

# МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ ВЭБ1/ВЭБ2 И ВГЧ6А/ВГЧ6В

М.И. Попкова<sup>1</sup>, О.В. Уткин<sup>1</sup>, Е.А. Соболева<sup>2</sup>, Н.А. Сахарнов<sup>1</sup>, Д.А. Брызгалова<sup>1</sup>,  
А.О. Сенатская<sup>1</sup>, Е.А. Кулова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

**Резюме.** В России из всего многообразия заболеваний ВЭБ- и ВГЧ6-этиологии официальной статистической отчетности подлежит только инфекционный мононуклеоз, что существенно затрудняет объективную оценку этиологической структуры, уровня заболеваемости, характеристики развития эпидемического процесса. В настоящее время сведения о генетической неоднородности ВЭБ, даже на уровне основных типов (ВЭБ1 и ВЭБ2), а также ВГЧ6А и ВГЧ6В, их распространенности и клиническом значении ограничиваются главным образом зарубежными данными. В России встречаются единичные публикации, посвященные данному вопросу. В то же время изучение циркуляции генетических типов (вариантов) и использование этой информации при осуществлении эпидемиологического надзора за некоторыми другими инфекциями уже вошло в повседневную практику. Одной из ключевых проблем является уровень развития лабораторного обеспечения молекулярно-генетического мониторинга. Цель данной работы — совершенствование методической базы дифференциальной детекции ВГЧ6А/В и основных типов ВЭБ. Материалом исследования послужили лейкоциты периферической крови детей в возрасте 1–15 лет с острым инфекционным мононуклеозом (n = 50) и с отсутствием клинических симптомов данного заболевания (n = 29). Выявление и количественное определение ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ6 выполняли с помощью метода ПЦР в реальном времени. Для дифференциального определения ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В в работе применялся оптимизированный однораундовый вариант ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле. По результатам исследований частота выявления ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ6 при остром инфекционном мононуклеозе составила 74 и 72%, а в контрольной группе — 35 и 74% соответственно. Установлено, что у обследованных детей Нижегородского региона в вирусной популяции преобладают ВЭБ1 и ВГЧ6В, что согласуется с существующими представлениями об их географическом распределении на прилегающих территориях. ВЭБ2 был обнаружен в единственном образце только в контрольной группе. ВГЧ6А ни в одной из исследуемых групп выявлен не был. Оптимизированный в данной работе методический подход позволяет отдельно детектировать ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В по единому лабораторному протоколу, а в сочетании с дополнительным этапом концентрирования ДНК повышает диагностическую чувствительность ПЦР-анализа, минимизирует долю дискордантных и ложноотрицательных результатов. Такой комплексный подход может применяться в диагностических, эпидемиологических и научно-исследовательских целях.

**Ключевые слова:** ВЭБ1, ВЭБ2, ВГЧ6А, ВГЧ6В, вирусная нагрузка, ПЦР, гентипирование, дифференциальная детекция.

## Адрес для переписки:

Попкова Мария Игоревна  
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,  
ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии  
им. академика И.Н. Блохиной.  
Тел.: 8 (831) 469-79-46. Факс: 8 (831) 469-79-20.  
E-mail: popmarig@mail.ru

## Contacts:

Mariia I. Popkova  
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Malaya  
Yamskaya str., 71, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod  
Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology.  
Phone: +7 (831) 469-79-46. Fax: +7 (831) 469-79-20.  
E-mail: popmarig@mail.ru

## Для цитирования:

Попкова М.И., Уткин О.В., Соболева Е.А., Сахарнов Н.А.,  
Брызгалова Д.А., Сенатская А.О., Кулова Е.А. Методические основы  
дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В // Инфекция  
и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1057–1066. doi: 10.15789/2220-7619-  
MBF-1661

## Citation:

Popkova M.I., Utkin O.V., Soboleva E.A., Sakharnov N.A., Bryzgalova D.A.,  
Senatskaia A.O., Kulova E.A. Methodological basics for differential  
detection of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B // Russian Journal of Infection  
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1057–1066.  
doi: 10.15789/2220-7619-MBF-1661

**METHODOLOGICAL BASICS FOR DIFFERENTIAL DETECTION OF EBV1/EBV2 AND HHV6A/HHV6B**Popkova M.I.<sup>a</sup>, Utkin O.V.<sup>a</sup>, Soboleva E.A.<sup>b</sup>, Sakharnov N.A.<sup>a</sup>, Bryzgalova D.A.<sup>a</sup>, Senatskaia A.O.<sup>a</sup>, Kulova E.A.<sup>b</sup><sup>a</sup> *Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation*<sup>b</sup> *Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation*

**Abstract.** Among a whole variety of EBV- and HHV6-linked diseases only infectious mononucleosis is subject to official statistical reporting in Russia that substantially complicates objective assessment of etiological structure, incidence rate, characteristics of developing epidemic process. Currently, the data on the genetic EBV heterogeneity, even at the level of the main types (EBV1 and EBV2), as well as HHV6A and HHV6B, prevalence and clinical importance are mainly limited to foreign research publications. Few publications assessing this issue are available in Russian scientific papers. At the same time, examining circulation of virus genetic types (variants) and use of such data in implementing epidemiological surveillance after some other infections have been commonly practiced. One of the key issues is the level of developed laboratory support for molecular genetic monitoring. The goal of the study was to improve methodological basics for differential detection of HHV6A/B and the major EBV types. There were used samples of peripheral blood leukocytes collected from children aged 1–15 years with acute ( $n = 50$ ) and asymptomatic infectious mononucleosis ( $n = 29$ ). The detection and quantification of EBV and HHV6 DNA was performed by using real-time PCR. For differential determination of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B, an optimized one-round PCR with electrophoretic agarose gel detection amplification products was used. The data from our own study showed that frequency of detected EBV and HHV6 DNA in acute infectious mononucleosis patients comprised 74 and 72% compared to control group reaching 35 and 74%, respectively. It was found that among the examined children of Nizhny Novgorod Region, EBV1 and HHV6B prevailed in the viral population that agrees with existing insights about their geographical distribution in the adjacent territories. EBV2 was found in a single sample only in the control group. HHV6A was not detected in any of the groups. The methodological approach optimized in this study allows to separately detect HHV6A/HHV6B and the main EBV types according to a unified laboratory protocol, whereas combining it with additional stage of DNA enrichment increases the diagnostic sensitivity of PCR analysis, minimizes proportion of discordant and false negative results. Such an integrated approach can be applied for diagnostic, epidemiological and research purposes.

**Key words:** EBV1, EBV2, HHV6A, HHV6B, viral load, PCR, genotyping, differential detection.

## Введение

На сегодняшний день сохраняют высокую актуальность и медико-социальную значимость инфекции и широкий спектр других нозологических форм заболеваний, в том числе онкологических, ассоциированных с вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ) и вирусами герпеса человека 6А и 6В (ВГЧ6А, ВГЧ6В) [5, 13, 20, 25]. Данные вирусы распространены повсеместно, но уровень заболеваемости на отдельных географических территориях может значительно варьировать [9].

