

ПОЛУЧЕНИЕ РНК-КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА И ПЕРСПЕКТИВА ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ МЕТОДОМ LAMP

Е.И. Кривошеина, К.Р. Беличенко, Е.В. Чуб, М.Ю. Карташов

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия

E-mail: katr962@mail.ru

Для цитирования: Получение РНК-контрольного образца и перспектива его применения для диагностики желтой лихорадки методом LAMP / Е.И. Кривошеина, К.Р. Беличенко, Е.В. Чуб, М.Ю. Карташов // Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). – 2025. – № 3 (76). – С. 261–268. – DOI: 10.31677/2072-6724-2025-76-3-261-268.

Ключевые слова: РНК-контроли, диагностика, петлевая изотермическая амплификация, вирус желтой лихорадки.

Реферат. Цель исследования заключалась в создании контрольного образца РНК для диагностики вируса желтой лихорадки (ВЖЛ) методом LAMP. Получены два контрольных образца: рекомбинантная плазмидная ДНК (pCR2.1-YFV-K+) и мРНК (РНК-YFV-K+). В ходе оценки аналитической чувствительности методом LAMP установлено, что оба образца демонстрируют сопоставимый уровень предела детекции, равный 10^4 копий/мл, что позволяет эффективно выявлять генетический материал вируса в первые дни симптомов заболевания. Исследование стабильности образцов показало, что при температуре от -15 до -25 °C оба образца сохраняют работоспособность даже после десятикратного цикла размораживания/замораживания. При температуре от 2 до 8 °C образцы определяются как положительные в течение семи дней хранения. Однако при комнатной температуре стабильность снижается: для pCR2.1-YFV-K+ она сохраняется до 72 ч, а для РНК-YFV-K+ – до 48 ч. Для обеспечения стабильности образцы следует хранить в условиях низких температур (от -15 до -25 или от 2 до 8 °C). Учитывая результаты, РНК-YFV-K+ может использоваться как контроль аналитической чувствительности и правильности проведения реакции обратной транскрипции с последующей амплификацией методом LAMP, что важно для детекции РНК-содержащего вируса желтой лихорадки.

OBTAINING RNA CONTROL SAMPLE AND PROSPECTS OF ITS APPLICATION FOR DIAGNOSTICS OF YELLOW FEVER BY THE LAMP METHOD

E.I. Krivosheina, K.R. Belichenko, E.V. Chub, M.Yu. Kartashov

State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector», Kol'tsovo, Russia

E-mail: katr962@mail.ru

Keywords: RNA controls, diagnostics, loop-mediated isothermal amplification, yellow fever virus.

Abstract. The aim of the study was to create a control RNA sample for yellow fever virus (YFV) diagnostics using the LAMP method. Two control samples were obtained: recombinant plasmid DNA (pCR2.1-YFV-K+) and mRNA (RNA-YFV-K+). During the assessment of the analytical sensitivity by the LAMP method, it was found that both samples demonstrated a comparable detection limit of 10^4 copies/ml, which allows for effective detection of the viral genetic material in the first days of disease symptoms. A study of the sample stability showed that at a temperature of -15 to -25 °C, both samples retain their functionality even after tenfold defrosting/freezing. At a temperature of 2 to 8 °C, the samples are determined as positive for 7 days of storage. However, stability decreases at room temperature: for pCR2.1-YFV-K+ it remains up to 72 hours, and for RNA-YFV-K+ — up to 48 hours. To ensure stability, samples should be stored at low temperatures (-15 to -25 °C or 2 to 8 °C). Based on the results, RNA-YFV-K+ can be used as a control for analytical sensitivity and correctness of the reverse transcription reaction followed by amplification by the LAMP method, which is important for the detection of RNA-containing yellow fever virus.

В качестве положительного контроля диагностического набора реагентов, основанного на различных вариантах метода ОТ-ПЦР, можно использовать как

ДНК-, так и РНК-материал. РНК-контроли не уступают в чувствительности ДНК, однако нестабильны из-за деградации РНКазой [1, 2].

ДНК имеет более устойчивую структуру, что позволяет ее легко транспортировать и хранить. Несмотря на это, РНК-контроль необходим в наборах реагентов, основанных на методах амплификации, с вложенной обратной транскрипцией, для проверки работы ревертазы [3]. Использование ДНК-контролей вызывает высокий риск ложноотрицательных результатов при диагностике заболеваний, вызванных РНК-содержащими вирусами [1].

