МРНТИ 34.15.27 https://doi.org/10.26577/bb1083202614

К.А. Шораева[1], Ж.С. Абсатова[1], С.У. Молдагулова[1], А. Ұланқызы[1], А.Е. Косылганова[2*], К.А. Жапаркулова[2], А.С. Калыкова[3], Т.С. Бекежанова[2], Г.О. Шыныбекова[1], Н.С. Кожабергенов[1], Г.Д. Наханова[1], К.К. Джекебеков[1], О.В. Червякова[1]

[1]ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», АО «Национальный холдинг QazBioPharm»
[2]НАО «Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова», Алматы, Казахстан
[3]НАО «Казахский национальный университет имени аль-Фараби», Алматы, Казахстан
*e-mail: aknur93@mail.ru; kossylganova.a@kaznmu.kz

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ПОДЛИННОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВИРУСОВ ГРИППА МЕТОДОМ ПЦР – ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВСТАВОК, КОДИРУЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ *BRUCELLA* SPP.

Разработка вирус-векторных вакцин против бруцеллеза требует строгого контроля подлинности рекомбинантных штаммов, используемых в качестве вакцинных кандидатов. Одним из ключевых этапов молекулярной характеристики таких штаммов является подтверждение наличия гетерологичных генетических вставок, кодирующих антигены *Brucella*. Целью настоящего исследования являлась оценка подлинности рекомбинантных гриппозных штаммов путем определения наличия бруцеллезных генетических вставок методом обратной транскрипции полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Объектами исследования служили рекомбинантные штаммы вируса гриппа Flu-NS1-80-Omp16, Flu-NS1-80-L7/L12, Flu-NS1-80-Omp19 и Flu-NS1-80-Cu-Zn SOD, содержащие гены иммунодоминантных белков *Brucella*. Оценка аналитической чувствительности проводилась с использованием серийных десятикратных разведений положительного контроля с известной концентрацией РНК. Специфичность метода подтверждена наличием ампликонов строго ожидаемого размера (**~1250–1300 п.о. для рекомбинантных конструкций и ~890 п.о. для контрольного вируса**) и отсутствием неспецифической амплификации в отрицательных контролях. В ходе анализа рекомбинантных штаммов (Flu-NS1-80-OMP16, Flu-NS1-80-OMP19, Flu-NS1-80-SOD, Flu-NS1-80-L7/L12) во всех образцах выявлены целевые фрагменты, что свидетельствует об успешной интеграции вставок *Brucella spp*. в геном вируса. Оценка воспроизводимости показала 100% совпадение результатов в 10 независимых повторностях для всех исследуемых образцов. Чувствительность метода составила 100%, положительные и отрицательные контроли продемонстрировали ожидаемые результаты, что подтверждает корректность постановки реакции и отсутствие контаминации. Полученные результаты подтверждают подлинность рекомбинантных гриппозных штаммов и наличие в их геноме бруцеллезных генетических вставок, что свидетельствует о корректности конструкции вирусных векторов и возможности их дальнейшего использования при разработке вакцинных препаратов против бруцеллеза.

Ключевые слова: ПЦР, рекомбинантные штаммы гриппа, бруцеллезные вставки, валидация, верификация.

 © 2026 Al-Farabi Kazakh National University

K.A. Shoraeva[1], Zh.S. Absatova[1], S.U. Moldagulova[1], A. Ulanqyzy[1],
A.E. Kossylganova[2]*, K.A. Zhaparkulova[2], A.S. Kalykova[3], T.S. Bekezhanova[2],
G.O. Shynybekova[1], N.S. Kozhabergenov[1], G.D. Nakhanova[1],
K.K. Dzhekebekov[1], O.V. Chervyakova[1]

[1]Research Institute for Biological Safety Issues LLP, National Holding QazBioPharm JSC
[2]Asfendiyarov Kazakh National Medical University NPJSC
[3]Al-Farabi Kazakh National University NPJSC
*e-mail: kossylganova.a@kaznmu.kz

Authentication of recombinant influenza viruses by PCR-based identification of genetic inserts encoding recombinant *Brucella* spp. proteins

The development of viral vector vaccines against brucellosis requires strict control of the authenticity of recombinant strains used as vaccine candidates. One of the key stages in the molecular characterization of such strains is confirmation of the presence of heterologous genetic inserts encoding *Brucella* antigens.

The aim of this study was to assess the authenticity of recombinant influenza strains by detecting brucellosis-related genetic inserts using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The study objects were recombinant influenza virus strains Flu-NS1-80-Omp16, Flu-NS1-80-L7/L12, Flu-NS1-80-Omp19, and Flu-NS1-80-Cu-Zn SOD, containing genes encoding immunodominant *Brucella* proteins. Analytical sensitivity was evaluated using serial tenfold dilutions of a positive control with a known RNA concentration.

The specificity of the method was confirmed by the presence of amplicons of the expected size, approximately 1250–1300 bp for recombinant constructs and approximately 890 bp for the control virus, as well as by the absence of nonspecific amplification in negative controls. During the analysis of recombinant strains Flu-NS1-80-OMP16, Flu-NS1-80-OMP19, Flu-NS1-80-SOD, and Flu-NS1-80-L7/L12, target fragments were detected in all samples, indicating successful integration of *Brucella* spp. inserts into the viral genome.

Reproducibility assessment showed 100% concordance of results in 10 independent replicates for all tested samples. The positive and negative controls demonstrated the expected results, confirming the correct performance of the reaction and the absence of contamination.

The obtained results confirm the authenticity of the recombinant influenza strains and the presence of brucellosis-related genetic inserts in their genome, indicating the correctness of the viral vector constructs and their potential for further use in the development of vaccine preparations against brucellosis.

Key words: PCR, recombinant influenza strains, brucellosis-related inserts, validation, verification.