В России из всего многообразия заболеваний ВЭБ- и ВГЧ6-этиологии официальной статистической отчетности подлежат только инфекционный мононуклеоз (ИМ) [7], что существенно затрудняет объективную оценку их этиологической структуры, уровня заболеваемости, характеристики развития эпидемического процесса. По данным отечественных исследователей, на долю классического ИМ ВЭБ-этиологии приходится 74,3%, а ВГЧ6А/В 6–14,5% всех случаев [3, 5]. В настоящее время повсеместно наблюдается повышение уровня заболеваемости ИМ [9], тенденция к увеличению случаев первичного инфицирования детей школьного и подросткового возраста с преобладанием у них тяжелых форм инфекции [10, 11]. За по-

следнее десятилетие в России наблюдался рост экономической значимости ИМ, а в 2018 г. экономический ущерб от заболеваемости ИМ составил 3,9 млрд рублей [7].

Достижения молекулярной биологии и развития молекулярно-генетических технологий позволяют постоянно обновлять и дополнять информацию о биологических особенностях ВЭБ и ВГЧ6А/В. По данным литературы, популяционная структура ВЭБ, циркулирующего во всем мире, характеризуется гетерогенностью как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей [17, 18, 19, 23, 29, 34]. Единой систематической картины генетических вариантов ВЭБ в настоящее время не существует. На основании выявленных различий в определенных генах вируса (BZLF1 [29], EBNA1 [17], EBNA2 [18], LMP1 [19, 23, 34]) предложено несколько классификаций.

В 2012 г. вирус герпеса человека 6 типа (ВГЧ6) был официально разделен Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) на два разных вида — ВГЧ6А и ВГЧ6В [14, 15]. С этого времени эксперты призывают ученых и врачей в дальнейших публикациях четко разграничивать эти два вида с целью стратификации клинических и биологических различий, а также дальнейшей детализации их классификации [14].

В настоящее время сведения о генетической неоднородности ВЭБ, даже на уровне основных типов (ВЭБ1 и ВЭБ2), а также ВГЧ6А и ВГЧ6В, их распространенности и клиническом значении ограничиваются главным образом зарубежными данными, которые нередко противоречивы [21, 24, 28, 32, 33]. В России встречаются единичные публикации, посвященные данному вопросу [1, 2, 4, 8]. В то же время изучение циркуляции генетических типов (вариантов) и использование этой информации при осуществлении эпидемиологического надзора за некоторыми инфекциями уже вошло в повседневную практику [7]. При этом одним из решающих аспектов является уровень развития методической базы для молекулярно-генетического анализа [12].

Целью данной работы было совершенствование методической базы для дифференциальной детекции ВГЧ6А/В и основных типов ВЭБ.

## Материалы и методы

Материалом для исследования послужила цельная периферическая кровь, стабилизированная К<sub>3</sub>ЭДТА. Обследованию подлежали дети в возрасте 1–15 лет (медиана — 5 лет), госпитализированные в инфекционный стационар с клиническим диагнозом «острый инфекционный мононуклеоз» (ОИМ) (n = 50). Из них лиц женского пола — 20, мужского — 30. У всех пациентов установлена средняя степень тяжести течения инфекции. Коллекцию образцов крови собирали в первые 3–10 дней от начала клинических проявлений. Контрольную группу составляли условно здоровые дети сопоставимого возраста и пола (n = 29), у которых отсутствовали клинические признаки данного заболевания.

В работе использовались остаточные количества образцов, полученных для проведения стандартных диагностических исследований в клинической практике. Информированное согласие родителей или опекунов на проведение исследовательской работы в соответствии с Хельсинкской декларацией было получено лечащими врачами медицинских организаций.

**Пробоподготовка.** Для получения фракции лейкоцитов периферической крови использовали реагент «Гемолитик» (ЦНИИЭ, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

**Выделение ДНК.** Выделение тотальной ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ЦНИИЭ, Россия) согласно инструкции производителя. При оптимизации метода полученную общую нуклеиновую кислоту в некоторых пробах дополнительно концентри-

ровали, добавляя ацетат натрия (рН 7,0) и изопропанол. Осадок растворяли в 30 мкл РНК-буфера (ЦНИИЭ, Россия) и хранили при –80°С до момента использования. Концентрацию и чистоту выделенной тотальной нуклеиновой кислоты измеряли с помощью спектрофотометра BioPhotometer Plus (Eppendorf, Германия).

**Количественное определение ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ6.** Выявление и количественное определение ДНК вирусов выполняли с помощью мультиплексной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением коммерческого набора «АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ЦНИИЭ, Россия) на амплификаторе Rotor-Gene Q 5plex HRM (Qiagen, Германия). Лабораторный протокол для ПЦР-РВ соблюдался согласно инструкции производителя. Результаты выражали в количественном формате — в логарифмах копий ДНК на 10<sup>5</sup> клеток (lg ДНК/10<sup>5</sup> клеток) и в копиях ДНК в пробе.

**Дифференциальная детекция ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В.** Для отдельной идентификации основных типов ВЭБ (ВЭБ1 и ВЭБ2) применяли двухраундовый («гнездовой») вариант ПЦР, описанный ранее [27, 31]. В первом раунде использовали внешнюю пару праймеров E2p1 (5'-AGG GAT GCCT GGA CAC AAG A-3') и E2p2 (5'-TGG TGC TGC TGG TGG TGG CAA T-3') и амплифицировали фрагмент гена EBNA-2 размером 596 п.н. Второй раунд ПЦР проводили в разных пробирках с использованием специфических пар праймеров Ap1 (5'-TCT TGA TAG GGA TCC GCT AGG ATA-3') и Ap2 (5'-ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT C-3'), амплифицирующих фрагмент 497 п.н., а также Bp1 (5'-CAT GGT AGC CTT AGG ACA TA-3') и Bp2 (5'-AGA CTT AGT TGA TGC CCT AG-3'), амплифицирующих фрагмент 150 п.н., которые детектируют ВЭБ1 и ВЭБ2 соответственно.

Для дифференциальной детекции ВГЧ6А и ВГЧ6В применялся метод, описанный ранее [30, 35]. Одностадийную ПЦР проводили в одной пробирке, используя праймеры, специфичные к немедленно раннему гену (IEG) вируса: forward (CTC ATA AGG TGC TGA GTG ATC AGT T) и reverse (CCT CAG TGA CAG ATC TGG GC) [30]. В данном случае используется одна пара праймеров, которые в реакции амплификации дают два разных по размеру фрагмента — 206 и 431 п.н., соответствующих ВГЧ6А и ВГЧ6В.

