

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-110-115

УДК 616.98:578.8+616-07

Е.В. Найденова¹, В.Г. Дедков², Д.А. Агафонов¹, А.М. Сеничкина¹, М.В. Сафонова³, В.В. Кутырев¹

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ СПОСОБА ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ЛУЙО МЕТОДОМ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;²ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ³ФКУЗ «Противочумный центр», Москва, Российская Федерация

Цель – разработка и оценка эффективности способа выявления РНК вируса Луйо в пробах клинического и биологического материала с помощью одношаговой ОТ-ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. **Материалы и методы.** Для подбора консервативных участков генома использовали доступные в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) последовательности вируса Луйо, выровненные с использованием программного пакета BioEdit 7.2.5 (IbisBiosciences, США). Для проведения ОТ-ПЦР в одном раунде использовали обратную транскриптазу и TaqF-полимеразу. Для создания положительного контрольного образца (ПКО) получали рекомбинантный штамм *Escherichia coli* XL1-Blue, содержащий плазмиду pGEM-T со встроенным синтетически полученным фрагментом генома вируса. Сконструированные рекомбинантные плазмиды использовали для создания РНК-содержащего ПКО с защитной белковой оболочкой MS2-фага. Определение специфичности разработанного способа осуществляли с использованием контрольной панели РНК и ДНК 23 штаммов вирусов, относящихся к 10 семействам, чувствительности – панели биологических образцов, искусственно контаминированных ПКО. Дальнейшую апробацию проводили на базе лаборатории Российско-Гвинейского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней (г. Kindia, Гвинейская Республика) на 265 сыворотках крови практически здоровых людей, 110 сыворотках крови крупного рогатого скота, 83 суспензиях клещей, 165 суспензиях органов мелких млекопитающих, собранных на территории Гвинеи. **Результаты и обсуждение.** В качестве мишени для детекции РНК вируса Луйо методом ОТ-ПЦР выбраны два консервативных фрагмента гена полимеразы. Экспериментально подобрано сочетание праймеров и зондов, установлен оптимальный состав реакционной смеси для проведения ПЦР, режим постановки ОТ-ПЦР, а также разработаны контрольные образцы К+, внутренний контрольный образец, положительный контрольный образец. Чувствительность предложенного способа составила $5 \cdot 10^3$ ГЭ/мл, специфичность – 100 %.

Ключевые слова: вирус Луйо, геморрагическая лихорадка Луйо, ОТ-ПЦР в реальном времени, Гвинейская Республика.

Корреспондирующий автор: Найденова Екатерина Владимировна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Найденова Е.В., Дедков В.Г., Агафонов Д.А., Сеничкина А.М., Сафонова М.В., Кутырев В.В. Разработка и апробация способа выявления РНК вируса Луйо методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 1:110–115. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-110-115

Поступила 18.02.2021. Принята к публ. 11.03.2021.

E.V. Naidenova¹, V.G. Dedkov², D.A. Agafonov¹, A.M. Senichkina¹, M.V. Safonova³, V.V. Kutyrev¹

Development and Testing of a Method for Detecting Lujo Virus RNA by Reverse Transcription and Real Time Polymerase Chain Reaction

¹Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;²Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint-Petersburg, Russian Federation;³Plague Control Center, Moscow, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to develop and assess the efficacy of a method for Lujo virus RNA detection in clinical and biological samples using one-step real-time RT-PCR. **Materials and methods.** In order to select the conservative regions of the genome, we utilized the available in GenBank database Lujo virus sequences (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) aligned in BioEdit 7.2.5 software package (IbisBiosciences, USA). To conduct one-round RT-PCR, reverse transcriptase and TaqF-polymerase were used. Recombinant *Escherichia coli* strain, XL1-Blue, containing pGEM-T plasmid with inserted synthetically-generated fragment of the virus genome, was produced to make positive control sample (PCS). Constructed recombinant plasmids were used for creating RNA-containing PCS with protective protein shell of MS2-phage. Determination of specificity of the developed method was performed with the help of control panel of RNA and DNA of 23 viral strains related to 10 families; the sensitivity – the panel of biological samples artificially contaminated with PCS. Further testing was carried out at the premises of laboratory of the Russian-Guinean Center for Epidemiology and Prevention of Infectious Diseases (Kindia, Republic of Guinea) on 265 blood sera from practically healthy persons, 110 blood sera of cattle, 83 suspensions of ticks, and 165 suspensions of organs of small mammals collected in the territory of Guinea. **Results and discussion.** Two conservative polymerase gene fragments have been chosen as targets for Lujo virus RNA detection using RT-PCR. The combination of primers and probes has been experimentally selected, optimum composition of reaction mixture for PCR and mode of RT-PCR set-up established, as well as control samples C+, internal control, positive control sample developed. Sensitivity of the proposed method is $5 \cdot 10^3$ GE/ml, specificity – 100 %.