К.А. Шораева[1], Ж.С. Абсатова[1], С.У. Молдагулова[1], А. Ұланқызы[1],
А.Е. Қосылғанова[2]*, К.А. Жапаркулова[2], А.С. Калыкова[3], Т.С. Бекежанова[2],
Г.О. Шыныбекова[1], Н.С. Кожабергенов[1], Г.Д. Наханова[1],
К.К. Джекебеков[1], О.В. Червякова[1]

[1]Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты ЖШС,
«QazBioPharm» Ұлттық холдингі АҚ, Жамбыл облысы, Қазақстан
[2]КЕ АҚ С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті, Алматы, Қазақстан
[3]КЕ АҚ Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті , Алматы, Қазақстан
*e-mail: kossylganova.a@kaznmu.kz

Brucella spp. рекомбинантты ақуыздарын кодтайтын генетикалық кірістірмелерді ПТР әдісімен идентификациялау арқылы рекомбинантты тұмау вирустарының түпнұсқалығын растау

Бруцеллезге қарсы вирустық-векторлық вакциналарды әзірлеу вакциналық кандидаттар ретінде қолданылатын рекомбинантты штаммдардың түпнұсқалығын қатаң бақылауды талап етеді. Мұндай штаммдарды молекулалық сипаттаудың негізгі кезеңдерінің бірі *Brucella* антигендерін кодтайтын гетерологиялық генетикалық кірістірмелердің болуын растау болып табылады. Осы зерттеудің мақсаты кері транскрипциялы полимеразды тізбекті реакция (КТ-ПТР) әдісі арқылы бруцеллездік генетикалық кірістірмелердің болуын анықтау негізінде рекомбинантты тұмау штаммдарының түпнұсқалығын бағалау болды. Зерттеу объектілері ретінде *Brucella* иммунодоминантты ақуыздарының гендерін қамтитын Flu-NS1-80-Omp16, Flu-NS1-80-L7/L12, Flu-NS1-80-Omp19 және Flu-NS1-80-Cu-Zn SOD рекомбинантты тұмау вирусы штаммдары қолданылды. Аналитикалық сезімталдықты бағалау белгілі РНҚ концентрациясы бар оң бақылаудың он еселік сериялық сұйылтуларын пайдалану арқылы жүргізілді. Әдістің спецификалығы күтілетін өлшемдегі ампликондардың болуымен расталды: рекомбинантты конструкциялар үшін шамамен 1250–

1300 ж.н. және бақылау вирусы үшін шамамен 890 ж.н.; теріс бақылауларда спецификалық емес амплификация байқалмады. Рекомбинантты штаммдарды талдау барысында Flu-NS1-80-OMP16, Flu-NS1-80-OMP19, Flu-NS1-80-SOD және Flu-NS1-80-L7/L12 үлгілерінің барлығында мақсатты фрагменттер анықталды, бұл *Brucella* spp. кірістірмелерінің вирус геномына сәтті интеграцияланғанын көрсетеді. Қайталанғыштықты бағалау барлық зерттелген үлгілер бойынша 10 тәуелсіз қайталауда нәтижелердің 100% сәйкес келуін көрсетті. Оң және теріс бақылаулар күтілетін нәтижелерді көрсетті, бұл реакцияның дұрыс қойылғанын және контаминацияның жоқтығын растайды. Алынған нәтижелер рекомбинантты тұмау штаммдарының түпнұсқалығын және олардың геномында бруцеллездік генетикалық кірістірмелердің болуын дәлелдейді, бұл вирустық векторлар конструкциясының дұрыстығын және оларды бруцеллезге қарсы вакциналық препараттарды әзірлеуде әрі қарай қолдану мүмкіндігін көрсетеді.

Түйін сөздер: ПТР, рекомбинантты тұмау штаммдары, бруцеллездік кірістірмелер, валидация, верификация.

Сокращения и обозначения

ПЦР – полимеразная цепная реакция; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; NS1 – неструктурный белок 1 вируса гриппа; Cu-Zn SOD – медьцинковая супероксиддисмутаза.

Введение

Бруцеллез – зоонозная инфекция, вызываемая бактериями рода *Brucella*. Заболевание поражает как животных, так и человека, характеризуется хроническим течением и тяжелыми осложнениями (Corbel, 2006; Pappas, 2006). Традиционные вакцины против бруцеллеза основаны на живых аттенуированных штаммах (*B. abortus* S19, *B. melitensis* Rev-1), однако они имеют ряд недостатков: остаточная вирулентность, риск инфицирования человека, невозможность применения у беременных животных (Schurig et al., 2002).

В связи с указанными ограничениями в последние десятилетия активно ведется поиск альтернативных вакцинных платформ, основанных на современных биотехнологических подходах. К числу перспективных направлений относятся субъединичные, ДНК-вакцины, наночастичные вакцины и вирус-векторные вакцины, способные индуцировать специфический иммунный ответ без использования живых бактерий (Avila-Calderón, 2013; Khan & Zahoor, 2018). Особый интерес представляют вирусные векторы, которые позволяют эффективно доставлять антигенные детерминанты патогена в клетки организма и индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет (Perkins et al., 2010).

Одной из перспективных платформ являются рекомбинантные вирусы гриппа, используемые в качестве вирусных векторов. Вирус гриппа обладает рядом преимуществ для создания векторных вакцин, включая высокую иммуногенность, возможность генетической модификации с использованием технологий обратной генетики и способность индуцировать мощный системный и мукозальный иммунный ответ (Gerlach et al., 2019). В таких системах гены, кодирующие иммунодоминантные антигены патогена, встраиваются в геном вируса гриппа, чаще всего в открытую рамку считывания гена NS1. Укорочение или модификация белка NS1 приводит к аттенуации вируса и повышению его безопасности при использовании в качестве вакцинного вектора (Richt & García-Sastre, 2009).

В качестве векторной платформы используется модифицированный вирус гриппа, в геном которого интегрируют гены *Brucella*, кодирующие ключевые иммунные белки, такие как рибосомный L7/L12, наружные мембранные белки Omp16, Omp19, а также фермент Cu-Zn SOD и другие. После введения такой вектор способен экспрессировать эти антигены внутри организма, вызывая специфическую иммунную реакцию против *Brucella*, при этом полностью исключая применение живых бактерий. Данный подход рассматривается как перспективный метод создания вакцин как для животных, так и для человека (Bugybayeva et al., 2021).

Наиболее активно изучаемыми антигенами являются L7/L12, Omp16, Omp19 и Cu-Zn SOD. Ряд исследований продемонстрировал, что комбинация нескольких белков, например Omp19 вместе с L7/L12, формирует более широкий и эффективный иммунный ответ по сравнению с использованием каждого антигена по отдельности (Arenas-Gamboa et al., 2011). Рекомбинантные вирусные вакцины на основе вируса гриппа обычно создаются с укороченным белком NS1, что приводит к аттенуации вируса и обеспечивает безопасное и эффективное выражение гетерологичных антигенов (Gerlach et al., 2019; Richt & García-Sastre, 2009).

Несмотря на значительные успехи в разработке вирус-векторных вакцин против бруцеллеза, важным этапом их создания является молекулярно-генетическая характеристика рекомбинантных штаммов. В частности, необходимо подтверждение наличия и стабильности гетерологичных генетических вставок, кодирующих антигены *Brucella*, в геноме вирусного вектора. В процессе получения и пассирования рекомбинантных вирусов возможны генетические перестройки или утрата вставленных последовательностей, что может привести к снижению экспрессии антигена и уменьшению иммуногенности вакцины (Dorneles et al., 2015).

Поэтому подтверждение подлинности рекомбинантных штаммов является важным этапом контроля качества вакцинных кандидатов. Особое значение данная процедура имеет при разработке вакцин для медицинского применения у человека, где требования к безопасности и воспроизводимости биологических препаратов особенно высоки (Tabynov et al., 2014).