Положительный контроль на основе ампликонов из положительных образцов или *in vitro* транскрибировании однородной для мишени последовательности позволяет оценить работу всех компонентов реакции, но в случае контаминации непосредственно образцов или его контаминации положительными образцами, такие ложноположительные результаты будет сложно отличить от истинно положительных результатов. Возможно использовать положительные контроли, которые подразумевают наличие других праймеров и амплификацию другой мишени, отличной от положительных образцов. Однако в таком случае не представляется возможной оценка работы самих диагностических праймеров [2].

Еще в 2006 г. Цзи-Мин Чену с соавторами удалось получить стабильный РНК-контроль для ОТ-ПЦР в реальном времени для обнаружения генетического материала вируса Нипах. Для решения возможной проблемы с контаминацией была использована последовательность ДНК, содержащая небольшую делецию между участками посадки праймеров. Последовательность клонировали в вектор, амплифицировали с использованием праймеров с T7 промотором на 5' концах. Так получили дцРНК *in vitro*, которая показала высокую стабильность: она лишь немного деградировала после инкубации при 37 °C в течение 24 ч и при инкубации с РНКазой I в течение 1 ч [4].

В статье М. Snow и соавторов [5] был разработан РНК-контроль для обнаружения вируса инфекционной анемии лосося (*Isavirus salaris*) с использованием ПЦР в реальном времени. Полученные транскрипты РНК *in vitro* содержали две последовательности: целевой фрагмент вируса (включая последовательность распознавания праймеров и зонда) и дополнительную искусственную контрольную последовательность, на которую нацелен второй зонд, включающий другой флуорофор. При детектировании результатов контрольный образец имеет два положительных сигнала на двух разных каналах, что позволяет

выявлять случаи ложноположительных результатов из-за контаминации исследуемых образцов положительным контролем [5].

В 2021 г. были разработаны химически модифицированные РНК-контроли (фосфороселенаотные и фосфоротиоатные) [2]. При замене одного атома кислорода на селен или серу, такие РНК демонстрируют высокую стабильность и специфичность. Их эффективно распознавала T7 полимеразы и обратная транскриптаза. Таким образом, химически модифицированные РНК-контроли обладают потенциалом в диагностических системах, однако отличить контаминацию образцов положительным контролем не удастся.

Также известно об использовании РНК-контролей для диагностики вирусов Чикунгунья [6], папилломы человека (для выявления транскриптов в клетках яичников) [7], SARS-CoV-2 [8] и других патогенов.

Желтая лихорадка (ЖЛ) – острое вирусное заболевание, возбудителем которой является представитель семейства *Flaviviridae* рода *Orthoflavivirus* – вирус желтой лихорадки (ВЖЛ) [9]. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно во всем мире регистрируется примерно от 80 до 200 тыс. случаев желтой лихорадки, из которых 30–60 тыс. заканчиваются летальным исходом, но реальную ситуацию оценить очень сложно, так как в ряде эндемичных стран в связи со сложной политической и экономической ситуацией не ведется реальная статистика заболеваемости [10, 11].

В настоящее время отечественная диагностика ЖЛ представлена только ПЦР тест-системами, время анализа которыми занимает более 3 ч без учета времени, затраченного на доставку проб в лабораторию [12]. В связи с ростом объема миграционных процессов, международного туризма и участвовавшими посещениями гражданами России стран, расположенных в тропических и субтропических поясах земного шара, и обнаружением на территории южных регионов России устойчивых популяций комаров видов *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*, являющихся основными переносчиками ВЖЛ, встает вопрос о разработке быстрых и эффективных тестов для подтверждения завозных случаев и изучения возможного распространения вируса комари-переносчиками на территории РФ [13, 14].

Обнаружение генетического материала вирусов петлевой изотермической амплификации (LAMP – Loop-Mediated Isothermal Amplification) представляет собой высокоспецифичный и бы-

стрый метод диагностики инфекции на начальных этапах заболевания [15]. Использование РНК-контрольных образцов для набора реагентов, использующих такой метод амплификации, позволит в полной мере изучить его диагностические характеристики и перспективу применения для диагностики ЖЛ или других заболеваний, вызываемых РНК-содержащими вирусами.

