

УДК 577.21:578.831:57.083.2

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84>

Оригинальная статья | Original article



## Влияние мутаций в местах посадки праймеров на эффективность выявления РНК вируса кори методами ПЦР и LAMP

Г.М. Цыганова<sup>1</sup> , Е.Д. Богословская<sup>2</sup> , Г.А. Шипулин<sup>1</sup> , О.Ю. Шипулина<sup>3</sup> ,  
Е.В. Богословская<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, ул. Погодинская, д. 10, стр. 1, Москва, 119121, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Институтский пер., д. 9, г. Долгопрудный, Московская область, 141701, Российская Федерация

<sup>3</sup> Акционерное общество «ЛабКвест», Бережковская наб., д. 20, стр. 13, Москва, 121059, Российская Федерация

✉ Богословская Елена Владимировна; [Bogoslovskaya@cspfmba.ru](mailto:Bogoslovskaya@cspfmba.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Высокая вариабельность генома РНК-содержащего вируса кори создает риск накопления мутаций в местах посадки (комплементарного связывания) праймеров, что может повлиять на надежность результатов молекулярной диагностики кори. В настоящей работе проведена оценка влияния таких мутаций на эффективность двух молекулярно-генетических методов – ПЦР и метода петлевой изотермической амплификации (LAMP).

**ЦЕЛЬ.** Оценить частоту встречаемости мутаций в местах связывания праймеров и их влияние на эффективность методов ПЦР и LAMP в выявлении РНК вируса кори.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Использовали нуклеотидные последовательности вируса кори из базы данных NCBI и клинические образцы носоглоточного секрета, предоставленные АО «ЛабКвест» (Москва, Россия). Экстракцию РНК вируса кори проводили с использованием набора реагентов «АмплиТест РИБО-преп». Амплификацию выполняли с использованием наборов реагентов «АмплиТест Корь» и методики LAMP. Биоинформатический анализ проводили с использованием программ MAFFT, Jalview 2.1, CD-HIT, MEGA12 и FigTree v.1.4.3.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** При анализе 1080 нуклеотидных последовательностей вируса кори было обнаружено не более одной замены в областях праймеров и зонда, используемых в ПЦР. Анализ последовательностей в местах посадки праймеров, используемых в LAMP, показал большую вариабельность по сравнению с методом ПЦР, но и в этом случае 96,5% последовательностей содержало не более одной мутации в месте посадки каждого праймера. В 15 из 69 клинических образцов была выявлена только одна мутация в области посадки прямого праймера, которая незначительно влияла на эффективность ПЦР при низких концентрациях вируса. Для метода LAMP в 18 образцах было обнаружено три мутации в целевых последовательностях для праймеров F3, V1с и V2. В модельных экспериментах показано, что мисмэтч (несовпадение) во внешнем праймере F3 не влияет на скорость и чувствительность реакции, в то время как для петлевого праймера VIP была показана аномально высокая эффективность амплификации при наличии двух мутаций в РНК-последовательностях, что может косвенно свидетельствовать о наличии конформационных особенностей длинных петлевых праймеров.

**ВЫВОДЫ.** Оба метода – ПЦР и LAMP – эффективно выявляют РНК вируса кори даже при наличии мутаций в области посадки праймеров. Однако метод LAMP требует дальнейшего изучения для широкого внедрения в диагностику кори.






**Ключевые слова:** вирус кори; петлевая изотермическая амплификация; LAMP; полимеразная цепная реакция; ПЦР; мутации; праймеры; диагностика; РНК-вирусы; филогенетический анализ

**Для цитирования:** Цыганова Г.М., Богословская Е.Д., Шипулин Г.А., Шипулина О.Ю., Богословская Е.В. Влияние мутаций в местах посадки праймеров на эффективность выявления РНК вируса кори методами ПЦР и LAMP. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(1):75–84. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках научной деятельности ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России.

**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Effect of primer binding sites mutations on the efficacy of measles virus RNA detection using PCR and LAMP techniques

Galina M. Tsyganova<sup>1</sup> , Ekaterina D. Bogoslovskaya<sup>2</sup> , German A. Shipulin<sup>1</sup> , Olga Yu. Shipulina<sup>3</sup> , Elena V. Bogoslovskaya<sup>4</sup> 

<sup>1</sup> Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical and Biological Agency, 10/1 Pogodinskaya St., Moscow 119121, Russian Federation

<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (MIPT), 9 Institutsky Ln., Dolgoprudny, Moscow region 141701, Russian Federation

<sup>3</sup> LabQuest, 20/13 Berezhkovskaya Emb., Moscow 121059, Russian Federation

✉ Elena V. Bogoslovskaya; [Bogoslovskaya@cspfmba.ru](mailto:Bogoslovskaya@cspfmba.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** The high variability of the measles virus RNA genome poses risks of mutations accumulating at primer binding sites (complementary binding site), potentially impacting the reliability of molecular measles diagnostics. In this study, we have assessed the impact of such mutations on the efficiency of two molecular genetic methods: PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP).

**AIM.** This study aimed to evaluate the occurrence of mutations at primer binding sites and their impact on the efficiency of PCR and LAMP methods in detecting measles virus RNA.

**MATERIALS AND METHODS.** Clinical samples of nasopharyngeal secretions (LabQuest, Moscow, Russia) and nucleotide sequences from NCBI database were used in the study. AmpliTest RI-BO-prep kit was used for RNA extraction. AmpliTest Measles kit and LAMP-based kit were used for amplification. MAFFT, Jalview 2.1, CD-HIT, MEGA1, and FigTree v.1.4.3 software were used to perform a bioinformatics analysis.