Таким образом, подтверждение наличия генов *Brucella* в составе рекомбинантных гриппозных штаммов является необходимым этапом их молекулярной характеристики и стандартизации. Исходя из этого, **целью данной работы является** оценка подлинности рекомбинантных гриппозных штаммов путем определения наличия бруцеллезных генетических вставок.

Материалы и методы исследования

2.1 Объекты исследования. Объектами исследования являются рекомбинантные штаммы векторы гриппа Flu-NS1-80-Omp16, Flu-NS1-80-L7/L12, Flu-NS1-80-Omp19, Flu-NS1-80-Cu–Zn SOD, подготовленные в лабораторных условиях и экспонирующие вставки бруцеллезных генов (Higuchi, 1992; Mullis & Faloona, 1987).

Методом исследования выбрана постановка полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров рассчитанные на гены, кодирующие бруцеллезные белки Omp16, Omp19, L7/L12 и SOD для оценки подлинности рекомбинантных гриппозных штаммов с помощью определения наличия бруцеллезных вставок.

2.2 Выделение РНК. Выделение вирусной РНК проводили с использованием набора **innuPREP Virus DNA/RNA Kit** (Германия) согласно инструкции производителя (Shiroguchi et al., 2012). Концентрацию и чистоту выделенной РНК оценивали спектрофотометрически по соотношению 260/280 нм (Gibson et al., 1996; Shiroguchi et al., 2012).

2.3 Постановка ПЦР. Наличие бруцеллезных вставок в штаммах было проведено с помощью ПЦР анализа с набором одношаговой системы «Super Script One-Step RT-PCR» фирмы Invitrogen, согласно протоколу производителя, с использованием олигонуклеотидных праймеров: NS1 – AGCAAAAGCAGGGTGACAAAG и NS834 – CTCTTGCTCCACTTCAAGC.

Реакционная смесь ПЦР была приготовлена согласно протоколу набора «Super Script One-Step RT-PCR»: 12,5 μL – 2X Reaction Mix, 0,5 μL – $MgSO_4$, 1 μL – NS1 primer (10 μM), 1 μL – NS834 primer (10 μM), 0,5 μL – SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme Mix, 0,5 μL – dNTP, 1 μL – RNA, 5 μL – вода для ПЦР.

Условия амплификации: пре-денатурация 45°C – 15 мин, 95°C – 2 мин 1 цикл; денатурация – 94°C – 15 сек, отжиг – 55°C – 30 сек, элонгация – 68°C – 1 мин 40 цикл; фин. элонгация – 68°C – 5 мин 1 цикл; хранение 4°C – ∞.

Амплификацию фрагментов *РНК* генов кодирующие бруцеллезные белки Omp16, Omp19, L7/L12 и SOD проведен на амплификаторе ProFlex PCR System, applied biosystems by Thermo Fisher Scientific (Сингапур).

2.4 Электрофоретический анализ. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в **1,5% агарозном геле** с TAE-буфером и бромистым этидием (Ivanova et al., 2025; Moulana et al., 2016). Визуализацию проводили с использованием системы **omni DOC** (Cleaver Scientific Ltd) с 5-мегапиксельной камерой (Richt & García-Sastre, 2009).

Оптимизация ОТ-ПЦР проводили с учетом концентрации Mg^{2+}, концентрации праймеров, температуры отжига, числа циклов и длительности этапов (Avila-Calderón, 2013; Khan & Zahoor, 2018). Это обеспечивало максимальную специфичность и чувствительность амплификации.

2.5 Верификация и валидация. Контроль специфичности реакции проводили с использованием позитивного контроля (РНК с известной вставкой) и негативного контроля (без шаблона) (Khan & Zahoor, 2018; Perkins et al., 2010).

Валидация включала оценку специфичности (наличие только целевого продукта), чувствительности (минимальное количество копий для надежного выявления), воспроизводимости (повторные измерения в разных сериях экспериментов) (Gerlach et al., 2019; Khan & Zahoor, 2018).

2.6 Статистическая обработка данных. Данные обрабатывали с использованием про-

граммы GraphPad Prism 9, применяли описательную статистику, тесты на нормальность распределения, t-тест или ANOVA, а также оценку коэффициента вариации для воспроизводимости (Bugybayeva et al., 2021).

Результаты исследования и их обсуждение

Для оценки чувствительности метода ОТ-ПЦР в рекомбинантных штаммах на основе вируса гриппа А были использованы образцы с известной концентрацией целевой РНК (Таблица 1). Образцы были получены путем серийного десятикратного разведения стандартного положительного контроля. Это позволило определить минимальное количество копий РНК, которое может быть достоверно обнаружено данным методом.

Результаты определения чувствительности исследуемого метода представлены на рисунке 1.

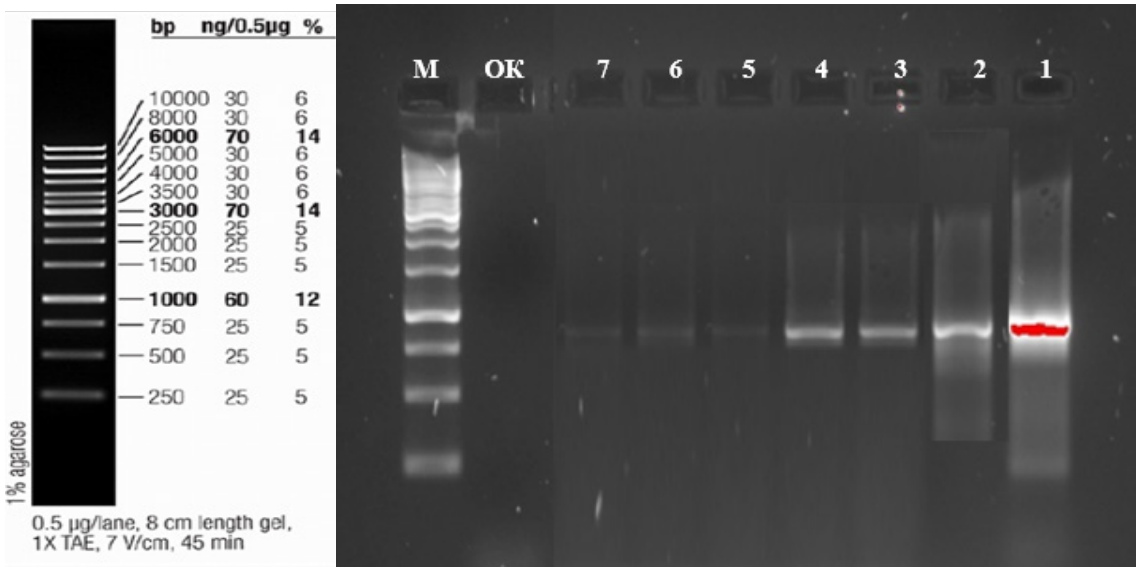
Таблица 1

Степень разведения положительного контроля для оценки чувствительности

№	Диапазон разведении, копия	Концентрация плазмидной ДНК, ПК	Объем в одной реакций, мкл
1	1000000	0,3 пг	3
2	100000	3 пг	3
3	10000	0,3 нг	3
4	1000	3 нг	3
5	100	0,3 мкг	3
6	10	3 мкг	3
7	1	30 мкг	3
8	Отрицательный контроль (свободная от РНК/ДНК-аз вода)	-	3