Key words: Lujo virus, Lujo hemorrhagic fever, real-time RT-PCR, Republic of Guinea.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Ekaterina V. Naidenova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Naidenova E.V., Dedkov V.G., Agafonov D.A., Senichkina A.M., Safonova M.V., Kutyrev V.V. Development and Testing of a Method for Detecting Lujo Virus RNA by Reverse Transcription and Real Time Polymerase Chain Reaction. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 1:110–115. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-110-115

Received 18.02.2021. Accepted 11.03.2021.

Naidenova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>

Dedkov V.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5500-0169>

Kutyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

В августе – сентябре 2008 г. на территории Южной Африки были выявлены случаи тяжелого лихорадочного заболевания, которые по клинической картине напоминали геморрагическую лихорадку Ласса и сопровождалась повышением температуры, головной болью, рвотой, диареей, артралгией и кровоизлияниями. Летальность составила 80 %, основным путем передачи возбудителя (кроме первичного случая, для которого источник заражения так и не был установлен) являлся контактный. В последующем доказано, что этиологическим агентом в данном случае является ранее неизвестный вирус, обозначенный как Луйо (*Lujo mammarynavirus* – LUJV) и относящийся к семейству *Arenaviridae* [1, 2]. Сделано предположение, что естественным резервуаром возбудителя в природе являются грызуны [3]. Но также необходимо отметить, что при первичном случае заболевания у больной при осмотре кожных покровов выявлено повреждение, напоминающее след от присасывания клеща, что не исключает трансмиссивный путь передачи [4].

В основе лабораторной диагностики геморрагической лихорадки, вызванной вирусом Луйо, лежат молекулярно-генетические методы исследований, которые характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью. Так, В. Atkinson *et al.* [5] подобраны праймеры и зонды, позволяющие выявлять РНК вируса Луйо в различных видах материала методом ОТ-ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. Показано, что чувствительность составила 10^5 копий/мл, а специфичность – 100 %. Однако данный способ выявления РНК вируса Луйо не позволяет осуществлять проведение диагностических работ в условиях лаборатории, т.к. отсутствует полный комплект реагентов и контрольная панель для проведения анализа и учета качества реакции.

Известен способ выявления РНК вируса Луйо с использованием полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией [6]. Однако в данной методике отсутствуют положительные контрольные образцы и внутренний контрольный образец, которые позволяли бы оценивать качество проводимых исследований.

В связи с увеличением числа наших соотечественников, посещающих страны Африки со служебными или туристическими целями, большим количеством иностранных студентов, обучающихся в высших учебных заведениях России, не исключен завоз возбудителя геморрагической лихорадки Луйо

на территорию нашей страны. Все вышеизложенное указывает на актуальность разработки способа детекции РНК вируса Луйо с использованием современных молекулярно-генетических методов.

Целью работы стало создание и определение диагностической ценности способа выявления РНК вируса Луйо в пробах клинического и биологического материала, основанного на ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Материалы и методы

Подготовку и обеззараживание проб проводили согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Выделение нуклеиновых кислот осуществляли с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Для подбора консервативных участков генома использовали доступные в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) последовательности вируса Луйо, выровненные с использованием программного пакета BioEdit 7.2.5 (IbisBio-sciences, США). Для регистрации результатов амплификации в режиме реального времени подбирали специфичные праймеры и зонды, причем в состав последних вводили флуоресцентные метки.