Цель исследования – получение РНК-положительного контрольного образца и оценка перспективы его применения для выявления методом LAMP генетического материала РНК-содержащих вирусов (на примере вируса желтой лихорадки).

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для получения положительного контрольного образца были использованы следующие методы: ПЦР для наработки ампликона, клонирование в плазмиду pCR2.1-ТОРО («Thermo Fisher Scientific», США), трансформацию клеток *E. coli* штамма TOP10 (Thermo Fisher Scientific, США), очистки рекомбинантной плазмидной ДНК набором diaGene для выделения плазмидной ДНК из бактерий («Диаэм», Россия), секвенирование по методу Сэнгера с использованием набора реагентов для секвенирования BigDye Terminator v3.1 и формамида Hi-Di (Thermo Fisher Scientific, США).

Транскрипцию *in vitro* проводили с использованием коммерческого набора для проведения Т7-транскрипции *in vitro* (Биолабмикс, Россия) согласно инструкции производителя. Далее реакционную смесь инкубировали при 37 °С в течение четырех часов и обрабатывали ДНКазой I (ThermoFisher, США), следуя инструкции производителя.

Флуориметрическое определение концентрации ДНК/РНК проводили на приборе NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия).

Приготовление модельных образцов осуществляли с помощью последовательных десятикратных разведений полученных контрольных образцов (pCR2.1-YFV-K+ и РНК-YFV-K+) до концентраций от 10⁷ до 10 копий/мл. Для приготовления модельных образцов использовали стерильную воду свободную от РНКаз и ДНКаз (Биолабмикс, Россия).

Постановку реакции петлевой изотермической амплификации осуществляли, используя разработанный комплект олигонуклеотидных праймеров: YFV-F3 5'-ARAAGATYACGGCYCACC-3', YFV-B3 5'-CAGATGTCACATTTAGGAGC-3', YFV-FIP 5'-GGCCACCACTCTYTAACTT

TCCTTTTTTGGTTGTGGAAAATGCTGG-3', YFV-BIP 5'-CCGTTCCCATGATGTTCTGAC TTTTTCGCA YCAAGGTCAC-3', YFV-LF 5'-ARCAGCCAAGCCTTGTCTTG-3' и YFV-LB 5'-TTGGGAATGCTGTTGATGACGG-3' (производства ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), набор БиоМастер LAMP (2×), ревертазу RNAscribe RT (Биолабмикс, Россия) и интеркалирующий краситель EvaGreen 20x (Biotium, США). Все реакции проводились на приборе CFX 96 (BioRad, США). Был применен следующий температурно-временной режим: инкубация в течение 30 мин при 65 °С с детекцией продуктов амплификации каждую минуту по каналу «FAM».

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программного обеспечения Statistica v.11.0 (Tibco, США).

Коэффициент вариации для воспроизводимости рассчитывался по формуле $CVp, \% = Ct \text{ (стандотклон)} / Ct \text{ (ср.знач.)} \times 100 \%$ для 33 проб.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате молекулярно-генетических манипуляций была получена рекомбинантная плазмидная ДНК – pCR2.1-YFV-K+, содержащая вставку ДНК, комплементарную участку гена белка Е ВЖЛ. Полученный плазмидный вектор использовался для получения РНК-YFV-K+ методом транскрипции *in vitro*.