Рисунок 1

Чувствительность метода при постановке ОТ-ПЦР



М – маркер молекулярной массы; ОК – отрицательный контроль; 1–7 – десятикратные разведения положительного контроля, содержащие 10□, 10□, 10□, 10^3, 10^2, 10 и 1 копию РНК в реакции соответственно. Ожидаемый размер ампликона – ~890 п.о.

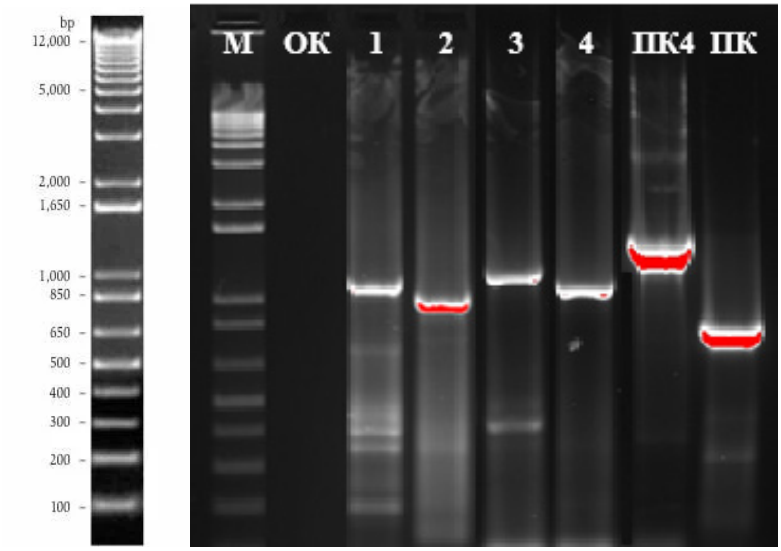
На основании данных, представленных на рисунке 1, можно отметить, что метод ОТ-ПЦР демонстрирует высокую чувствительность при концентрациях РНК положительного контроля в диапазоне от 10□ до 10 копий. Во всех протестированных разведениях были четко амплифицированы ПЦР-фрагменты, соответствующие ожидаемому размеру (~890 п.о.), что указывает на надежное обнаружение целевой последовательности.

Полученные результаты ОТ-ПЦР показали, что предлагаемый метод является чувствительным и воспроизводимым, и может быть эффективно использован для идентификации вставок *Brucella spp.* в рекомбинантных штаммах на основе вируса гриппа А.

В процессе создания рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих антигены *Brucella spp.*, важным этапом является подтверждение наличия целевых вставок в вирусном геноме. Для этого была проведена оптимизация метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР), позволяющего специфически выявлять фрагменты генов *Brucella* в культуральных материалах.

Рисунок 2

Определение наличия вставок Brucella spp. в рекомбинантных штаммах вируса гриппа методом ОТ-ПЦР



М – маркер, ОК – отрицательный контроль, культуральные материалы 1 – Flu-NS1-80-OMP16, 2 – Flu-NS1-80-L7/L12, 3 – Flu-NS1-80- SOD, 4 – Flu-NS1-80-OMP19, ПК4 – положительный контроль (плазмидная ДНК – 1500 п.о.), ПК – РНК A/chicken/Akmola/KZ/62/2021 (H5N8) (~890 п.о.)

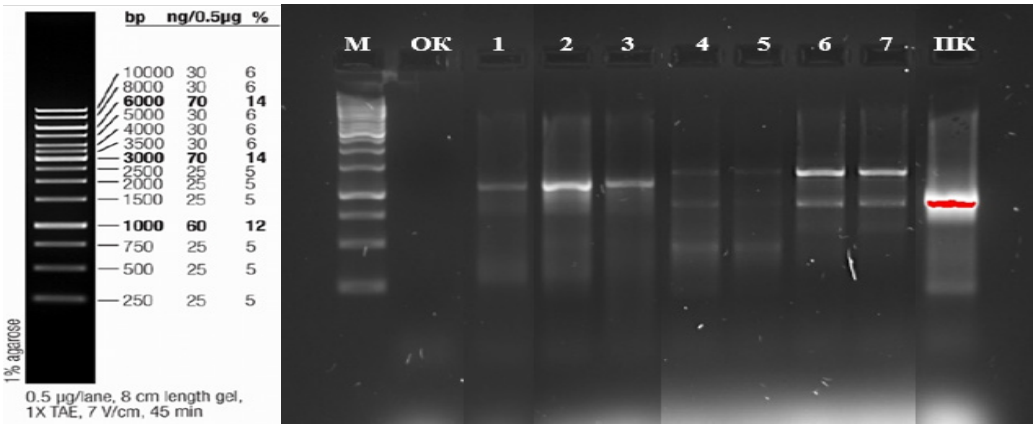
В результате проведения ОТ-ПЦР было установлено наличие специфических ампликонов соответствующего размера во всех исследуемых образцах рекомбинантных вирусов (дорожки 1-4), что свидетельствует об успешной интеграции генетических вставок *Brucella spp.* в геном вируса гриппа А. В отрицательном контроле (ОК) амплификация отсутствовала, что подтверждает отсутствие контаминации в реакционной смеси. В положительном контроле (ПК4) наблюдался четкий ампликон ожидаемого размера (~1400 п.о.), подтверждающий корректность работы праймеров и условий реакции.

Контрольный вирусный штамм (ПК) не содержал вставок *Brucella spp.*, что подтверждается наличием специфической полосы в области ~890 п.о., и служит дополнительным подтверждением специфичности используемого ОТ-ПЦР метода.

Валидацию метода по обнаружению вставок *Brucella spp. (L7/L12, OMP16, OMP19, Cu-Zn-SOD)* в рекомбинантных штаммах вакцины на основе вируса гриппа А путем оценки специфичности проводили с использованием образцов РНК рекомбинантных штаммов вируса гриппа с бруцеллезными вставками (Рисунок 3).