Одношаговую обратную транскрипцию и ПЦР (ОТ-ПЦР) с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов осуществляли в объеме 25 мкл, из которых: 10 мкл – образец выделенной РНК; 15 мкл – общая реакционная смесь, содержащая специфические праймеры и зонды (rt-LJ f1, rt-LJ r1, LVL-rev1, rt-LJ f2, rt-LJ r2, LJ-prb1 bis, LJ-prb2), смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ): дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ, буфер с ионами магния, обратную транскриптазу, дитиотрейтол и полимеразу TaqF. Результаты реакции считались положительными при любых значениях Ct.

Для контроля качества прохождения этапов выделения РНК, обратной транскрипции и ПЦР разработаны: внутренний контрольный образец (ВКО), положительный контрольный образец (ПКО) и рекомбинантные положительные контрольные образцы (К+).

Ввиду отсутствия генетического материала вируса Луйо, матрицу для создания К+ готовили синтетическим методом на основе ампликона, включающего в себя первую диагностическую область-мишень и фланкирующие последовательности нуклеотидов. Ампликон получали методом «степ-аут» ПЦР. Конечный ПЦР-продукт лигировали в плазмидный вектор pGEM-T (Promega, США) под контролем промотора T7 РНК полимеразы и трансформировали им *Escherichia coli* (штамм XL1-Blue). Рекомбинантные плазмиды из индивидуальных клонов проверяли на правильность ориентации целевой последовательности и отсутствие мутаций в области посадки праймеров и зонда. Проверку осуществляли методом Сэнгера с помощью прибора для автоматического капиллярного секвенирования ABI PRISM 3500xl (Applied Biosystems, США). Соответствующие заданным критериям рекомбинантные плазмиды применяли для приготовления положительного контрольного образца этапа ПЦР (К+). Для этого определяли концентрацию ДНК в растворе рекомбинантной плазмиды и разводили ДНК-буфером до рабочей концентрации $1 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^7$ копий/мл.

Рекомбинантные плазмиды применялись для создания РНК-содержащего положительного контрольного образца с защитной белковой оболоч-

кой MS2-фага (ПКО). Для полученного продукта также производили определение концентрации, затем разводили РНК-буфером (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия) до рабочей концентрации $1 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^7$ копий/мл, которую использовали в качестве препарата ПКО.

Для оценки эффективности экстракции РНК к смеси реагентов добавляли экзогенный внутренний контроль IC-F1 (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия), представляющий искусственную последовательность РНК (150–170 п.о., содержание GC – 50 %), полученную на основе MS2-фага и окруженную защитным белковым слоем.

Определение чувствительности разработанного подхода осуществляли с использованием панелей различных биологических образцов, искусственно контаминированных РНК-содержащим рекомбинантным положительным контрольным образцом. Потенциальную перекрестную реактивность оценивали с использованием высокотитражных растворов вирусной РНК и ДНК представителей 23 видов вирусов, принадлежащих к 10 семействам (табл. 1).

Апробацию разработанного подхода проводили на базе лаборатории Российско-Гвинейского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней (г. Kindia, Гвинейская Республика) с соблюдением правил биологической безопасности. Сбор

Таблица 1 / Table 1

Виды вирусов, использованных для оценки аналитической специфичности
Species of viruses used for the evaluation of analytical specificity