**RESULTS.** Having analyzed 1,080 nucleotide sequences of the measles virus, we found no more than one mutation in the target primers target sites and probe used for PCR. The analyzed LAMP primer binding sites showed greater variability compared to PCR primers; even in this case, 96.5% of the sequences contained no more than a single mutation at each site. Out of 69 clinical samples, only 15 had one mutation in the forward primer binding site, with a minor impact on PCR performance at low virus concentrations. For the LAMP method, three mutations were detected in the F3, B1c, and B2 primer target sites in 18 samples. In a model experiment, the mismatch in the region of the outer primer F3 did not affect the speed and sensitivity of the reaction. Inversely, the loop forming primer BIP performed abnormally well in the presence of two mutations in the RNA sequences. This can indirectly prove the existence of conformational aspects for long loop primers.

**CONCLUSIONS.** Both methods (PCR and LAMP) effectively detect samples with mutations; however, the LAMP method warrants further research to expand its potential for diagnosing measles.

**Keywords:** measles virus; loop-mediated isothermal amplification; LAMP; polymerase chain reaction; PCR; mutations; primers; diagnostics; RNA viruses; phylogenetic analysis

**For citation:** Tsyganova G.M., Bogoslovskaya E.D., Shipulin G.A., Shipulina O.Yu., Bogoslovskaya E.V. Effect of primer binding sites mutations on the efficacy of measles virus RNA detection using PCR and LAMP techniques. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(1):75–84. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84>

**Funding.** The study was performed using scientific results obtained at the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical and Biological Agency.

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Корь остается актуальной проблемой здравоохранения во многих странах, в том числе в Российской Федерации. Важную роль в снижении распространения кори, помимо вакцинации, играет ранняя диагностика. Поскольку иммуноферментный анализ (ИФА) обладает низкой чувствительностью при диагностике на ранних сроках заболевания корью, когда пациент наиболее заразен, необходимы прямые методы выявления вируса [1–3]. Наиболее эффективным из таких методов является полимеразная цепная реакция (ПЦР) благодаря ее высокой чувствительности и специфичности. Метод ПЦР рекомендован Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) для обнаружения вируса кори в продромальный период заболевания и в течение 14 дней после появления сыпи<sup>1</sup>.

В 2024 г. в Российской Федерации были обновлены клинические рекомендации по ведению больных корью, включившие метод ПЦР с целью идентификации вируса кори и подтверждения диагноза у всех пациентов с подозрением на коревую инфекцию (подозрительный или вероятный случай), а также у детей, рожденных от матерей, переболевших корью в третьем триместре беременности<sup>2</sup>. Единственным зарегистрированным в России (2022 г.) набором для молекулярной диагностики кори является «АмплиТест Корь». Позднее в ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России) был разработан набор реагентов на основе метода петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) для выявления РНК вируса кори, обладающий аналитическими характеристиками, не уступающими зарегистрированному набору на основе ПЦР, и значительно превосходящий его по скорости анализа [4].

Однако методы изотермической амплификации до сих пор не получили широкого распространения в клинической практике. Это связано с новизной

метода и малым количеством работ, демонстрирующих его эффективность в выявлении высоковариабельных матриц. Несмотря на активное применение LAMP во время пандемии SARS-CoV-2 [5], необходимость использования как минимум 6 праймеров ограничивает его использование для выявления вариабельных вирусов [6].

В случае вариабельных вирусов полная комплементарность между нуклеотидными последовательностями праймеров и матрицей практически недостижима независимо от метода амплификации. Возникающие несоответствия могут приводить к снижению чувствительности анализа вплоть до получения ложноотрицательных результатов. Влияние мутаций на эффективность ПЦР было многократно показано для различных матриц [7, 8], в том числе в наших исследованиях [9]. В то же время работ, демонстрирующих влияние мутаций в местах посадки праймеров на эффективность LAMP, крайне мало.

Цель работы – оценить частоту встречаемости мутаций в местах связывания праймеров и их влияние на эффективность методов ПЦР и LAMP в выявлении РНК вируса кори.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Клинический материал*

Были исследованы 69 клинических образцов носоглоточного секрета, полученных в 2024 г. из лабораторий АО «ЛабКвест» (Москва, Россия), в которые образцы поступали из различных клиник Российской Федерации. Все образцы имели положительные результаты на наличие в них РНК вируса кори, полученные с использованием набора реагентов «АмплиТест Корь» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России).

### *Экстракция РНК вируса кори из клинических образцов*

Экстракцию РНК вируса кори проводили с использованием набора реагентов «АмплиТест РИБО-преп» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России).

### *Амплификация*

ПЦР, совмещенную с обратной транскрипцией, проводили с помощью набора реагентов

<sup>1</sup> Surveillance guidelines for measles, rubella and congenital rubella syndrome in the WHO European Region. Update December 2012. WHO Regional Office for Europe; 2012.

<sup>2</sup> Клинические рекомендации (утв. Министерством здравоохранения Российской Федерации). 2024.

«АмплиТест Корь» согласно инструкции производителя. Реакцию LAMP, совмещенную с обратной транскрипцией, выполняли с использованием методики, описанной ранее [4]. Амплификацию экстрагированных образцов проводили с помощью прибора Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Германия).

#### **Секвенирование**

Для выявления мутаций в местах связывания праймеров с матрицей все клинические образцы секвенировали по Сэнгеру с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific, США) и генетического анализатора Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific, США). Использовали пару праймеров, ограничивающих область ампликации вируса кори обоими методами (ПЦР и LAMP): tagtyggtgaatttagattggag и saaaagtaagatcgaccraagttc (длина ампликона 458 п.н.). Дополнительно полученные нуклеотидные последовательности использовали для генотипирования вируса кори.