Дифференциальный ПЦР-анализ проводили в отдельных пробирках (для ВЭБ1, ВЭБ2 и ВГЧ6А/В). Состав реакционной смеси общим объемом 25 мкл включал следующие реагенты: праймеры (5 пкмоль/в реакцию) (ДНК-синтез, Россия); 5-кратный ПЦР-буфер blue 15 mM Mg<sup>2+</sup> (ЦНИИЭ, Россия); 2,5 е.а. Taq-F ДНК-полимеразу (ЦНИИЭ, Россия); смесь дезокси-нуклеозидтрифосфатов (до конечной концен-

трации 0,1 мМ) (Евроген, Россия); деионизированную воду I типа (Milli-Q Integral 3, Франция). В качестве матрицы использовали выделенную ДНК в объеме 5 мкл на реакцию (около 0,8 мкг). В данном исследовании для дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В нами применялся оптимизированный единый лабораторный протокол приготовления реакционной смеси и температурного профиля ПЦР-анализа. Условия для проведения амплификации в работе не приведены, так как оптимизированный вариант является объектом патентной защиты. Амплификацию специфичных фрагментов проводили на амплификаторе MaxuGene Gradient (Ахуген, США).

Продукты ПЦР-амплификации анализировались с помощью электрофореза в 3% агарозном геле, содержащем бромид этидия (0,02% по объему). В качестве стандарта для определения длины двухцепочечных молекул ДНК в интервале 100–1500 п.н. был использован маркер длин ДНК (100+ bp DNA Ladder) (Евроген, Россия). Результаты регистрировали на трансиллюминаторе InGenius 3 с использованием программного обеспечения GeneSys (Syngene, Великобритания). Полученные данные выражали в качественном формате — положительный или отрицательный.

## Результаты

### Количественное определение ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ6

На первом этапе исследования все пробы лейкоцитов периферической крови тестировались на наличие ДНК ВЭБ и ВГЧ6 методом количественной ПЦР-РВ. В результате среди

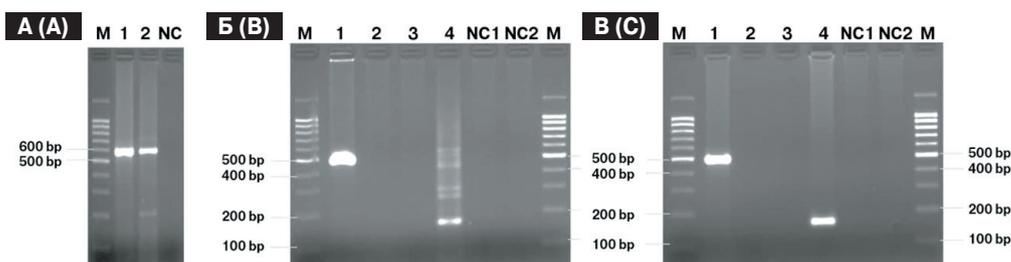
пациентов с ОИМ у 74% (37/50) обнаружена ДНК ВЭБ. По уровню вирусной нагрузки положительные пробы были объединены в две группы: с концентрацией ДНК ВЭБ < 1 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток и > 1 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток. В большинстве образцов — 81% (30/37) — содержание вирусной ДНК варьировало от 1,52 до 3,72 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток, при этом средняя концентрация составила 2,37 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток. В остальных случаях содержание вирусной ДНК не превышало 1 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток. Таким образом, ВЭБ-ассоциированный ОИМ подтверждался у 60% (30/50) из числа обследованных. ДНК ВГЧ6 выявлена в 66% (33/50) случаев ОИМ, но только в 3 пробах ее уровень незначительно превысил 1 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток (1,28–1,46 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток).

Образцы контрольной группы детей 1–15 лет были положительны на ДНК ВЭБ в 35% (10/29) случаев, на ДНК ВГЧ6 — в 74% (23/29) случаев. При этом у здоровых вирусоносителей концентрация ДНК ВЭБ и ВГЧ6 не превышала 1 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток практически во всех исследованных образцах. Исключением стали две девочки двух и пяти лет, у которых вирусная нагрузка ВЭБ составила 2,19 и 1,92 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток на фоне отсутствия клинических симптомов.

### Дифференциальная детекция ВЭБ1 и ВЭБ2

На этапе генотипирования ВЭБ нами проведена оптимизация условий ПЦР-анализа, направленная на дифференциальную детекцию ВЭБ1 и ВЭБ2 не в двухраундовой («гнездовой») ПЦР, описанной в статьях [27, 31], а в однораундовой. Результаты работы представлены на рис. 1.

При использовании двухраундовой «гнездовой» ПЦР по результатам первого раунда



**Рисунок 1. Сравнение результатов двухраундового и однораундового вариантов ПЦР для детекции ВЭБ1 и ВЭБ2**

Figure 1. Comparing two-round vs. one-round PCR methods for detection of EBV1 and EBV2

**Примечание.** А) первый раунд «гнездовой» ПЦР: 1 — ВЭБ1(+) (596 п.н., проба 1), 2 — ВЭБ1(+) (596 п.н., проба 2); Б) второй раунд «гнездовой» ПЦР: 1 — ВЭБ1(+) (497 п.н., проба 1), 2 — ВЭБ2(–) (проба 1), 3 — ДНК ВЭБ1(–) (проба 2), 4 — ВЭБ2(+) (150 п.н., проба 2); В) оптимизированная однораундовая ПЦР: 1 — ВЭБ1(+) (497 п.н., проба 1), 2 — ВЭБ2(–) (проба 1), 3 — ДНК ВЭБ1(–) (проба 2), 4 — ВЭБ2(+) (150 п.н., проба 2). М — маркер длин фрагментов (bp = п.н.). NC, NC1, NC2 — отрицательный контроль.

Note. A) the first round of nested PCR: 1 — EBV (+) (596 bp, sample 1), 2 — EBV (+) (596 bp, sample 2); B) the second round of nested PCR: 1 — EBV1(+), 2 — EBV2 (–) (sample 1), 3 — EBV1 DNA (–) (sample 2), 4 — EBV2 (+) (150 bp, sample 2); C) optimized one-round PCR: 1 — EBV1 (+) (497 bp, sample 1), 2 — EBV2 (–) (sample 1), 3 — EBV1 DNA (–) (sample 2), 4 — EBV2 (+) (150 bp, sample 2). M — 100+ bp DNA ladder. NC, NC1, NC2 — negative control.

в ВЭБ-положительных образцах лейкоцитов периферической крови были амплифицированы фрагменты размером 596 п.н., одинаковые для обоих типов вируса (рис. 1А). Второй раунд ПЦР (детекция проводилась для каждой пробы в двух отдельных пробирках) позволил дифференцированно определить типы ВЭБ1 (497 п.н.) и ВЭБ2 (150 п.н.) (рис. 1Б). При этом для ВЭБ2 наблюдалось множество неспецифических фрагментов разных размеров. Оптимизированный нами вариант ПЦР, ориентированный на детекцию ВЭБ1 и ВЭБ2, отличался проведением амплификации в один раунд с использованием праймеров, приведенных в разделе «Материалы и методы» (исходно использовались во втором раунде ПЦР) (рис. 1В). Однораундовый вариант ПЦР характеризуется достаточной чувствительностью и специфичностью амплифицированных фрагментов.

