

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Никольский М.А.¹, Ведерников В.Е.², Вязовая А.А.³, Домонова Э.А.⁴, Лисок А.В.², Лиознов Д.А.^{1,5}

АПРОБАЦИЯ И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОГО НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВИДОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ВИРУСОВ ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА 6А И 6В

¹ФГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия;

²ГК «Алкор Био», 192148, Санкт-Петербург, Россия;

³ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия;

⁵ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, 197376, Санкт-Петербург, Россия

Вирус герпеса человека 6 (ВГЧ-6) с 2012 года подразделяют на два биологических вида – ВГЧ-6А и ВГЧ-6В. Данные о циркуляции этих видов в России ограничены. Целью нашей работы была апробация и доклинические испытания отечественного набора реагентов для выявления и видовой дифференциации вирусов герпеса человека 6А и 6В методом ПЦР (ГК «Алкор Био», г. Санкт-Петербург). Изучены образцы биологического материала 239 детей и взрослых с острой и латентной ВГЧ-6А/В-инфекцией и подозрением на хромосомно-интегрированный ВГЧ-6А/В-статус. Для подтверждения результатов дифференциации использовали параллельное тестирование образцов с помощью двух альтернативных методик и секвенирование. Дополнительно проведена апробация на панели контрольных образцов ДНК ВГЧ-6А/В. Видовая дифференциация ВГЧ-6А и ВГЧ-6В происходит независимо от исходных концентраций ДНК вирусов в исследуемом образце. Аналитическая специфичность – 100%. Показана 100% сходимость обнаружения и дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В, полученных с помощью изучаемого набора реагентов и двух альтернативных референсных систем. Результаты подтверждены секвенированием по Сэнгеру. При тестировании панели контрольных образцов ДНК ВГЧ-6А/В установлено 100% совпадение результатов. Отечественный набор реагентов для видовой дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В методом ПЦР может быть использован как для диагностики, так и в эпидемиологических исследованиях.

Ключевые слова: ВГЧ-6А; ВГЧ-6В; хиВГЧ-6А/В; ВГЧ-6А/В-инфекция; внезапная экзантема; секвенирование.

Для цитирования: Никольский М.А., Ведерников В.Е., Вязовая А.А., Домонова Э.А., Лисок А.В., Лиознов Д.А. Апробация и доклинические испытания отечественного набора реагентов для видовой дифференциации вирусов герпеса человека 6А и 6В. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (4): 224-231. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-224-231>

Для корреспонденции: Никольский Михаил Андреевич, врач-педиатр, канд. мед. наук, асс. каф. педиатрии; e-mail: nicolm@inbox.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 22.10.2022

Принята к печати 10.03.2023

Опубликовано 00.04.2023

Nikolskiy M.A.¹, Vedernikov V.E.², Vyazovaya A.A.³, Domonova E.A.⁴, Lisok A.V.², Lioznov D.A.^{1,5}

APPROBATION AND PRECLINICAL TRIALS OF RUSSIAN REAGENTS SET FOR SPECIES DIFFERENTIATION OF HUMAN HERPES VIRUSES 6A AND 6B

¹First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, 197022, Saint Petersburg, Russia;

²Alkor Bio Group of Companies, 192148, Saint Petersburg, Russia;

³St. Petersburg Pasteur Institute, 197101, Saint Petersburg, Russia;

⁴Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 111123, Moscow, Russia;

⁵Smorodintsev Research Institute of Influenza, 197376, Saint Petersburg, Russia

Since 2012, human herpes virus 6 (HHV-6) was divided into two different species (HHV-6A and HHV-6B). These variants have various geographical predominance and clinical manifestation, but there is no enough data about prevalence of HHV-6 species in Russia. The aim of our study was to test a novel PCR set of reagents for HHV-6A/B detection and differentiation, designed and manufactured by the "Alkor Bio" company. 239 patients with acute or latent HHV-6A/B-infection or iciHHV-6A/B were tested by novel PCR set of reagents and in parallel by two other reference PCR test systems and sequencing. All tested samples were typed as HHV-6B. Novel PCR set of reagents showed 100% analytical specificity and full concordance with two other reference PCR test systems and Sanger sequencing. The novel PCR set of reagents from "Alkor Bio" company for HHV-6A and HHV-6B species detection and differentiation can be used both for diagnostics and in epidemiological studies.

Key words: HHV-6A; HHV-6B; iciHHV-6A/B; exanthem subitum; sequencing.

For citation: Nikolskiy M.A., Vedernikov V.E., Vyazovaya A.A., Domonova E.A., Lisok A.V., Lioznov D.A. Approbation and preclinical trials of Russian reagents set for species differentiation of human herpes viruses 6A and 6B. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (4): 224-231 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620-0869-2084-2023-68-4-224-231>

For correspondence: *Nikolskiy Mikhail Andreevich*, pediatrician, PhD, assistant of professor; e-mail: nicolm@inbox.ru

Information about authors:

Nikolskiy M.A., <https://orcid.org/0000-0001-9766-2577>;
Vedernikov V.E., <https://orcid.org/0000-0001-7260-8013>;
Vyazovaya A.A., <https://orcid.org/0000-0001-9140-8957>;
Domonova E.A., <https://orcid.org/0000-0001-8262-3938>;
Lisok A.V., <https://orcid.org/0000-0002-3134-1970>;
Lioznov D.A., <https://orcid.org/0000-0003-3643-7354>.

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 20.10.2022
Accepted 10.03.2023
Published 00.04.2023

Вирус герпеса человека 6 (ВГЧ-6) идентифицирован в 1986 г. [1]. Уже через несколько лет были выявлены новые штаммы этого же вируса, имеющие значимые молекулярно-биологические отличия. В 1992 г. предложено разделить ВГЧ-6 на два варианта А и В. Эти два варианта *in vitro* демонстрируют различия по тропизму к Т-клеткам, особенностям иммунологического ответа и последовательности ДНК [2, 3]. В виду отсутствия сведений о межвидовой рекомбинации вируса герпеса человека 6А (ВГЧ-6А) и вируса герпеса человека 6В (ВГЧ-6В), сделан вывод, что они занимают разные экологические ниши [4]. Согласно новой международной классификации, принятой в 2012 году, ВГЧ-6А и ВГЧ-6В являются самостоятельными таксономическими единицами [5, 6].

ВГЧ-6А и ВГЧ-6В – ДНК-содержащие вирусы, принадлежащие семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Betaherpesvirinae*, роду *Roseolovirus*. ВГЧ-6А и ВГЧ-6В различаются по последовательности нуклеотидов, особенностям культивирования, эпидемиологическим данным. Нуклеотидные последовательности ВГЧ-6А и ВГЧ-6В совпадают в 75–95% в зависимости от сравниваемого гена. Кроме того, ряд исследований продемонстрировал различия процесса сплайсинга и регуляции транскрипции [7]. Имеют место географические различия в распространенности ВГЧ-6А и ВГЧ-6В, хотя возможна и одновременная циркуляция обоих видов на одной территории [8, 9].

ВГЧ-6В значительно чаще, чем ВГЧ-6А, вызывает острую инфекцию у детей (внезапная экзантема, лихорадка без сыпи), а также ассоциирован с фебрильными судорогами и височной эпилепсией. К тому же ВГЧ-6В, в отличие от ВГЧ-6А, резистентен к противовирусному действию альфа- и бета-интерферонов [10]. ВГЧ-6А чаще выявляется у взрослых людей с хроническими заболеваниями [11]. Несмотря на то, что оба вируса являются нейротропными, ВГЧ-6А оказывает более серьезное воздействие на организм человека [12] и встречается чаще, чем ВГЧ-6В, при рассеянном склерозе и ромбэнцефалите [13].

В зарубежной литературе представлены данные о способности реактивации обоих вариантов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [14] и органов [15]. Помимо этого, ВГЧ-6А и ВГЧ-

6В могут интегрироваться в субтеломерную/теломерную область хромосом человека и передаваться по наследству (хромосомно-интегрированный ВГЧ-6А (хиВГЧ-6А), хромосомно-интегрированный ВГЧ-6В (хиВГЧ-6В)) [16].

Как ВГЧ-6А, так и ВГЧ-6В, тропны к CD4+ лимфоцитам [17]. В отличие от ВГЧ-6В, ВГЧ-6А способен инфицировать также CD8+ лимфоциты и натуральные киллеры [18]. Кроме того, он успешно реплицируется в нейтральных стволовых клетках, а также в клетках-предшественниках астроцитов и олигодендроцитов [19]. Вирусы используют разные клеточные рецепторы для проникновения: ВГЧ-6А – CD46, ВГЧ-6В – CD134 [20, 21]. Эти различия могут объяснять различную их тропность к тканям и отличающийся спектр патологии.

Таким образом, продолжают накапливаться новые сведения о различиях между ВГЧ-6А и ВГЧ-6В.

На текущий момент используемые традиционные иммунохимические методы, направленные на выявление и количественное определение вирусоспецифических антител, не способны различить ВГЧ-6А и ВГЧ-6В. Для научных целей создана мультиплексная методика, позволяющая провести дифференциацию антител класса G к антигенам ВГЧ-6А и ВГЧ-6В [22]. Но чаще для дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В используются молекулярно-генетические методы: ПЦР и секвенирование (определение последовательностей нуклеотидов нуклеиновой кислоты).

Известен способ дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В (JP2003135100 (A), 2003-05-13) на основе разницы длин амплифицируемых фрагментов для различных подтипов с последующей электрофоретической детекцией. Для анализа выбран ген *U89/90*, отличающийся наличием инсерций размером 108 и 228 п.н. для ВГЧ-6В относительно ВГЧ-6А. Недостатком способа является использование для анализа электрофоретической детекции и варибельность размеров инсерций [23].

Более перспективными для использования являются методики на основе ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов анализа в режиме «реального времени» для которых задача по дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В может быть сведена к определе-

нию однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), позволяющих специфично различать указанные виды.

Потребность в быстрых, производительных, недорогих тестах для анализа ОНП привело к бурному развитию различных методов для дискриминации аллельных вариантов: на основе лигирования [24], масс-спектропии [25]; ДНК-микрочипа [26]; анализа длин рестрикционных фрагментов [27]; зондов типа TaqMan [28]; анализа кривой плавления [29] и др. Наиболее распространенной за счет высокой чувствительности, специфичности и надежности интерпретации результатов является технология TaqMan.

Отсутствие в России зарегистрированных наборов реагентов для дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В до настоящего времени не позволяло изучить соотношение видов в популяции ВГЧ-6.

Целью нашей работы явилась апробация и проведение доклинических испытаний набора реагентов для обнаружения и видовой дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В на основе метода ПЦР.

Материал и методы. Разработка набора реагентов осуществлена в ГК «Алкор Био», Санкт-Петербург. Техническим результатом изобретения является способ определения ВГЧ-6А и ВГЧ-6В на основе технологии TaqMan. При использовании заявленного способа исследования могут проводиться в одной пробирке на амплификаторах с тремя каналами детекции [30]. Определение ВГЧ-6А и ВГЧ-6В осуществляется по фрагменту последовательности гена *U67*, содержащей два ОНП, что позволяет дифференцировать виды. В качестве внутреннего эндогенного контроля используется фрагмент ДНК гена *B2M* (*beta-2-microglobulin*). Амплификация ДНК гена *B2M* не конкурирует с определением ВГЧ-6А, ВГЧ-6В и позволяет по значениям пороговых циклов *Sq* контролировать преаналитический и аналитический этапы исследования. В процессе амплификации происходит специфическое связывание и последующее расщепление соответствующих зондов, в результате чего повышается уровень флуоресценции, который фиксируется детектором амплификатора в режиме «реального времени» одновременно по каналам: HEX – для ВГЧ-6А, ROX – ВГЧ-6В и FAM – *B2M*.

Последовательности специфических праймеров и зондов, используемых для видовой дифференциации вирусов и детекции внутреннего эндогенного контроля описаны в патенте [30].

Состав реакционной смеси ($V=30$ мкл): 50 mM Tris- SO_4 , pH 8,0; 10 mM $(NH_4)_2SO_4$; 3,5 mM $MgCl_2$; 30 mM KCl; 0,01 % Tween-20; по 0,25 mM каждого dNTP; по 3 pM праймеров и по 1,5 pM зондов; 2,5 е.а. TaqM ДНК-полимеразы производства ООО «Компания Алкор Био» (Россия) и 5 мкл ДНК выделенной из биологического образца.

Параметры циклирования: «горячий старт» в течение 15 мин при 95°C; 45 циклов в режиме 95°C в течение 10 с, 60°C в течение 20 с с детекцией флуоресцентного сигнала для флуорофоров FAM, HEX и ROX. Постановку ПЦР проводили на термоциклере для амплификации нуклеиновых кислот «CFX96 Touch» («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США, № ФСЗ 2008/03399).

При апробации разработчиками набора реагентов проведено изучение влияния исходной концентрации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В в тестируемом образце на получаемые результаты ПЦР-анализа. Исследование проводили с использованием стандартных образцов предприятия (СОП). В качестве высококонцентрированной матрицы использовали СОП с $Sq=20\pm 2$, а низкоконцентрированной – $Sq=30\pm 2$. Для каждой комбинации концентраций ДНК вирусов тестирование проводилось в 8 повторениях. Схема эксперимента представлена в табл. 1.

Аналитическую специфичность оценили при тестировании образцов геномной ДНК человека и панели ДНК следующих микроорганизмов: *Human alphaherpesvirus 1*, *Human alphaherpesvirus 2*, *Human alphaherpesvirus 3*, *Human gammaherpesvirus 4*, *Human betaherpesvirus 5*, *Human betaherpesvirus 7*. Кроме того, оценили *in silico* методом выравнивания последовательности целевого специфического участка с ДНК *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydomydia pneumoniae*, *Chlamydomydia psittaci*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma* sp., *Ureaplasma* sp., *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus*.

На первом этапе доклинических испытаний разработанного набора реагентов в ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (НИИ-ЭМ им. Пастера) исследованы 239 образцов ДНК, экстрагированных из образцов плазмы ($n=124$) или сыворотки ($n=40$) или лейкоцитов ($n=5$) венозной крови детей с острой ВГЧ-6А/В-инфекцией, полученных в Детской городской клинической больнице им. Н.Ф. Филатова (ДГКБ № 5), НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой (НИИ ДОГиТ); ногтевых пластин ($n=22$) пациентов с подозрением на хВГЧ-6А/В-статус, собранных в ДГКБ № 5 и амбулаторно; слюны ($n=48$) детей и взрослых с латентной ВГЧ-6А/В-инфекцией, наблюдавшихся амбулаторно в Санкт-Петербурге.

Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. Добровольное информированное согласие родителей получали в момент госпитализации ребенка.

Таблица 1

Схема эксперимента по исследованию взаимного ингибирования двух выявляемых специфических мишеней (ДНК ВГЧ-6А и ДНК ВГЧ-6В)

№ образца п/п	ДНК ВГЧ-6А	ДНК ВГЧ-6В
1	Высокая концентрация СОП	Высокая концентрация СОП
2	Высокая концентрация СОП	Низкая концентрация СОП
3	Низкая концентрация СОП	Высокая концентрация СОП
4	Низкая концентрация СОП	Низкая концентрация СОП

На втором этапе работы выполнено параллельное тестирование 120 биологических образцов плазмы венозной крови детей из вышеописанной выборки с выявленным ВГЧ-6А/В с использованием двух альтернативных референсных систем на основе технологии TaqMan: согласно описанию, представленному в патенте CN103820574В к гену *U38* [31] и по J. Yavarian и соавт. [32] к гену *U41*.

Дополнительно, для подтверждения полученных результатов проведено секвенирование по Сэнгеру 49 образцов фрагмента гена *U86* длиной 547 п.н., который идентичен между ВГЧ-6А и ВГЧ-6В менее чем на 70% и у ВГЧ-6А несет делецию длиной 15 п.н. [33]. Результаты секвенирования сравнивались с референсными последовательностями HNV-6А NC_001664 и HNV-6В NC_000898.

На заключительном этапе проведена апробация отечественного набора реагентов для видовой дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В методом ПЦР на панели контрольных образцов ДНК ВГЧ-6А/В, разработанной в отделе молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва).

Контрольная панель включала в себя 12 зашифрованных образцов: 10 положительных и 2 отрицательных. Положительные образцы представляли собой препараты очищенной ДНК клинических изолятов ВГЧ-6А или ВГЧ-6В, выделенных от пациентов с хиВГЧ-6А, хиВГЧ-6В или больных ВЭ. Отрицательные – препараты очищенной ДНК, экстрагированной из биологического материала, не содержащего ВГЧ-6А/В. Все образцы ДНК были выделены с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Количественное определение ДНК ВГЧ-6А/В выполняли методом ПЦР-РВ с использованием набора реагентов «АмплиСенс® HNV6-скрин-титр-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Постановку и анализ результатов амплификации проводили на приборе с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» «Rotor-Gene Q», «Qiagen GmbH», Германия). Видовую принадлежность устанавливали на основании анализа данных, полученных методом массового параллельного секвенирования («MiSeq», Illumina, США), описанных ранее [34, 35].

Расшифровку панели контрольных образцов ДНК ВГЧ-6А/В осуществляли в НИИЭМ им. Пастера. Идентификацию ДНК в анализируемых образцах проводили методом ПЦР-РВ с использованием разработанного набора реагентов (ГК «Алкор Био»). Постановку ПЦР проводили на термоциклере для амплификации нуклеиновых кислот «CFX96 Touch» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

Результаты. В ходе апробации разработанного набора реагентов установлено, что видовая дифференциация ВГЧ-6А и ВГЧ-6В происходит независимо от исходных концентраций ДНК вирусов в исследуемом образце. На рисунке представлены кривые флуоресценции в соответствии с табл. 1.

При тестировании образцов ДНК человека и панели ДНК 6 микроорганизмов (*Human alphaherpesvirus*

1, *Human alphaherpesvirus 2*, *Human alphaherpesvirus 3*, *Human gammaherpesvirus 4*, *Human betaherpesvirus 5*, *Human betaherpesvirus 7*) неспецифических реакций не обнаружено. По результатам анализа *in silico* отсутствуют неспецифические реакции с ДНК *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma* sp., *Ureaplasma* sp., *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus*.

В рамках доклинических испытаний отечественного набора реагентов для видовой дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В в ДГКБ№ 5 в обследование были включены 166 больных (88 мальчиков, 78 девочек) в возрасте от 9 дней до 33 месяцев жизни (средний возраст – 10,5±0,6 месяцев) с острой ВГЧ-6А/В-инфекцией.

Проанализированы особенности клинического анализа крови у детей с острой ВГЧ-6А/В-инфекцией. У большинства обследованных он характеризовался нормальным содержанием лейкоцитов (53,6%) или лейкопенией (20,5%), также была типична нейтропения и/или лимфоцитопения (суммарно 57% больных). Лейкоцитоз не был характерен для острой ВГЧ-6А/В-инфекции и встречался в 4,8% случаях при наличии сопутствующих заболеваний.

На основании выявленных симптомов и данных лабораторного обследования у 150 пациентов был выставлен диагноз внезапной экзантемы (ВЭ). ВЭ была типичной (3-4 суток высокая температура тела с последующим появлением типичной пятнисто-папулезной сыпи) у большинства пациентов (92%). У 8% детей ВЭ была атипичной – сыпь появлялась после однократного подъема температуры тела выше 38° С или через 2-3 дня субфебрильной температуры. Фебрильные судороги на фоне ВЭ были у 13 пациентов (7,8%).

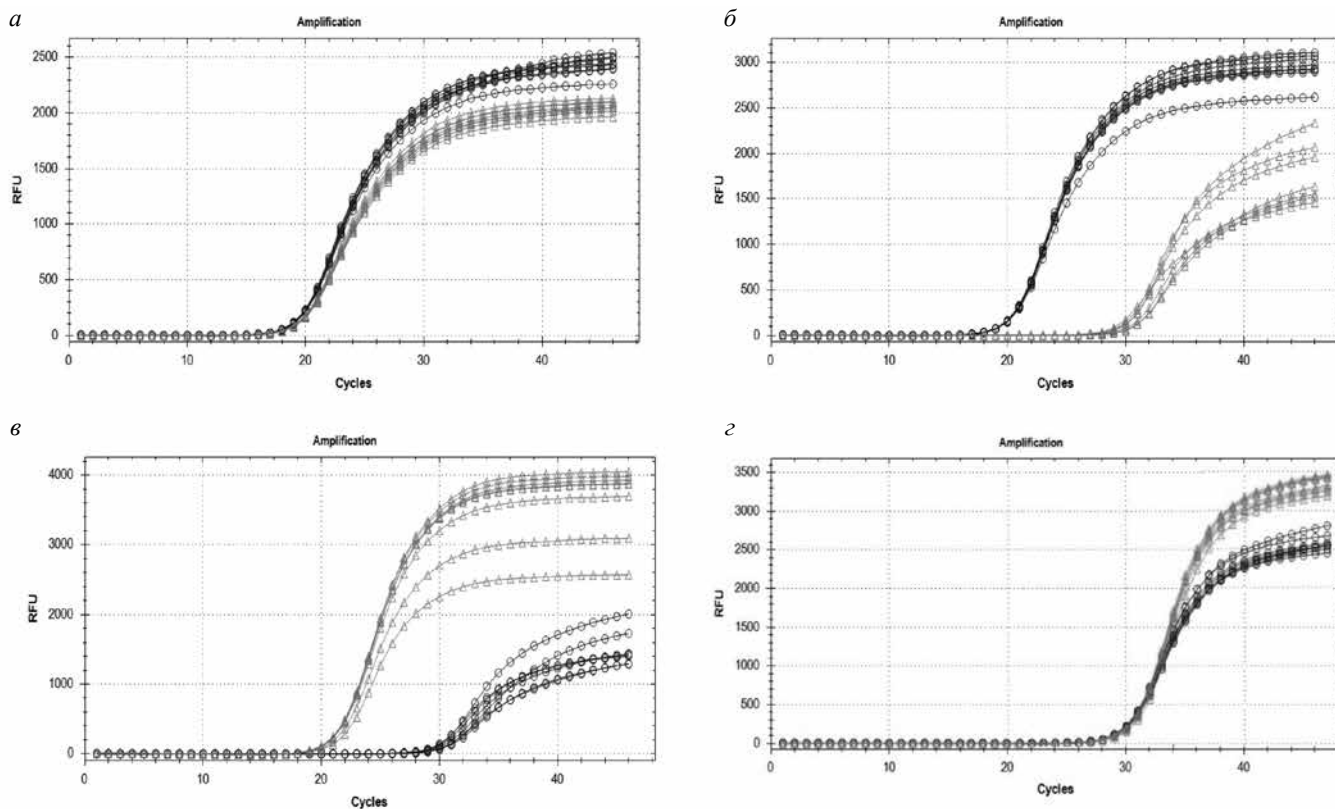
У девяти детей была лихорадка без сыпи (ЛС). ЛС характеризовалась подъемом температуры тела в течение 3-4 суток, но после ее нормализации сыпи не регистрировалось.

У пяти новорожденных детей была сыпь без лихорадки. В двух случаях сыпь была яркой, похожей на многоформную крапивницу, описанной рядом авторов [36] и послужила основной причиной госпитализации, в остальных – пятнисто-папулезной. Сыпь проходила бесследно в течение нескольких дней. У двух обследованных новорожденных детей не было ни лихорадки, ни сыпи.

У трети пациентов с острой ВГЧ-6А/В-инфекцией заболевание манифестировало на фоне острого респираторного заболевания (ОРВИ, бронхиты, бронхиолиты, пневмонии) – 34 пациента (20%), острых кишечных инфекций (в основном ротавирусной природы – 22 пациента (13%)). У 10 пациентов (6%) была клиническая картина мононуклеозоподобного синдрома.

ДНК ВГЧ-6В была определена у всех пациентов (n=166) с ВЭ, ЛС, мононуклеозоподобным синдромом.

Среди пациентов НИИ ДОГиТ острая ВГЧ-6В-инфекция была выявлена у трех детей. Больные были обследованы до и после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в динамике на 14, 28, 30 день (табл. 2).



Кривые флуоресценции при исследовании влияния амплификации ДНК вирусов ВГЧ-6А и ВГЧ-6В в различной концентрации друг на друга.

а – высокая вирусная нагрузка вирусов ВГЧ-6А и ВГЧ-6В; б – высокая вирусная нагрузка вируса ВГЧ-6А при низкой ВГЧ-6В; в – высокая вирусная нагрузка вируса ВГЧ-6В при низкой ВГЧ-6А; з – низкая вирусная нагрузка вирусов ВГЧ-6А и ВГЧ-6В.

Кружками обозначены кривые флуоресценции по каналу HEX (ВГЧ-6А), треугольниками - кривые флуоресценции, соответствующие каналу ROX (ВГЧ-6В).

Таблица 2

Диагнозы и вид ТГСК у пациентов НИИ ДОГиТ

№ п/п	Возраст, годы	Пол	Диагноз	Вид и характеристики ТГСК
1	5 лет	М	Острый миелоидный лейкоз, М5, первично резистентное течение	Аллогенная неродственная КМ* РИК**
2	14 мес	Ж	Врожденный острый лимфобластный лейкоз	Гаплоидентичная КМ МАК**
3	5 лет	М	Вторичный острый миелоидный лейкоз	Аллогенная неродственная КМ МАК

Примечание. * - Источник ТГСК (трансплантации гемопоэтических стволовых клеток) – КМ – костный мозг; ** - различия в режимах кондиционирования – МАК – миелоаблативный, РИК – режим кондиционирования со сниженной токсичностью.

У одного пациента произошла реактивация ВГЧ-6В на 14-й день после ТГСК. Во втором случае острая первичная инфекция, вызванная ВГЧ-6В, зарегистрирована на 24 день. У третьего больного первичная ВГЧ-6В-инфекция выявлена на 30-й день после ТГСК. У всех пациентов после ТГСК клиническими проявлениями острого инфекционного процесса были лихорадка и нейтропения.

В слюне 48 больных (от 1 года жизни до 54 лет), наблюдавшихся у инфекциониста в амбулаторном центре НИИЭМ им. Пастера, был также выделен ВГЧ-6В. Основными причинами обследования на ВГЧ-6А/В пациентов были синдром хронической

усталости, частые и длительные респираторные заболевания, рецидивирующие герпетические инфекции, подозрение на иммунодефицитное состояние.

Кроме этого, ВГЧ-6В был выделен из образцов ногтевых пластин 22 пациентов и их ближайших родственников с подозрением на хиВГЧ-6А/В-статус. Поиск производился как у пациентов ДГКБ № 5 с высокой вирусной нагрузкой в плазме венозной крови, так и у пациентов, обратившихся амбулаторно [37].

Таким образом, во всех 239 образцах биологического материала, исследованных на первом этапе доклинических испытаний разработанного набора реагентов, у детей и взрослых с различными диагнозами, с острой и

Сопоставление результатов тестирования образцов контрольной панели

№ образца п/п	Биологический материал	Заданные параметры (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора)		Полученные результаты (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера)
		Вид микроорганизма	Концентрация, (копий ДНК/мл)	Вид микроорганизма
1	Моча	ВГЧ-6А	2,0x10 ³	ВГЧ-6А
2	Плазма крови	Отсутствует	–	Отсутствует
3	Плазма крови	ВГЧ-6А	3,3x10 ⁴	ВГЧ-6А
4	Плазма крови	ВГЧ-6А	8,5x10 ⁴	ВГЧ-6А
5	Плазма крови	ВГЧ-6А	2,2x10 ⁵	ВГЧ-6А
6	Моча	ВГЧ-6В	6,9x10 ⁴	ВГЧ-6В
7	Моча	ВГЧ-6В	1,6x10 ⁴	ВГЧ-6В
8	Плазма крови	ВГЧ-6А	7,5x10 ³	ВГЧ-6А
9	Плазма крови	ВГЧ-6А	1,7x10 ⁴	ВГЧ-6А
10	Плазма крови	Отсутствует	–	Отсутствует
11	Плазма крови	ВГЧ-6А	3,6x10 ⁴	ВГЧ-6А
12	Плазма крови	ВГЧ-6А	1,6x10 ⁵	ВГЧ-6А

латентной инфекцией, вызванной ВГЧ-6А/В, а также с подозрением на хиВГЧ-6А/В, определен ВГЧ-6В.

Параллельное тестирование 120 образцов, экстрагированных из плазмы венозной крови, с помощью двух альтернативных референсных систем и филогенетический анализ результатов секвенирования по Сэнгеру 49 образцов ДНК подтвердили, что во всех образцах обнаружена ДНК ВГЧ-6В.

Результаты апробации набора реагентов для видовой дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В методом ПЦР на панели контрольных образцов ДНК ВГЧ-6А/В (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора), полученные на заключительном этапе исследования, представлены в табл. 3. Среди зашифрованных образцов контрольной панели были определены: в двух случаях ДНК ВГЧ-6В, восьми – ДНК ВГЧ-6А, двух – ДНК вирусов не обнаружена. Как видно из табл. 3, расхождений в полученных данных с разработчиком контрольной панели не выявлено.

Обсуждение. До сих пор значительное число представленных эпидемиологических и клинических исследований не разграничивают ВГЧ-6А и ВГЧ-6В, что ведет к получению недостоверных данных об этих различных уникальных видах.

В клинической практике определение видов ВГЧ-6А и ВГЧ-6В важно. Например, показано, что выявление ВГЧ-6А чаще всего свидетельствует о наследуемой хромосомной интеграции – хиВГЧ-6А–статусе пациента, не требующем назначения противовирусной терапии [38].

Существуют только единичные отечественные исследования, посвященные изучению ВГЧ-6А и ВГЧ-6В. Так, при обследовании в Московском регионе образцов крови 59 детей в возрасте от 1 года до 10 лет с установленной инфекцией, вызванной ВГЧ-6А/В (клинически здоровыми были 14 человек, с проявлениями острой респираторной инфекции – 45) у

27 (46%) детей был выявлен ВГЧ-6А, ВГЧ-6В – у 31 (53%), у одного пациента вид не определен [39]. Для видовой дифференциации использована методика, описанная J.Yavarian и соавт. [32].

В других исследованиях определение уникального вида ВГЧ-6А или ВГЧ-6В у пациентов с хиВГЧ-6А/В–статусом осуществлялось при использовании метода массового параллельного секвенирования [34, 35, 40] с целью последующего филогенетического анализа. Однако данный метод дорог и не доступен для рутинной клинической практики.

В соответствии с полученным нами в ходе апробации и доклинического испытания разработанного набора реагентов результатами ВГЧ-6В превалирует у детей с ВГЧ-6А/В–инфекцией в Санкт-Петербурге. Изучаемый набор реагентов, разработанный ГК «Алкор Био» (Санкт-Петербург) позволил в кратчайшие сроки провести дифференцировку уникальных видов ВГЧ-6А/В в условиях стандартной ПЦР-лаборатории.

Выводы

1. Проведены апробация и доклинические испытания отечественного набора реагентов для обнаружения и видовой дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В методом ПЦР (ГК «Алкор Био», Санкт-Петербург) в различном биологическом материале (плазма, сыворотка, лейкоциты крови; слюна, ногтевые пластины, моча).

2. Установлено, что видовая дифференциация ВГЧ-6А и ВГЧ-6В при использовании разработанного набора реагентов происходит независимо от исходных концентраций ДНК вирусов в исследуемом образце. Аналитическая специфичность – 100%.

3. Показана 100% сходимость обнаружения и дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В, полученных с помощью изучаемого набора реагентов и двух альтернативных референсных систем. Результаты подтверждены секвенированием по Сэнгеру.

4. Разработанный набор реагентов позволил провести идентификацию ДНК ВГЧ-6А и ВГЧ-6В и показал 100% совпадение результатов при тестировании панели контрольных образцов ДНК ВГЧ-6А/В (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

5. Отечественный набор реагентов для выявления и видовой дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В методом ПЦР может быть использован как для диагностики, так и в эпидемиологических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Salahuddin S.Z., Ablashi D.V., Markham P.D., Josephs S. F., Sturzenegger S., Kaplan M. et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 1986; 234(4776):596–601.
2. Wyatt L.S., Balachandran N., Frenkel N. Variations in the replication and antigenic properties of human herpesvirus 6 strains. *J. Infect. Dis.* 1990; 162(4):852–7.
3. Ablashi D.V., Balachandran N., Josephs S.F., Hung C.L., Krueger G.R., Kramarsky B. et al. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology*. 1991; 184(2):545–52.
4. Ablashi D., Agut H., Berneman Z., Campadelli-Fiume G., Carrigan D., Ceccerini-Nelli L. et al. Human herpesvirus-6 strain groups: a nomenclature. *Arch. Virol.* 1993; 129(1):363–6.
5. Davison A., Pellett P., Stewart J. Rename species in the family *Herpesviridae* to incorporate a subfamily designation. *ICTVonline*. Code assigned: 2015.010aD.
6. Ablashi D., Agut H., Alvarez-Lafuente R., Clark D.A., Dewhurst S., DiLuca D. et al. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. *Arch. Virol.* 2014 May; 159(5):863-70.
7. Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J. Virol.* 1999; 73(10):8040–52.
8. Bates M., Monze M., Bima H., Kapambwe M., Clark D., Kasolo F.C. et al. Predominant human herpesvirus 6 variant A infant infections in an HIV-1 endemic region of Sub-Saharan Africa. *J. Med. Virol.* 2009; 81(5):779–89.
9. Leibovitch E.C., Brunetto G.S., Caruso B. Coinfection of Human Herpesviruses 6A (HHV-6A) and HHV-6B as Demonstrated by Novel Digital Droplet PCR Assay. *PLoS One*. 2014; 9(3):1-12.
10. Jaworska J., Gravel A., Flamand L. Divergent susceptibilities of human herpesvirus 6 variants to type I interferons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107:8369–74.
11. Flamand L., Lautenschlager I., Krueger G., Ablashi D. Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B, and HHV-7. *Diagnosis and Clinical Management*. 3rd ed. Elsevier UK; 2014.
12. Hall C.B., Caserta M.T., Schnabel K.C., Long C., Epstein L.G., Insel R.A. et al. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 26(1):132–7.
13. Alvarez-Lafuente R., De Las Heras V., Bartolome M., Picazo J.J., Arroyo R. Relapsing-remitting multiple sclerosis and human herpesvirus 6 active infection. *Arch. Neurol.* 2004; 61(10):1523–7.
14. Chapenko S., Trociukas I., Donina S., Chistyakov M., Sultanova A., Gravelina S. et al. Relationship between beta-herpesviruses reactivation and development of complications after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J. Med. Virol.* 2012; 84(12):1953–60.
15. Cone R.W., Huang M.L., Hackman R.C., Corey L. Coinfection with human herpesvirus 6 variants A and B in lung tissue. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(4):877–81.
16. Pellett P.E., Ablashi D.V., Ambros P.F., Agut H., Caserta M.T., Descamps V. et al. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. *Rev. Med. Virol.* 2012; 22(3): 144–55.
17. Nastke M.D., Becerra A., Yin L., Dominguez-Amoroch O., Gibson L., Stern L.J. et al. Human CD4+ T cell response to human herpesvirus 6. *J. Virol.* 2012; 86:4776–92.
18. De Filippis L., Foglieni C., Silva S., Vescovi A.L., Lusso P., Malnati M.S. Differentiated human neural stem cells: a new ex vivo model to study HHV-6 infection of the central nervous system. *J. Clin. Virol.* 2006; 37(Suppl. 1):27–32.
19. Gu B., Zhang G.F., Li L.Y., Zhou F., Feng D.J., Ding C.L. et al. Human herpesvirus 6A induces apoptosis of primary human fetal astrocytes via both caspase-dependent and -independent pathways. *Virol. J.* 2011; 8:530.
20. Mori Y., Seya T., Huang H.L., Akkapaiboon P., Dhepakson P., Yamanishi K. et al. Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. *J. Virol.* 2002; 76:6750–61.
21. Tang H., Serada S., Kawabata A., Ota M., Hayashi E., Naka T. et al. CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 110:9096–9.
22. Engdahl E., Gustafsson R., Huang J., Biström M., Lima Bomfim I., Stridh P. et al. Increased Serological Response Against Human Herpesvirus 6A Is Associated With Risk for Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* 2019; 10:2715.
23. <https://patents.google.com/patent/JP2003135100A/en?q=JP2003135100>.
24. Landegren U., Kaiser R., Sanders J., Hood L.A. A Ligase-Mediated Gene Detection Technique. *Science*. 1988; 241:1077-80.
25. Griffin T. J., Hall J.G., Prudent J.R., Smith L.M. Direct genetic analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 25: 6301-6.
26. Wang D.G., Fan J.B., Siao C.J., Berno A., Young P., Sapolsky R. et al. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science*. 1998; 280:1077-82.
27. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230:1350-4.
28. Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995; 4: 357-62.
29. Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Anal. Biochem.* 1997; 245:154-60.
30. Ведерников В.Е., Никольский М.А., Вязовая А.А., Лиознов Д.А., Нарвская О.В. Способ идентификации вариантов А и В вируса герпеса человека 6-го типа. Патент РФ № 2627607; 2017. <https://patents.google.com/patent/CN103820574B/en>.
31. Yavarian J., Shatizadeh Malekshahi S., Yavarian R., Yazdani S., Janani L. et al. Type specific Real time PCR for detection of human herpes virus 6 in schizophrenia and bipolar patients: a case control study. *BMC Psychiatry*. 2015 Nov 20; 15:296.
32. Isegawa Y., Mukai T., Nakano K., Kagawa M., Chen J., Mori Y. et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J. Virol.* 1999; 73(10):8053–63.
33. Мелехина Е.В., Домонова Э.А., Гоптарь И.А., Шипулина О.Ю., Горелов А.В. Первый в России случай наследственной передачи хромосомно-интегрированного вируса герпеса человека 6В (Human betaherpesvirus 6В). *Вопросы практической педиатрии*. 2019; 14(1):33–40. DOI: 10.20953/1817-7646-2019-1-33-40.
34. Домонова Э.А., Сильвейстрова О.Ю., Гоптарь И.А., Кулешов К.В., Пасхина И.Н., Никифорова А.В. и др. Первый случай выявления и лабораторного подтверждения наследственной передачи хромосомно-интегрированного Human betaherpesvirus 6A в Российской Федерации. *Инфекционные болезни*. 2019; 17(3): 5–14. DOI: 10.20953/1729-9225-2019-3-5-14.
35. Borghesi A., Cipelletti P., Maragliano R., Manzoni P., Stronati M. Human herpesvirus-6 associated neonatal urticaria multiforme. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*. 2012; 98(5): F450.
36. Никольский М.А., Вязовая А.А., Лиознов Д.А., Нарвская О.В., Смирнова Н.Н. Случай хромосомно-интегрированного вируса герпеса человека 6В типа у часто длительно болеющего ребенка. *Журнал Инфектологии*. 2020; 12(4):105-8.
37. Ar buckle J.H., Medveczky P.G. The molecular biology of human herpesvirus-6 latency and telomere integration. *Microbes Infect.* 2011; 13(9): 731–41.
38. Мелехина Е.В., Лысенкова М.Ю., Свитич О.А., Музыка А.Д., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н. и др. Особенности течения инфекции ВГЧ-6А и ВГЧ-6В у детей, проживающих в Московском регионе. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2018; (2):42–9.