Рисунок 3

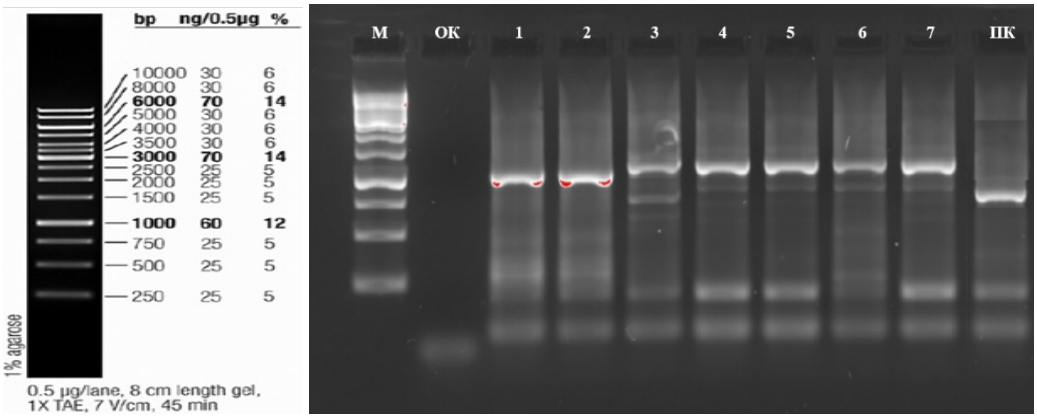
Специфичность метода идентификации вставок Brucella spp. (L7/L12, Omp16) в рекомбинантных штаммах на основе вируса гриппа А



М – маркер молекулярной массы 1 kb; ОК – отрицательный контроль; 1–3 – образцы рекомбинантного штамма Flu-NS1-80-L7/L12; 4–7 – образцы рекомбинантного штамма Flu-NS1-80-Omp16; ПК – положительный контроль РНК вируса гриппа А (H5N8).

Рисунок 4

Специфичность метода идентификации вставок Brucella spp. (L7/L12, OMP16, OMP19, Cu-Zn-SOD) в рекомбинантных штаммах на основе вируса гриппа А



М – 1 кб маркер, ОК – ПЦР вода, 1 – Flu-NS1-80-L7/L12; 2 – Flu-NS1-80-L7/L12; 3 – Flu-NS1-80-OMP16; 4 – Flu-NS1-80- OMP19; 5 – Flu-NS1-80- OMP19; 6 – Flu-NS1-80- SOD; 7 – Flu-NS1-80- SOD; ПК – РНК (H5N8) (~890 п.о.)

Как видно из рисунка 4, ОТ-ПЦР-амплификация прошла успешно, так в образце положительного контроля (ПК) был получен ампликон ожидаемого размера 890 п.о. гена NS, что подтверждает корректность проведения реакций. В отрицательном контроле (ОК) амплификация отсутствует, что свидетельствует об отсутствии контаминации и высокой специфичности метода. В образцах №1 и 2 были получены фрагменты размером ~1250 п.о., соответствующие гену NS с бруцеллезной вставкой L7/L12. В то же время, в образцах №3, 4, 5, 6 и 7 наблюдались образование ПЦР-продуктов размером ~1300 п.о., что подтверждает наличие вставок в конструкциях Flu-NS1-80-OMP16, Flu-NS1-80-OMP19 и Flu-NS1-80- SOD, соответственно.

Для оценки воспроизводимости и валидации метода ОТ-ПЦР для идентификации вставок *Brucella spp. (L7/L12, OMP16, OMP19, Cu-Zn-SOD)* в рекомбинантных штаммах на основе

вируса гриппа А в качестве объекта исследования были использованы РНК конструкции Flu-NS1-80-OMP16, Flu-NS1-80-MP19, Flu-NS1-80- SOD, Flu-NS1-80- L7/L12. Постановку ОТ-ПЦР осуществляли в одинаковых условиях с применением одного и того же оборудования с одинаковыми условиями в 10 повторностях (Таблица 2).

Таблица 2

Воспроизводимость метода ОТ-ПЦР для идентификации вставок Brucella spp. в рекомбинантных гриппозных штаммах

Повторность постановки ОТ-ПЦР	Образцы рекомбинантных конструкций			
	Flu-NS1-80-OMP16	Flu-NS1-80-MP19	Flu-NS1-80- SOD	Flu-NS1-80- L7/L12
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+
10	+	+	+	+
Процент чувствительности	100 %	100 %	100 %	100 %
ПК	+	+	+	+
ОК	-	-	-	-

Примечание: «+» – положительный; «-» – отрицательный.

Результаты, представленные в таблице 2, демонстрируют высокую воспроизводимость и надежность разработанного метода ОТ-ПЦР. Во всех 10 повторностях для всех исследованных рекомбинантных конструкций (Flu-NS1-80-OMP16, Flu-NS1-80-MP19, Flu-NS1-80-SOD и Flu-NS1-80-L7/L12) были получены положительные результаты амплификации, что свидетельствует о стабильности метода при неизменных условиях проведения эксперимента.

Чувствительность метода составила 100% для всех анализируемых вставок *Brucella* spp., что подтверждает его высокую диагностическую эффективность. При этом положительный контроль (ПК) во всех случаях дал ожидаемый положительный результат, а отрицательный контроль (ОК) – отрицательный, что указывает на отсутствие контаминации и корректность постановки реакции.

Таким образом, разработанный метод ОТ-ПЦР обеспечивает достоверную и воспроизводимую идентификацию генетических вставок *Brucella* spp. (L7/L12, OMP16, OMP19, Cu-Zn-SOD) в составе рекомбинантных штаммов на основе вируса гриппа А и может быть рекомендован для дальнейшего применения в лабораторной практике.

В настоящей работе проведена оценка подлинности рекомбинантных гриппозных штаммов, экспрессирующих иммунодоминантные антигены *Brucella* (L7/L12, Omp16, Omp19, Cu-Zn SOD), с использованием одношаговой ОТ-ПЦР с праймерами к гену NS.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности, специфичности и воспроизводимости разработанного метода ОТ-ПЦР для идентификации вставок *Brucella* spp. в рекомбинантных штаммах вируса гриппа А, что соответствует современным требованиям к молекулярно-генетическим методам диагностики и сопоставимо с данными зарубежных исследований (Corman, 2020; Tahamtan & Ardebili, 2020).

Особое значение имеет высокая специфичность метода, подтвержденная отсутствием амплификации в отрицательных контролях и наличием продуктов строго ожидаемого размера для каждой конструкции. Это согласуется с данными зарубежных авторов, подчеркиваю-

щих, что специфичность ОТ-ПЦР при детекции рекомбинантных вирусов определяется, прежде всего, дизайном праймеров и отсутствием перекрестной реактивности с геномом вируса-хозяина (Thornton & Basu, 2011). В представленном исследовании четкое различие размеров ампликонов (~1250–1300 п.о. для вставок и ~890 п.о. для контрольного вируса) дополнительно подтверждает точность идентификации целевых последовательностей.