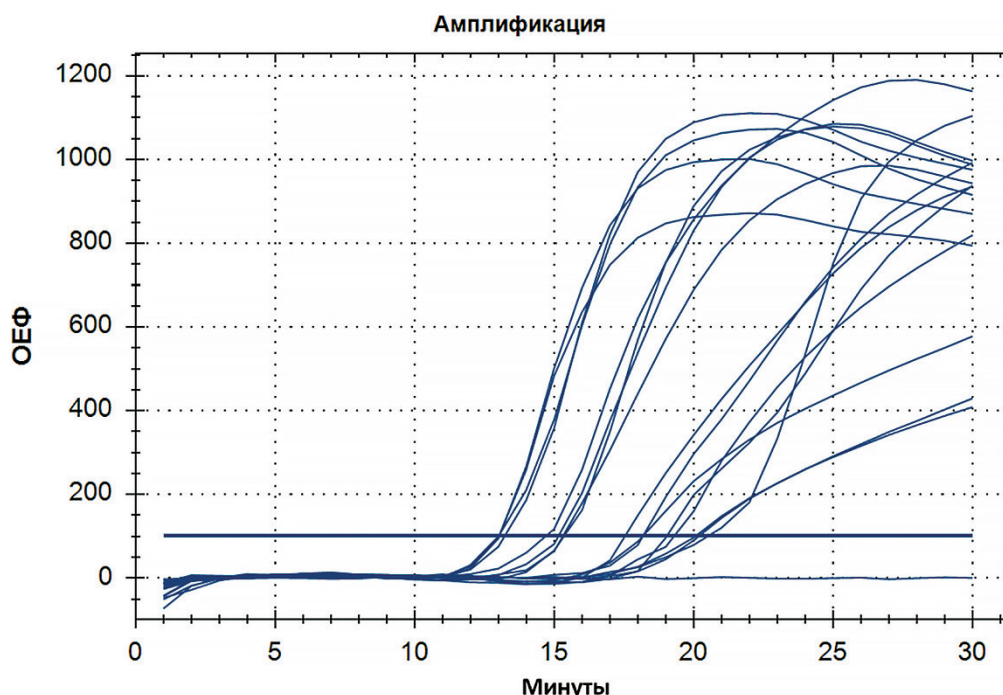
Таким образом получены два контрольных образца, один из которых представлен плазмидной ДНК (pCR2.1-YFV-K+), другой мРНК (РНК-YFV-K+).

Оценку аналитической чувствительности осуществляли методом LAMP, используя комплект праймеров, комплементарный восьми последовательностям целевого фрагмента гена белка Е ВЖЛ. В качестве анализируемых образцов использовали полученные контрольные образцы (pCR2.1-YFV-K+ и РНК-YFV-K+) в концентрациях от 10⁷ до 10 копий/мл.

Образцы, содержащие pCR2.1-YFV-K+ и РНК-YFV-K+ в концентрации от 10⁷ до 10⁴ копий/мл, определены как положительные, а в концентрации от 10³ до 10¹ копий/мл определены как отрицательные (рисунок, табл. 1). Таким образом установлена аналитическая чувствительность (предел детекции) – 10⁴ копий/мл.

Такой предел детекции достаточен для эффективного выявления генетического материала ВЖЛ методом LAMP в первые дни появления

симптомов заболевания, когда уровень вирусной нагрузки максимален.



Анализ аналитической чувствительности при использовании РНК-контроля (РНК-YFV-K+) и плазмидного контроля (pCR2.1-YFV-K+) по каналу «FAM» на амплификаторе CFX 96 (BioRad, США)
Analysis of analytical sensitivity using RNA control (RNA-YFV-K+) and plasmid control (pCR2.1-YFV-K+) in the “FAM” channel on a CFX 96 amplifier (BioRad, USA)

Таблица 1

Анализ аналитической чувствительности
Analytical sensitivity analysis

Концентрация, копий/мл	Значение Ct (канал FAM)			
	pCR2.1-YFV-K+		РНК-YFV-K+	
	№ 1	№ 2	№ 1	№ 2
10 ⁷	11,66	11,70	11,61	11,96
10 ⁶	14,82	15,07	15,10	14,22
10 ⁵	17,87	17,28	18,64	17,71
10 ⁴	18,64	19,60	19,38	19,61
10 ³	N/A	N/A	N/A	N/A
10 ²	N/A	N/A	N/A	N/A
10 ¹	N/A	N/A	N/A	N/A

Одной из важной характеристик контрольных образцов в тест-системах является их стабильность при хранении, так как именно от них зависит оценка работоспособности набора реагентов и правильная интерпретация результатов анализа. Для изучения стабильности контрольных образцов, полученных в данной работе, нами были

приготовлены модельные образцы pCR2.1-YFV-K+ и РНК-YFV-K+ в концентрации 10⁶ копий/мл. Затем аликвоты модельных образцов были помещены в различные температурные условия: при температуре от -15 до -25 °С, от 2 до 8 °С и от 15 до 25 °С. Образцы, хранящиеся при температуре от -15 до -25 °С, были подвергнуты десятикрат-

ному циклу заморозки/разморозки. Каждый этап анализировали методом LAMP.

При размораживании/замораживании все модельные образцы определялись как положительные. Вариабельность полученных результатов сопоставима друг с другом, а коэффициенты ва-

риации для воспроизводимости результатов амплификации для pCR2.1-YFV-K+ и РНК-YFV-K+ составили 2,9 и 3,2 %, соответственно.

