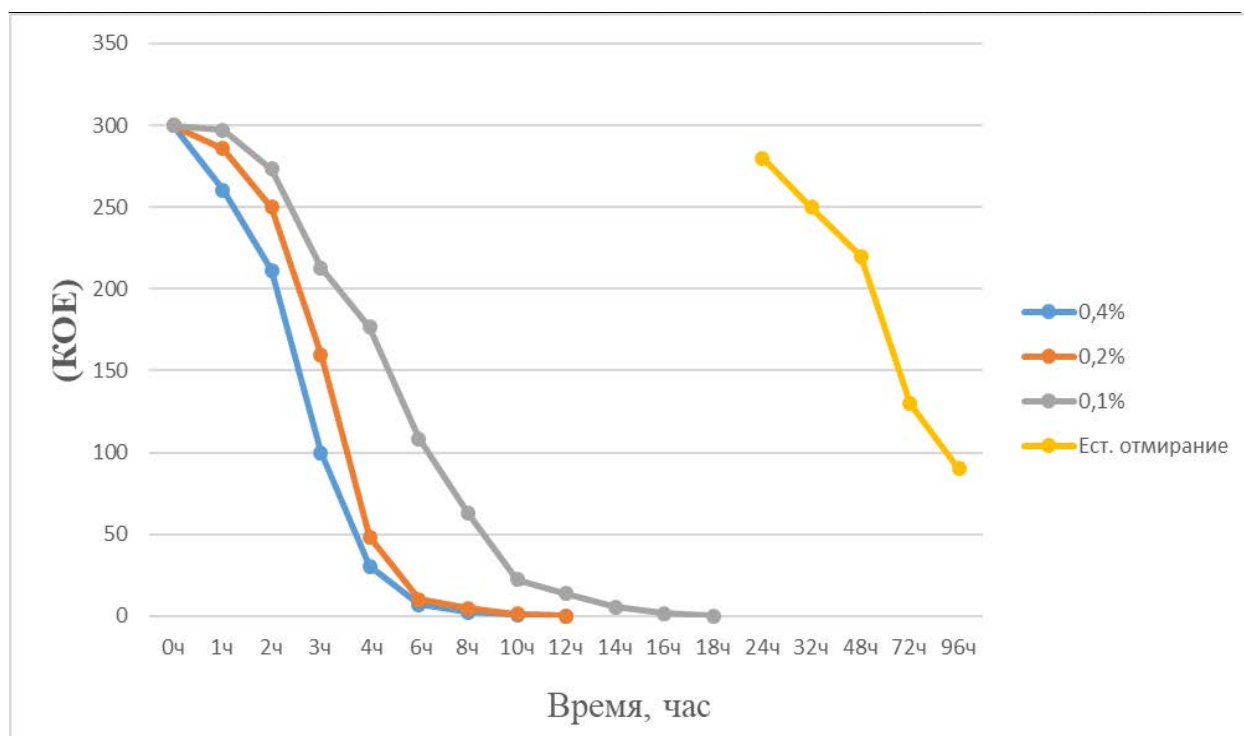


Рисунок 1 – Инактивация бактерий *E. rhusiopathiae* формальдегидом

На рис. 1 представлены кривые выживания бактерий *E. rhusiopathiae* при внесении в бульонную культуру различных концентраций формальдегида и кривая естественной гибели бактерий в фазе отмирания.

Результаты исследований показывают, что указанные выше концентрации формальдегида обеспечивают процесс инактивации бактерий *E. rhusiopathiae*, который идет с переменной скоростью. При этом время полной инактивации для 0,1 % формальдегида составила 20 часов, а для 0,2 % и 0,4 % – 14 и 12 часов соответственно.

Полученные показатели кривых выживания инактивируемых микроорганизмов позволяют вести расчеты времени инактивации для получения тех или иных объемов антигена с высокой степенью вероятности.

При увеличении концентрации формалина в 2 раза, отмечено значительное сокращение времени инактивации культуры. В этом случае можно говорить о том, что процесс инактивации формалином является прогнозируемым процессом (рис. 1).

