

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің Ғылым жаршысы (пәнаралық) = Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный). - 2022. - №3 (114). –Ч.2. - С. 137-146

## **ОТРАБОТКА РЕЖИМОВ РЕГУЛИРОВАНИЯ pH ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ШТАММА EHV-1 РИНОПНЕВМОНИИ ЛОШАДЕЙ**

*Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович*  
Доктор ветеринарных наук, профессор  
Казахский национальный аграрный исследовательский университет  
г. Алматы, Казахстан  
E-mail: nurlan.akhmetsadykov@gmail.com

*Батанова Жанат Мухаметкалиевна*  
Кандидат ветеринарных наук, ассоциированный профессор  
ТОО Научно-производственное предприятие «Антиген»  
г. Алматы, Казахстан  
E-mail: batanova\_77@mail.ru

*Крыкбаев Еркин Алийбекович*  
PhD докторант  
ТОО Научно-производственное предприятие «Антиген»  
г. Алматы, Казахстан  
E-mail: krykbaev\_e@mail.ru

*Турсынбаев Нуртас Сабитжанулы*  
Научный сотрудник  
ТОО Научно-производственное предприятие «Антиген»  
г. Алматы, Казахстан  
E-mail: nurtastursynbaev@mail.ru

### **Аннотация**

Производство современных культуральных вакцин является одним из самых эффективных способов борьбы с ринопневмонией лошадей на территории Республики Казахстан. С этой целью, в процессе производства, отработка режимов регулирования pH вируссодержащей суспензии штамма EHV-1 ринопневмонии лошадей с помощью углекислого газа и кислорода, позволит получить чистый и безопасный препарат, соответствующий международным требованиям. Полученные данные позволяют регулировать pH в автоматическом режиме, на основе исследования влияние давления и времени контакта газов, как в ходе культивирования, так и при получении итогового продукта производства иммунобиологических препаратов и

диагностических тест-систем. Стандартизация применяемого режима регулирования рН соответствует нормативным требованиям производства Good Manufacturing Practices, и применимо при суспензионном культивировании других культуральных биопрепаратов.

В работе использовались вирусологические, технологические и химические методы регулировки и контроля рН питательной среды при культивировании штамма EHV-1 вируса ринопневмонии лошадей, при суспензионном культивировании, с применением общепринятого метода десятикратного титрования по Риду и Менчу [16].

**Ключевые слова:** герпесвирус лошадей; ринопневмония; культивирование; культура клеток; питательная среда; биореактор; вакцина.

### Введение

В последней таксономии вирусы герпеса объединены в новый порядок, *Herpesvirales*, которые делятся на три семейства: *Herpesviridae*, *Alloherpesviridae* и *Malacoherpesviridae* [1, 2, 3]. Первичная инфекция EHV-1 или EHV-4 характеризуется заболеванием верхних дыхательных путей различной степени тяжести, которая зависит от возраста и иммунологического статуса инфицированного животного [4, 5, 6]. EHV-1 также вызывает более серьезные осложнения, связанные с абортом, перинатальной смертью жеребят или паралитическим неврологическим заболеванием (миелоэнцефалопатия, вызванная герпесвирусом лошадей). EHV-4 связан со спорадическими случаями абортов, но не с крупными вспышками, как связанные с EHV-1 [7, 8, 9]. Как и другие герпесвирусы, EHV-1 и EHV-4 вызывают длительные латентные инфекции и могут реактивироваться после стресса или беременности. Большинство лошадей будут повторно инфицированы несколько раз в

течение своей жизни, часто в легкой или субклинической форме. Поэтому к обнаружению вирусной ДНК или антител против ринопневмонии лошадей следует относиться с осторожностью. [10]

Хотя он вызывает только легкое респираторное заболевание и лихорадку у взрослых лошадей инфекция EHV-1 может привести к умеренно тяжелым респираторным заболеваниям. EHV-1 также может вызывать миелоэнцефалопатию примерно у 10% инфицированных взрослых лошадей во время вспышек. [11] И наиболее опасными для коневодства являются штаммы EHV-1 (вирусный аборт) и EHV-4 (ринопневмония) [12, 13].

Герпесвирус лошадей циркулирует на территории Республики Казахстан, только на территории Жамбылской области в 2011-2012 гг. были диагностированы серотипы EHV-1 и EHV-4 [14] также периодически наблюдаются вспышки, как например в феврале 2021 года в селе Амангельды, Аккайынского района Северо-Казахстанской

области наложены ограничительные мероприятия [15].