Вирус Virus	Акроним Acronym	Семейство Family	Род Genus	Тип нуклеиновой кислоты Type of nucleic acid
Zaireebolavirus	EBOV	Filoviridae	Ebolavirus	PHK/RNA
Sudanebolavirus	SUDV	Filoviridae	Ebolavirus	PHK/RNA
Marburgvirus	MARV	Filoviridae	Marburgvirus	PHK/RNA
Tahynavirus	TAHV	Peribunyaviridae	Orthobunyavirus	PHK/RNA
Bataivirus	BATV	Peribunyaviridae	Orthobunyavirus	PHK/RNA
Inkoovirus	INKV	Peribunyaviridae	Orthobunyavirus	PHK/RNA
Cream-Congo hemorrhagic fever virus	CCHFV	Nairoviridae	Orthobunyavirus	PHK/RNA
Dhorivirus	DHOV	Orthomyxoviridae	Thogotovirus	PHK/RNA
FluA/H1N3	FLUAV(H1N3)	Orthomyxoviridae	Influenzavirus A	PHK/RNA
FluA/H3N2	FLUAV(H3N2)	Orthomyxoviridae	Influenzavirus A	PHK/RNA
FluB	FLUBV	Orthomyxoviridae	Influenzavirus B	PHK/RNA
Yellowfevervirus	YFV	Flaviviridae	Flavivirus	PHK/RNA
WestNilevirus	WNV	Flaviviridae	Flavivirus	PHK/RNA
Zikavirus	ZIKV	Flaviviridae	Flavivirus	PHK/RNA
Tickborneencephalitisvirus	TBEV	Flaviviridae	Flavivirus	PHK/RNA
Sindbisvirus	SNDBV	Togaviridae	Alphavirus	PHK/RNA
Chikungunyavirus	CHIKV	Togaviridae	Alphavirus	PHK/RNA
Kemerovovirus, strain 21/10	KEMV-21/10	Reoviridae	Orbivirus	PHK/RNA
HumanRotavirus A	RVA	Reoviridae	Rotavirus	PHK/RNA
Humanimmunodeficiencyvirus 1	HIV-1	Retroviridae	Lentivirus	PHK/RNA
HumanCytomegalovirus 5	HCMV-5	Herpesviridae	Cytomegalovirus	ДНК/DNA
Humanparvovirus B19	B19	Parvoviridae	Erythroparvovirus	ДНК/DNA
Middle East respiratory syndrome coronavirus	MERS	Coronaviridae	Betacoronavirus	PHK/RNA

проб биологического и клинического материала осуществляли на территории всех четырех ландшафтно-климатических зон Гвинейской Республики в 2018 г.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы подобраны и определены консервативные участки генома вируса Лу́йо, перспективные в качестве ДНК-мишеней для детекции патогена методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. В качестве матрицы выбрано два консервативных фрагмента гена полимеразы. Осуществлен дизайн олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов, протяженность детектируемых фрагментов составила 108 и 133 пары оснований соответственно. Для регистрации амплификации РНК вируса Лу́йо методом ОТ-ПЦР-РВ в состав зондов введены флуоресцентные метки FAM-BHQ1, для ВКО – метки JOE-BHQ1.

В ходе ряда экспериментов подобран оптимальный состав реакционной смеси, отработаны условия амплификации. Установлено, что ряд компонентов реакции можно объединить в одну реакционную смесь, которая сохраняет свою стабильность в течение 6 месяцев при условии хранения при температуре не выше минус 18 °С или в лиофилизированном виде в течение длительного времени. В состав такой смеси вошли (из расчета на одну реакцию): праймеры, комплементарные фрагменту гена полимеразы вируса Лу́йо и последовательности ВКО, в концентрации 0,5 пмоль; флуоресцентные зонды в концентрации 0,3 пмоль; смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ) в концентрации 0,44 ммоль; стерильная вода до конечного объема 10 мкл.

С другой стороны, 5х реакционный буфер для ферментов с $MgCl_2$ в концентрации 15 ммоль, обрат-

ную транскриптазу, дитиотрейтол в концентрации 1 ммоль и полимеразу TaqF можно объединить во вторую реакционную смесь, объемом 5,0 мкл, которая готовится непосредственно перед постановкой реакции (хранению не подлежит). Использование компонентов реакции, объединенных в отдельные смеси, позволило упростить и стандартизовать подготовку реактивов перед началом постановки ПЦР: для каждого исследования смешиваются 10 мкл первой и 5 мкл второй реакционных смесей.

Наибольшая эффективность амплификации ПКО и ВКО отмечена при осуществлении реакции при следующих температурных режимах: 1) обратная транскрипция при температуре 50 °С – 15 мин (1 цикл); 2) прогревание при температуре 95 °С – 5 мин (1 цикл); 3) полимеразная цепная реакция (42 цикла): 95 °С – 10 с, 60 °С – 20 с. При этом детекция флуоресцентного сигнала производится при температуре 60 °С по каналам для флуорофоров Green (FAM) и Yellow (JOE), значения Threshold (пороговой линии) составляют 0,03, устранение выбросов – 10 %.

