

УДК 577.215

Кожабергенов Нурлан Сиязбекович,

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Национальный холдинг «QazBioPharm», пгт. Гвардейский, Казахстан, аспирант 3-го курса Института биотехнологии НАН КР, 8702-291-11-42,
e-mail: nurlanks@gmail.com, автор-корреспондент

Кожабергенов Нурлан Сиязбекович,

Казакстандын Гвардейский шаарындагы QazBioPharm Улуттук холдингинин Биологиялык коопсуздук проблемаларынын илимий-изилдөө институту, Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын Биотехнология институтунун үчүнчү курсунун аспиранты

Nurlan Kozhabergenov

Research Institute for Biological Safety Problems, QazBioPharm National Holding, Gvardeysky, Kazakhstan, third-year postgraduate student at the Institute of Biotechnology of the National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic

Усербаев Бекболат Сабитович,

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Национальный холдинг «QazBioPharm», пгт. Гвардейский, Казахстан, магистр, моб. 8702-759-59-90,
e-mail: b.usserbayev@biosafety.kz

Усербаев Бекболат Сабитович,

Казакстандын Гвардейский шаарындагы QazBioPharm Улуттук холдингинин Биологиялык коопсуздук проблемаларынын илимий-изилдөө институту, магистр

Bekbolat Usserbayev,

Research Institute for Biological Safety Problems, QazBioPharm National Holding, Gvardeysky, Kazakhstan, Master's degree student

Жумадил Балнур Нурболкызы,

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Национальный холдинг «QazBioPharm», пгт. Гвардейский, Казахстан, магистрант, моб. 8705-558-40-91,
e-mail: b.zhumadil@biosafety.kz

Жумадил Балнур Нурболкызы,

Казакстандын Гвардейский шаарындагы QazBioPharm Улуттук холдингинин Биологиялык коопсуздук проблемаларынын илимий-изилдөө институту, магистратуранын студенти

Balnur Zhumadil,

Research Institute for Biological Safety Problems, QazBioPharm National Holding, Gvardeysky, Kazakhstan, Master's student

Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна,

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Национальный холдинг «QazBioPharm», пгт. Гвардейский, Казахстан, кандидат биологических наук, профессор. 8775-424-29-16, e-mail: k.sultankulova@biosafety.kz

Султанкулова Куляйсан Турлыбайевна,

Казакстандын Гвардейский шаарындагы QazBioPharm Улуттук холдингинин Биологиялык коопсуздук проблемаларынын илимий-изилдөө институту, биология илимдеринин кандидаты, профессор

Kulyaisan Sultankulova,

Research Institute for Biological Safety Problems, QazBioPharm National Holding, Gvardeysky, Kazakhstan, PhD in Biology, Professor.

Кошеметов Жумагали Каукарбаевич,

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Национальный холдинг «QazBioPharm», пгт. Гвардейский, Казахстан, доктор биологических наук, профессор. 8701-662-61-12, e-mail: zh.koshemetov@biosafety.kz

Кошеметов Жумагали Каукарбаевич,

Казакстандын Гвардейский шаарындагы QazBioPharm Улуттук холдингинин Биологиялык коопсуздук проблемаларынын илимий-изилдөө институту, биология илимдеринин доктору, профессор

Koshemetov, Zhumagali

Research Institute for Biological Safety Problems, QazBioPharm National Holding, Gvardeysky, Kazakhstan, PhD in Biology, Professor

Жунушов Асанкадыр Темирбекович,

«Институт биотехнологии» НАН КР, г. Бишкек, Кыргызстан, доктор ветеринарных наук, профессор, академик НАН КР

Zhunushov Asankadir,

“Institute of Biotechnology” NAS KR, Bishkek, Kyrgyzstan, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Academician of NAS KR

Жунушов Асанкадыр Темирбекович,

Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын “Биотехнология институту”, Бишкек, Кыргызстан, ветеринария илимдеринин доктору, профессор, КР УИАнын академиги

РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ККГЛ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

НУ КТ-ПЧР АДИСИМЕНЕН ККГЛ ВИРУСУН АНЫКТОО ҮЧҮН ПРАЙМЕРЛЕРДИ ЖАНА ЗОНДДОРДУ ИШТЕП ЧЫГУУ

DEVELOPMENT OF PRIMERS AND PROBES FOR THE DIAGNOSTICS OF CCHF VIRUS BY REAL-TIME RT-PCR

*ТОО Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Национальный холдинг «QazBioPharm», пгт. Гвардейский, Казахстан
Институт биотехнологии НАН КР, г. Бишкек, Кыргызстан*

Аннотация. Конго-Крымская геморрагическая лихорадка (ККГЛ) – смертельная вирусная инфекция с летальностью от 10 до 40% при передаче клещами и до 80% при внутрибольничной передаче. Случаи заболевания у людей зарегистрированы более чем в 30 странах Европы, Азии и Африки. Быстрая и точная диагностика ККГЛ необходима для правильного лечения, прогнозирования исхода заболевания и предотвращения дальнейшего распространения инфекции. Молекулярные методы, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР), получили широкое применение относительно инфекционных заболеваний. Целью данной работы являлась разработка новых праймеров и зондов, которые будут применены для быстрого и специфичного выявления РНК вируса ККГЛ методом одношагового ОТ-ПЦР в режиме реального времени. После оптимизации и проведения лабораторных испытаний, разработанные олигонуклеотиды могут обеспечить эффективное выявление вируса ККГЛ в клинических образцах.

Ключевые слова: диагностика, ККГЛ, праймер, зонд, от-ПЦР РВ

Аннотация. Крым-Конго геморрагиялык ысытмасы (ККГЛ) – бул өлүмгө алып келүүчү вирустук инфекция, кенелер аркылуу жукканда өлүм көрсөткүчү 10-дон 40%-га чейин, ал эми ооруканага жаткырылганда 80%га чейин жетет. Европа, Азия жана Африка боюнча 30дан

ашык өлкөдө адамдарда оору катталган. ККГЛ тез жана так диагноздоо тийиштүү дарылоо, натыйжасын алдын ала айтуу жана инфекциянын андан ары жайылышынын алдын алуу үчүн абдан маанилүү. Полимераз чынжыр реакциясы (ПЧР) сыяктуу молекулярдык ыкмалар жугуштуу ооруларда кеңири колдонулган. Бул изилдөөнүн максаты реалдуу убакыттагы КТ-ПЧР анализин колдонуу менен ККГЛ вирусунун РНК-сын тез жана спецификалык аныктоо үчүн жаңы праймерлерди жана зонддорду иштеп чыгуу болгон. Оптималдаштыруудан жана лабораториялык текшерүүдөн кийин, иштелип чыккан олигонуклеотиддер клиникалык үлгүлөрдө ККГЛ вирусун натыйжалуу аныктоого мүмкүндүк бере алат.

Ачкыч сөздөр: диагностика, ККГЛ, праймер, зонд, НУ КТ-ПЧР

Annotation. Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a fatal viral infection with a mortality rate of 10 to 40% when transmitted by ticks and up to 80% when acquired through hospitalization. Human cases have been reported in more than 30 countries across Europe, Asia, and Africa. Rapid and accurate diagnosis of CCHF is essential for appropriate treatment, predicting the outcome, and preventing further spread of the infection. Molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) have been widely used in infectious diseases. The aim of this study was to develop new primers and probes for the rapid and specific detection of CCHF virus RNA using a one-step real-time RT-PCR assay. Following optimization and laboratory testing, the developed oligonucleotides could enable effective detection of CCHF virus in clinical samples.

Key words: diagnostics, CCHF, primer, probe, real-time rt-PCR

Введение. ККГЛ является одним из приоритетных патогенов, определенных в плане исследований и разработок ВОЗ в связи с высокой летальностью, потенциалом внутрибольничных вспышек и трудностями в лечении и профилактике. ККГЛ широко распространённое заболевание, вызываемое клещевым вирусом (Nairovirus) семейства Bunyaviridae. Вирус ККГЛ вызывает тяжёлые вспышки вирусной геморрагической лихорадки с летальностью 10–40% и встречается в Европе, Азии, Африке, на Ближнем Востоке и на Индийском субконтиненте, при этом в настоящее время не существует вакцины для широкого применения [1, 2].

Заболевание было впервые описано в Крыму в 1944 году, но вирус был впервые выделен в Конго в 1956 году. В 1969 году эти два названия соединились в единое название - Конго-Крымская геморрагическая лихорадка [3, 4]. ККГЛ считается «новым» заболеванием во всем мире, и за последние десятилетия многие страны сообщили о новых случаях заражения. Случаи заболевания, как правило, спорадические и сезонные и возникают в отдаленных или сельскохозяйственных регионах [5–7].

Среди арбовирусов вирус ККГЛ характеризуется наибольшим генетическим разнообразием: изоляты различаются по нуклеотидным последовательностям на 20%

для вирусного S-сегмента и на 31% для вирусного М-сегмента [8, 9]. ККГЛ – оболочечный вирус размером 90 нм, вирионы имеют сферическую форму. Геном ККГЛ содержит отрицательно-полярную, одноцепочечную и трехсегментную РНК, состоящую из большого (L), среднего (M) и малого (S) сегментов [10]. Сегменты M и S кодируют структурные белки гликопротеин и нуклеокапсид, соответственно, в то время как сегмент L кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу [11, 12]. Существует девять различных кладов ККГЛ, основанных на сегменте S; Клада I (Африка 1), Клада II (Африка 2), Клада IIIa (Африка 3), Клада IIIb (Африка 4), Клада IVa (Азия 1), Клада IVb (Азия 2), Клада V (Европа-1), Клада VI (Европа-2) и Клада VII (Европа-3) [13 - 16].

Диагностика ККГЛ затруднена неспецифичностью симптомов, высоким генетическим разнообразием вируса ККГЛ и требованиями биологической безопасности, предъявляемыми к вирусу. ОТ-ПЦР РВ является рекомендуемым методом для быстрого лабораторного выявления заболевания в острой фазе среди множества диагностических процедур [17-19]. В настоящее время данный метод широко применяется в диагностических лабораториях и имеет ряд преимуществ: высокая специфичность и чувствительность, экономия времени на проведение анализа.

Целью данного исследования являлась разработка специфичных и чувствительных наборов праймеров и зондов для эффективной диагностики вируса ККГЛ методом ОТ-ПЦР РВ анализа.

Материалы и методы исследования

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей.

Поиск нуклеотидных последовательностей генов вируса ККГЛ для подбора специфических праймеров и зондов, осуществляли в международной базе данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей генов вирусных изолятов было выполнено с использованием программного обеспечения Mega версия 12 по алгоритму ClustalW.

Дизайн праймеров и зондов. Праймеры подбирали таким образом, чтобы они были полностью комплементарны по отношению к сайту-мишени, температура плавления находилась в пределах 55-60 °С, абсолютно отсутствовала внутренняя гомология, превышающая 3 нуклеотидные пары. Последо-

вательность праймеров и зондов проверяли на комплементарность, образование димеров и другие параметры в программе [Ugene ver. 52.1 с помощью модуля Primer 3](#). Проверку специфичности подобранных олигонуклеотидных праймеров и зондов проводили с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Результаты и обсуждение

Научные работы ученых показывают, что многие ОТ-ПЦР тест-системы для диагностики вируса ККГЛ в основном нацелены на ген нуклеокапсидного белка, который кодирует основную часть S сегмента. Существуют также разработанные наборы праймеров, специфичные только для региональных изолятов, при использовании которых снижается возможность обнаружения других циркулирующих генотипов [20 - 22].

В наших исследованиях для множественного выравнивания полных последовательностей нуклеотидов выбрано из генетической базы GenBank 170 изолятов по S и 206 изолятов по M сегменту вируса ККГЛ с разным географическим происхождением (см. таблицу 1).

Таблица 1 – Номера регистрации в GenBank изолятов вируса ККГЛ

Сегмент вируса ККГЛ	Идентификационные номера изолятов вируса ККГЛ в генетической базе данных GenBank
<i>S сегмент</i>	AF354296.1; AF362080.1; AF428144.3; AF481799.1; AF527816.1; AJ010648.1; AJ010649.1; AJ538198.1; AY029157.1; AY049083.2; AY223475.1; AY297691.2; AY297692.2; DQ076415.1; DQ076416.1; DQ133507.1; DQ211641.1; DQ211642.1; DQ211645.1; DQ211646.1; DQ211647.1; DQ217496.1; DQ211649.1; DQ217602.1; DQ446212.1; DQ446213.1; DQ446214.1; EU871766.2; FJ562093.1; GQ862371.1; GQ862372.1; HM452305.1; HQ378179.1; JN108025.1; JN173797.1; JX908640.1; KC867274.1; KC880335.1; KF793333.1; KJ027522.1; KJ566326.1; KJ566329.1; KJ682815.1; KJ676542.1; KJ682816.1; KJ682817.1; KJ682818.1; KJ682819.1; KJ682820.1; KJ682821.1; KJ682822.1; KJ682823.1; KM201260.1; KR011837.1; KR092376.1; KR092378.1; KR814836.1; KR814841.1; KR814842.1; KR814847.1; KU707898.1; KU707900.1; KU707901.1; KU013446.1; KU013449.1; KU013455.1; KU013458.1; KU013461.1; KU129738.1; KU238958.1; KY213714.1; KY354080.1; KY362516.1; KY362517.1; KY484036.1; KY484040.1; M86625.1; MF287636.1; MF511207.1; MF511208.1; MF511209.1; MF511210.1; MF511211.1; MF511212.1; MF511213.1; MF511215.1; MF511216.1; MF511217.1; MF511218.1; MF511219.1; MF511222.1; MF511223.1; MF547415.1; MG659724.1; MG659727.1; MH037279.1; MH037280.1; MH037281.1; MH037282.1; MH037283.1; MH037284.1; MH037285.1; MH037287.1; MH037289.1; MH037290.1; MH133277.1; MH133280.1; MH133283.1; MH133286.1; MH133289.1; MH133292.1; MH133295.1; MH133298.1; MH133301.1; MH133304.1; MH133307.1; MH133310.1; MH396654.1; MH396675.1; MH461097.1; MH483984.1; MH483987.1; MK330134.1; MK442893.1; MN832721.1; MN832724.1; MN866128.1; MN866131.1; MN866134.1; MN866137.1; MN866140.1; MN866143.1; MN866146.1; MN866149.1; MN866152.1; MN866154.1; MN866158.1; MN866161.1; MN866164.1; MN866167.1; MN866170.1; MN866172.1; MN866176.1; MN866179.1; MN866182.1; MN866185.1; MN866186.1; MN866191.1; MN866192.1; MN866197.1; MN866200.1; MN866203.1; MN866205.1; MN866209.1; MN866211.1; MN866214.1; MN866217.1; MN901927.1; MN930421.1; MN930422.1; MN930423.1; MN930426.1; MN930427.1; MN930428.1; MN930429.1; MW058030.1; U88410.1; U88413.1; U88414.1; U88415.1
<i>M сегмент</i>	KY484042.1; MF511236.1; KY484045.1; DQ157175.1; DQ157174.1; KJ682814.1; AY900141.1; MF511235.1; KJ682813.1; KY484035.1; KJ6848915.1; AF467768.2; HQ378185.1; KJ648916.1; HQ378184.1; MH483988.1; KU013451.1; MF287637.1; HQ378187.1; MF547416.1; U39455.2; MF511240.1; DQ211634.1; MN689740.1; AY900142.1; AB069671.1; AB069672.1; AY223476.1; KU013448.1; MG659723.1; MG659726.1; JN572086.1; MN396643.1; MN396641.1; JN572084.1; MN396650.1; JN572085.1; KU013454.1; KU013457.1; KU013460.1; MN396656.1; MN396662.1; MN930412.1; MN396647.1; MF289415.1; MN396659.1; MN396653.1; MN135943.1; MN396668.1; JN572083.1; DQ446216.1; HM452306.1; MF289418.1; MH461098.1; KY213713.1; AJ538197.2; AY900144.1; MN866198.1; MN866189.1; KC867273.1; MN866183.1; MN866162.1; AJ538199.1; MN866168.1; MN930414.1; MN930415.1; MN866132.1; AY179962.1; MN866141.1; MN866129.1; MN866188.1; MK330132.1; MN866138.1; MN866153.1; MW298542.1; MW298541.1; MW298540.1; MN930416.1; MN396674.1; MW298544.1; MN866147.1; DQ446215.1; MN930413.1; MN930419.1; MN866177.1; MN866173.1; MN866150.1; MN866144.1; MN866126.1; MN866161.1; MN866135.1; KX458183.1; MN866165.1; MN930418.1; MN866159.1; MN930417.1; MN866180.1; MN866174.1; MK330135.1; MW298546.1; MN866210.1; MW298545.1; MN866213.1; MN866207.1; MN866201.1; MN866196.1; MN832722.1; DQ211632.1; KR864901.1; KY362518.1; AF350448.1; MF511238.1; MF511232.1; KU161585.1; DQ211633.1; MF511227.1; KJ682811.1; AB069669.1; DQ211635.1; KC344856.1; MH133293.1; MH133287.1; EU037902.1; KR814864.1; KR814856.1; KR092379.1; DQ211631.1; MH133281.1; DQ211636.1; KJ682812.1; MF511224.1; KU161584.1; MH483985.1; MH133284.1; KR814870.1; KR814858.1; DQ211629.1; KR814863.1; KR814860.1; KR814862.1; KR814865.1; KY484032.1; MF511228.1; MH133296.1; MH133290.1; KR814874.1; GQ337054.1; MF511233.1; AF467769.2; KR864902.1; MH133311.1; MH133299.1; KR814869.1; DQ206448.1; MW058029.1; MH133308.1; MF511226.1; KR814873.1; KR814872.1; AB069675.1; KU013481.1; AB069674.1; KU013478.1; KU013487.1; MF511229.1; KU013466.1; KR814871.1; AF338470.1; KR814866.1; MF511234.1; KY484029.1; KX056060.1; KU013445.1; DQ211630.1; MF511230.1; MH133302.1; KR814868.1; KX056051.1; KR814867.1; AF350449.1; KX056054.1; KR814857.1; MN987248.1; KU013475.1; MF511231.1; KR814863.1; KR814859.1; MH133305.1; MH133278.1; KU013469.1; AY179961.1; AY675511.1; KY362519.1; KX056057.1; MF511225.1; KU013472.1; KJ682805.1; KJ682807.1; KJ682806.1; KY982866.1; KJ682810.1; MF511239.1; GU477490.1; KJ682808.1; KJ682809.1;

Как показал анализ множественного выравнивания, в данных сегментах среди гео-

графических изолятов ККГЛ выявлены наиболее консервативные участки генов в S и M сегментах (см. рисунок 1).

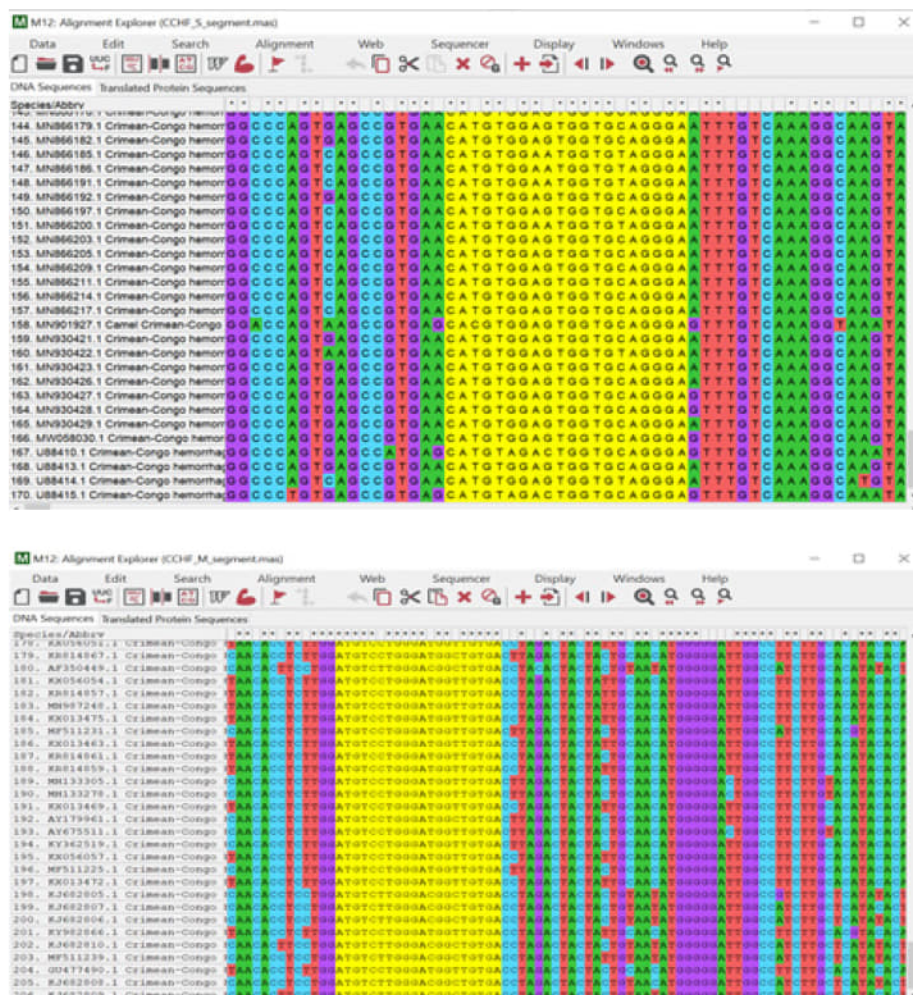


Рисунок 1 – Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей изолятов вируса ККГЛ по S и M сегментам

При разработке праймеров несовпадающие пары оснований корректировались путем смешивания определенных олигонуклеотидов. После проверки на комплементарность, образование димеров, гомологии и других параметров, выбранные последо-

вательности проверяли в программе [Ugene ver. 52.1 с помощью модуля Primer 3](#). Таким образом, для каждого из сегмента конструированы наиболее консервативные последовательности пар праймеров и зондов (см. рисунок 2).