Основной целью исследования является отработка режимов регулировки рН культуральной питательной среды при суспензионном культивировании в биореакторе, что позволит эффективно получать вирусодержащую суспензию, полученную согласно современным тенденция производства качественных и безопасных препаратов, соответствующие нормативным требованиям GMP (Good Manufacturing Practice - правила надлежащего производства), которое должно быть стандартизировано на каждом этапе, начиная от подготовки материалов, культивирование клеток и вируса, заканчивая выпуском готовой продукции. Регулировка рН вирусодержащей суспензии штамма EHV-1 вируса

### Материалы и методы

Работа выполнена в период с октября по декабрь 2021 года, в лаборатории «Вирусология» ТОО Научно-производственного предприятия «Антиген», и на кафедре «Биологическая безопасность» Казахского национального аграрного исследовательского университета.

#### *Вирус*

Вирус ринопневмонии лошадей EHV-1 (*equine herpesvirus type-1*), выделенный из патологического материала органов зараженных лошадей, обладающий типичными свойствами вируса ринопневмонии лошадей, адаптированный для стационарного

ринопневмонии лошадей является одним из этапов производства, как при стационарном и суспензионном культивировании, а также при подготовке вирусодержащей суспензии для инактивации. Чтобы обеспечить оптимальные условия культивирования, регулировка рН вирусодержащей суспензии должна основываться на следующих принципах: 1) скорость понижения уровня рН; 2) скорость повышения уровня рН; 3) влияние газового регулирования рН на вирусодержащую суспензию.

Новизна работы связана с технологическими и вирусологическими аспектами промышленного производства в биореакторе, которая позволит интенсифицировать и экономически эффективно использовать клетки и вирус EHV-1.

и суспензионного культивирования. Цитопатогенное действие представлено округлением и шелушением клеток, что при стационарном культивировании вызывает отделением монослоя клеток. При суспензионном культивировании наблюдается общее падение концентрации жизнеспособных клеток.

#### *Культура клеток*

Перевиваемая культура клеток ВНК-21/С-13, представлена лабораторией «Культура клеток» ТОО Научно-производственного предприятия «Антиген» (Казахстан, Алматы),

первоначально полученной из международной коллекции *ATCC*<sup>®</sup> (*CCL-10*).

#### *Питательная среда*

Стационарное и суспензионное культивирование проводилось с использованием среды Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Life technologies, USA), с добавлением 5%-ной фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS) (Gibco, Life technologies, USA), без антибиотиков. Содержащий феноловый красный (фенолсульффталеин) - колориметрический индикатор pH, обеспечивающий интегрированный контроль pH среды.

#### *Суспензионное культивирование*

В стеклянном биореакторе (Bailun Bio-Technology Co., Ltd., China) трехлопастной, рабочий объем 12 литров, с автоматическими системами регулировки температуры, pH, растворенного кислорода (DO), а также системами подачи углекислого газа, азота и кислорода, при температуре 37°C, скорость перемешивания 80 оборотов в минуту.

#### *Контроль pH*

### **Результаты**

Исследования проводились в следующих направлениях: изменения значения pH вирусодержащей суспензии в зависимости от давления углекислого газа и сжатого воздуха, времени их контакта, а также влияние примененных режимов на биологическую

Для контроля pH применялся лабораторный pH-метр Hanna HI2210-02, откалиброванный согласно ГОСТ Р 8.857-2013.

#### *Регулировка pH*

Для подкисления суспензии применялся углекислый газ, с давлением на выходе 0,1-0,6 МПа. Для повышения pH суспензии применялся сжатый воздух, получаемый от безмасляного компрессора, с давлением на выходе 0,1-0,6 МПа. Все газы проходили через стерильные мембранные фильтры Sartorius.

#### *Контроль активности вируса*

Контроль биологической активности вируса EHV-1 ринопневмонии лошадей проводилось методом последовательного титрования на культуре клеток ВНК-21 по методу Рида и Менча. [16]

#### *Реакция иммунофлюоресценции*

Определение специфичности вируса EHV-1 проводилась в прямом иммунофлуоресцентном анализе с помощью набора «FLUO Herpesvirus EHV-1/EHV-4» Флуоресцентное свечение регистрировалось с помощью микроскопа OLYMPUS [17].

активность вируса EHV-1. Перед экспериментами по подкислению и подщелачиванию pH, образцов вирусодержащей суспензии устанавливали изначальные показатели pH.

Регулировка pH проводилась ручными и автоматическими

системами биореактора (Рисунок 1).