#### **Базы данных и биоинформатический анализ**

Из базы данных Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnological Information, NCBI)<sup>3</sup> были выгружены все последовательности гена N вируса кори (15476 последовательностей на конец апреля 2025 г.). Проводили множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей с помощью программы MAFFT<sup>4</sup>. Выравнивание обрезали по области праймеров, используемых для секвенирования по Сэнгеру, с использованием программы Jalview 2.1<sup>5</sup> и повторно выравнивали (MAFFT), удаляя пустые и неполные последовательности. В итоге было получено 1080 последовательностей, содержащих область ампликации РНК вируса кори двумя методами (ПЦР и LAMP).

Для анализа каждого праймера выравнивание обрезали по области того или иного праймера или зонда. Кластеризацию последовательностей каждого праймера проводили с помощью программы CD-HIT-v4.8.1-2019-0228<sup>6</sup> (порог идентичности – 100%). Кластеры ранжировали по числу включенных в них представителей в порядке убывания. Кластеры с одной последовательностью исключали. Если олигонуклеотид содержал инозин или вырожденный нуклеотид,

то такая позиция не считалась мисмэтчем (несоответствием, несопадением).

Для построения филогенетического дерева полученное в MAFFT выравнивание 15476 последовательностей обрезали справа по 1596 нуклеотиду полногеномной последовательности, а слева по 721 нуклеотиду (граница левого праймера, используемого для секвенирования). Последовательности короче заданного порога исключали из анализа. В итоге осталось 1078 последовательностей, включающих области, фланкированные диагностическими праймерами, и регион N-гена, рекомендуемый для генотипирования вируса кори [10, 11]. Для уменьшения числа последовательностей проводили кластеризацию с идентичностью 98% с использованием программы CD-HIT-v4.8.1-2019-0228, получив 42 кластера. К ним добавили референсные последовательности 24 известных генотипов вируса кори [12]. После выравнивания и обрезки по наименьшей длине последовательности был получен фрагмент длиной 455 нуклеотидов (с 1142 по 1596 нуклеотид полногеномной последовательности, рекомендуемый для генотипирования вируса кори). Филогенетическое дерево строили для указанного фрагмента с использованием программы MEGA12<sup>7</sup> и алгоритма Neighbor-Joining и Bootstrap анализа (500 повторов). Визуализацию дерева, включая отображение значений Bootstrap (%) и выделение референсных последовательностей, проводили при помощи программы FigTree v.1.4.3<sup>8</sup>.

Для генотипирования клинических образцов использовали программу Nextclade v3.18.0<sup>9</sup>.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **Оценка репрезентативности выборки**

Для оценки репрезентативности выборки проанализированных нами нуклеотидных последовательностей генома вируса кори из базы данных NCBI был проведен анализ их генотипической принадлежности и актуальности. Филогенетический анализ (рис. S1, опубликован на сайте журнала<sup>10</sup>) показал равномерное распределение последовательностей по всем известным генотипам, включая актуальные (выявленные за последние 12 мес. на момент последнего обновления номенклатуры 20.05.2015 [12]).

<sup>3</sup> GenBank. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

<sup>4</sup> <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/large.html>

<sup>5</sup> [https://www-test.jalview.org/development/archive/Version-2\\_1/](https://www-test.jalview.org/development/archive/Version-2_1/)

<sup>6</sup> [https://usegalaxy.eu/?tool\\_id=cd\\_hit](https://usegalaxy.eu/?tool_id=cd_hit)

<sup>7</sup> <https://www.megasoftware.net/>

<sup>8</sup> [https://www.researchgate.net/figure/FigTree-v143-http-treebioedacuk-software-figtree-Phylogenetic-analysis-of-E1\\_fig1\\_353848815](https://www.researchgate.net/figure/FigTree-v143-http-treebioedacuk-software-figtree-Phylogenetic-analysis-of-E1_fig1_353848815)

<sup>9</sup> <https://clades.nextstrain.org/>

<sup>10</sup> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s1>

### **Частота встречаемости и расположение мутаций в местах посадки праймеров и зонда для методов LAMP и ПЦР**

В результате анализа 1080 нуклеотидных последовательностей генома вируса кори были получены данные по частоте встречаемости и положению мутаций для каждого праймера.

Согласно полученным данным для праймеров и зонда, используемых в ПЦР (*рис. S2*, опубликован на сайте журнала<sup>11</sup>), 85,5% последовательностей полностью комплементарны прямому праймеру, 88% – обратному праймеру и 98,8% – зонду. Более одной замены в областях прямого, обратного праймера или зонда обнаружено не было. Мутации в большинстве случаев значительно отстоят от 3'-конца праймера и 5'-конца зонда (*рис. 2*). Наиболее близко к 3'-концу прямого праймера расположены мутации в кластерах 2 и 4, а обратного – в кластерах 1 и 3. Для зонда абсолютное большинство последовательностей являются консервативными.

Для праймеров, используемых в LAMP (*рис. S3*, опубликован на сайте журнала<sup>12</sup>), была показана большая вариабельность в местах посадки праймеров по сравнению с методом ПЦР. Однако подавляющее большинство последовательностей не имело мутаций или имело только одну мутацию в местах посадки праймеров. Для внешних праймеров F3 и B3 99,4 и 99,3% последовательностей соответственно консервативны области выбранных праймеров или содержали только одну мутацию. Праймеры FIP (прямой внутренний праймер) и VIP (обратный внутренний праймер) имеют по два сайта связывания с матрицей (F1c и F2, B1c и B2 соответственно). Они взаимодействуют с противоположными цепями ДНК и поэтому оценивались как два отдельных олигонуклеотида. Праймеры FIP и VIP показали высокую консервативность: для областей F1c и F2 праймера FIP – 99,3 и 99,5%, а для областей B1c и B2 праймера VIP – 96,5 и 99,7% последовательностей были полностью консервативны выбранным праймерам либо имели всего одну замену. Петлевые праймеры LF (прямой петлевой праймер) и LB (обратный петлевой праймер) также высоко консервативны: 99,5% последовательностей для LF и 96,7% последовательностей для LB имели не более одной замены.