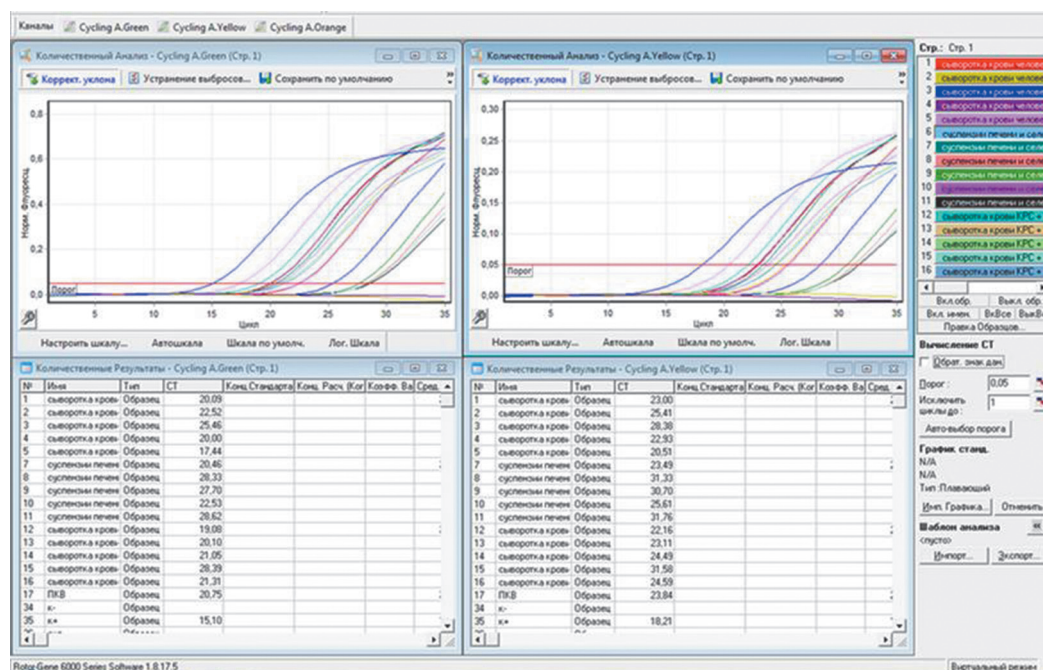
Для интерпретации результатов амплификации был предложен соответствующий алгоритм (табл. 2). В случае несоответствия полученных результатов данным таблицы реакцию необходимо переставить, начиная с этапа экстракции РНК.

Оценку аналитической чувствительности разработанного подхода проводили на панели различных биологических образцов, искусственно контаминированных РНК-содержащим рекомбинантным ПКО до конечной концентрации $5 \cdot 10^3$ ГЭ/мл. В качестве исследуемого материала использовано пять образцов сывороток крови здоровых людей, пять сывороток крови КРС, пять образцов суспензий органов (печень+селезенка) от мелких млекопитающих (лабораторные мыши). Во всех случаях наблюда-

Таблица 2 / Table 2

Учет результатов выявления РНК вируса Лу́йо с помощью предложенной ОТ-ПЦР-РВ
/Registration of results of Lujo virus RNA detection using the proposed real-time RT-PCR

Наименование пробы Smaple	Детекция по каналу Detection by the channel		Интерпретация результатов Interpretation of results
	FAM (ВКО)	JOE	
	значение ct ct value		
Исследуемый образец Sample under study	≤ 35	≤ 35	Подлежит учету. Выявлена РНК вируса Луйо Liable for registration. Lujo virus RNA has been detected
	≤ 35	отсутствует absent	Подлежит учету. Не выявлена РНК вируса Луйо Liable for registration Lujo virus RNA has not been detected
ОКО NCS	≤ 35	отсутствует absent	Подлежит учету Liable for registration
ПКО PCS	≤ 35	≤ 35	Подлежит учету Liable for registration
К+	отсутствует absent	≤ 35	Подлежит учету Liable for registration
К-	отсутствует absent	отсутствует absent	Подлежит учету Liable for registration



Оценка аналитической чувствительности разработанного способа выявления РНК вируса Луйо с помощью ОТ-ПЦР-РВ

Evaluation of analytic sensitivity of the developed method for Lujov virus RNA detection using real-time RT-PCR

лось образование специфичной флуоресценции по каналам FAM и JOE со значениями Ct не более 35 (рисунок).