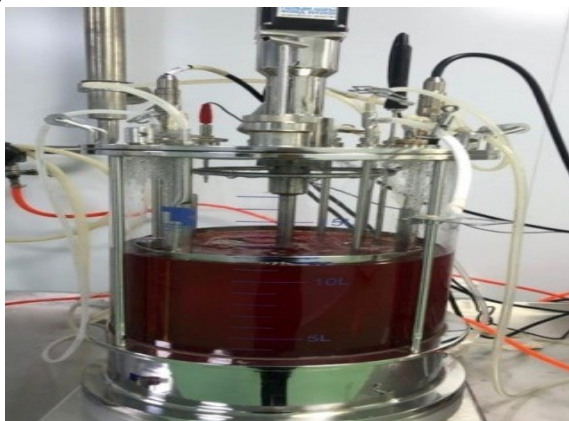


Рисунок 1 - биореактор VlBio L15 с контрольной панелью управления.

В ходе исследований было установлено, что с увеличением давления углекислого газа ее влияние на питательную среду значительно. При повышении времени контакта с суспензией в исследуемых пределах величина показателя рН повышается

пропорционально. Что говорит о том, что для регулирования рН необходимо контролировать как давление, так и время контакта. Как показано в таблице 1, видна корреляция между давлением и временем контакта газа с питательной средой.

Таблица 1 - изменение значения рН 8,2 вирусосодержащей суспензии штамма ENV-1 до значения 7,2 в зависимости от давления углекислого газа и времени контакта.

№	Давление углекислого газа, Л/мин					
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Время контакта, минута	8	7	6	5	5	5

Разница значений между 0,4 Л/мин, 0,5 Л/мин и 0,6 Л/мин полностью отсутствует, связано это с повышенным уровнем барботации внутри камеры биореактора, в следствии чего пузырьки углекислого газа слипаются и образуют более крупные пузыри, с последующим уменьшением времени контакта с питательной средой. Оптимальным давлением углекислого газа был выбран режим 0,4 Л/мин.

Как показано в таблице 2, в отличии от углекислого газа, влияние сжатого воздуха на рН питательной среды меньше, в следствии чего время контакта большее, но при этом разницы изменения рН между 0,5 Л/мин и 0,6 Л/мин отсутствует, и давление сжатого воздуха 0,6 Л/мин вызывает слишком сильную барботацию. Оптимальным давлением сжатого воздуха был выбран режим 0,5 Л/мин.

Таблица 2 - Изменение значения рН 6,2 вирусосодержащей суспензии штамма EHV-1 до значения 7,2, в зависимости от давления сжатого воздуха и времени контакта.

№	Давление сжатого воздуха, Л/мин					
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Время контакта, минута	10	9	8	7	6	6

Применение этих режимов регулирования рН питательной среды позволяет безопасно и стерильно контролировать культивирование вируса ринопневмонии лошадей, что является одним из главных аспектов производства согласно международному стандарту GMP.

*Влияние газового регулирования рН на вирус EHV-1*

Для определения влияния газов на регулировку рН, было проведено сравнение

вирусосодержащей суспензии из биореактора на котором применялись режимы газового регулирования рН, а также контрольного вируса содержащегося в лиофилизированном состоянии.

Титрование исследуемого образца и контрольного вируса проводилась на монослое культуры клеток ВНК-21 (Рисунок 2). Наблюдение за ЦПД вируса велось ежедневно.

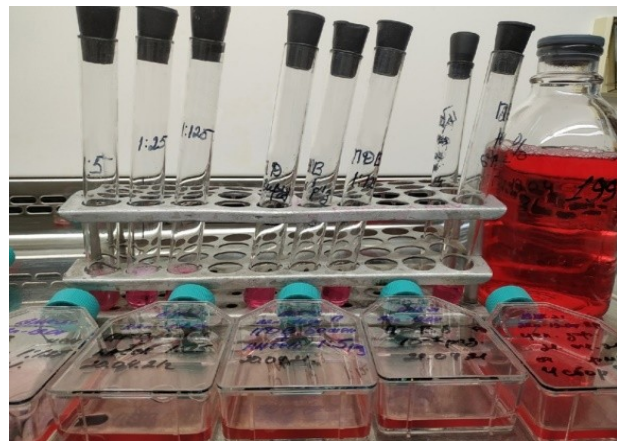
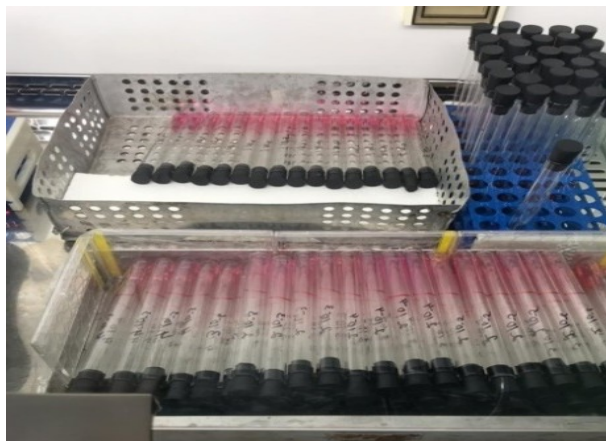