Результаты анализа воспроизводимости демонстрируют 100% совпадение результатов во всех 10 повторностях, что указывает на высокую надежность метода. Подобные показатели воспроизводимости соответствуют международным рекомендациям по валидации молекулярных методов, согласно которым коэффициент воспроизводимости должен превышать 95% (Broeders et al., 2014). Это делает разработанный подход пригодным не только для научных исследований, но и для рутинной лабораторной диагностики.

Следует отметить, что использование вируса гриппа А в качестве векторной платформы для экспрессии антигенов *Brucella spp*. является перспективным направлением современной вакцинологии. В ряде недавних исследований показано, что рекомбинантные гриппозные вирусы способны эффективно экспрессировать чужеродные антигены и индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ (Isakova-Sivak, 2016; Krammer, 2019). В этом контексте разработанный метод ОТ-ПЦР представляет собой важный инструмент контроля качества таких вакцинных конструкций.

В контексте активного развития вирус-векторных вакцин против бруцеллеза, включая платформы на основе модифицированного вируса гриппа с укороченным NS1 (Carascal et al., 2022), валидированный нами ОТ-ПЦР-подход закрывает важный пробел именно в стандартизированном контроле подлинности таких векторов. Это особенно критично при разработке препаратов для медицинского применения у человека, где требования к стабильности и воспроизводимости генетических конструкций максимально жесткие.

В дальнейшем целесообразно дополнить разработанный подход количественной ОТ-ПЦР и/или секвенированием для оценки уровня экспрессии и целостности вставок при длительном пассировании.

Заключение

Метод одношаговой обратной транскрипции ПЦР, разработанный в данном исследовании, продемонстрировал чувствительность и стабильность метода, а также полную специфичность и 100 % воспроизводимость при идентификации всех проверяемых бруцеллезных вставок в рекомбинантных гриппозных векторах строго с ожидаемыми размерами продукта (~890 п.о. – контрольный вирус; ~1250–1300 п.о. – рекомбинантные конструкции). Оценка воспроизводимости показала 100% совпадение результатов в 10 повторностях для всех исследуемых конструкций (Flu-NS1-80-OMP16, Flu-NS1-80-OMP19, Flu-NS1-80-SOD, Flu-NS1-80-L7/L12).

Это позволяет использовать ОТ-ПЦР как надежный инструмент контроля качества при создании вирус-векторных вакцин против бруцеллеза и обеспечивает основу для дальнейшего масштабирования и клинической валидации подобных вакцинных кандидатов.

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках программно-целевого финансирования Министерства здравоохранения Республики Казахстан на 2024-2026 годы (ИРН BR25293294).

Благодарности

Выражаем сотрудникам НИИПББ и КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова, которые принимали непосредственное участие в экспериментальных этапах настоящей работы.

Вклад авторов

К.А. Шораева: концептуализация, методология, рецензирование и редактирование рукописи, администрирование проекта; К.А. Жапаркулова: концептуализация, научное руководство, администрирование проекта; А.Е. Косылганова: концептуализация, валидация, рецензирование и редактирование рукописи; Ж.С. Абсатова: методология, проведение исследований; А. Ұланқызы: методология, подготовка первоначального текста; Т.С. Бекежанова: валидация, рецензирование и редактирование рукописи; А.С. Калыкова: валидация, курирование данных; Н.С. Кожабергенов: формальный анализ, кури-

рование данных; К.К. Джекебеков: формальный анализ, ресурсы; С.У. Молдагулова: проведение исследований, подготовка первоначального текста; Г.О. Шыныбекова: проведение исследований, визуализация; О.В. Червякова: ресурсы, научное руководство, получение финансирования; Г.Д. Наханова: курирование данных, подготовка первоначального текста, визуализация.

Литература

Arenas-Gamboa, A. M., Rice-Ficht, A. C., Kahl-McDonagh, M. M., & Ficht, T. A. (2011). Protective efficacy and safety of *Brucella melitensis* 16MΔmucR against intraperitoneal and aerosol challenge in BALB/c mice. *Infection and Immunity, 79*(9), 3653–3658. https://doi.org/10.1128/IAI.05330-11

Avila-Calderón, E. D., Lopez-Merino, A., Sriranganathan, N., Boyle, S. M., & Contreras-Rodríguez, A. (2013). A history of the development of *Brucella* vaccines. *BioMed Research International, 2013*, Article 743509. https://doi.org/10.1155/2013/743509

Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M., Roosens, N., & Morisset, D. (2014). Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology, 37*(2), 115–126. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.008

Bugybayeva, D., Kydyrbayev, Z., Zinina, N., Assanzhanova, N., Yespembetov, B., Kozhamkulov, Y., Zakarya, K., Ryskeldinova, S., & Tabynov, K. (2021). A new candidate vaccine for human brucellosis based on influenza viral vectors: A preliminary investigation for the development of an immunization schedule in a guinea pig model. *Infectious Diseases of Poverty, 10*(1), Article 13. https://doi.org/10.1186/s40249-021-00801-y

Carascal, M. B., Pavon, R. D. N., & Rivera, W. L. (2022). Recent progress in recombinant influenza vaccine development toward heterosubtypic immune response. *Frontiers in Immunology, 13*, Article 878943. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.878943

Corbel, M. J. (2006). *Brucellosis in humans and animals*. World Health Organization. https://iris.who.int/handle/10665/43597

Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K. W., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G. J. C., Haagmans, B. L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.-L., Ellis, J., Zambon, M., … Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance, 25*(3), Article 2000045. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045

Dorneles, E. M., Sriranganathan, N., & Lage, A. P. (2015). Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Veterinary Research, 46*, Article 76. https://doi.org/10.1186/s13567-015-0199-7

Gerlach, T., Elbahesh, H., Saletti, G., & Rimmelzwaan, G. F. (2019). Recombinant influenza A viruses as vaccine vectors. *Expert Review of Vaccines, 18*(4), 379–392. https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1582338

Gibson, U. E., Heid, C. A., & Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research, 6*(10), 995–1001. https://doi.org/10.1101/gr.6.10.995

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology, 10*(4), 413–417. https://doi.org/10.1038/nbt0492-413

Isakova-Sivak, I., Tretiak, T., & Rudenko, L. (2016). Cold-adapted influenza viruses as a promising platform for viral-vector vaccines. *Expert Review of Vaccines, 15*(10), 1241–1243. https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1208088

Ivanova, Z., Grigorova, N., Petrova, V., Vachkova, E., & Beev, G. (2025). Comparative evaluation of computational methods for validating housekeeping gene RT-qPCR data in 3T3-L1 cells. *Biomedicines, 13*(8), Article 2036. https://doi.org/10.3390/biomedicines13082036

Khan, M. Z., & Zahoor, M. (2018). An overview of brucellosis in cattle and humans, and its serological and molecular diagnosis in control strategies. *Tropical Medicine and Infectious Disease, 3*(2), Article 65. https://doi.org/10.3390/tropicalmed3020065

Krammer, F. (2019). The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. *Nature Reviews Immunology, 19*(6), 383–397. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0143-6

Moulana, Z., Hasanjani Roushan, M. R., & Marashi, S. M. A. (2016). Evaluation of different primers for detection of *Brucella* by using PCR method. *Electronic Physician, 8*(11), 3222–3227. https://doi.org/10.19082/3222

Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology, 155*, 335–350. https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6

Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., & Tsianos, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases, 6*(2), 91–99. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6

Perkins, S. D., Smither, S. J., & Atkins, H. S. (2010). Towards a *Brucella* vaccine for humans. *FEMS Microbiology Reviews, 34*(3), 379–394. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00211.x

Richt, J. A., & García-Sastre, A. (2009). Attenuated influenza virus vaccines with modified NS1 proteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology, 333*, 177–195. https://doi.org/10.1007/978-3-540-92165-3_9

Schurig, G. G., Sriranganathan, N., & Corbel, M. J. (2002). Brucellosis vaccines: Past, present and future. *Veterinary Microbiology, 90*(1–4), 479–496. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00255-9

Shiroguchi, K., Jia, T. Z., Sims, P. A., & Xie, X. S. (2012). Digital RNA sequencing minimizes sequence-dependent bias and amplification noise with optimized single-molecule barcodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109*(4), 1347–1352. https://doi.org/10.1073/pnas.1118018109

Tabynov, K., Kydyrbayev, Z., Ryskeldinova, S., Yespembetov, B., Zinina, N., Assanzhanova, N., Kozhamkulov, Y., Inkarbekov, D., Gotskina, T., & Sansyzbay, A. (2014). Novel influenza virus vectors expressing *Brucella* L7/L12 or Omp16 proteins in cattle

induced a strong T-cell immune response, as well as high protectiveness against *B. abortus* infection. *Vaccine, 32*(18), 2034–2041. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.058

Tahamtan, A., & Ardebili, A. (2020). Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: Issues affecting the results. *Expert Review of Molecular Diagnostics, 20*(5), 453–454. https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1757437

Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education, 39*(2), 145–154. https://doi.org/10.1002/bmb.20461

Сведения об авторах:

Шораева Камшат Абитхановна – PhD, заведующая лабораторией ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (пгт. Гвардейский, Казахстан, e-mail: k.a.shorayeva@mail.ru; k.shorayeva@biosafety.kz).

Абсатова Жаркинай Серикбаевна – магистр технических наук по направлению «Биотехнология», старший научный сотрудник ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (пгт. Гвардейский, Казахстан, e-mail: zh.absatova@biosafety.kz).

Молдагулова Сабина Улановна – магистр биологии, младший научный сотрудник ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Национальный холдинг «QazBioPharm» (пгт. Гвардейский, Казахстан, e-mail: sabina_moldagulova@mail.ru).

Уланқызы Ақнұр (автор для корреспонденции) – младший научный сотрудник ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Национальный холдинг «QazBioPharm» (пгт. Гвардейский, Казахстан, e-mail: aknur93@mail.ru).

Қосылғанова Айнар Ерланқызы (автор для корреспонденции) – магистр технических наук, PhD-докторант кафедры биотехнологии и общей химической технологии Школы фармации НАО «КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова», научный сотрудник (Алматы, Казахстан, e-mail: aynar03031998@gmail.com; kossylganova.a@kaznmu.kz).

Жапаркулова Карлыгаш Алтынбековна – PhD, ассоциированный профессор, заведующая кафедрой биотехнологии и общей химической технологии Школы фармации НАО «КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова», ответственный исполнитель научно-технической программы, ведущий научный сотрудник (Алматы, Казахстан, e-mail: zhaparkulova.k@kaznmu.kz).

Калыкова Асем Сериковна – PhD, ассоциированный профессор, заведующая кафедрой фундаментальной медицины факультета медицины и здравоохранения Казахского национального университета имени аль-Фараби, ведущий научный сотрудник (Алматы, Казахстан, e-mail: a.kalykova@gmail.com).

Бекежанова Толкын Слямовна – PhD, ассоциированный профессор кафедры инженерных дисциплин и надлежащих практик НАО «Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова», ведущий научный сотрудник (Алматы, Казахстан, e-mail: bekezhanova.t@kaznmu.kz).

Шыныбекова Гаухар Орынбековна – магистр биологии, старший научный сотрудник ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (пгт. Гвардейский, Казахстан, e-mail: gaukhar_1988@bk.ru).

Кожабергенов Нурлан Сиязбекович – старший научный сотрудник ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (пгт. Гвардейский, Казахстан, e-mail: nurlanks@gmail.com).

Наханова Гульнур Джолдасбековна – магистр, старший научный сотрудник ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (пгт. Гвардейский, Казахстан, e-mail: gal.gulnur@mail.ru).

Джекебеков Куаныш Кайратович – сотрудник ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (пгт. Гвардейский, Казахстан, e-mail: k.zhekebekov@biosafety.kz).

Червякова Ольга Викторовна – кандидат биологических наук, профессор, заместитель генерального директора по науке и коммерциализации дочерней организации Национального холдинга «QazBioPharm» – ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (пгт. Гвардейский, Казахстан, e-mail: o.chervyakova@biosafety.kz).

Information about the authors:

Shorayeva Kamshat Abitkhanovna – PhD, Head of Laboratory, Research Institute for Biological Safety Issues (Gvardeyskiy settlement, Kazakhstan, e-mail: k.a.shorayeva@mail.ru; k.shorayeva@biosafety.kz).

Absatova Zharkynai Serikbaevna – Master of Technical Sciences in Biotechnology, Senior Researcher, Research Institute for Biological Safety Issues (Gvardeyskiy settlement, Kazakhstan, e-mail: zh.absatova@biosafety.kz).

Moldagulova Sabina Ulanovna – Master of Biology, Junior Researcher, Research Institute for Biological Safety Issues, National Holding QazBioPharm (Gvardeyskiy settlement, Kazakhstan, e-mail: sabina_moldagulova@mail.ru).

Ulankyzy Aknur (corresponding author) – Junior Researcher, Research Institute for Biological Safety Issues, National Holding QazBioPharm (Gvardeyskiy settlement, Kazakhstan, e-mail: aknur93@mail.ru).

Kossylganova Ainar Erlanovna (corresponding author) – Master of Technical Sciences, PhD Candidate, Department of Biotechnology and General Chemical Technology, School of Pharmacy, Asfendiyarov Kazakh National Medical University; Researcher (Almaty, Kazakhstan, e-mail: aynar03031998@gmail.com; kossylganova.a@kaznmu.kz).

Zhaparkulova Karlygash Altynbekovna – PhD, Associate Professor, Head of the Department of Biotechnology and General Chemical Technology, School of Pharmacy, Asfendiyarov Kazakh National Medical University; Principal Investigator of the Scientific and Technical Program; Leading Researcher (Almaty, Kazakhstan, e-mail: zhaparkulova.k@kaznmu.kz).

Kalykova Assem Serikovna – PhD, Associate Professor, Head of the Department of Fundamental Medicine, Faculty of Medicine and Healthcare, Al-Farabi Kazakh National University; Leading Researcher (Almaty, Kazakhstan, e-mail: a.kalykova@gmail.com).

Bekezhanova Tolkyn Slyamovna – PhD, Associate Professor, Department of Engineering Disciplines and Good Practices, Asfendiyarov Kazakh National Medical University; Leading Researcher (Almaty, Kazakhstan, e-mail: bekezhanova.t@kaznmu.kz).

Shynybekova Gauhar Orynbekovna – Master of Biology, Senior Researcher, Research Institute for Biological Safety Issues (Gvardeyskiy settlement, Kazakhstan, e-mail: gaukhar_1988@bk.ru).

Kozhabergenov Nurlan Siyazbekovich – Senior Researcher, Research Institute for Biological Safety Issues (Gvardeyskiy settlement, Kazakhstan, e-mail: nurlanks@gmail.com).

Nakhanova Gulnur Dzholdasbekovna – Master of Biology, Senior Researcher, Research Institute for Biological Safety Issues (Gvardeyskiy settlement, Kazakhstan, e-mail: gal.gulnur@mail.ru).

Jackebekov Kuanysh Kairatovich – Researcher, Research Institute for Biological Safety Issues (Gvardeyskiy settlement, Kazakhstan, e-mail: k.zhekebekov@biosafety.kz).

Chervyakova Olga Viktorovna – Candidate of Biological Sciences, Professor, Deputy General Director for Science and Commercialization of the subsidiary organization of National Holding QazBioPharm – Research Institute for Biological Safety Issues (Gvardeyskiy settlement, Kazakhstan, e-mail: o.chervyakova@biosafety.kz).

Авторлар туралы мәлімет:

Шораева Камшат Әбитханқызы – PhD, зертхана меңгерушісі, «Биологиялық қауіпсіздік проблемалары ғылыми-зерттеу институты» ЖШС (Гвардейский кенті, Қазақстан, e-mail: k.a.shorayeva@mail.ru; k.shorayeva@biosafety.kz).

Абсатова Жарқынай Серікбайқызы – «Биотехнология» бағыты бойынша техника ғылымдарының магистрі, аға ғылыми қызметкер, «Биологиялық қауіпсіздік проблемалары ғылыми-зерттеу институты» ЖШС (Гвардейский кенті, Қазақстан, e-mail: zh.absatova@biosafety.kz).

Молдағұлова Сабина Ұланқызы – биология магистрі, кіші ғылыми қызметкер, «Биологиялық қауіпсіздік проблемалары ғылыми-зерттеу институты» ЖШС, «QazBioPharm» ұлттық холдингі (Гвардейский кенті, Қазақстан, e-mail: sabina_moldagulova@mail.ru).

Ұланқызы Ақнұр (хат-хабарға жауапты автор) – кіші ғылыми қызметкер, «Биологиялық қауіпсіздік проблемалары ғылыми-зерттеу институты» ЖШС, «QazBioPharm» ұлттық холдингі (Гвардейский кенті, Қазақстан, e-mail: aknur93@mail.ru).

Қосылғанова Айнар Ерланқызы (хат-хабарға жауапты автор) – техника ғылымдарының магистрі, «С. Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті» КЕАҚ Фармация мектебінің биотехнология және жалпы химиялық технология кафедрасының PhD-докторанты, ғылыми қызметкер (Алматы, Қазақстан, e-mail: aynar03031998@gmail.com; kossylganova.a@kaznmu.kz).

Жапаркулова Карлығаш Алтынбекқызы – PhD, қауымдастырылған профессор, «С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті» КЕАҚ Фармация мектебінің биотехнология және жалпы химиялық технология кафедрасының меңгерушісі, ғылыми-техникалық бағдарламаның жауапты орындаушысы, жетекші ғылыми қызметкер (Алматы, Қазақстан, e-mail: zhaparkulova.k@kaznmu.kz).

Калыкова Асем Сериккызы – PhD, қауымдастырылған профессор, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті Медицина және денсаулық сақтау факультетінің іргелі медицина кафедрасының меңгерушісі, жетекші ғылыми қызметкер (Алматы, Қазақстан, e-mail: a.kalykova@gmail.com).

Бекежанова Толқын Слямқызы – PhD, қауымдастырылған профессор, «С. Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті» КЕАҚ инженерлік пәндер және тиісті практикалар кафедрасының қызметкері, жетекші ғылыми қызметкер (Алматы, Қазақстан, e-mail: bekezhanova.t@kaznmu.kz).

Шыныбекова Гаухар Орынбекқызы – биология магистрі, аға ғылыми қызметкер, «Биологиялық қауіпсіздік проблемалары ғылыми-зерттеу институты» ЖШС (Гвардейский кенті, Қазақстан, e-mail: gaukhar_1988@bk.ru).

Қожабергенов Нұрлан Сиязбекұлы – аға ғылыми қызметкер, «Биологиялық қауіпсіздік проблемалары ғылыми-зерттеу институты» ЖШС (Гвардейский кенті, Қазақстан, e-mail: nurlanks@gmail.com).

Наханова Гульнур Джолдасбековна – магистр, аға ғылыми қызметкер, «Биологиялық қауіпсіздік проблемалары ғылыми-зерттеу институты» ЖШС (Гвардейский кенті, Қазақстан, e-mail: gal.gulnur@mail.ru).

Джекебеков Куаныш Кайратович – «Биологиялық қауіпсіздік проблемалары ғылыми-зерттеу институты» ЖШС қызметкері (Гвардейский кенті, Қазақстан, e-mail: k.zhekebekov@biosafety.kz).

Червякова Ольга Викторовна – биология ғылымдарының кандидаты, профессор, «QazBioPharm» ұлттық холдингінің еншілес ұйымы – «Биологиялық қауіпсіздік проблемалары ғылыми-зерттеу институты» ЖШС бас директорының ғылым және коммерцияландыру жөніндегі орынбасары (Гвардейский кенті, Қазақстан, e-mail: o.chervyakova@biosafety.kz).

Поступило 1 декабря 2025 года
Повторно загружено 16 мая 2026 года
Принято 15 сентября 2026 года