В табл. 2 представлен анализ контрольных образцов при замораживании/размораживании.

Таблица 2

Анализ стабильности контрольных образцов при замораживании/размораживании
Analysis of freeze/thaw stability of control samples

Кол-во замораживаний/размораживаний	Значение Ct (канал FAM)					
	pCR2.1-YFV-K+(10 ⁶ копий/мл)			РНК-YFV-K+(10 ⁶ копий/мл)		
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 1	№ 2	№ 3
Исходные данные	12,69	12,98	12,85	13,02	13,42	13,26
1	13,30	13,60	14,33	14,16	13,30	13,99
2	13,35	13,06	13,08	13,09	14,02	14,37
3	13,12	13,42	13,07	13,26	14,02	14,28
4	13,11	13,88	12,67	14,32	14,75	13,63
5	13,20	13,89	13,62	14,21	13,22	13,51
6	13,39	13,62	13,63	13,72	13,98	13,61
7	13,10	13,67	13,07	13,97	13,70	13,80
8	13,78	13,45	13,31	13,56	13,10	13,88
9	13,59	13,67	13,41	13,27	13,44	13,57
10	14,15	13,80	13,45	13,22	13,41	13,81

Модельные образцы, хранящиеся при температуре от 2 до 8 °С и от 15 до 25 °С, тестировались в разные временные точки после начала хранения: 24, 48, 72, 96 и 168 ч. При хранении от 2 до 8 °С все образцы определялись как положительные. Коэффициенты вариации для производимости для pCR2.1-YFV-K+ и РНК-YFV-K+ составили 4,1 и 12,7 % соответственно.

При хранении от 15 до 25 °С модельный образец pCR2.1-YFV-K+ определялся как положительный в трех повторах до 72 ч хранения включительно, а РНК-YFV-K+ – до 48 ч. Коэффициент

вариации для воспроизводимости был вычислен для всех образцов, определенных как положительные до 48 ч (включительно) и составил 11,5 % для pCR2.1-YFV-K+ , 15,8 % для РНК-YFV-K+.

Вариабельность результатов, полученных при использовании ДНК-контроля (pCR2.1-YFV-K+), была ниже, вероятно, из-за меньшей стабильности РНК по сравнению с ДНК [20].

Анализ стабильности при хранении контрольных образцов при положительных температурах отражен в табл. 3.

Таблица 3

Анализ стабильности при хранении контрольных образцов при положительных температурах
Analysis of stability during storage of control samples at positive temperatures

Хранение при температуре от 2 до 8 °С						
Время, ч	pCR2.1-YFV-K+(10 ⁶ копий/мл)			PHK-YFV-K+(10 ⁶ копий/мл)		
	Значение Ct (канал FAM)					
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 1	№ 2	№ 3
1	2	3	4	5	6	7
24	12,45	12,03	12,45	13,70	13,48	14,13
48	12,55	12,19	12,61	13,00	13,42	13,97

1	2	3	4	5	6	7
72	12,53	12,49	12,24	13,31	13,14	13,76
96	12,55	12,48	12,46	15,36	15,75	15,86
168	13,89	13,67	13,12	18, 12	18,47	18,59
Хранение при комнатной температуре (от 15 до 25 °С)						
Время, ч	pCR2.1-YFV-K+(10 ⁶ копий/мл)			PHK-YFV-K+(10 ⁶ копий/мл)		
	Значение Ct (канал FAM)					
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 1	№ 2	№ 3
24	13,39	13,12	14,06	13,57	13,60	13,97
48	16,81	16,19	16,79	18,20	18,30	18,43
72	22,13	23,12	22,30	N/A	N/A	N/A
96	25,20	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
168	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Компоненты, используемые для реакции LAMP с обратной транскрипцией (буферный раствор, Bst ДНК-полимераза и ревертаза), необходимо хранить при температурах от -15 до -25 °С в течение 12–18 мес., или в течение нескольких месяцев при температуре от 2 до 8 °С для стабильной работы согласно инструкциям большинства производителей. Следовательно, РНК-YFV-K+ может быть использован совместно с этими реагентами, так как его стабильность сохраняется при схожем режиме хранения.

РНК-YFV-K+ можно использовать для контроля аналитической чувствительности и других диагностических характеристик экспериментального набора реагентов для выявления РНК ВЖЛ методом LAMP на уровне с плазмидным контролем (pCR2.1-YFV-K+).