Специфичность предложенной ОТ-ПЦР-РВ для детекции РНК вируса Луйо определяли с помощью панели образцов, состоящей из РНК и ДНК 23 видов вирусов, принадлежащих к 11 семействам (табл. 1). В результате исследования перекрестных реакций не зафиксировано.

Апробация разработанного способа выявления РНК вируса Луйо методом ОТ-ПЦР-РВ проведена на

пробах клинического и биологического материала, собранных на территории Гвинейской Республики, являющейся эндемичной по лихорадке Ласса, возбудитель которой относится к тому же семейству, что и вирус Луйо. В связи с тем, что ранее исследования по выявлению циркуляции вируса Луйо в Гвинее не проводились, не исключается возможность его распространения на данной территории. Во всех случаях получен отрицательный результат (табл. 3).

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан способ выявления РНК ви-

Таблица 3 / Table 3

Результаты исследования проб клинического и биологического материала, собранного на территории Гвинейской Республики, с помощью разработанного способа выявления РНК вируса Луйо методом ОТ-ПЦР-РВ

Results of testing of clinical and biological samples collected in the territory of the Republic of Guinea applying the developed method for Lujov virus RNA detection using real-time RT-PCR

№ п/п No	Вид материала Type of material	Количество образцов The number of samples		
		всего total	положительные positive	отрицательные negative
1	Сыворотки крови практически здоровых людей Blood sera from practically healthy individuals	265	0	265
2	Сыворотки крови крупного рогатого скота Blood sera of the cattle	110	0	110
3	Суспензии клещей Tick suspensions	83	0	83
4	Суспензии органов мелких млекопитающих (печень+селезенка) Suspension of organs of small mammals (liver+spleen)	55	0	55
5	Суспензии органов мелких млекопитающих (головной мозг) Suspensions of organs of small mammals (brain)	55	0	55
6	Суспензии органов мелких млекопитающих (легкое+почка) Suspensions of organs of small mammals (lung+kidney)	55	0	55
Итого: Total:		623	0	623

руса Луйо (сем. *Arenaviridae*) методом ОТ-ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени в пробах клинического и биологического материала из объектов окружающей среды, который может быть использован в научно-исследовательских и медицинских учреждениях, учреждениях Роспотребнадзора. В связи с тем, что патогномичные симптомы при лихорадочном заболевании, вызванном вирусом Луйо, отсутствуют, диагноз можно поставить только при использовании вирусологических и молекулярно-биологических методов исследований. Поиск природного резервуара возбудителя геморрагической лихорадки Луйо также является важным направлением для изучения распространения вируса на Африканском континенте. Описанный способ позволит решить эти задачи в короткие сроки и с достаточной чувствительностью и специфичностью.

На разработанный способ выявления РНК вируса Луйо методом ОТ-ПЦР-РВ получен патент на изобретение «Способ выявления РНК вируса Луйо методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени» № RU 2744665 (опубл. 12.03.2021, бюл. № 8).

Благодарности. Авторский коллектив выражает свою благодарность за помощь в сборе образцов клинического и биологического материала сотрудникам Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи (г. Kindia, Гвинейская Республика) и Института медицинской ветеринарии (г. Dalaba, Гвинейская Республика).

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Paweska J.T., Sewlall N.H., Ksiazek T.G., Blumberg L.H., Hale M.J., Lipkin W.I., Weyer J., Nichol S.T., Rollin P.E., McMullan L.K., Paddock C.D., Briese T., Mnyalaza J., Dinh T.H., Mukonka V., Ching P., Duse A., Richards G., de Jong G., Cohen C., Ikalafeng B., Mugero C., Asomugha C., Malotle M.M., Nteo D.M., Misiani E., Swanepoel R., Zaki S.R. Nosocomial outbreak of novel arenavirus infection, Southern Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(10):1598–602. DOI: 10.3201/eid1510.090211.
2. Briese T., Paweska J.T., McMullan L.K., Hutchison S.K., Street C., Palacios G., Khristova M.L., Weyer J., Swanepoel R., Egholm M., Nichol S.T., Lipkin W.I. Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from Southern Africa. *PLoS Pathog.* 2009; 5(5):e1000455. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000455.
3. Ishii A., Thomas Y., Moonga L., Nakamura I., Ohnuma A., Hang'ombe B.M., Takada A., Mweene A.S., Sawa H. Molecular surveillance and phylogenetic analysis of Old World arenaviruses in Zambia. *J. Gen. Virol.* 2012; 93(Pt 10):2247–51. DOI: 10.1099/vir.0.044099-0.
4. Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Сыромятникова С.И., Борисевич С.В. Геморрагическая лихорадка Луйо. *Вопросы ви-*