В дальнейшем тестирование проб пациентов и контрольной группы проводилось с помощью оптимизированного метода. При обследовании пациентов с ОИМ во всех образцах был выявлен ВЭБ1. Единственная ВЭБ(+) проба (по результатам ПЦР-РВ) при типировании в однораундовой ПЦР показала отрицательный результат. При этом все результаты ВЭБ(–) проб были полностью конкордантны.

Обследование контрольной группы показало, что у здоровых вирусоносителей преобладающим типом также является ВЭБ1. Только один образец лейкоцитов крови, принадлежавший девочке в возрасте пяти лет, был положительным на ВЭБ2. Дискордантность результатов в образцах контрольной группы наблюдалась в каждой десятой пробе, в том числе ложноотрицательный результат был отмечен для ПЦР-РВ.

## Раздельная детекция ВГЧ6А и ВГЧ6В

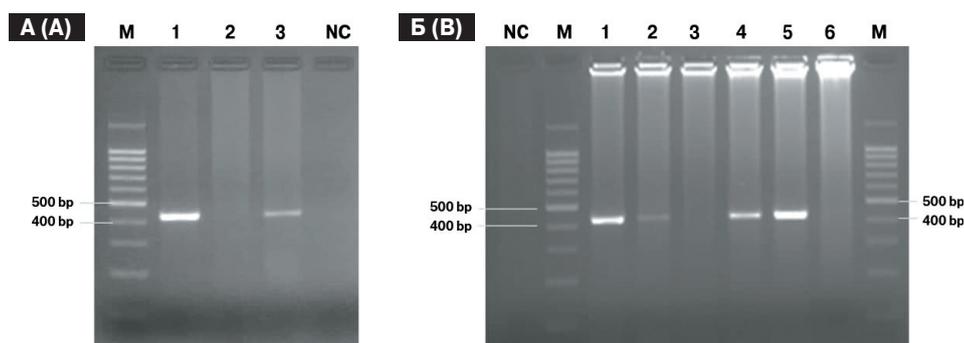
Определение ВГЧ6А и ВГЧ6В проводилось в ходе однораундовой ПЦР [30]. Среди пациентов с ОИМ выявлялся только ВГЧ6В. Дискордантность результатов увеличилась до каждой пятой пробы: 6 ВГЧ6(+) проб (по результатам ПЦР-РВ) прошли как отрицательные, а в 4 ВГЧ6(–) пробах, наоборот, обнаружен ВГЧ6В.

В контрольной группе также единственным выявленным видом стал ВГЧ6В. При исследовании материала в контрольной группе установлено 6 дискордантных проб, из которых ложноотрицательной в ПЦР-РВ была только одна.

## Оптимизация ПЦР для дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В

Проанализировав ситуацию с дискордантными пробами по результатам проведенного ПЦР-анализа, мы установили, что во всех случаях, в которых были получены отрицательные результаты, концентрация вирусной ДНК ВЭБ или ВГЧ6А/В находилась в диапазоне  $< 1 \text{ lgДНК}/10^5$  клеток. При этом значения концентрации, выражаемые в копиях ДНК в пробе, в данных образцах были менее 4,7. Следует отметить, что в других пробах пациентов и в контрольной группе при уровне ДНК менее 4,7 копий в пробе регистрировались и положительные результаты.

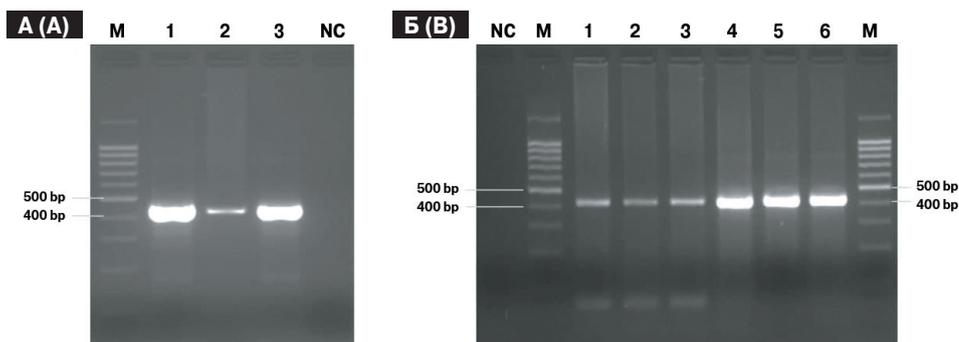
Так, при концентрации ВГЧ6В  $< 1 \text{ lgДНК}/10^5$  клеток отмечались выраженные различия в визуализации ПЦР-фрагментов в пробах с различным содержанием вирусной ДНК (рис. 2А). На рис. 2Б два образца с целевыми для нас концентрациями менее 4,7 копий в пробе представлены в триплетах. Данные свидетельствуют о низкой сходности результатов исследований при установленных



**Рисунок 2. Результаты дифференциальной детекции ВГЧ6А и ВГЧ6В в образцах с низкой вирусной нагрузкой ( $< 1 \text{ lgДНК}/10^5$  клеток)**

Figure 2. Results of differentially detected HHV6A and HHV6B in samples with low viral load ( $< 1 \text{ lgДНК}/10^5$  cells)

**Примечание.** А) детекция ВГЧ6В (431 п.н.) при концентрации ДНК 15,0 копий в пробе (линия 1), 0,4 копии в пробе (линия 2), 4,0 копии в пробе (линия 3); Б) детекция ВГЧ6В (431 п.н.) в триплетах при концентрации ДНК 0,4 копии в пробе (линии 1, 2, 3), 4,0 копии в пробе (линии 4, 5, 6). М — маркер длин фрагментов (bp = п.н.). NC — отрицательный контроль.  
Note. А) HHV6B (431 bp) detection: 15.0 DNA copies per probe (lane 1), 0.4 DNA copies per probe (lane 2), 4.0 DNA copies per probe (lane 3); В) HHV6B (431 bp) in triplets at concentration of 0.4 DNA copies per probe (lanes 1, 2, 3), 4.0 DNA copies per probe (lanes 4, 5, 6). М — 100+ bp DNA ladder. NC — negative control.