Также использование РНК-YFV-K+ является контролем протекания реакции обратной транскрипции, что является важным этапом при детекции РНК как ВЖЛ, так и других РНК-содержащих вирусов.

ВЫВОДЫ

1. Получен РНК-положительный контрольный образец (РНК-YFV-K+), представляющий собой аналог фрагмента гена белка Е вируса желтой лихорадки.

2. При использовании РНК-YFV-K+ и плазмидного контроля pCR2.1-YFV-K+ в реакции петлевой изотермической амплификации показан сопоставимый уровень аналитической чувствительности (предел детекции), составляющий 10⁴ копий/мл.

3. Сравнение модельных контрольных образцов при хранении показало, что в условиях температуры от -15 до -25 °С и от 2 до 8 °С оба модельных контроля работают стабильно, а при комнатной температуре до 72 ч (pCR2.1-YFV-K+) и до 48 ч (РНК-YFV-K+).

4. Установлена возможность использования РНК-положительного контрольного образца (РНК-YFV-K+) для диагностики желтой лихорадки методом LAMP при соблюдении соответствующих условий хранения: при температуре от -15 до -25 °С или от 2 до 8 °С (до семи дней).

Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора ГЗ-1/25 «Разработка набора реагентов для экспресс-выявления маркеров инфекции желтой лихорадки».

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Preparation of His-Tagged Armored RNA Phage Particles as a Control for Real-Time Reverse Transcription-PCR Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus / C. Yangjian [et al.] // J Clin Microbiol. American Society for Microbiology. – 2006. – Vol. 44, № 10. – P. 3557–3561.
2. High-quality RT-PCR with chemically modified RNA controls / G. Luo [et al.] // Talanta. – 2021. – Vol. 224. – P. 121850.

3. *Virus-Like Particles as Positive Controls for COVID-19 RT-LAMP Diagnostic Assays* / S.K. Chan [et al.] // *Biomacromolecules. American Chemical Society*. – 2021. – Vol. 22, № 3. – P. 1231–1243.
4. *A stable and differentiable RNA positive control for reverse transcription-polymerase chain reaction* / J.-M. Chen [et al.] // *Biotechnol Lett.* – 2006. – Vol. 28, № 22. – P. 1787–1792.
5. *Snow M., McKay P., Matejusova I.* Development of a widely applicable positive control strategy to support detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) using Taqman real-time PCR // *J Fish Dis. John Wiley & Sons, Ltd.* – 2009. – Vol. 32, № 2. – P. 151–156.
6. *Johnson B.W., Russell B.J., Goodman C.H.* Laboratory diagnosis of chikungunya virus infections and commercial sources for diagnostic assays // *J Infect Dis. Oxford University Press*. – 2016. – Vol. 214, № suppl_5. – P. S471–S474.
7. *Detection of Human Papillomavirus RNA in Ovarian and Endometrial Carcinomas by Reverse Transcription/Polymerase Chain Reaction* / C.-H. Lai [et al.] // *Gynecol Obstet Invest.* – 2010. – Vol. 38, № 4. – P. 276–280.
8. *Development of in vitro transcribed RNA as positive control for laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 in India* / M.L. Choudhary [et al.] // *Indian Journal of Medical Research. Medknow*. – 2020. – Vol. 151, № 2–3. – P. 251–254.
9. *Monath TP.* Yellow fever: an update // *Lancet Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 1, № 1. – P. 11–20.
10. *Douam F., Ploss A.* Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe // *Trends Microbiol.* – 2018. – Vol. 26, № 11. – P. 913–928.
11. *Yellow fever in the diagnostics laboratory* / C. Domingo, R.N. Charrel, J. Schmidt-Chanasit [et al.] // *Emerg Microbes Infect.* – 2018. – Vol. 7 (1). – P. 129.
12. *Кривошеина Е.И., Карташов М.Ю., Найденова Е.В.* Современные лабораторные методы выявления возбудителя желтой лихорадки // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2021. – № 2. – С. 24–32.
13. *Detection of Aedes aegypti, Aedes albopictus, and Aedes koreicus in the Area of Sochi, Russia* / L.A. Ganushkina [et al.] // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2016. – Vol. 16, № 1. – P. 58–60.
14. *Об обнаружении комаров Aedes (Stegomyia albopictus Skuse) на территории Российской Федерации* // Л.А. Ганушкина, Е.Ю. Таныгина, О.В. Безжонова, В.П. Сергиев // *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. – 2012. – № 1. – С. 3–4.
15. *Перспективы применения петлевой изотермической амплификации в диагностике опасных инфекционных болезней, вызванных вирусами I группы патогенности* / М.Ю. Карташов, Е.В. Чуб, Т.П. Микрюкова [и др.] // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2020. – № 2. – С. 22–30.

REFERENCES

1. *Yangjian C. [et al.]*, Preparation of His-Tagged Armored RNA Phage Particles as a Control for Real-Time Reverse Transcription-PCR Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus, *J Clin Microbiol. American Society for Microbiology*, 2006, Vol. 44, No. 10, pp. 3557–3561.
2. *Luo G. [et al.]*, High-quality RT-PCR with chemically modified RNA controls, *Talanta*, 2021, Vol. 224, pp. 121850.
3. *Chan S.K. [et al.]*, Virus-Like Particles as Positive Controls for COVID-19 RT-LAMP Diagnostic Assays, *Biomacromolecules. American Chemical Society*, 2021, Vol. 22, No. 3, pp. 1231–1243.
4. *Chen J.-M. [et al.]*, A stable and differentiable RNA positive control for reverse transcription-polymerase chain reaction, *Biotechnol Lett*, 2006, Vol. 28, No. 22, pp. 1787–1792.
5. *Snow M., McKay P., Matejusova I.*, Development of a widely applicable positive control strategy to support detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) using Taqman real-time PCR, *J. Fish Dis. John Wiley & Sons, Ltd*, 2009, Vol. 32, No. 2, pp. 151–156.
6. *Johnson B.W., Russell B.J., Goodman C.H.*, Laboratory diagnosis of chikungunya virus infections and commercial sources for diagnostic assays, *J Infect Dis. Oxford University Press*, 2016, Vol. 214, No. suppl_5, pp. S471–S474.
7. *Lai C.-H. [et al.]*, Detection of Human Papillomavirus RNA in Ovarian and Endometrial Carcinomas by Reverse Transcription/Polymerase Chain Reaction, *Gynecol Obstet Invest*, 2010, Vol. 38, No. 4, pp. 276–280.
8. *Choudhary M.L. [et al.]*, Development of in vitro transcribed RNA as positive control for laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 in India, *Indian Journal of Medical Research. Medknow*, 2020, Vol. 151, No. 2–3, pp. 251–254.
9. *Monath TP.*, Yellow fever: an update, *Lancet Infect. Dis*, 2001, Vol. 1, No 1, pp. 11–20.
10. *Douam F., Ploss A.*, Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe, *Trends Microbiol.*, 2018, Vol. 26, No. 11, pp. 913–928.
11. *Domingo C., Charrel R.N., Schmidt-Chanasit J. [et al.]*, Yellow fever in the diagnostics laboratory, *Emerg Microbes Infect*, 2018, Vol. 7 (1), pp. 129.
12. *Krivosheina E.I., Kartashov M.Yu., Naydenova E.V.*, *Problemy osobo opasnykh infektsiy*, 2021, No. 2, pp. 24–32.
13. *Ganushkina L.A. [et al.]*, Detection of Aedes aegypti, Aedes albopictus, and Aedes koreicus in the Area of Sochi, Russia, *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2016, Vol. 16, No. 1, pp. 58–60.
14. *Ganushkina L.A., Tanygina E.Yu., Bezzhonova O.V., Sergiev V.P.*, *Meditinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*, 2012, No. 1, pp. 3–4. (In Russ.)
15. *Kartashov M.Yu., Chub E.V., Mikryukova T.P. [i dr.]*, *Problemy osobo opasnykh infektsiy*, 2020, No. 2, pp. 22–30. (In Russ.)

Информация об авторах:

Е.И. Кривошеина, научный сотрудник

К.Р. Беличенко, лаборант-исследователь

Е.В. Чуб, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

М.Ю. Карташов, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Contribution of the authors:

E.I. Krivosheina, Research Associate

K.R. Belichenko, Laboratory Research Assistant

E.V. Chub, PhD in Biology, Leading Researcher

M.Yu. Kartashov, PhD in Biology, Senior Researcher

Вклад авторов:

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.