### **Частота встречаемости мутаций в нуклеотидных последовательностях вируса кори, выделенных из клинических образцов**

Анализ 69 клинических образцов с использованием разработанного набора на основе

метода LAMP и набора реагентов на основе ПЦР («АмлиТест Корь») показал высокую сходимость результатов (98,6%), что согласуется с нашими предыдущими данными [4]. Один образец был отрицательным в обоих тестах и один образец – отрицательным при использовании LAMP и положительным (Ct 30,52) в ПЦР.

После секвенирования и анализа нуклеотидных последовательностей с помощью программы CD-HIT с порогом идентичности 100% все образцы разделили на 5 кластеров. Используемые нами праймеры для секвенирования охватывают общую область расположения праймеров для обоих методов (нуклеотиды 721–1179 полногеномной последовательности). По данным программы Nextclade v3.18.0, один кластер был отнесен к генотипу B3 (18 образцов – 26,5% от всех изученных изолятов), остальные 4 кластера – к генотипу D8.

Детальный анализ по каждому олигонуклеотиду, входящему в состав реакционной смеси ПЦР, выявил только одну мутацию для прямого праймера ПЦР в 23 положении относительно 3'-конца, что соответствует кластеру 3 на *рисунке S2*. Для олигонуклеотидов, используемых в LAMP, было выявлено по одной мутации в трех из восьми анализируемых фрагментах (*табл. 1*), все они соответствовали кластерам 1 и 2 на *рисунке S2*.

### **Оценка влияния мутаций в местах посадки праймеров на чувствительность методов LAMP и ПЦР для обнаружения РНК вируса кори**

Для оценки влияния мутаций на чувствительность методов были отобраны 3 образца с мутациями в местах посадки праймеров для LAMP (образцы 18а, 31а и 32а, по 3 мутации в каждом образце, *табл. 2*) и 3 образца с мутациями в местах посадки праймеров для ПЦР (образцы 19а, 22а и 30а, 1 мутация в прямом праймере в каждом образце, *табл. 3*). При этом образцы с мутациями в местах посадки праймеров LAMP не имели мутаций в местах посадки праймеров, используемых в ПЦР, и наоборот. Тестирование 10-кратных разведений РНК, выделенных из этих образцов (*табл. 2, 3*), показало большую чувствительность метода ПЦР по сравнению с методом LAMP. Число разведений РНК, прошедших в исследовании как положительные, в ПЦР было больше на 1–2 порядка, чем в LAMP, даже при наличии мутаций в местах посадки праймеров, что согласуется с ранее полученными данными [4, 13, 14].

Для изучения влияния выявленных мутаций на чувствительность обоих методов все представленные в *таблице 1* мутации были внесены

<sup>11</sup> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s2>

<sup>12</sup> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s3>

**Таблица 1.** Мутации в местах посадки праймеров и зонда, выявленные в нуклеотидных последовательностях вируса кори, выделенных из клинических образцов**Table 1.** Mutations in primers and probe sites identified in the nucleotide sequences of measles virus isolated from clinical samples

| Метод<br><i>Method</i>   | Последовательность праймера<br><i>Primer sequence</i>                      | Тип несоответствия<br><i>Mismatch type</i> | Расстояние от 3'-конца праймера<br><i>Distance from 3'-end primer</i> | % последовательностей<br><i>% of sequences</i> | Количество образцов<br><i>Samples count</i> | Кластер<br><i>Cluster</i> |
|--|--|--|---|--|---|---------------------------|
| ПЦР<br><i>PCR</i>  | Прямой праймер / <i>Forward primer</i><br>ctgacyattaagtttgagatagara        | -  | -   | 77,9   | 53  | -                         |
|  |  | G→A  | 23  | 22,1   | 15  | 3                         |
|  | Обратный праймер / <i>Backward primer</i><br>tatcmacacttgagtcctgatg        | -  | -   | 100  | 68  | -                         |
|  | Зонд / <i>Probe</i><br>atgtaucctgctctyggactgcatg                           | -  | -   | 100  | 68  | -                         |
| LAMP   | Прямой праймер / <i>Forward primer</i><br>F3: ccgaaatgatatgygacattga       | -  | -   | 73,5   | 50  | -                         |
|  |  | C→T  | 21  | 26,5   | 18  | 1                         |
|  | Обратный праймер / <i>Backward primer</i><br>B3: gagaactcaattcagaacaag     | -  | -   | 100  | 68  | -                         |
|  | Обратный праймер / <i>Backward primer</i><br>FIP(F1c): tcttgactgcatgaatttc | -  | -   | 100  | 68  | -                         |
|  | Прямой праймер / <i>Forward primer</i><br>FIP(F2): ggcaggaytagccagt        | -  | -   | 100  | 68  | -                         |
|  | Прямой праймер / <i>Forward primer</i><br>BIP(B1c): ggtgagttatccacacttgatc | -  | -   | 73,5   | 50  | -                         |
|  |  | G→A  | 18  | 26,5   | 18  | 1                         |
|  | Обратный праймер / <i>Backward primer</i><br>BIP(B2): gaaactgcaccctayatg   | -  | -   | 73,5   | 50  | -                         |
|  |  | A→G  | 3   | 26,5   | 18  | 2                         |
| Обратный праймер / <i>Backward primer</i><br>LF: tggatagaaactatgtaucctgc | -  | -  | 100   | 68   | -   |                           |
| Прямой праймер / <i>Forward primer</i><br>LB: tgatgaatctttaccagcaaatg    | -  | -  | 100   | 68   | -   |                           |

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

*Примечание.* LAMP – петлевая изотермическая амплификация; «-» отсутствие мутаций в месте посадки праймеров или зонда.  
*Note.* LAMP, loop-mediated isothermal amplification; -, no mutations in primer binding sites or probe.