Рисунок 2 - Титрование вируса EHV-1 на монослое культуры клеток ВНК-21.

Титрование является традиционным методом контроля биологической активности, что позволяет достаточно точно определить активность и концентрацию вируса. Титрование десятикратное, проводилось в двух повторностях на культуре клеток ВНК-21/С-13. Результат титрования представлен в таблице 3.

Таблица 3 - Контроль биологической активности исследуемого и контрольного вируса EHV-1.

№	Наименование исследуемого материала	Разведение				Титр исследуемого материала
		10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	
1	Образец ЕНУ-1 при суспензионном культивировании	++ ++	++ ++	++ ++	-- --	6,5 lg ТЦД/см <sup>3</sup>
2	Контрольный штамм ЕНУ-1	++ ++	++ ++	++ ++	-- --	6,5 lg ТЦД/см <sup>3</sup>

Активность исследуемого образца вируса совпадает с контрольным штаммом ЕНУ-1, что говорит о том, что вирус сохраняет свои цитопатогенные свойства в ходе суспензионного культивирования и применения режимов газового регулирования рН.

Сохранение антигенных свойств вируса ЕНУ-1 исследовалось методом РИФ, набором FLUO Herpesvirus ЕНУ-1/ЕНУ-4. Как показано на рисунке 2, вирус сохранил свои антигенные свойства, наблюдаются типичные очаги свечения.

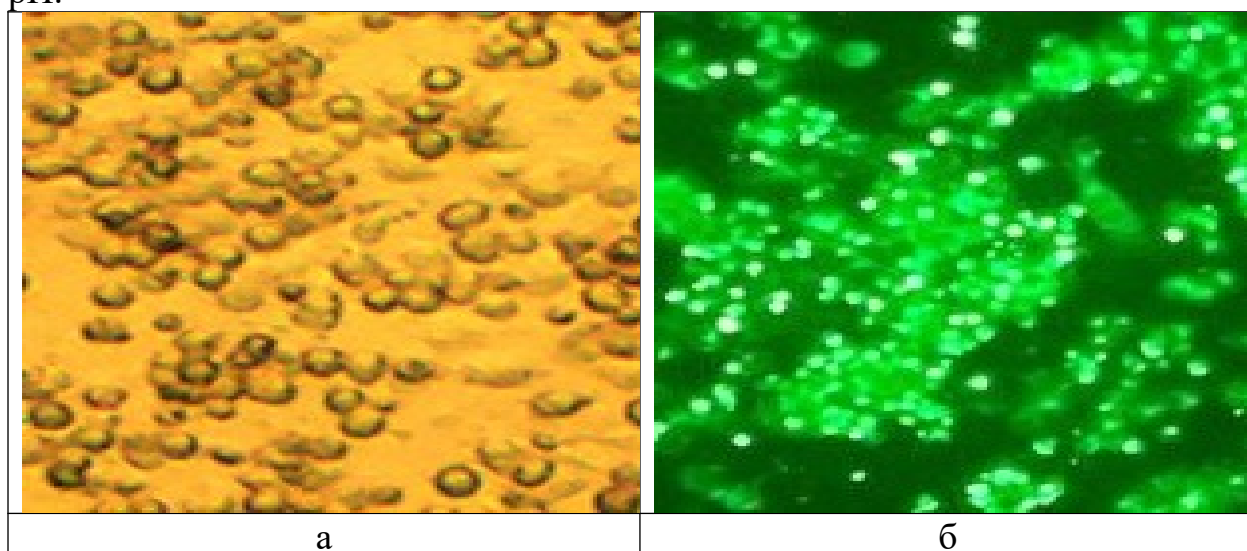


Рисунок 2 - Культура клеток ВНК-21 зараженная вирусом ЕНУ-1, а - до окрашивания методом РИФ; б - после окрашивания методом РИФ.