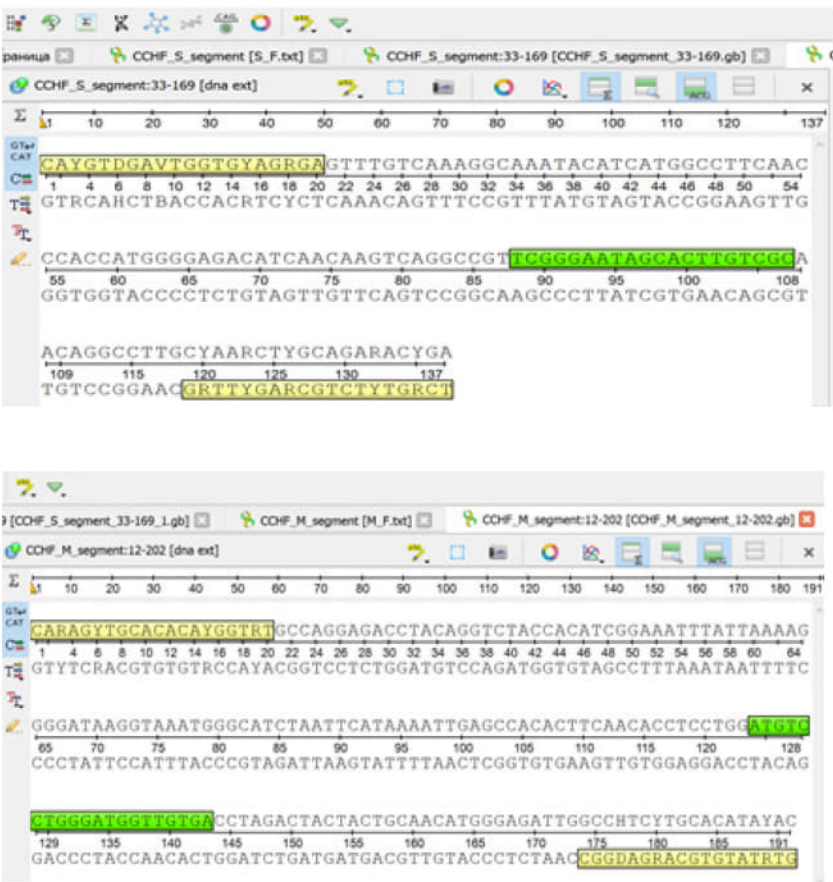


Рисунок 2 – Конструирование праймеров и зондов в программе [Ugene v. 52.1](#)

Сконструированные праймеры и зонды были проверены на специфичность и гомологию с помощью программы BLAST. Для дальнейших работ были выбраны последовательности олигонуклеотидов, показывающие 100% идентичность с возбудителем вируса ККГЛ всех известных генотипов (см. таблицу 2).

Таблица 2 - Параметры разработанных праймеров и зондов

Наименование праймера и зонда	Последовательность 5' - 3'	GC%	Размер продукта, п.о.
CCHF_S F	CAY GTD GAV TGG TGY AGR GA	40-65	137
CCHF_S_Probe	FAM - TCR GGR ATA GCA CTY GTY GC - BHQ1	45-65	
CCHF S R	TCR GTY TCT GCR AGY TTR G	37-63	
CCHF_M_F	CAR AGY TGC ACA CAY GGT RT	40-60	191
CCHF_M_Probe	ROX - ATG TCY TGG GAN GGH TGT GA – BHQ2	45-60	
CCHF_M_R	GTR TAT GTG CAR GAD GGC	44-61	

Заключение. В результате проведённых исследований определены наиболее консервативные участки генов в S и M сегментах вируса ККГЛ, фрагменты которых были использованы для конструирования олигонуклеотидных праймеров и зондов.

В итоге разработаны новые праймеры и зонды для диагностики всех известных генотипов вируса ККГЛ со 100% специфичностью. В дальнейших исследованиях разработанные наборы праймеров и зондов будут оптимизированы для эффективной детек-

ции РНК вируса ККГЛ, где будут определены параметры специфичности и чувствительности в лабораторных испытаниях.

Данная работа выполнена в рамках диссертационной работы аспирантуры «Института биотехнологии» НАН КР по теме: «Метагеномный анализ и разработка современных тест-систем для диагностики клещевых инфекций». Научным руководителем является, доктор ветеринарных наук, профессор, академик НАН КР - Жунушов Асанкадыр Темирбекович.

Литература

- 1 Bente D.A., et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res.* 2013;100(1):159–89.
- 2 Mazzola L.T., Kelly-Cirino C. Diagnostic tests for Crimean-Congo haemorrhagic fever: a wide-spread tickborne disease. *BMJ Global Health.* 2019; 4: e001114. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2018-001114>.
- 3 Chinikar S., Mirahmadi R., Moradi M., et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF), Zoonosis. *IntechOpen* 2012. <https://doi.org/10.5772/2125>.
- 4 Whitehouse C.A. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 2004; 64:145–60. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(04\)00163-9](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(04)00163-9).
- 5 Al-Abri S.S., Abaidani I.A., Fazlalipour M., et al. Current status of crimean-congo haemorrhagic fever in the world health organization eastern mediterranean region: issues, challenges, and future directions. *Int J Infect Dis* 2017; 58:82–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.02.018>.
- 6 Ergonul O. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: new outbreaks, new discoveries. *Curr Opin Virol* 2012; 2:215–20. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.03.001>.
- 7 Mertens M, Schmidt K, Ozkul A, et al. The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health. *Antiviral Res* 2013; 98:248–60. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.02.007>.
- 8 Suschak J.J., et al. A CCHFV DNA vaccine protects against heterologous challenge and establishes GP38 as immunorelevant in mice. *npj Vaccines.* 2021;6(1):31.
- 9 Flick R., Whitehouse C.A. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Curr Mol Med.* 2005;5(8):753–60.
- 10 Papa A., Papadopoulou E., Tsioka K., Kontana A., Pappa S., Melidou A., Giadinis N.D. Isolation and whole-genome sequencing of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strain, Greece. *Ticks tick-borne Dis.* 2018;9(4):788–91.
- 11 Papa A., Ma B., Kouidou S., Tang Q., Hang C., Antoniadis A. Genetic characterization of the M RNA segment of Crimean congo hemorrhagic fever virus strains, China. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(1):50.
- 12 Hewson R., Gmyl A., Gmyl L., Smirnova S.E., Karganova G., Jamil B., Hasan R., Chamberlain J., Clegg C. Evidence of segment reassortment in Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *J Gen Virol.* 2004;85(10):3059–70.
- 13 Deyde VM, Khristova ML, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol S.T. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *J Virol.* 2006;80(17):8834–42.
- 14 Carroll S.A., Bird B.H., Rollin P.E., Nichol ST. Ancient common ancestry of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Mol Phylogenet Evol.* 2010;55(3):1103–10.
- 15 Anagnostou V, Papa A. Evolution of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(5):948–54.
- 16 Portillo A., Palomar A.M., Santibáñez P, Oteo JA. Epidemiological aspects of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Western Europe: what about the future? *Microorganisms* 2021, 9(3):649.
- 17 Gruber C.E., et al. Geographical variability affects CCHFV detection by RT-PCR: a Tool for In-Silico evaluation of molecular assays. *Viruses.* 2019;11(10):953.

18 Sánchez-Seco M.P., et al. Widespread detection of multiple strains of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2022;28(2):394.

19 Norouzi M., et al. Recent advances on nanomaterials-based fluorimetric approaches for microRNAs detection. *Mater Sci Engineering: C.* 2019;104:110007.

20 Osman H.A., et al. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Crimean Congo hemorrhagic fever virus in Sudan. *J Virol Methods.* 2013;190(1–2):4–10.

21 Jafari A., et al. Molecular detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus in hard ticks from South Khorasan, east of Iran 2022.

22 Febrer-Sendra B., Fernández-Soto P., et al. A Novel RT-LAMP for the Detection of Different Genotypes of Crimean–Congo Haemorrhagic Fever Virus in Patients from Spain. *Intern. Journal of Molecular Sciences.* 2023; 24(7):6411. <https://doi.org/10.3390/ijms24076411>.