в последовательности праймеров (один праймер для ПЦР и четыре для LAMP) таким образом, чтобы новые праймеры стали полностью или частично комплементарны последовательностям с мутациями. Последующее тестирование 10-кратных разведений РНК шести ранее отобранных образцов с мутациями проводили для оценки влияния мутаций на скорость и чувствительность ПЦР и LAMP. Использовали смеси со стандартными праймерами из наборов реагентов (смесь А) и с модифицированными праймерами (смеси В, С, D, F, G) (табл. 4).

В ПЦР (табл. 5) использование смеси В с модифицированным праймером увеличило число разведений РНК, прошедших в исследовании как положительные, на порядок для одного из трех образцов, а для двух других различий не было выявлено. При этом для предельных разведений с положительным результатом наблюдалось наибольшее отставание по пороговым циклам в случае мисмэтча, что может указывать на снижение чувствительности метода при тестировании низких концентраций вируса.

В LAMP (табл. 6) праймер F3 (смесь С) практически не оказывал влияние на скорость реакции. При использовании праймера BIP с мутацией только в сайте B1c (смесь F) разницы в скорости реакции и чувствительности также не наблюдалось. Неожиданные результаты были получены при использовании праймера BIP с одной мутацией в сайте B2 (смесь G) и с двумя внесенными мутациями (смесь D): в обоих случаях праймеры сработали аномально хуже, приведя к уменьшению чувствительности и скорости реакции, несмотря на то что праймер с двумя мутациями был полностью комплементарен исследуемому образцу.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярно-генетические методы (ПЦР и LAMP) играют важную роль в ранней диагностике кори, когда пациент наиболее заразен, а ИФА малоинформативен [2, 15, 16]. Основным фактором при разработке молекулярно-генетических методик для выявления РНК вируса кори является консервативность области генома вируса, на которую направлены диагностические

**Таблица 2.** Результаты ПЦР и LAMP при тестировании 10-кратных разведений РНК вируса кори с мутациями в местах связывания праймеров для метода LAMP

**Table 2.** PCR and LAMP results for 10-fold dilutions of measles virus RNA with mismatches in LAMP primer binding sites

| Разведение<br><i>Dilution</i> | Образцы с мутациями в местах связывания праймеров LAMP<br><i>Samples with mutations in LAMP primers binding sites</i> |                   |                      |                   |                      |                      |
|-------------------------------|---|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
|                               | 18a   |                   | 31a                  |                   | 32a                  |                      |
|                               | LAMP, Ct  | ПЦР, Ct / PCR, Ct | LAMP, Ct             | ПЦР, Ct / PCR, Ct | LAMP, Ct             | ПЦР, Ct / PCR, Ct    |
| 10 <sup>-1</sup>              | 8,31  | 20,21             | 8,25                 | 20,14             | 12,28                | 24,31                |
| 10 <sup>-2</sup>              | 10,37   | 23,79             | 10,51                | 23,80             | 22,87                | 28,43                |
| 10 <sup>-3</sup>              | 17,25   | 27,91             | 21,01                | 28,22             | Отриц. / <i>Neg.</i> | 32,62                |
| 10 <sup>-4</sup>              | 19,46   | 31,89             | Отриц. / <i>Neg.</i> | 31,33             | Отриц. / <i>Neg.</i> | 33,84                |
| 10 <sup>-5</sup>              | Отриц. / <i>Neg.</i>  | 33,35             | Отриц. / <i>Neg.</i> | 34,39             | Отриц. / <i>Neg.</i> | Отриц. / <i>Neg.</i> |

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

*Примечание.* LAMP – петлевая изотермическая амплификация; Ct – пороговый цикл; отриц. – значение Ct не определено.  
*Note.* LAMP, loop-mediated isothermal amplification; Ct, threshold cycle; neg., threshold cycle not determined.

**Таблица 3.** Результаты ПЦР и LAMP при тестировании 10-кратных разведений РНК вируса кори с мутациями в местах связывания праймеров для метода ПЦР

**Table 2.** PCR and LAMP results for 10-fold dilutions of measles virus RNA with mismatches in PCR primer binding sites

| Разведение<br><i>Dilution</i> | Образцы с мутациями в местах связывания праймеров ПЦР<br><i>Samples with mismatches in PCR primer binding sites</i> |                   |                      |                   |                      |                      |
|-------------------------------|---|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
|                               | 19a   |                   | 22a                  |                   | 30a                  |                      |
|                               | LAMP, Ct  | ПЦР, Ct / PCR, Ct | LAMP, Ct             | ПЦР, Ct / PCR, Ct | LAMP, Ct             | ПЦР, Ct / PCR, Ct    |
| 10 <sup>-1</sup>              | 4,91  | 19,18             | 20,13                | 20,14             | 6,33                 | 23,36                |
| 10 <sup>-2</sup>              | 6,27  | 22,82             | 24,24                | 23,80             | 7,49                 | 27,15                |
| 10 <sup>-3</sup>              | 9,66  | 27,52             | 28,32                | 28,22             | 11,21                | 31,63                |
| 10 <sup>-4</sup>              | 17,88   | 31,15             | 32,00                | 31,33             | Отриц. / <i>Neg.</i> | Отриц. / <i>Neg.</i> |
| 10 <sup>-5</sup>              | Отриц. / <i>Neg.</i>  | 35,12             | Отриц. / <i>Neg.</i> | 34,39             | Отриц. / <i>Neg.</i> | Отриц. / <i>Neg.</i> |

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

*Примечание.* LAMP – петлевая изотермическая амплификация; Ct – пороговый цикл; отриц. – значение Ct не определено.  
*Note.* LAMP, loop-mediated isothermal amplification; Ct, threshold cycle; neg., threshold cycle not determined.