Сохранение цитопатогенных свойств, а также сохранение специфичности, подтвержденных в ходе исследований, говорит о том, что примененные режимы газового регулирования рН не влияют на вирус ринопневмонии лошадей, и применимы для производства иммунобиологических препаратов.

### Обсуждение

Ринопневмония лошадей является одним из заболеваний, наносящий ущерб коневодческим

хозяйствам, и издержками связанными с карантинными мерами [18, 19]. Отечественное

производство вакцины против ринопневмонии лошадей из штамма EHV-1 позволит внести вклад в противоэпизоотологические мероприятия, и внедрить современные международные стандарты GMP при разработке и внедрении ветеринарных биопрепаратов. Суспензионное культивирование является одним из эффективнейших инструментов массового культивирования клеток и вируса [20, 21]. Регулирование рН вирусной суспензии с помощью газов является одним из альтернативных методов применимых при суспензионном культивировании в биореакторе. Применение данного метода позволяет значительно снизить возможность микробной контаминации, а также повысить

безопасность производства, так как снижается человеческий фактор. Применение стандартных растворов щелочей и кислот могут негативно влиять на клетки и вирус, связанную в первую очередь с изменением состава питательных сред. Автоматические системы управления позволяют интенсифицировать и стандартизировать подачу газов на разных этапах культивирования, обеспечивая клетки и вирус как необходимым уровнем рН, так и подачей необходимого количества растворенного кислорода, при этом не меняя состав питательной среды. Сохранение цитопатогенных свойств и специфичности вируса является одним из факторов в пользу применения данного метода.

### **Заключение**

Для понижения уровня рН с 8,2 до 7,2 необходимо давление углекислого газа 0,4 Л/мин, при времени контакта 5 минут.

Для повышения уровня рН с 6,2 до 7,2 необходимо давление сжатого воздуха 0,4 Л/мин, при времени контакта 7 минут.

Применяемые режимы газового регулирования рН при суспензионном культивировании в биореакторе, не влияют на активность и специфичность вируса ринопневмонии лошадей.

### **Информация о финансировании**

Исследования проведены в рамках реализации программно-целевого финансирования по научным, научно-техническим программам на 2021-2023 годы, Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан, ИРН BR10764975 «Разработать и предложить для производства средства и методы диагностики, профилактики болезней, терапии инфицированных животных и обеззараживания почвенных сибирезвенных очагов».

### **Список литературы**

1 Davison, A.J., The order herpesvirales [Текст] / Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., /Archives of Virology, -2009. -Vol.154. -№1. -P. 171–177.



2 El-Habashi N, Lesions and distribution of viral antigen in the brain of hamsters infected with equine herpesvirus (EHV)-9, EHV-1 strain Ab4p, and Zebra-Borne EHV-1 [Текст] / El-Nahass E-S, Abd-Ellatieff H, Saleh A, Abas O et al., / *Veterinary Pathology*, -2019. -Vol.56. -P. 691-702.

3 Dunowska M. A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part B: pathogenesis and epidemiology [Текст] / *New Zealand Veterinary Journal*, -2014. -Vol.62. - P.179-188.

4 Chapter 2.5.9. - Equine rhinopneumonitis (infection with equid herpesvirus-1 and -4) [Текст] / OIE - World organization for animal health / OIE Terrestrial Manual, -2017. - P. 894-903.

5 Wilsterman S, Soboll-Hussey G, Lunn DP, Ashton LV, Callan RJ et al., Equine herpesvirus-1 infected peripheral blood mononuclear cell subpopulations during viremia [Текст] / *Veterinary Microbiology*, -2011. -Vol.149. -P. 40-47.

6 Patel J.R., Heldens J. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)-epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review [Текст] / *Vet J.* -2005. -Vol.170. -№1. -P.14-23.

7 Allen, G.P., Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses [Текст] / *Am. J. Vet. Res.* -2008. -Vol.69. -P.1595–1600.

8 Ataseven, V.S., Prevalence of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 infections in equidae species in Turkey as determined by ELISA and multiplex nested PCR [Текст] / Dagalp, S.B., Guzel, M., Basaran, Z., Tan, M.T., Geraghty, B. / *Res. Vet. Sci.* -2009. -Vol 86. -P.339-344.

9 Azab, W., Cloning of the genome of equine herpesvirus 4 strain TH20p as an infectious bacterial artificial chromosome [Текст] / Kato, K., Arai, J., Tsujimura, K., Yamane, D., Tohya, Y., Matsumura, T., Akashi, H. / *Arch. Virol.* -2009. -Vol.154. - P. 833-842.