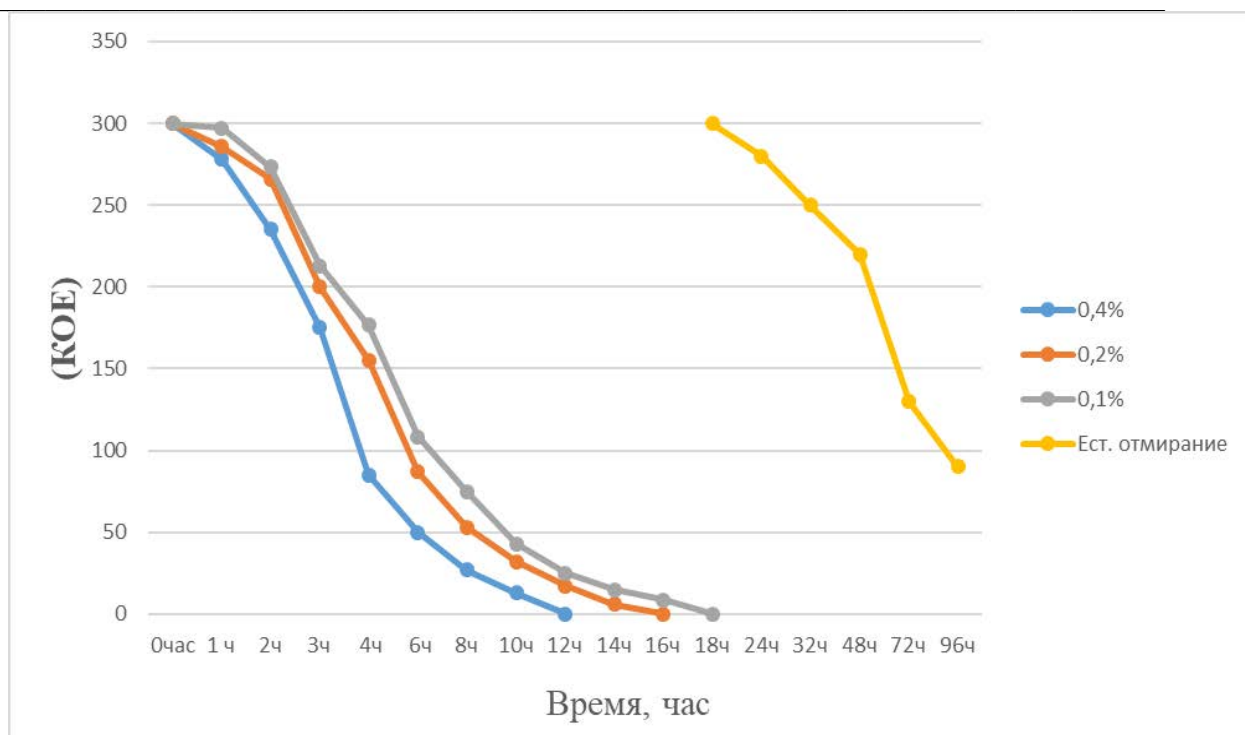


Рисунок 2 – Инактивация бактерий *E. rhusiopathiae*
 β -пропиолактоном

На рис. 2 представлены кривые выживания бактерий *E. rhusiopathiae* при внесении в бульонную культуру различных концентраций β -пропиолактона и кривая естественной гибели бактерий в фазе отмирания.

Результаты исследований показывают, что указанные выше концентрации β -пропиолактона обеспечивают процесс инактивации бактерий *E. rhusiopathiae*, который идет с переменной скоростью. При этом время полной инактивации для 0,1 % β -пропиолактона составило 22 часа, для 0,2 и 0,4 % – 18 и 14 часов соответственно.

Кривые выживания инактивируемых микроорганизмов позволяют вести расчеты времени инактивации для получения тех или иных объемов антигена с высокой степенью вероятности.

При увеличении концентрации β -пропиолактона в 2 раза замечено сокращение времени инактивации культуры в два раза (рис. 2). В этом случае можно говорить о том, что процесс инактивации β -пропиолактоном является полностью прогнозируемым процессом.