**Таблица 4.** Праймеры, используемые в реакционных смесях для LAMP и ПЦР

**Table 4.** Primers for LAMP and PCR mixes

| Смесь<br><i>Mix</i> | Праймер<br><i>Primer</i> | 5'-3'-последовательность<br><i>5'-3'-sequence</i> | Метод<br><i>Method</i> |
|---------------------|--------------------------|---|------------------------|
| B                   | Forward mut              | ctaacyattaagtttgggtagara                          | ПЦР/ PCR<br><br>LAMP   |
| C                   | F3 mut                   | ctgaaatgatatgyacattga                             |                        |
| D                   | BIP mut                  | ggtgaattatccacacttgagcttttcatrtagggtgcagtc        |                        |
| F                   | MIBIPmod1                | ggtgaattatccacacttgagcttttcatrtagggtgcagtttc      |                        |
| G                   | MIBIPmod2                | ggtgagttatccacacttgagcttttcatrtagggtgcagtc        |                        |

Таблица составлена авторами / The table was prepared by the authors

*Примечание.* LAMP – петлевая изотермическая амплификация. Жирным шрифтом выделены внесенные в праймеры мутации, выявленные в клинических образцах.

*Note.* LAMP, loop-mediated isothermal amplification. Mutations introduced in the primers and identified in clinical samples are highlighted in bold.

олигонуклеотиды. Несмотря на относительно высокую генетическую стабильность вируса кори (скорость накопления мутаций (3,4–9,02)×10<sup>-4</sup> замен/основание/год [17]) по сравнению с другими РНК-вирусами, выбор матрицы для праймеров имеет решающее значение для обеспечения высокой чувствительности и специфичности

анализа. В качестве матрицы для обоих методов (ПЦР и LAMP) нами был выбран ген внутреннего структурного белка нуклеопротеина (N-ген), сочетающий достаточную консервативность с высоким уровнем транскрипции [18].

Тем не менее несоответствия между праймером и матрицей неизбежны независимо

от используемой методики. Любое несовпадение в последовательности праймера снижает термическую стабильность дуплекса праймера и матрицы и может влиять на чувствительность ПЦР или LAMP.

В настоящей работе мы оценили частоту встречаемости мутаций в местах посадки праймеров и зонда, используемых в наборах реагентов на основе LAMP и ПЦР для выявления РНК вируса кори. В отличие от нашего предыдущего исследования, в котором было

проанализировано 696 полногеномных нуклеотидных последовательностей вируса кори [4], в настоящей работе были изучены все последовательности, представленные в базе данных NCBI, что почти вдвое увеличило объем выборки. Филогенетический анализ этих образцов показал, что выборка включает все генотипы вируса кори, в том числе актуальные.

Согласно полученным данным, более 99% последовательностей полностью комплементарны праймерам, используемым в ПЦР, или имеют

**Таблица 5.** Результаты ПЦР для 10-кратных разведений РНК вируса кори с мутациями в местах посадки праймеров  
**Table 5.** PCR results for 10-fold dilutions of measles virus RNA with mutations in primer binding sites

| Разведение образца<br><i>Sample dilution</i> | ПЦР, Ct / <i>PCR, Ct</i>        |                        |                                 |                        |                                 |                        |
|--|---------------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|
|  | Образец 22а / <i>Sample 22a</i> |                        | Образец 19а / <i>Sample 19a</i> |                        | Образец 30а / <i>Sample 30a</i> |                        |
|  | Смесь А / <i>Mix A</i>          | Смесь В / <i>Mix B</i> | Смесь А / <i>Mix A</i>          | Смесь В / <i>Mix B</i> | Смесь А / <i>Mix A</i>          | Смесь В / <i>Mix B</i> |
| 10 <sup>-1</sup>                             | 21,68                           | 20,46                  | 20,72                           | 19,23                  | 25,61                           | 24,08                  |
| 10 <sup>-2</sup>                             | 27,88                           | 26,00                  | 25,78                           | 24,23                  | 31,81                           | 29,12                  |
| 10 <sup>-3</sup>                             | 35,34                           | 32,08                  | 33,03                           | 29,78                  | Отриц. / <i>Neg.</i>            | 35,70                  |
| 10 <sup>-4</sup>                             | 40,51                           | 36,61                  | 38,16                           | 34,32                  | Отриц. / <i>Neg.</i>            | Отриц. / <i>Neg.</i>   |
| 10 <sup>-5</sup>                             | Отриц. / <i>Neg.</i>            | Отриц. / <i>Neg.</i>   | Отриц. / <i>Neg.</i>            | Отриц. / <i>Neg.</i>   | Отриц. / <i>Neg.</i>            | Отриц. / <i>Neg.</i>   |

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

*Примечание.* Ct – пороговый цикл; отриц. – значение Ct не определено. А – реакционная смесь со стандартными праймерами из набора реагентов; В – реакционная смесь с модифицированными праймерами.

*Note.* Ct, threshold cycle; neg., threshold cycle not determined. A, standard mix with primers from the reagent kit; B, mix with modified primers.