**Рисунок 3. Результаты оптимизации ПЦР-анализа для проб с низкой вирусной нагрузкой (< 1 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток)**

Figure 3. Results of PCR optimization analysis for samples with low viral load (< 1 IgDNA/10<sup>5</sup> cells)

**Примечание.** А) реамплификация ВГЧ6В (431 п.н.) при концентрации ДНК 15,0 копий в пробе (линия 1), 0,4 копии в пробе (линия 2), 4,0 копии в пробе (линия 3); Б) однораундовая ПЦР (в триплетах) после концентрирования проб: исходно 0,4 копии в пробе (линии 1, 2, 3), 4,0 копии в пробе (линии 4, 5, 6). М — маркер длин фрагментов (bp = п.н.). NC — отрицательный контроль.

Note. A) reamplification of HHV6B (431 bp) at concentration of 15.0 DNA copies per probe (lane 1), 0.4 DNA copies per probe (lane 2), 4.0 DNA copies per probe (lane 3); B) one-round PCR (in triplets) after DNA enrichment in samples: initially 0.4 DNA copies per probe (lanes 1, 2, 3), 4.0 DNA copies per probe (lanes 4, 5, 6). M — 100+ bp DNA ladder. NC — negative control.

предельных значениях чувствительности применяемых методов. Таким образом, обнаружение вирусной ДНК в этих образцах во многом может носить случайный характер.

На следующем этапе для проб с вирусной нагрузкой < 1 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток работа проводилась по двум направлениям: а) проведение второго раунда ПЦР с теми же праймерами, которые использовались в однораундовой ПЦР (реамплификация); б) концентрирование ДНК в пробах (рис. 3).

Реамплификация, когда во втором раунде ПЦР используется матрица и праймеры, фигурирующие в первом раунде ПЦР, позволяет повысить эффективность детекции (рис. 3А). Например, при определении ВГЧ6А/ВГЧ6В с помощью такого способа дополнительно были выявлены положительные образцы еще у 6% пациентов с ОИМ, составившие суммарно 72%, и все они были ВГЧ6В(+). Концентрирование проб путем добавления ацетата натрия (рН 7,0) и изопропанола в большинстве низкокопийных проб позволяет достичь стабильной воспроизводимости результатов в триплетах (рис. 3Б) и повысить концентрацию как тотальной, так и вирусной ДНК до детектируемого с помощью электрофореза уровня (табл.). Следует отметить, что ни в одной из исследуемых проб, в том числе после оптимизации, ВГЧ6А обнаружен не был.

## Обсуждение

ВЭБ и ВГЧ6А/В отличаются выраженной лимфотропностью, поражая преимущественно В- и Т-клетки соответственно. В латентном периоде инфекции основным резервуаром обоих вирусов остаются главным образом мононук-

леарные клетки периферической крови [21, 26]. Эффективность обнаружения патогенов во многом определяется выбором исследуемого клинического материала. Именно поэтому в нашей работе основным материалом послужили лейкоциты периферической крови. По данным литературы, результаты детекции ВЭБ и ВГЧ6 могут существенно различаться. Так, частота выявления ДНК ВЭБ в мононуклеарных клетках периферической крови при ОИМ варьирует у разных авторов от 30,3 [28] до 100% [21]. Исследования здоровых вирусоносителей в детской популяции проводятся, как правило, на малочисленных выборках. У взрослых такое ограничение отсутствует. При этом данные довольно сильно разнятся. Так, у взрослых доноров крови ДНК ВЭБ обнаруживается, по одним сведениям, в 5,1% случаев, ДНК ВГЧ6 — в 6,1% [32], по другим — в 72 и 30% соответственно [24]. Высокая степень расхождения данных, вероятнее всего, обусловлена отсутствием стандартизации лабораторных методов, применяемых разными группами исследователей, в том числе на этапе выбора праймеров к разным генам вирусов. Объективные трудности может создавать низкое содержание нуклеиновой кислоты определенного патогена в исследуемом материале. Известно, что в латентной фазе, характерной для здоровых вирусоносителей, в периферической крови ВЭБ персистирует в 1–50 инфицированных клетках на миллион В-клеток [16].

В соответствии с результатами наших исследований частота выявления ДНК ВЭБ и ВГЧ6 в лейкоцитах периферической крови при ОИМ у детей 1–15 лет составила 74 и 72%, а в контрольной группе — 35 и 74% соответственно. При этом вирусная нагрузка распределилась следующим

**Таблица. Результаты концентрирования проб с низким содержанием ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ6 (< 1 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток)**

Table. DNA sample enrichment for low EBV DNA and HHV6 DNA cases (< 1 IgDNA/10<sup>5</sup> cells)

№ образца Sample ID	ДНК общая, мкг/мл DNA total, µg/µl		ДНК ВЭБ, копий в пробе EBV DNA, copies per probe		ДНК ВГЧ6, копий в пробе HHV6 DNA, copies per probe	
	до before	после after	до before	после after	до before	после after
1315	0,123	0,458	0	1,90	1,47	8,80
1358	0,210	0,598	0,59	7,81	0,44	2,30
1390	0,167	0,438	7,47	13,59	3,28	13,34
1393	0,125	0,460	0,54	2,16	1,20	6,68
1173	0,240	0,730	0	0	0	0,96
1185	0,152	0,705	4,70	36,3	0	0,43
Отрицательный контроль Negative control	0,175	0,603	0	0	0	0
Положительный контроль Positive control	0,462	0,570	830	2400	2,41	21,30

**Примечание.** Отрицательный контроль — серонегативный образец крови, ДНК ВЭБ(-) и ВГЧ6(-); положительный контроль — серопозитивный пациент, ДНК ВЭБ — 3,72 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток, ДНК ВГЧ6 — 1,46 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток. Серые ячейки — положительные результаты при детекции на электрофорезе.

Note. Negative control — seronegative blood sample, EBV DNA(-) and HHV6 DNA(-); positive sample — seropositive sample, EBV DNA — 3.72 IgDNA/10<sup>5</sup> cells, HHV6 DNA — 1.46 IgDNA/10<sup>5</sup> cells. Gray boxes depict positive results after running electrophoresis.

образом: в группе пациентов с ОИМ значения концентрации ДНК ВЭБ > 1 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток выявлялись у 81% (30/37), средняя концентрация составила 2,37 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток, в остальных случаях содержание вирусной ДНК не превышало 1 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток. Таким образом, ВЭБ-ассоциированный ОИМ подтверждался в отношении 60% (30/50) обследованных пациентов. У здоровых вирусоносителей концентрация ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ6 не превышала 1 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток практически во всех исследованных образцах. Исключением являются две девочки двух и пяти лет, у которых вирусная нагрузка ВЭБ составила 1,92 и 2,19 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток на фоне отсутствия клинических симптомов. Следует отметить, что сравнение результатов количественной ПЦР, представленных в разных публикациях, вызывает определенные затруднения из-за отсутствия стандартизации единиц измерения (копии на микрограмм ДНК, копии на миллилитр, копии на 100 000 лейкоцитов, логарифм копий ДНК на 100 000 клеток, копии на инфицированную клетку).