10 Bresgen, C., Serological responses and clinical outcome after vaccination of mares and foals with equine herpesvirus type 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) vaccines [Текст] / Lammer, M., Wagner, B., Osterrieder, N., Damiani, A.M. / *Vet. Microbiol.* -2012. -Vol.160. -P. 9-16.

11 Bryant, N.A., Davis-Poynter, N., Vanderplassen, A., Alcami, A. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad spectrum chemokine binding proteins [Текст] / *EMBO J.* -2003. -Vol.22. - P.833–846.

12 Griffin, B.D., Verweij, M.C., Wiertz, E.J. Herpesviruses and immunity: the art of evasion [Текст] / *Vet. Microbiol.* -2010. -Vol.143. - P.89–100.

13 Goodman, L.B., Comparison of the efficacy of inactivated combination and modified-live virus vaccines against challenge infection with neuropathogenic equine herpesvirus type 1 (EHV-1) [Текст] / Wagner, B., Flaminio, M.J.B.F., Sussman, K.H., Metzger, S.M., Holland, R., Osterrieder, N. / *Vaccine.* -2006. Vol.24. -P. 3636–3645.

14 Шалгынбаев Э.К., Мониторинг, выделение, идентификация и культивирование герпесвируса лошадей на территории Республики Казахстан [Текст] / Коспанова М. Н., Рябинникова А.И., Омарова З.Д.,

Орынбаев М.Б. / Изденістер, нәтижелер. Исследования, результаты. -2014. -№4. -С.87-92.

15 <https://legalacts.egov.kz/npa/view?id=7184877> (электронный ресурс).

16 Reed L.J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints [Текст] / American Journal of Epidemiology, -1938. -Vol.27. -№3. -P. 493–7.

17 <https://www.agrolabo.it/en/diagnostics/for-equine/immunofluorescence/fluoherpeshv-1-ehv-4/> (электронный ресурс).

18 <http://www.aphis.usda.gov/animalhealth/emergingissues/downloads/ehv1final.pdf> (электронный ресурс).

19 Goodman, L.B., A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity [Текст] / Loregian, A., Perkins, G.A., Nugent, J., Buckles, E.L., Mercorelli, B., Kydd, J.H., Palu, G., Smith, K.C., Osterrieder, N., Davis-Poynter, N. / PLoS Pathog, -2007. -Vol.3. -P. 160.

20 Frampton Jr., Equine herpesvirus 1 utilizes a novel herpesvirus entry receptor [Текст] / A.R., Goins, W.F., Cohen, J.B., von Einem, J., Osterrieder, N., O’Callaghan, D.J., Glorioso, J.C. / J. Virol. -2005. -Vol.79. -P. 3169–3173.

21 Ehlers, B., Novel mammalian herpesviruses and lineages within the Gammaherpesvirinae: cospeciation and interspecies transfer [Текст] / Dural, G., Yasmum, N., Lembo, T., de Thoisy, B., Ryser-Degiorgis, M.P., Ulrich, R.G., McGeoch, D.J. / J. Virol. -2008. -Vol.82. - P.3509–3516.

### Reference

1 Davison, A.J., The order herpesvirales [Текст] / Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., /Archives of Virology, - 2009. -Vol.154. -№1. -P. 171–177.

2 El-Habashi N, Lesions and distribution of viral antigen in the brain of hamsters infected with equine herpesvirus (EHV)-9, EHV-1 strain Ab4p, and Zebra-Borne EHV-1 [Текст] / El-Nahass E-S, Abd-Ellatieff H, Saleh A, Abas O et al., / Veterinary Pathology, -2019. -Vol.56. -P. 691-702.

3 Dunowska M. A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part B: pathogenesis and epidemiology [Текст] / New Zealand Veterinary Journal, - 2014. -Vol.62. -P. 179-188.

4 Chapter 2.5.9. - Equine rhinopneumonitis (infection with equid herpesvirus-1 and -4) [Текст] / OIE - World organization for animal health / OIE Terrestrial Manual, 2017. - P. 894-903.

5 Wilsterman S, Soboll-Hussey G, Lunn DP, Ashton LV, Callan RJ et al., Equine herpesvirus-1 infected peripheral blood mononuclear cell subpopulations during viremia [Текст] / Veterinary Microbiology, -2011. -Vol.149. -P. 40-47.

6 Patel J.R., Heldens J. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)-epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review [Текст] / Vet J. - 2005. -Vol.170. -№1. -P. 14-23.

7 Allen, G.P., Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses [Текст] / *Am. J. Vet. Res.* - 2008. -Vol.69. - P. 1595–1600.

8 Ataseven, V.S., Prevalence of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 infections in equidae species in Turkey as determined by ELISA and multiplex nested PCR [Текст] / Dagalp, S.B., Guzel, M., Basaran, Z., Tan, M.T., Geraghty, B. / *Res. Vet. Sci.* -2009. -Vol.86. - P. 339-344.

9 Azab, W., Cloning of the genome of equine herpesvirus 4 strain TH20p as an infectious bacterial artificial chromosome [Текст] / Kato, K., Arai, J., Tsujimura, K., Yamane, D., Tohya, Y., Matsumura, T., Akashi, H. / *Arch. Virol.* - 2009. -Vol.154. - P. 833-842.

10 Bresgen, C., Serological responses and clinical outcome after vaccination of mares and foals with equine herpesvirus type 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) vaccines [Текст] / Lammer, M., Wagner, B., Osterrieder, N., Damiani, A.M. / *Vet. Microbiol.* - 2012. -Vol.160. -P. 9-16.

11 Bryant, N.A., Davis-Poynter, N., Vanderplasschen, A., Alcami, A. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad spectrum chemokine binding proteins [Текст] / *EMBO J.* -2003. -Vol.22. - P.833–846.

12 Griffin, B.D., Verweij, M.C., Wiertz, E.J. Herpesviruses and immunity: the art of evasion [Текст] / *Vet. Microbiol.* - 2010. -Vol.143. -P. 89–100.

13 Goodman, L.B., Comparison of the efficacy of inactivated combination and modified-live virus vaccines against challenge infection with neuropathogenic equine herpesvirus type 1 (EHV-1) [Текст] / Wagner, B., Flaminio, M.J.B.F., Sussman, K.H., Metzger, S.M., Holland, R., Osterrieder, N. / *Vaccine.* -2006. - Vol.24. - P. 3636–3645.

14 Shalgynbaev E.K., Kospanova M. N., Ryabinnikova A.I., Omarova Z.D., Orynbaev M.B. Monitoring, vydelenie, identifikaciya i kul'tivirovanie gerpesvirusa loshadej na territorii Respubliki Kazahstan [Текст] / *Izdenister, natizheler. Issledovaniya, rezul'taty.* -2014. -№ 4. - S.87-92.

15 <https://legalacts.egov.kz/npa/view?id=7184877> (электронный ресурс).

16 Reed L.J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints [Текст] / *American Journal of Epidemiology,* -1938. -Vol.27. -№3. - P. 493–7.

17 <https://www.agrolabo.it/en/diagnostics/for-equine/immunofluorescence/fluoherpesevirus-1-ehv-4/> (электронный ресурс).

18 <http://www.aphis.usda.gov/animalhealth/emergingissues/downloads/ehv1final.pdf> (электронный ресурс).

19 Goodman, L.B., A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity [Текст] / Loregian, A., Perkins, G.A., Nugent, J., Buckles, E.L., Mercorelli, B., Kydd, J.H., Palu, G., Smith, K.C., Osterrieder, N., Davis-Poynter, N. / *PLoS Pathog.* -2007. -Vol.3. -P. 160.

20 Frampton Jr., Equine herpesvirus 1 utilizes a novel herpesvirus entry receptor [Текст] / A.R., Goins, W.F., Cohen, J.B., von Einem, J., Osterrieder, N., O'Callaghan, D.J., Glorioso, J.C. / *J. Virol.* -2005. -Vol.79. -P. 3169–3173.

21 Ehlers, B., Novel mammalian herpesviruses and lineages within the Gammaherpesvirinae: cospeciation and interspecies transfer [Текст] / Dural, G., Yasmum, N., Lembo, T., de Thoisy, B., Ryser-Degiorgis, M.P., Ulrich, R.G., McGeoch, D.J. / J. Virol. -2008. -Vol.82. -P. 3509–3516.

## **ЖЫЛҚЫ РИНОПНЕВМОНИЯСЫНЫҢ ENV-1 ШТАММЫН ӨСІРУ КЕЗІНДЕ ҚОРЕКТІК ОРТАНЫҢ рН РЕТТЕУ РЕЖИМДЕРІН ПЫСЫҚТАУ**

*Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович*  
Ветеринария ғылымдарының докторы, профессор  
Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті  
Алматы қ., Қазақстан  
E-mail: nurlan.akhmetsadykov@gmail.com

*Батанова Жанат Мухаметкалиевна*  
Ветеринария ғылымдарының кандидаты,  
қауымдастырылған профессор  
ЖШС FӨК «Антиген»  
Алматы қ., Қазақстан  
E-mail: batanova\_77@mail.ru

*Крыкбаев Еркин Алийбекович*  
PhD докторант  
ЖШС FӨК «Антиген»  
Алматы қ., Қазақстан  
E-mail: krykbaev\_e@mail.ru

*Турсынбаев Нуртас Сабитжанулы*  
Ғылыми қызметкер  
ЖШС FӨК «Антиген»  
Алматы қ., Қазақстан  
E-mail: nurtastursynbaev@mail.ru

### **Түйін**

Қазіргі заманғы мәдени вакциналарды өндіру Қазақстан Республикасында жылқы ринопневмониясымен күресудің тиімді әдістерінің бірі болып табылады. Осы мақсатта өндіріс процесінде көмірқышқыл газы мен оттегін пайдалана отырып, жылқылардың ринопневмониясының ENV-1 штаммының вирусы бар суспензиясының рН реттеу режимдерін әзірлеу халықаралық талаптарға жауап беретін таза және қауіпсіз препарат алуға мүмкіндік береді. Алынған деректер культивация кезінде де, иммунобиологиялық препараттар мен диагностикалық сынақ жүйелерін

өндіруге арналған соңғы өнімді алу кезінде де қысымның және газдардың жанасу уақытының әсерін зерттеу негізінде автоматты режимде рН реттеуге мүмкіндік береді. Қолданылатын рН бақылау режимін стандарттау стерильділік пен сапаға қатысты Жақсы өндірістік тәжірибелердің нормативтік талаптарына сәйкес келеді.

Жұмыста жылқының ринопневмониясы вирусының EHV-1 штаммын өсіруде, суспензиялық өсіруде, Рид пен Менч бойынша он рет титрлеудің жалпы қабылданған әдісін қолдана отырып, қоректік ортаның рН реттеу мен бақылаудың вирусологиялық, технологиялық және химиялық әдістері қолданылды [16].

**Кілт сөздер:** жылқы герпесвирусы; ринопневмония; өсіру; жасуша өсіндісі; қоректік орта; биореактор; вакцина.

## **WORKING OUT THE pH REGULATION MODES OF THE NUTRIENT MEDIUM DURING CULTIVATION OF THE EHV-1 STRAIN OF EQUINE RHINOPNEUMONIA**

*Akhmetsadykov Nurlan Nurolidinovich  
Doctor of veterinary sciences, professor  
Kazakh National Agrarian Research University  
Almaty, Kazakhstan  
E-mail: nurlan.akhmetsadykov@gmail.com*

*Batanova Zhanat Mukhametkaliyevna  
Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor  
RSE Antigen Co Ltd  
Almaty, Kazakhstan  
E-mail: batanova\_77@mail.ru*

*Krykbayev Yerkin Aliibekovich  
PhD doctoral student  
RSE Antigen Co Ltd  
Almaty, Kazakhstan  
E-mail: krykbaev\_e@mail.ru*

*Tursynbaev Nurtas Sabitzhanuly  
Researcher  
RSE Antigen Co Ltd  
Almaty, Kazakhstan  
E-mail: nurtastursynbaev@mail.ru*

### **Annotation**

The production of modern culture vaccines is one of the most effective ways to combat horse rhinopneumonia on the territory of the Republic of Kazakhstan.

To this end, during the production process, the development of pH control modes of a virus-containing suspension of equine rhinopneumonia EHV-1 strain, with the carbon dioxide and oxygen, will allow to obtain a clean and safe drug that meets international requirements. The obtained data make it possible to adjust the pH in automatic mode, based on the study of the effect of pressure and gas contact time, both during cultivation and when obtaining the final product of the production of immunobiological drugs and diagnostic test-systems. Standardization of the applied pH regulation regime meets the regulatory requirements of Good Manufacturing Practices in terms of sterility and quality.

In the work, virological, technological and chemical methods were used to adjust and control the pH of the nutrient medium during the cultivation of the strain EHV-1 of the equine rhinopneumonia virus, during suspension cultivation, using the generally accepted method of tenfold titration according to Reed and Mench [16].

**Key words:** equine herpesvirus; rhinopneumonia; cultivation; cell culture; nutrient medium; bioreactor; vaccine.