**Таблица 6.** Результаты LAMP для 10-кратных разведений РНК вируса кори с мутациями в местах посадки праймеров  
**Table 6.** LAMP results for 10-fold dilutions of measles virus RNA with mismatches in primer binding sites

| Разведение образца<br><i>Sample dilution</i> | LAMP, Ct                        |                        |                        |                        |                        |
|--|---------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|  | Образец 18а / <i>Sample 18a</i> |                        |                        |                        |                        |
|  | Смесь А / <i>Mix A</i>          | Смесь С / <i>Mix C</i> | Смесь D / <i>Mix D</i> | Смесь F / <i>Mix F</i> | Смесь G / <i>Mix G</i> |
| 10 <sup>-1</sup>                             | 11,22                           | 13,33                  | 30,03                  | 11,18                  | 32,44                  |
| 10 <sup>-2</sup>                             | 13,10                           | 21,15                  | 36,76                  | 14,53                  | Отриц.                 |
| 10 <sup>-3</sup>                             | 14,72                           | Отриц. / <i>Neg.</i>   | Отриц. / <i>Neg.</i>   | Отриц. / <i>Neg.</i>   | Отриц. / <i>Neg.</i>   |
| <b>Образец 31а / <i>Sample 31a</i></b>       |                                 |                        |                        |                        |                        |
| 10 <sup>-1</sup>                             | 11,55                           | 13,59                  | 29,6                   | 11,34                  | 32,49                  |
| 10 <sup>-2</sup>                             | 13,40                           | 20,15                  | 35,56                  | 14,62                  | 36,76                  |
| 10 <sup>-3</sup>                             | 26,35                           | Отриц. / <i>Neg.</i>   | Отриц. / <i>Neg.</i>   | 36,76                  | Отриц. / <i>Neg.</i>   |
| <b>Образец 32а / <i>Sample 32a</i></b>       |                                 |                        |                        |                        |                        |
| 10 <sup>-1</sup>                             | 14,02                           | 14,02                  | 34,69                  | 14,87                  | 38,01                  |
| 10 <sup>-2</sup>                             | 21,67                           | 16,46                  | Отриц. / <i>Neg.</i>   | 22,29                  | Отриц. / <i>Neg.</i>   |
| 10 <sup>-3</sup>                             | Отриц. / <i>Neg.</i>            | Отриц. / <i>Neg.</i>   | Отриц. / <i>Neg.</i>   | Отриц. / <i>Neg.</i>   | Отриц. / <i>Neg.</i>   |

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

*Примечание.* LAMP – петлевая изотермическая амплификация; Ct – пороговый цикл; отриц. – значение Ct не определено. А – реакционная смесь со стандартными праймерами из набора реагентов; С, D, F, G – реакционные смеси с модифицированными праймерами.

*Note.* LAMP, loop-mediated isothermal amplification; Ct, threshold cycle; neg., samples threshold cycle not determined. A, standard mix with primers from the reagent kit; C, D, F, G, mixes with modified primers.

только одну замену в местах их посадки. Для LAMP была показана чуть большая вариабельность в области посадки праймеров: 96,5% последовательностей, представленных в базе данных NCBI, комплементарны праймерам или содержат единичные мутации. Таким образом, нам удалось выбрать не только максимально консервативную область в гене нуклеопротеина (919–1008 – для ПЦР, 860–1071 – для LAMP), но и подобрать праймеры, которые могут эффективно выявлять РНК вируса кори в клинических образцах обоими методами, независимо от генотипа.

Анализ последовательностей вируса кори, полученных из клинических образцов от пациентов в Российской Федерации, показал наличие одной мутации в области посадки прямого праймера для ПЦР и по одной мутации в областях праймеров F3 и VIP (B1c и B2) для LAMP. В модельных экспериментах было показано небольшое снижение чувствительности ПЦР в случае единичной мутации при крайне низких концентрациях вируса. Несмотря на расположение мутации в прямом праймере достаточно далеко от 3'-конца праймера (23-е положение), в крайних разведениях РНК наблюдалось отставание примерно на 4 цикла, где эта мутация присутствовала, а для одного из трех образцов число разведений РНК с положительным результатом было на одно больше при использовании полностью комплементарного прямого праймера.

В случае использования метода LAMP для выявления РНК вируса кори нами установлено, что замены во внешних праймерах

F3 и B3, используемых для инициации реакции, не влияют на скорость и чувствительность реакции, что согласуется с данными литературы [19]. В отличие от внешних праймеров, петлевой праймер VIP внес гораздо больший вклад в реакцию. Механизм этого влияния остается неясным, поскольку праймер с двумя внесенными мутациями и полностью комплементарный РНК вируса кори сработал аномально хуже, чем праймер с двумя мисмэтчами к этим РНК-последовательностям, приводя к уменьшению скорости реакции, но не к снижению чувствительности анализа. Негативное влияние на реакцию оказывала только замена в сайте B2 праймера VIP, тогда как замена в сайте B1c не влияла на ее скорость. Это может косвенно указывать на наличие конформационных особенностей длинных петлевых праймеров, негативно влияющих на скорость реакции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулярно-генетические методы – ПЦР и LAMP – эффективно выявляют РНК вируса кори в клинических образцах независимо от генотипа. При использовании метода ПЦР в большинстве случаев одиночные мутации мало влияли на эффективность амплификации, что согласуется с нашими предыдущими данными по диагностике ВИЧ. В случае LAMP одиночные мутации также в большинстве случаев не влияли на чувствительность анализа, однако влияние структуры петлевых праймеров на скорость реакции требует дальнейшего изучения.