Рутинным методом лабораторной диагностики ВЭБ- и ВГЧ6-инфекции остается серологический, не позволяющий оценить гетерогенность циркулирующей популяции каждого вируса. В основе существующих лабораторных технологий для изучения генетического разнообразия патогенов лежит метод ПЦР [12]. Для дифференциальной детекции основных типов ВЭБ и разных видов ВГЧ6 исследователи применяют отличающиеся лабораторные протоколы преимущественно на основе качественной «гнездовой» ПЦР [22, 31]. Отдельного внимания при этом требуют методические подходы для обогащения

вирусного генетического материала в образцах с низким содержанием нуклеиновых кислот извлекаемых патогенов [12].

Оптимизированный в данной работе методический подход позволяет отдельно детектировать основные типы ВЭБ, а также виды ВГЧ6 по единому лабораторному протоколу, а с дополнительным этапом концентрирования ДНК повышает диагностическую чувствительность ПЦР-анализа, минимизирует долю дискордантных и ложноотрицательных результатов.

Основной классификацией является деление ВЭБ на два типа — ВЭБ1 и ВЭБ2 [18]. С 2012 г. ВГЧ6А и ВГЧ6В ратифицированы как отдельные виды [14, 15]. Их географическое распределение имеет определенные особенности. Оба типа ВЭБ встречаются повсеместно, однако ВЭБ1 является основным типом, распространенным во всем мире. Он доминирует среди населения Европы, Северной Америки, Азии. В то же время ВЭБ2 считается характерным типом вируса, циркулирующим в регионе Африки к югу от Сахары и в Папуа — Новой Гвинее [33, 36]. ВГЧ6В является основной причиной первичной ВГЧ6-инфекции в США, Великобритании, Японии и России, а ВГЧ6А чаще обнаруживается в африканских странах [6].

В настоящее время имеется мало доказательств обусловленности заболеваний определенным типом ВЭБ. Так, в одной из работ показано, что инфекционный мононуклеоз чаще ассоциировался с типом ВЭБ1, нежели с типом ВЭБ2. В другом исследовании существенных различий выявлено не было. Предполагается, что инфицирование ВЭБ2 может происходить в условиях хронической иммунной активации, например

в тех частях Африки, где много сопутствующих инфекций, включая малярию, или у иммунокомпрометированных лиц [33]. ВГЧ6В является основным этиологическим агентом первичной ВГЧ6-инфекции у детей раннего возраста. ВГЧ6А регистрируется в более старшем возрасте и отличается большей нейротропностью. Оба вируса способны интегрироваться в хромосомы человека и передаваться по наследству [6].

Полученные нами результаты свидетельствуют о преобладании в вирусной популяции среди обследованных детей Нижегородского региона ВЭБ1 и ВГЧ6В, что согласуется с существующими представлениями об их географическом распределении на прилегающих территориях. Следует отметить, что ВЭБ2 был обнаружен только в одной пробе контрольной группы детей. ВГЧ6А не детектировался ни в одной из исследуемых групп.

Для клинико-эпидемиологической характеристики ВГЧ6А, ВГЧ6В, а также типов ВЭБ1/ВЭБ2 требуются дальнейшие, более масштабные исследования.

## Заключение

В контексте метода ПЦР оптимизированы методические подходы для дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В, что впервые позволило на более детальном уровне оценить циркуляцию данных вирусов на территории Нижегородского региона.

Оптимизация раздельной детекции основных типов ВЭБ, а также видов ВГЧ6 базировалась на использовании комплексного подхода, включающего применение однораундового варианта ПЦР вместо двухраундового, а также

единого лабораторного протокола исследования для разных вирусов, что существенно упрощает диагностический процесс. Другой аспект оптимизации направлен на концентрирование вирусной ДНК в образцах лейкоцитов периферической крови, характеризующихся низкой вирусной нагрузкой, что позволяет повысить чувствительность анализа и снизить долю ложноотрицательных результатов.

Среди пациентов с ОИМ и в контрольной группе установлено преобладание ВЭБ1 и ВГЧ6В. При этом ВГЧ6А не детектировался ни в одном из исследованных образцов, а ВЭБ2 был обнаружен только в одном случае в лейкоцитах крови волонтера из контрольной группы.

По результатам проведенного исследования предлагается следующий алгоритм дифференциальной диагностики основных типов ВЭБ и видов ВГЧ6. На первом этапе тестирования могут применяться стандартизованные коммерческие наборы для количественного определения ДНК ВЭБ и ВГЧ6 в клиническом материале с последующим распределением образцов в зависимости от вирусной нагрузки:  $> 1 \text{ lgДНК}/10^5$  клеток или  $< 1 \text{ lgДНК}/10^5$  клеток. На втором этапе пробы, содержащие  $> 1 \text{ lgДНК}/10^5$  клеток, сразу могут тестироваться с применением оптимизированного нами варианта однораундовой ПЦР. Пробы с содержанием  $< 1 \text{ lgДНК}/10^5$  клеток перед ПЦР-анализом рекомендуется дополнительно обработать ацетатом натрия (рН 7,0) и изопропанолом для концентрирования ДНК, а затем провести анализ с помощью оптимизированной однораундовой ПЦР. Данный методический подход может применяться в диагностических, эпидемиологических и научно-исследовательских целях.

## Список литературы/References

1. Гончарова Е.В., Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена LMP1 у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и здоровых лиц // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60, № 2. С. 11–17. [Goncharova E.V., Senyuta N.B., Smirnova K.V., Shcherbak L.N., Gurtsevich V.E. Epstein–Barr virus (EBV) in Russia: infection of the population and analysis of the LMP1 gene variants in patients with EBV-associated pathologies and healthy individuals. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2015, vol. 60, no. 2, pp. 11–17. (In Russ.)]
2. Гурцевич В.Э., Смирнова К.В., Ботезату И.В., Душенькина Т.Е., Лубенская А.К., Дубар Э., Сенюта Н.Б., Лихтенштейн А.В., Петров С.В. Полиморфизм онкогена LMP1 вируса Эпштейна–Барр в двух этнических группах России, татар и славян, и его влияние на развитие некоторых злокачественных опухолей // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 347–358. [Gurtsevich V.E., Smirnova K.V., Botezatu I.V., Dushenkina T.E., Lubenskaya A.K., Dubar E., Senyuta N.B., Lichtenstein A.V., Petrov S.V. Epstein–Barr virus LMP1 oncogene polymorphism in tatar and slavic populations in Russian Federation impacting on some malignant tumours. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 347–358. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-EBV-1162
3. Львов Н.Д., Дудукина Е.А. Ключевые вопросы диагностики Эпштейна–Барр вирусной инфекции // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2013. № 3. С. 24–32. [Lvov N.D., Dudukina E.A. Key issues of current and diagnosis of Epstein–Barr virus infection. *Infektsionnye bolezni: novosti, mnenia, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2013, no. 3, pp. 24–32. (In Russ.)]
4. 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. Т. 14, № 1. С. 33–40. [Melekhina E.V., Domonova E.A., Goptar I.A., Shipulina O.Yu., Gorelov A.V. First verified case of hereditary transmission of chromosomally integrated Human betaherpesvirus 6B. *Voprosy prakticheskoy pediatrii = Clinical Practice in Pediatrics*, 2019, vol. 14, no. 1, pp. 33–40. (In Russ.)] doi: 10.20953/1817-7646-2019-1-33-40