русологии. 2017; 62(4):149–53. DOI: 10.18821/0507-4088-2017-62-4-149-153.

5. Atkinson B., Chamberlain J., Dowall S.D., Cook N., Bruce C., Hewson R. Rapid molecular detection of Lujo virus RNA. *J. Virol. Methods.* 2014; 195:170–3. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.09.006.

6. Найденова Е.В., Дедков В.Г., Сафонова М.В., Сеничкина А.М., Агафонов Д.А., Захаров К.С., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Разработка методики выявления РНК вируса Луйо с использованием полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. В кн.: Покровский В.И., редактор. Сборник трудов Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018». Минск: СтройМедиаПроект; 2018. С. 453–4.

References

1. Paweska J.T., Sewlall N.H., Ksiazek T.G., Blumberg L.H., Hale M.J., Lipkin W.I., Weyer J., Nichol S.T., Rollin P.E., McMullan L.K., Paddock C.D., Briese T., Mnyalaza J., Dinh T.H., Mukonka V., Ching P., Duse A., Richards G., de Jong G., Cohen C., Ikalafeng B., Mugero C., Asomugha C., Malotle M.M., Nteo D.M., Misiani E., Swanepoel R., Zaki S.R. Nosocomial outbreak of novel arenavirus infection, Southern Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(10):1598–602. DOI: 10.3201/eid1510.090211.
2. Briese T., Paweska J.T., McMullan L.K., Hutchison S.K., Street C., Palacios G., Khristova M.L., Weyer J., Swanepoel R., Egholm M., Nichol S.T., Lipkin W.I. Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from Southern Africa. *PLoS Pathog.* 2009; 5(5):e1000455. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000455.
3. Ishii A., Thomas Y., Moonga L., Nakamura I., Ohnuma A., Hang'ombe B.M., Takada A., Mweene A.S., Sawa H. Molecular surveillance and phylogenetic analysis of Old World arenaviruses in Zambia. *J. Gen. Virol.* 2012; 93(Pt 10):2247–51. DOI: 10.1099/vir.0.044099-0.
4. Sizikova T.E., Lebedev V.N., Syromyatnikova S.I., Borisovich S.V. [Lujo hemorrhagic fever]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2017; 62(4):149–53. DOI: 10.18821/0507-4088-2017-62-4-149-153.
5. Atkinson B., Chamberlain J., Dowall S.D., Cook N., Bruce C., Hewson R. Rapid molecular detection of Lujo virus RNA. *J. Virol. Methods.* 2014; 195:170–3. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.09.006.
6. Naidenova E.V., Dedkov V.G., Safonova M.V., Senichkina A.M., Agafonov D.A., Zakharov K.S., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. [Development of a method for detecting Lujo virus RNA using polymerase chain reaction with hybridization-fluorescence detection]. In: [Pokrovsky V.I., editor. Proceedings of the International Scientific and Practical Conference “Molecular Diagnostics-2018”]. Minsk: “StroyMediaProekt”; 2018. P. 453–4.

Authors:

Naidenova E.V., Agafonov D.A., Senichkina A.M., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Dedkov V.G. Saint Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology. 14 Mira St., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Safonova M.V. Plague Control Center. 4, Musorgskogo St., Moscow, 127490, Russian Federation. E-mail: protivochym@nlm.ru.

Об авторах:

Найденова Е.В., Агафонов Д.А., Сеничкина А.М., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Дедков В.Г. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Сафонова М.В. Противочумный центр. Российская Федерация, 127490, Москва, ул. Мусоргского, 4. E-mail: protivochym@nlm.ru.