## Литература/References

- Cui A, Mao N, Wang H, et al. Importance of real-time RT-PCR to supplement the laboratory diagnosis in the measles elimination program in China. *PLoS One*. 2018;13(11):e0208161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208161>
- Ma R, Lu L, Suo L, et al. Evaluation of the adequacy of measles laboratory diagnostic tests in the era of accelerating measles elimination in Beijing, China. *Vaccine*. 2019;37(29):3804–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.058>
- Woo G, Wong AH, Lee WY, et al. Comparison of laboratory diagnostic methods for measles infection and identification of measles virus genotypes in Hong Kong. *J Med Virol*. 2010;82(10):1773–81. <https://doi.org/10.1002/jmv.21888>
- Цыганова ГМ, Носова АО, Шипулина ОЮ и др. Разработка первого российского LAMP-набора для диагностики кори. *Лабораторная служба*. 2024;13(4):28–35. Tsyganova GM, Nosova AO, Shipulina OYu, et al. Development of a first LAMP kit for measles diagnostics. *Laboratory Service*. 2024;13(4):28–35 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/labs20241304128>
- Thompson D, Lei Y. Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection. *Sens Actuators Rep*. 2020;2(1):100017. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2020.100017>
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(12):e63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Stadhouders R, Pas SD, Anber J, et al. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *J Mol Diagn*. 2010;12(1):109–17. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090035>
- Zimmermann F, Urban M, Krüger C, et al. In vitro evaluation of the effect of mutations in primer binding sites on detection of SARS-CoV-2 by RT-qPCR. *J Virol Methods*. 2022;299:114352. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114352>
- Bogoslovskaya EV, Tsyganova GM, Nosova AO, Shipulin GA. Analysis of the frequency of mutations at diagnostic oligonucleotide sites and their impact on the efficiency of PCR for HIV1. *Microorganisms*. 2023;11(12):2838. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122838>
- Measles virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epidemiol Rec*. 2012;87(9):73–81.
- Expanded Programme on Immunization (EPI). Standardization of the nomenclature for describing the genetic char-

- acteristics of wild-type measles viruses. *Wkly Epidemiol Rec.* 1998;73(35):265–9.
12. Genetic diversity of wild-type measles viruses and the global measles nucleotide surveillance database (MeaNS). *Wkly Epidemiol Rec.* 2015;90(30):373–80.
  13. Choi G, Moehling TJ, Meagher RJ. Advances in RT-LAMP for COVID-19 testing and diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2023;23(1):9–28. <https://doi.org/10.1080/14737159.2023.2169071>
  14. Tapia-Sidas DA, Vargas-Hernández BY, Ramírez-Pool JA, et al. Starting from scratch: Step-by-step development of diagnostic tests for SARS-CoV-2 detection by RT-LAMP. *PLoS One.* 2023;18(1):e0279681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279681>
  15. Носова АО, Богословская ЕВ, Шипулин ГА. Современные подходы и перспективы развития лабораторной диагностики кори. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2023;25(1):4–12. Nosova AO, Bogoslovskaya EV, Shipulin GA. Current approaches and prospects for the development of laboratory diagnosis of measles. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2023;25(1):4–12 (In Russ.). <https://doi.org/10.36488/cmacc.2023.1.4-12>
  16. Tipples GA, Hamkar R, Mohktari-Azad T, et al. Assessment of immunoglobulin M enzyme immunoassays for diagnosis of measles. *J Clin Microbiol.* 2003;41(10):4790–2. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4790-4792.2003>
  17. Beaty SM, Lee B. Constraints on the genetic and antigenic variability of measles virus. *Viruses.* 2016;8(4):109. <https://doi.org/10.3390/v8040109>
  18. Schneider-Schaulies S, Liebert UG, Baczko K, et al. Restriction of measles virus gene expression in acute and subacute encephalitis of Lewis rats. *Virology.* 1989;171(2):525–34. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90622-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90622-3)
  19. Tamanaha E, Zhang Y, Tanner NA. Profiling RT-LAMP tolerance of sequence variation for SARS-CoV-2 RNA detection. *PLoS One.* 2022;17(3):e0259610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259610>

**Дополнительная информация.** На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены рисунки S1–S3.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s2>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s3>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Г.М. Цыганова** — планирование и проведение экспериментальной части работы с клиническим материалом, обработка данных, анализ результатов, написание текста рукописи; **Е.Д. Богословская** — работа с базами данных, биоинформатический анализ; **Г.А. Шипулин** — дизайн исследования, редактирование текста рукописи; **О.Ю. Шипулина** — сбор клинического материала; **Е.В. Богословская** — дизайн исследования, формулировка выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

**Additional information.** Figures S1–S3 are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.*

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s2>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s3>

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **G.M. Tsyganova** performed the experiments, processed data, analysed the results, and drafted the manuscript. **E.D. Bogoslovskaya** processed databases and performed bioinformatics analysis. **G.A. Shipulin** designed the study and edited the article. **O.Yu. Shipulina** performed the experiments. **E.V. Bogoslovskaya** designed the study, formulated the conclusions and approved the final version for publication.

## Об авторах / Authors

**Цыганова Галина Михайловна / Galina M. Tsyganova**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-1527-949X>

**Богословская Екатерина Денисовна / Ekaterina D. Bogoslovskaya**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-9891-2565>

**Шипулин Герман Александрович, канд. мед. наук / German A. Shipulin, Cand. Sci. (Med.)**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3668-6601>

**Шипулина Ольга Юрьевна, канд. мед. наук / Olga Yu. Shipulina, Cand. Sci. (Med.)**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4679-6772>

**Богословская Елена Владимировна, д-р мед. наук / Elena V. Bogoslovskaya, Dr. Sci. (Med.)**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3250-6498>

Поступила 03.10.2025

После доработки 05.02.2026

Принята к публикации 13.03.2026

Received October 3, 2025

Revised February 5, 2026

Accepted March 13, 2026