5. Мелехина Е.В., Музыка А.Д., Калугина М.Ю., Горелов А.В., Чугунова О.Л. Современные представления об инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6 типа // Архив внутренней медицины. 2016. Т. 6, № 1. С. 13–19. [Melekhina E.V., Muzyka A.D., Kalugina M.J., Gorelov A.V., Chugunova O.L. Current concept of human herpesvirus type 6 infection. *Arkhiv vnutrenney meditsiny = The Russian Archives of Internal Medicine*, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 13–19. (In Russ.)] doi: 10.20514/2226-6704-2016-6-1-13-19
6. Никольский М.А., Вязовая А.А., Ведерников В.Е., Нарвская О.В., Лиознов Д.А., Смирнова Н.Н., Полунина А.В., Бурмистрова А.Г., Золотова М.А. Молекулярно-биологическая характеристика вируса герпеса человека 6-го типа у пациентов с различными вариантами течения заболевания // Педиатрия. 2019. Т. 98, № 1. С. 53–56. [Nikolsky M.A., Vyazovaya A.A., Vedernikov V.E., Narvskaya O.V., Lioznov D.A., Smirnova N.N., Polunina A.V., Burmistrova A.G., Zolotova M.A. Molecular and biological characteristics of human herpes virus type 6 in patients with different variants of the disease course. *Pediatr = Pediatrics*, 2019, vol. 98, no. 1, pp. 53–56. (In Russ.)] doi: 10.24110/0031-403X-2019-98-1-53-56
7. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году: государственный доклад. М.: Роспотребнадзор, 2019. 254 с. [On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2018: state report. *Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing*, 2019. 254 p. (In Russ.)]
8. Смирнова К.В., Дидук С.В., Гурцевич В.Э. Полиморфизм онкогена LMP1 вируса Эпштейна–Барр у представителей коренного малочисленного народа Дальнего Востока России // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017. Т. 22, № 5. С. 239–247. [Smirnova K.V., Diduk S.V., Gurtsevich V.E. Polymorphism of Epstein–Barr virus LMP1 oncogene in nanaians, representatives of indigenous minority of the Russian Far East. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and infectious diseases*, 2017, vol. 22, no. 5, pp. 239–247. (In Russ.)] doi: 10.18821/1560-9529-2017-22-5-239-247
9. Соломай Т.В. Динамика заболеваемости и территориальное распространение инфекционного мононуклеоза // Здравоохранение Российской Федерации. 2019. Т. 63, № 4. С. 186–192. [Solomay T.V. Dynamics of morbidity and territorial spread of infectious mononucleosis. *Zdravookhranenie Rossiiskoi Federatsii = Health Care of the Russian Federation, Russian Journal*, 2019, vol. 63, no. 4, pp. 186–192. (In Russ.)] doi: 10.18821/0044-197X-2019-63-4-186-192
10. Тимченко В.Н., Баннова С.Л., Павлова Н.В., Павлова Е.Б., Каплина Т.А., Федорова А.В., Булина О.В., Балашов А.Л., Хакизimana Ж.-К. ВЭБ-мононуклеоз на госпитальном этапе: клиническая характеристика и этиотропная терапия у детей различного возраста // Педиатр. 2018. Т. 9, № 6. С. 77–82. [Timchenko V.N., Bannova S.L., Pavlova N.V., Pavlova E.B., Kaplina T.A., Fedorova A.V., Bulina O.V., Balashov A.L., Hakizimana J.-C. EBV-mononucleosis in children at the hospital stage in modern conditions. *Pediatr = Pediatrician*, 2018, vol. 9, no. 6, pp. 77–82. (In Russ.)]
11. Хакизimana Ж.К., Тимченко В.Н., Шакмаева М.А., Каплина Т.А., Субботина М.Д., Баннова С.Л., Федорова А.В., Суховецкая В.Ф., Павлова Е.Б., Павлов Н.В. ВЭБ-мононуклеоз у детей в современных условиях // Детские инфекции. 2020. Т. 19, № 2. С. 23–28. [Hakizimana J.K., Timchenko V.N., Shakmaeva M.A., Kaplina T.A., Subbotina M.D., Bannova S.L., Fedorova A.V., Sukhovetskaya V.F., Pavlova E.B., Pavlova N.V. EBV mononucleosis in children in modern conditions. *Detskie infektsii = Children's Infections*, 2020, vol. 19, no. 2, pp. 23–28. (In Russ.)] doi: 10.22627/2072-8107-2020-19-2-23-28
12. Хафизов К.Ф., Сперанская А.С., Мацвай А.Д., Шипулин Г.А., Дедков В.Г. Передовые технологии в диагностике вирусных заболеваний неясной этиологии // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 9–25. [Khafizov K.F., Speranskaya A.S., Matsvay A.D., Shipulin G.A., Dedkov V.G. Advanced technologies in diagnostics of viral diseases of unknown etiology. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 9–25. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ATI-824
13. Шарипова Е.В., Бабаченко И.В. Герпесвирусные инфекции и инфекционный мононуклеоз (обзор литературы) // Журнал инфектологии. 2013. Т. 5, № 2. С. 5–12. [Sharipova E.V., Babachenko I.V. Herpesvirus infection and infectious mononucleosis. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2013, vol. 5, no. 2, pp. 5–12. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2013-5-2-
14. Ablashi D., Agut H., Alvarez-Lafuente R., Clark D.A., Dewhurst S., DiLuca D., Flamand L., Frenkel N., Gallo R., Gompels U.A., Höllsberg P., Jacobson S., Luppi M., Lusso P., Malnati M., Medveczky P., Mori Y., Pellett P.E., Pritchett J.C., Yamanishi K., Yoshikawa T. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. *Arch. Virol.*, 2014, vol. 159, pp. 863–870. doi: 10.1007/s00705-013-1902-5
15. Adams M.J., Carstens E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.*, 2012, vol. 157, no. 7, pp. 1411–1422. doi: 10.1007/s00705-012-1299-6
16. Babcock G.J., Decker L.L., Volk M., Thorley-Lawson D.A. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*, 1998, vol. 9, no. 3, pp. 395–404. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80622-6
17. Bhatia K., Raj A., Guitierrez M.I., Judde J.G., Spangler G., Venkatesh H., Magrath I.T. Variation in the sequence of Epstein–Barr virus nuclear antigen 1 in normal peripheral blood lymphocytes and in Burkitt's lymphomas. *Oncogene*, 1996, vol. 13, pp. 177–181.
18. Dambaugh T., Hennessy K., Chamnankit L., Kieff E. U2 region of Epstein–Barr virus DNA may encode Epstein–Barr nuclear antigen 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, pp. 7632–7636. doi: 10.1073/pnas.81.23.7632
19. Edwards R.H., Seillier-Moiseiwitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein–Barr virus strains. *Virology*, 1999, vol. 261, pp. 79–95. doi: 10.1006/viro.1999.9855
20. Eliassen E., Lum E., Pritchett J., Ongradi J., Krueger G., Crawford J.R., Phan T.L., Ablashi D., Hudnall S.D. Human Herpesvirus 6 and malignancy: a review. *Front. Oncol.*, 2018, vol. 8: 512. doi: 10.3389/fonc.2018.00512
21. Fafi-Kremer S., Brengel-Pesce K., Barguès G., Bourgeat M.J., Genoulaz O., Seigneurin J.M., Morand P. Assessment of automated DNA extraction coupled with real-time PCR for measuring Epstein–Barr virus load in whole blood, peripheral mononuclear cells and plasma. *J. Clin. Virol.*, 2004, vol. 30, no. 2, pp. 157–164. doi: 10.1016/j.jcv.2003.10.002
22. Greninger A.L., Roychoudhury P., Makhous N., Hanson D., Chase J., Krueger G., Xie H., Huang M.-L., Saunders L., Ablashi D., Koelle D.M., Cook L., Jerome K.R. Copy number heterogeneity, large origin tandem repeats, and interspecies recombination in human herpesvirus 6A (HHV-6A) and HHV-6B reference strains. *J. Virol.*, 2018, vol. 92, no. 10: e00135-18. doi: 10.1128/JVI.00135-18
23. Hu L.F., Zabarovsky E.R., Chen F., Cao S.L., Ernberg I. Isolation and sequencing of the Epstein–Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J. Gen. Virol.*, 1991, vol. 72, pp. 2399–2409. doi: 10.1099/0022-1317-72-10-2399