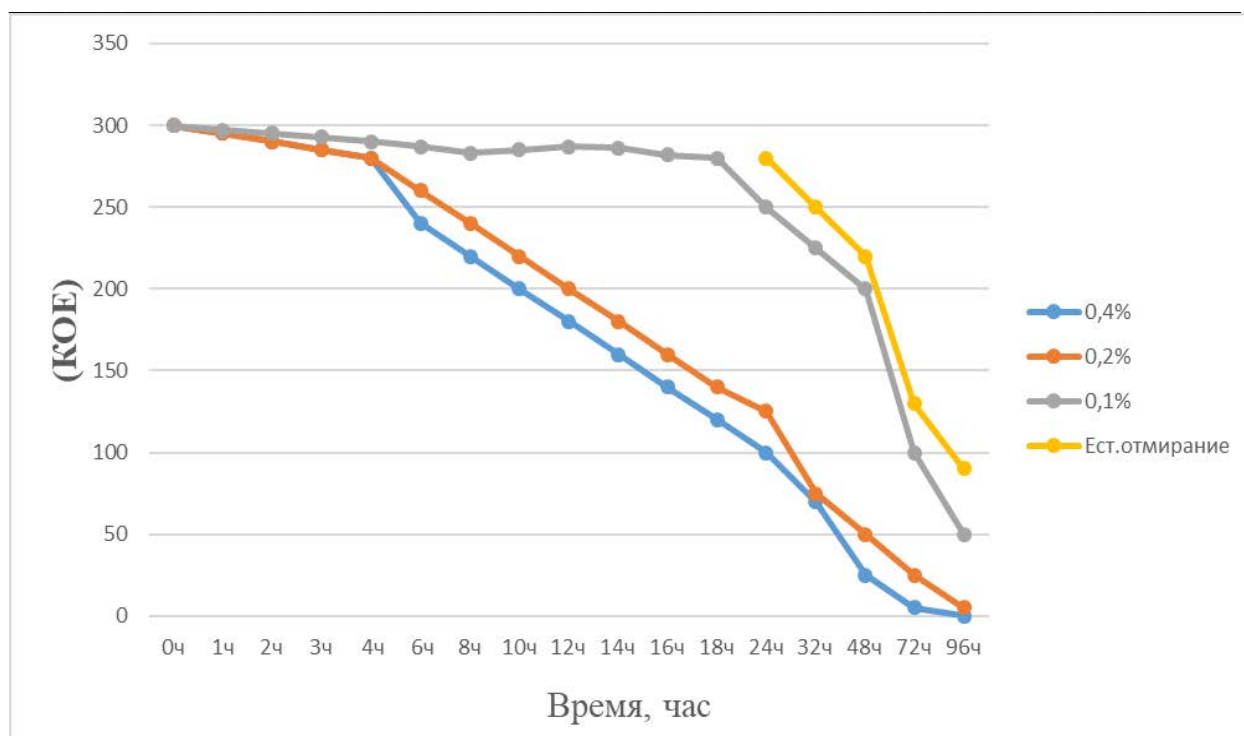


Рисунок 3 – Инактивация бактерий *E. rhusiopathiae* 1-(2-аминоэтил)-азиридином

На рис. 3 представлены кривые выживания бактерий *E. rhusiopathiae* при внесении в бульонную культуру различных концентраций 1-(2-аминоэтил)-азиридина и кривая естественной гибели бактерий в фазе отмирания.

В результате исследования установлено, что указанные выше концентрации 1-(2-аминоэтил)-азиридина обеспечивают процесс инактивации бактерий *E. Rhusiopathiae*. При этом полнота инактивации для 0,1 % 1-(2-аминоэтил)-азиридина не была достигнута, для 0,2 и 0,4 % – 4 и 5 суток соответственно.

При увеличении концентрации 1-(2-аминоэтил)-азиридина в 2 раза, была замечена определенная закономерность в сокращении времени полной инактивации культуры (рис. 3).

Заключение. Изучена инактивация производственных штаммов *E. Rhusiopathiae* с использованием различной концентрации инактивирующих веществ – *формальдегида, 1-(2-аминоэтил)-азиридина, β-пропиолактона*.

Установлено, что использованные инактиванты обеспечивают прогнозируемую инактивацию бактериальных клеток с высокой степенью

вероятности. При этом концентрация действующих веществ обеспечивающая гибель возбудителя рожи и время экспозиции было различным.

Для **формальдегида** данные показатели составили: 0,1 % – 20 ч.; 0,2 % – 14 ч.; 0,4 % – 12 ч.

При внесении в бульонную культуру **β -пропиолактона** полноту инактивации бактерий наблюдали при 0,1; 0,2; 0,3 % через 22, 18 и 14 часов соответственно. С внесением аналогичной концентрации **1-(2-аминоэтил)-азиридина** инаktivация занимает значительно больше времени: 0,2 % – 5 сут.; 0,4 % – 4 сут.

Проведенные исследования показали, что **формальдегид, β -пропиолактон и 1-(2-аминоэтил)-азиридина** обладают различной активностью при инактивации *E. rhusiopathiae*.

Список источников

1. Wang Q., Chang B. J., Riley T. V. Erysipelothrix rhusiopathiae // Veterinary Microbiology. 2010. vol. 140. no. 3-4. pp. 405–417. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.012>
2. Бакулов И. А., Ведерников В. А., Семинихин В. А. Эпизоотология с микробиологией: учебник и практикум. Москва : Колос, 1997. 480 с.
3. Колычев Н. М., Госманов Р. Г. Ветеринарная микробиология и микология: учебник. Санкт-Петербург: Лань, 2019. 624 с. ISBN 978-5-8114-4735-0.
4. Integrated Taxonomic Information System – Report // ITIS: site. URL: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=956395
5. Mollicutes // Berman J. J. Taxonomic Guide to Infectious Diseases: Understanding the biologic classes of pathogenic organisms. Amsterdam: Elsevier Science, 2012. Ch. 11. pp. 61–63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415895-5.00011-8>
6. Bender J. S., Irwin C. K., Shen H. G., Schwartz K. J., Oprissnig T. Erysipelothrix Spp. Genotypes, Serotypes, and Surface Protective Antigen Types Associated with Abattoir Condemnations // J Vet Diagn Invest. 2011. vol. 23. no 1. pp. 139–142. <https://doi.org/10.1177/104063871102300126>
7. Матвеев В. Е. Научные основы микробиологической технологии: кинетика развития и инаktivация микробных популяций. Москва : Агропромиздат, 1985. 224 с.

8. Калашников Н. В. Особенности поражения бактерий формальдегидом // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1986. № 6. С. 35–41.
9. Костина Г. И. К вопросу о механизмах химической инактивации микроорганизмов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1981. № 8. С. 25–32.
10. Heck H. A., Casanova-Schmitz M. Biochemical toxicology of formaldehyde // J. Biol. Chemistry. 1983. vol. 1. pp. 155–189.
11. Бушуева Н. Б., Ярцев М. Я. Инактивация пастерелл и сальмонелл при изготовлении биопрепаратов // Ветеринария. 1997. № 11. С. 23–25.
12. Ласкавый В. Н., Ночевный В. Т., Виолин Б. В. Формальдегид: метаболизм, антибактериальные, терапевтические и иммуномодулирующие свойства // Аграрная наука. 2005. № 10. С. 21–25. EDN [PKRZPR](#)
13. Семин Ю. А. Взаимодействие формальдегида с нуклеотидами и ДНК в присутствии аминокислот и белков: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва, 1989. 39 с.
14. Gomes L F, Augusto O. Formation of methyl radicals during the catalase-mediated oxidation of formaldehyde hydrazone // Carcinogenesis. 1991. vol. 12. no 7. pp. 1351–1353. DOI: [10.1093/carcin/12.7.1351](https://doi.org/10.1093/carcin/12.7.1351)
15. Swapnaa B., Neupane R., Tiwari A. K., Ray S. D. Betapropiolactone // Encyclopedia of Toxicology : reference work. Amsterdam: Academic Press, 2024. vol. 2. pp. 39–46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00769-7>
16. De Peyster A. Beta-Propiolactone // Encyclopedia of Toxicology: reference work. Amsterdam: Academic Press, 2014. pp. 442–445. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01168-4>
17. Патент № 1266847 Способ получения 1-(2-аминоэтил)-азиридина / Борисенко В. С., Кротова В. К., Бобылев В. А., Михайлова Т. А., Козлова И. А., Юшина Н. Л., Терещенко Г. Ф., Комаров В. М.; заявл. 08.07.1983; опубл. 30.10.1986.

References

1. Wang Q., Chang B. J., Riley T. V. Erysipelothrix rhusiopathiae // *Veterinary Microbiology*. 2010;140(3-4):405–417. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.012>
2. Bakulov I. A., Vedernikov V. A., Seminikhin V. A. Epizootologiya s mikrobiologiyey [Epizootology with microbiology] : uchebnik i praktikum. Moscow, Kolos, 1997. 480 p. (in Russ).
3. Kolychev N. M., Gosmanov R. G. Veterinarnaya mikrobiologiya i mikologiya [Veterinary microbiology and mycology]: uchebnik. St. Petersburg, Lan', 2019, 624 p. ISBN 978-5-8114-4735-0. (in Russ).
4. Integrated Taxonomic Information System – Report. ITIS: site. URL: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=9563955.

5. Mollicutes. Berman J. J. Taxonomic Guide to Infectious Diseases: Understanding the biologic classes of pathogenic organisms. Amsterdam, Elsevier Science, 2012, Ch. 11. pp. 61–63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415895-5.00011-8>

6. Bender J. S., Irwin C. K., Shen H. G., Schwartz K. J., Oprissnig T. Erysipelothrix Spp. Genotypes, Serotypes, and Surface Protective Antigen Types Associated with Abattoir Condemnations. *J Vet Diagn Invest.* 2011;23(1):139–142. <https://doi.org/10.1177/104063871102300126>

7. Matveev V. E. Nauchnye osnovy mikrobiologicheskoy tekhnologii : kinetika razvitiya i inaktivatsiya mikrobnnykh populyatsiy [Scientific bases of microbiological technology : developmental kinetics and inactivation of microbial populations]. Moscow, Agropromizdat, 1985, 224 p. (in Russ).

8. Kalashnikov N. V. Osobennosti porazheniya bakteriy formal'degidom [Features of bacterial damage by formaldehyde]. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 1986;6:35–41. (in Russ).

9. Kostina G. I. K voprosu o mekhanizmax khimicheskoy inaktivatsii mikroorganizmov [On the mechanisms of chemical inactivation of microorganisms]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 1981;8: 25–32. (in Russ).

10. Heck H. A., Casanova-Schmitz M. Biochemical toxicology of formaldehyde. *J. Biol. Chemistry.* 1983;1:155–189.

11. Bushueva N. B., Yartsev M. Ya. Inaktivatsiya pasterell i sal'monell pri izgotovlenii biopreparatov [Inactivation of Pasteurella and Salmonella in the manufacture of biologics]. *Veterinariya.* 1997;11:23–25. (in Russ).

12. Laskavyi V. N., Nochevnyy V. T., Violin B. V. Formal'degid: metabolism, antibakterial'nye, terapevticheskie i immunomoduliruyushchie svoystva [Formaldehyde: metabolism, antibacterial, therapeutical and immunomodulating characteristics]. *Agrarnaya nauka.* 2005;10:21–25. (in Russ). EDN [PKRZPR](#)

13. Semin Yu. A. Vzaimodeystvie formal'degida s nukleotidami i DNK v prisutstvii aminokislot i belkov [Interaction of formaldehyde with nucleotides and DNA in the presence of amino acids and proteins] : avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Moskva, 1989, 39 p. (in Russ).

14. Gomes L F, Augusto O. Formation of methyl radicals during the catalase-mediated oxidation of formaldehyde hydrazone. *Carcinogenesis.* 1991;12(7):1351–1353. DOI: [10.1093/carcin/12.7.1351](https://doi.org/10.1093/carcin/12.7.1351)

15. Swapnaa B., Neupane R., Tiwari A. K., Ray S. D. Betapropiolactone. *Encyclopedia of Toxicology : reference work.* Amsterdam, Academic Press, 2024, vol. 2, pp. 39–46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00769-7>

16. De Peyster A. Beta-Propiolactone. *Encyclopedia of Toxicology: reference work.* Amsterdam, Academic Press, 2014. pp. 442–445. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01168-4>

17. Borisenko V. S., Krotova V. K., Bobylev V. A., Mikhaylova T. A., Kozlova I. A., Yushina N. L., Tereshchenko G. F., Komarov V. M. Sposob polucheniya 1-(2-aminoetil)-aziridina [Method for preparation of 1-(2-aminoethyl)-aziridine]. Patent no. 1266847 (1983). (in Russ).

© Балахнин Н. Д., Фроловцева А. А., 2024

Статья поступила в редакцию 16.01.2024; одобрена после рецензирования 16.02.2024; принята к публикации 06.03.2024.

The article was submitted 16.01.2024; approved after reviewing 16.02.2024; accepted for publication 06.03.2024.