40. Викулов Г.Х., Домонова Э.А., Мелехина Е.В., Сильвейстрова О.Ю., Кулешов К.В. Наследуемая хромосомная интеграция *Human betaherpesvirus 6B* у женщины с сочетанной герпесвирусной инфекцией, протекающей на фоне вторичной иммунной недостаточности. *Инфекционные болезни*. 2020; 18(4): 182–8. DOI: 10.20953/1729-9225-2020-4-182-188.

REFERENCES

1. Salahuddin S.Z., Ablashi D.V., Markham P.D., Josephs S. F., Sturzenegger S., Kaplan M. et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 1986; 234(4776):596–601.
2. Wyatt L.S., Balachandran N., Frenkel N. Variations in the replication and antigenic properties of human herpesvirus 6 strains. *J. Infect. Dis.* 1990; 162(4):852–7.
3. Ablashi D.V., Balachandran N., Josephs S.F., Hung C.L., Krueger G.R., Kramarsky B. et al. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology*. 1991; 184(2):545–52.
4. Ablashi D., Agut H., Berneman Z., Campadelli-Fiume G., Carrigan D., Ceccerini-Nelli L. et al. Human herpesvirus-6 strain groups: a nomenclature. *Arch. Virol.* 1993; 129(1):363–6.
5. Davison A., Pellett P., Stewart J. Rename species in the family *Herpesviridae* to incorporate a subfamily designation. *ICTVonline*. Code assigned: 2015.010ad.
6. Ablashi D., Agut H., Alvarez-Lafuente R., Clark D.A., Dewhurst S., DiLuca D. et al. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. *Arch. Virol.* 2014 May; 159(5):863–70.
7. Dominguez G., Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J. Virol.* 1999; 73(10):8040–52.
8. Bates M., Monze M., Bima H., Kapambwe M., Clark D., Kasolo F.C. et al. Predominant human herpesvirus 6 variant A infant infections in an HIV-1 endemic region of Sub-Saharan Africa. *J. Med. Virol.* 2009; 81(5):779–89.
9. Leibovitch E.C., Brunetto G.S., Caruso B. Coinfection of Human Herpesviruses 6A (HHV-6A) and HHV-6B as Demonstrated by Novel Digital Droplet PCR Assay. *PLoS One*. 2014; 9(3):1–12.
10. Jaworska J., Gravel A., Flamand L. Divergent susceptibilities of human herpesvirus 6 variants to type I interferons. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2010; 107:8369–74.
11. Flamand L., Lautenschlager I., Krueger G., Ablashi D. Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B, and HHV-7. Diagnosis and Clinical Management. 3rd ed. *Elsevier UK*; 2014.
12. Hall C.B., Caserta M.T., Schnabel K.C., Long C., Epstein L.G., Insel R.A. et al. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 26(1):132–7.
13. Alvarez-Lafuente R., De Las Heras V., Bartolome M., Picazo J.J., Arroyo R. Relapsing-remitting multiple sclerosis and human herpesvirus 6 active infection. *Arch. Neurol.* 2004; 61(10):1523–7.
14. Chapenko S., Trociukas I., Donina S., Chistyakov M., Sultanova A., Gravelina S. et al. Relationship between beta-herpesviruses reactivation and development of complications after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J. Med. Virol.* 2012; 84(12):1953–60.
15. Cone R.W., Huang M.L., Hackman R.C., Corey L. Coinfection with human herpesvirus 6 variants A and B in lung tissue. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(4):877–81.
16. Pellett P.E., Ablashi D.V., Ambros P.F., Agut H., Caserta M.T., Descamps V. et al. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. *Rev. Med. Virol.* 2012; 22(3) 144–55.
17. Nastke M.D., Becerra A., Yin L., Dominguez-Amoroch O., Gibson L., Stern L.J. al. Human CD4+ T cell response to human herpesvirus 6. *J. Virol.* 2012; 86:4776–92.
18. De Filippis L., Foglieni C., Silva S., Vescovi A.L., Lusso P., Malnati M.S. Differentiated human neural stem cells: a new ex vivo model to study HHV-6 infection of the central nervous system. *J. Clin. Virol.* 2006; 37(Suppl.1):27–32.
19. Gu B., Zhang G.F., Li L.Y., Zhou F., Feng D.J., Ding C.L. et al. Human herpesvirus 6A induces apoptosis of primary human fetal astrocytes via both caspase-dependent and -independent pathways. *Virol. J.* 2011; 8:530.
20. Mori Y., Seya T., Huang H.L., Akkapaiboon P., Dhepakson P., Yamanihi K. et al. Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. *J. Virol.* 2002; 76:6750–61.
21. Tang H., Serada S., Kawabata A., Ota M., Hayashi E., Naka T. al. CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 110:9096–9.
22. Engdahl E., Gustafsson R., Huang J., Biström M., Lima Bomfim I., Stridh P. et al. Increased serological response against herpesvirus 6A is associated with risk for multiple sclerosis. *Front. Immunol.* 2019; 10:2715.
23. <https://patents.google.com/patent/JP2003135100A/en?q=JP2003135100>.
24. Landegren U., Kaiser R., Sanders J., Hood L.A. A Ligase-Mediated Gene Detection Technique. *Science*. 1988; 241:1077–80.
25. Griffin T. J., Hall J.G., Prudent J.R., Smith L.M. Direct genetic analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 25:6301–6.
26. Wang D.G., Fan J.B., Siao C.J., Berne A., Young P., Sapolsky R. et al. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science*. 1998; 280:1077–82.
27. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230:1350–4.
28. Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization. *PCR Methods. Appl.* 1995; 4:357–62.
29. Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Anal. Biochem.* 1997; 245:154–60.
30. Vedernikov V.E., Nikolskiy M.A., Vyazovaya A.A., Lioznov D.A., Narvskaya O.V. Identification method for a and b versions of human herpes virus 6. Patent RF № 2627607; 2017. (in Russian)
31. <https://patents.google.com/patent/CN103820574B/en>.
32. Yavarian J., Shatizadeh Malekshahi S., Yavarian R., Yazdani S., Janani L. et al. Type specific Real time PCR for detection of human herpes virus 6 in schizophrenia and bipolar patients: a case control study. *BMC Psychiatry*. 2015 Nov 20; 15:296.
33. Isegawa Y., Mukai T., Nakano K., Kagawa M., Chen J., Mori Y. et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J. Virol.* 1999; 73(10):8053–63.
34. Melekhina E. V., Domonova E. A., Goptar' I. A., Shipulina O.Y., Gorelov A.V. First verified case of hereditary transmission of chromosomally integrated Human betaherpesvirus 6B. *Voprosy prakticheskoy pediatrii*. 2019; 14 (1):33–40. DOI: 10.20953/1817-7646-2019-1-33-40. (in Russian)
35. Domonova E.A., Sil'veystrova O.Yu., Goptar' I.A., Kuleshov K.V., Pashkina I.N., Nikiforova A.V. First laboratory confirmed case of hereditary transmission of chromosomally integrated human betaherpesvirus 6A in the Russian Federation. *Infektsionnye bolezni*. 2019; 17(3): 5–14. DOI: 10.20953/1729-9225-2019-3-5-14. (in Russian)
36. Borghesi A., Cipelletti P., Maragliano R., Manzoni P., Stronati M. Human herpesvirus-6 associated neonatal urticaria multiforme. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*. 2012; 98(5): F450.
37. Nikolskiy M.A., Vyazovaya A.A., Lioznov D.A., Narvskaya O.V., Smirnova N.N. The case of inherited chromosomal integrated human herpes virus type 6b in child with recurrent respiratory tract infections. *Zhurnal Infektologii*. 2020; 12(4):105–8. (in Russian)
38. Arbuckle J.H., Medveczky P.G. The molecular biology of human herpesvirus-6 latency and telomere integration. *Microbes Infect.* 2011; 13 (9): 731–41.
39. Melekhina E.Y., Lyseukova M.Yu., Svitich O.A., Muzyka A.D., Karazhas N.V., Rybalkina T.N. et al. Features of HHV-6A and HHV-6B infections in children living in the Moscow region. *Epidemiologiya I infektsionnye bolezni. Aktual' nye voprosy*. 2018; (2):42–9. (in Russian)
40. Vikulov G.K., Domonova E.A., Melekhina E.V., Sil'veystrova O.Yu., Kuleshov K.V. Inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6B in a woman with herpesvirus infection and secondary immune deficiency. *Infektsionnye bolezni*. 2020; 18(4): 182–8. DOI: 10.20953/1729-9225-2020-4-182-188. (in Russian)