24. Hudnall S.D., Chen T., Allison P., Tyring S.K., Heath A. Herpesvirus prevalence and viral load in healthy blood donors by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Transfusion*, 2008, vol. 48, no. 6, pp. 1180–1187. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01685.x
25. Kanda T., Yajima M., Ikuta K. Epstein–Barr virus strain variation and cancer. *Cancer Sci.*, 2019, vol. 110, no. 4, pp. 1132–1139. doi: 10.1111/cas.13954
26. Kondo K., Kondo T., Okuno T., Takahashi M., Yamanishi K. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J. Gen. Virol.*, 1991, vol. 72, no. 6, pp. 1401–1408. doi: 10.1099/0022-1317-72-6-1401
27. Mendes T.M., Oliveira L.C., Yamamoto L., Del Negro G.M., Okay T.S. Epstein–Barr virus nuclear antigen-2 detection and typing in immunocompromised children correlated with lymphoproliferative disorder biopsy findings. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2008, vol. 12, no. 3, pp. 186–191. doi: 10.1590/s1413-86702008000300005
28. Monteiro T.A.F., Costa I.B., Costa I.B., Corrêa T.L.D.S., Coelho B.M.R., Silva A.E.S., Ramos F.L.P., Filh A.J.M., Monteiro J.L.F., Siqueira J.A.M., Gabbay Y.B., Sousa R.C.M. Genotypes of Epstein–Barr virus (EBV1/EBV2) in individuals with infectious mononucleosis in the metropolitan area of Belém, Brazil, between 2005 and 2016. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 24, no. 4, pp. 322–329. doi: 10.1016/j.bjid.2020.06.004
29. Packham G., Brimmell M., Cook D., Sinclair A.J., Farrell P.J. Strain variation in Epstein–Barr virus immediate early genes. *Virology*, 1993, vol. 192, no. 2, pp. 541–550. doi: 10.1006/viro.1993.1070
30. Reddy S., Manna P. Quantitative detection and differentiation of human herpesvirus 6 subtypes in bone marrow transplant patients by using a single real-time polymerase chain reaction assay. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2005, vol. 11, pp. 530–541. doi: 10.1016/j.bbmt.2005.04.010
31. Smatti M.K., Yassine H.M., Abu Odeh R., Al Marawani A., Taleb S.A., Althani A.A., Nasrallah G.K. Prevalence and molecular profiling of Epstein–Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 12: e0189033. doi: 10.1371/journal.pone.0189033
32. Traore L., Tao I., Bisseye C., Diarra B., Compaore T.R., Nebie Y., Assih M., Ouedraogo A., Zohoncon T., Djigma F., Ouermi D., Barro N., Sanou M., Ouedraogo R.T., Simpore J. Molecular diagnosis of cytomegalovirus, Epstein–Barr virus and herpes virus 6 among blood donors in Ouagadougou, Burkina Faso. *BMC Infectious Diseases*, 2014, vol. 14, no. 2: P99. doi: 10.1186/1471-2334-14-s2-p99
33. Tzellos S., Farrell P.J. Epstein–Barr virus sequence variation–biology and disease. *Pathogens*, 2012, vol. 1, no. 2, pp. 156–174. doi: 10.3390/pathogens1020156
34. Walling D.M., Shebib N., Weaver S.C., Nichols C.M., Flaitz C.M., Webster-Cyriaque J. The molecular epidemiology and evolution of Epstein–Barr virus: Sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. *J. Infect. Dis.*, 1999, vol. 179, pp. 763–774. doi: 10.1086/314672
35. Yalcin S., Karpuzglu T., Suleymanlar G., Mutlu G., Mukai T., Yamamoto T., Isegawa Y., Yamanishi K. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infections in renal transplant recipients and healthy adults in Turkey. *Arch. Virol.*, 1994, vol. 136, pp. 183–190. doi: 10.1007/BF01538827
36. Zimmer U., Adldinger H.K., Lenoir G.M., Vuillaume M., Knebel-Doerberitz M.V., Laux G., Desgranges C., Wittmann P., Freese U.K., Schneider U., Bornkamm G.W. Geographical prevalence of two types of Epstein–Barr virus. *Virology*, 1986, vol. 154, pp. 56–66. doi: 10.1016/0042-6822(86)90429-0

**Авторы:**

**Попкова М.И.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

**Уткин О.В.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

**Соболева Е.А.**, врач-инфекционист, ассистент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия;

**Сахарнов Н.А.**, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

**Брызгалова Д.А.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

**Сенатская А.О.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

**Кулова Е.А.**, к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней, ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия.

**Authors:**

**Popkova M.I.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Utkin O.V.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Soboleva E.A.**, Infectologist, Assistant Professor, Department of Infectious Diseases, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Sakharnov N.A.**, Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Bryzgalova D.A.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Senatskaia A.O.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Kulova E.A.**, PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Infectious Diseases, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation.