

**МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ
ДЕТЕКЦИИ ВЭБ1/ВЭБ2 И ВГЧ6А/ВГЧ6В В СЛЮНЕ**

Попкова М.И.¹

Уткин О.В.¹

Брызгалова Д.А.¹

Сенатская А.О.¹

Соболева Е.А.²

Сахарнов Н.А.¹

Филатова Е.Н.¹

Кулова Е.А.³

¹ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

²ФГБОУ ВО "Приволжский исследовательский медицинский университет" Минздрава России, г. Нижний Новгород, Россия

³ООО «Тонус Кроха и семейная СТОМАТОЛОГИЯ», г. Нижний Новгород, Россия

**METHODOLOGICAL APPROACHES TO DIFFERENTIAL DETECTION
OF EBV1/EBV2 AND HHV6A/HHV6B IN SALIVA**

Popkova M.I.^a

Utkin O.V.^a

Bryzgalova D.A.^a

Senatskaia A.O.^a

Soboleva E.A.^b

Sakharnov N.A.^a

Filatova E.N.^a

^aAcademician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

^bFederal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

^c “Tonus Krokha i Semeynaya STOMATOLOGIYA”, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

Резюме. Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) и вирусы герпеса человека 6А и 6В (ВГЧ6А и ВГЧ6В) убиквитарны, инфицируют все социальные группы. В России сведения о генетической неоднородности ВЭБ, даже на уровне основных типов (ВЭБ1 и ВЭБ2), а также ВГЧ6А и ВГЧ6В, их распространенности и клиническом значении ограничиваются единичными публикациями. Преимущественно исследовались плазма и лейкоциты крови. Слюна – основной фактор передачи и распространения ВЭБ- и ВГЧ6А/В-инфекции, доступный, недорогой, неинвазивный материал для обнаружения вирусной ДНК. Цель работы - совершенствование методической базы для дифференциальной детекции ВГЧ6А/ВГЧ6В и основных типов ВЭБ в слюне. Материалом исследования послужила нестимулированная смешанная слюна детей в возрасте 1-17 лет с острым инфекционным мононуклеозом (n=22) и с отсутствием клинических симптомов данного заболевания (n=26), а также условно здоровых взрослых (n=9). Образцы собирали однократно и в динамике (ежедневно в течение 14 дней). Количественное определение ДНК ВЭБ и ВГЧ6А/В выполнено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Для дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В в работе применялся оптимизированный однораундовый вариант ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле. В результате частота выявления ДНК ВЭБ, ВГЧ6А/В и ВЭБ+ВГЧ6А/В при остром инфекционном мононуклеозе составила 95%, 91% и 86%, среди условно здоровых детей - 69%, 85% и 61,5%, соответственно. Установлено, что среди детей Нижегородского региона в слюне преобладают исключительно ВЭБ1 и ВГЧ6В. По результатам 14-тидневного динамического мониторинга выделения вирусов со слюной у здоровых вирусоносителей (взрослые и дети) показано, что однократное исследование ДНК ВЭБ не позволяет достоверно оценить инфицированность лиц или интенсивность выделения ВЭБ. При этом ВГЧ6А/В характеризуется более постоянным и равномерным выделением. Оптимизированный в данной работе методический подход позволяет отдельно детектировать ВЭБ1/ВЭБ2

и ВГЧ6А/ВГЧ6В по единому лабораторному протоколу, а в сочетании с дополнительным этапом пробоподготовки слюны 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; слюна; ПЦР; генотипирование; дифференциальная детекция.

Abstract. Epstein-Barr virus (EBV) and human herpesviruses 6A and 6B (HHV6A and HHV6B) are ubiquitous, infecting representatives of all social groups, starting from early childhood. Currently, information on the genetic heterogeneity of EBV, even at the level of the main types (EBV1 and EBV2), as well as HHV6A and HHV6B, their prevalence and clinical significance are limited mainly by foreign data. In Russia, there are isolated publications devoted to this issue. In this case, the objects of study are mainly plasma and leukocytes of peripheral blood, scrapings or swabs from the oropharynx are used much less often. Saliva is the main factor in the transmission and spread of EBV and HHV6A/B infections. Saliva testing is an affordable, inexpensive, and non-invasive method for detecting viral DNA. The purpose of this work is to improve the methodological base for differential detection of HHV6A/HHV6B and the main types of EBV in saliva. The material for the study was unstimulated mixed saliva of children aged 1-17 years with acute infectious mononucleosis (n=22) and no clinical symptoms of this disease (n=26), as well as conditionally healthy adults (n=9). Samples were collected once and dynamically (daily for 14 days). The detection and quantification of EBV DNA and HHV6A/B DNA was performed using real-time PCR. For the differential determination of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B, an optimized one-round PCR variant with electrophoretic detection of amplification products in an agarose gel was used. Statistical data processing was carried out using the R programming language and the RStudio

environment. According to the results of our own research, the frequency of detection of EBV, HHV6A/B and EBV+HHV6A/B DNA in acute infectious mononucleosis was 95%, 91% and 86%, and among conventionally healthy children - 69%, 85% and 61.5%, respectively. It was found that among the examined children of the Nizhny Novgorod region, EBV1 and HHV6B prevail in the viral population, which is consistent with existing ideas about their geographical distribution in the adjacent territories. EBV2 and HHV6A were not detected in any of the examined saliva samples. According to the results of 14-day dynamic monitoring of saliva virus secretion in healthy virus carriers (adults and children), it was shown that a single EBV DNA study does not allow to reliably assess the infection of individuals or the intensity of EBV secretion. In this case, HHV6A/B is characterized by a more constant and uniform release. The methodological approach optimized in this work makes it possible to separately detect EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B according to a single laboratory protocol, and in combination with an additional stage of saliva sample preparation increases the diagnostic sensitivity of PCR analysis, minimizes the 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; saliva; PCR; genotyping; differential detection.

1 Введение

2
3 Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) и вирусы герпеса человека 6А и 6В
4 (ВГЧ6А и ВГЧ6В) убиквитарны, инфицируют представителей всех
5 социальных групп, начиная с раннего детского возраста. Они
6 характеризуются выраженной лимфотропностью, способностью к
7 хромосомной интеграции генома, модуляции иммунного ответа организма
8 хозяина, онкогенным потенциалом. ВЭБ общеизвестен как самый частый
9 возбудитель инфекционного мононуклеоза (ИМ) (76,6% случаев) [4], ВГЧ6В
10 является этиологическим агентом внезапной экзантемы, реже ИМ, в то время
11 как специфическая форма ВГЧ6А-инфекции еще не определена [10]. Спектр
12 ВЭБ- и ВГЧ6А/В-ассоциированных заболеваний у детей и взрослых
13 постоянно расширяется и уточняется. Специфические средства их лечения и
14 профилактики до настоящего времени не разработаны.

15 ВЭБ характеризуется генетической гетерогенностью. Первой и
16 общепринятой классификацией генетического разнообразия ВЭБ является
17 деление на два основных типа – ВЭБ1 и ВЭБ2 [20]. Патогенетическая роль
18 каждого из них до конца не изучена, доказательств о связи генотипов с
19 развитием различных заболеваний недостаточно. ВГЧ6А и ВГЧ6В были
20 официально ратифицированы в 2012 году Международным комитетом по
21 таксономии вирусов (ICTV) как два разных вида, заменив ВГЧ6 [13].
22 Обобщающее название «ВГЧ6» или «ВГЧ6А/В» встречается в
23 исследованиях, не предусматривающих видовую дифференциацию [21].
24 Эксперты призывают ученых и врачей четко различать ВГЧ6А и ВГЧ6В для
25 их клинической и эпидемиологической стратификации [13].

26 Существующие серологические методы не позволяют отдельно
27 определять ВГЧ6А, ВГЧ6В и основные типы ВЭБ. Для их дифференциальной
28 детекции применяют методы, основанные на полимеразной цепной реакции
29 (ПЦР), при этом основная часть исследований реализована с помощью
30 «гнездовой» ПЦР [12, 42]. Зарегистрированных тест-систем для типирования

31 ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В в России нет, что ограничивает возможности их
32 применения в клинической практике.

33 В публикациях отечественных авторов дифференциальная детекция
34 ВГЧ6А/ВГЧ6В и основных типов ВЭБ носит эпизодический и
35 противоречивый характер [6, 8, 12]. Объектами исследования
36 преимущественно являются плазма и лейкоциты периферической крови,
37 значительно реже используются соскобы или смывы из ротоглотки. В то же
38 время в зарубежных публикациях показана принципиальная возможность
39 исследования с этой целью слюны. При этом только единичные работы
40 посвящены одновременной дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и
41 ВГЧ6А/ВГЧ6В [27].

42 Слюна – основной фактор передачи и распространения ВЭБ- и
43 ВГЧ6А/В-инфекции. Исследование слюны представляет собой доступный,
44 недорогой и неинвазивный способ обнаружения вирусной ДНК [16, 31, 40].
45 Известно, что разные штаммы одного и того же вируса доминируют в разных
46 биосубстратах (лейкоциты крови, плазма, слюна, опухолевые ткани), могут
47 мигрировать между ними в ходе жизненного цикла или замещаться на новые
48 в результате повторного инфицирования [28, 39, 40]. В целом характеристика
49 генетических особенностей циркулирующих вирусов лежит в основе
50 изучения патогенеза, целевой разработки методов лабораторной
51 диагностики, вакцин, средств специфической терапии, а также
52 совершенствования системы эпидемиологического надзора за инфекциями.

53 Целью данной работы явилось совершенствование методической базы
54 для дифференциальной детекции ВГЧ6А/ВГЧ6В и основных типов ВЭБ в
55 слюне.

56 Материалы и методы

57

58 Обследованию подлежали дети в возрасте 1-17 лет (медиана 6 [3;10]
59 лет), госпитализированные в «Детскую инфекционную больницу №8 г.

60 Нижнего Новгорода» с клиническим диагнозом «острый инфекционный
61 мононуклеоз» (ОИМ) (n=22). Группа сравнения сформирована из клинически
62 здоровых детей сопоставимого пола и возраста (n=26), проходивших
63 диспансеризацию в ООО «Тонус Кроха и семейная Стоматология» (г.
64 Нижний Новгород). Взрослые условно здоровые доноры были привлечены
65 для отработки методов и динамического наблюдения выделения вирусов со
66 слюной (n=9).

67 Материалом для исследования послужила нестимулированная
68 смешанная слюна (далее слюна). Образцы собирали однократно и в
69 динамике. Однократный забор материала проводили: 1) у пациентов с ОИМ в
70 первые 3–10 дней от начала клинических проявлений; 2) у здоровых
71 волонтеров в день обследования. Для исследования динамики выделения
72 ВЭБ и ВГЧ6А/В со слюной у шести клинически здоровых вирусоносителей
73 (5 взрослых 25-40 лет и 1 ребенок 3-х лет) материал собирали ежедневно в
74 течение 14 дней.

75 Информированное согласие родителей или опекунов на проведение
76 исследовательской работы в соответствии с положениями Хельсинкской
77 декларации (2013) было получено лечащими врачами медицинских
78 организаций.

79 *Сбор материала*

80 Сбор материала проводили утром после сна натошак до проведения
81 гигиенических процедур полости рта. Применяли традиционную методику
82 накопления слюны в ротовой полости и сплевывания ее в контейнер для
83 сбора биоматериала. Использовали пластиковые одноразовые емкости с
84 крышкой. Образцы слюны доставляли в лабораторию в течение 2 часов,
85 аликвотировали в микропробирки объемом 1,5 мл по 100 мкл для реализации
86 Способа 1, 300 мкл для реализации Способа 2, дополнительно по 500 и 1000
87 мкл для отработки Способа 2. Пробы хранили при -80°C до момента
88 исследования. Допускалось только однократное замораживание-оттаивание
89 биоматериала.

90 *Пробоподготовка*

91 Способ 1. Предварительная обработка проб слюны не требуется [3].

92 Способ 2. Пробы цельной слюны в объеме 300 мкл предварительно
93 обрабатывали путем центрифугирования при 13000 об/мин в течение 5
94 минут. На этапе отработки метода на биоматериале взрослых здоровых
95 волонтеров таким же образом обрабатывали пробы по 500 мкл и 1000 мкл.
96 Полученную надосадочную жидкость удаляли (на этапе отработки метода ее
97 использовали для ПЦР-анализа). К осадку добавляли до 100 мкл
98 деионизированной воды I типа и тщательно ресуспендировали. Полученную
99 суспензию осадка использовали для выделения нуклеиновых кислот.

100 *Выделение ДНК*

101 Экстракцию тотальной ДНК проводили с помощью комплекта
102 реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп»
103 (ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Россия).

104 Способ 1. При работе с цельной слюной и надосадочной жидкостью
105 точно следовали инструкции производителя. Для выделения вирусной ДНК
106 использовали 100 мкл пробы.

107 Способ 2. Материалом для выделения нуклеиновых кислот послужили
108 100 мкл предварительно подготовленной суспензии осадка слюны. В ходе
109 выделения проводили дополнительный этап: смесь осадка слюны и
110 лизирующего раствора после прогревания (65°C, 5 минут) центрифугировали
111 при 13000 об/мин в течение 5 минут. Полученный супернатант полностью
112 отбирали и переносили в чистую пробирку объемом 1,5 мл, сразу добавляли
113 к нему раствор для преципитации, продолжая процедуру выделения согласно
114 инструкции.

115 Концентрацию и чистоту выделенной тотальной ДНК измеряли с
116 помощью спектрофотометра BioPhotometer Plus («Eppendorf», Германия).

117 *Количественное определение ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ6А/В*

118 Выявление и количественное определение ДНК вирусов выполняли с
119 помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением коммерческих

120 наборов «АмплиСенс® EBV-скрин/монитор-FL» и «АмплиСенс® HHV6-
121 скрин-титр-FL» (ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Россия) на
122 амплификаторе Rotor-Gene Q 5plex HRM («Qiagen», Германия).
123 Лабораторный протокол для ПЦР-РВ соблюдался согласно инструкции
124 производителя. Результаты выражали в количественном формате – в
125 количестве копий ДНК на мл образца цельной слюны, а при сравнительном
126 анализе двух способов пробоподготовки – в копиях ДНК в пробе.

127 *Дифференциальная детекция ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В*

128 Для отдельной детекции основных типов ВЭБ (ВЭБ1 и ВЭБ2)
129 применен модифицированный нами вариант описанной ранее двухраундовой
130 «гнездовой» ПЦР [42]. ПЦР проводили в один раунд в разных пробирках с
131 использованием специфических пар праймеров, ранее использовавшихся для
132 второго раунда: Ap1 (5'-ТСТ TGA TAG GGA TCC GCT AGG АТА-3') и Ap2
133 (5'- ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT С-3'), амплифицирующих
134 фрагмент 497 п.н. (англоязычная аббревиатура – bp) и Bp1 (5'-САТ GGT
135 AGC СТТ AGG АСА ТА-3') и Bp2 (5'-АГА СТТ АГТ TGA TGC ССТ АГ-3'),
136 амплифицирующих фрагмент 150 п.н., которые детектируют ВЭБ1 и ВЭБ2,
137 соответственно [42].

138 Для отдельной детекции ВГЧ6А и ВГЧ6В применен метод, описанный
139 в статье [41]. Одностадийный вариант ПЦР проводили в одной пробирке,
140 используя праймеры, специфичные к немедленно-раннему гену (IE) вируса:
141 forward (СТС АТА АГГ TGC TGA GTG АТС АГТ Т) и reverse (ССТ САГ
142 TGA САГ АТС TGG GC) [41]. В данном случае используется одна пара
143 праймеров, которые в реакции амплификации дают два разных по размеру
144 фрагмента – 206 п.н. и 431 п.н., соответствующих ВГЧ6А и ВГЧ6В.

145 Дифференциальный ПЦР-анализ проводили в отдельных пробирках
146 (для ВЭБ1, ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В). Состав реакционной смеси общим
147 объемом 25 мкл включал следующие реагенты: праймеры (5 пкМ в реакцию)
148 («ДНК-синтез», Россия); 5-кратный Taq Red буфер 12,5 мМ Mg²⁺ («Евроген»,
149 Россия); 5 е.а. HS Taq ДНК-полимеразы («Евроген», Россия); смесь

150 дезоксинуклеозидтрифосфатов (до конечной концентрации 0,1 мМ)
151 («Евроген», Россия); деионизированную воду I типа («Milli-Q Integral 3»,
152 Франция). В качестве матрицы использовали выделенную ДНК в объеме 5
153 мкл на реакцию. В данном исследовании для дифференциальной детекции
154 ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В нами применялся оптимизированный единый
155 лабораторный протокол приготовления реакционной смеси и температурного
156 профиля ПЦР-анализа. Условия для проведения амплификации в работе не
157 приведены, т.к. оптимизированный вариант является объектом патентной
158 защиты. Амплификацию специфичных фрагментов проводили на
159 амплификаторе MaxuGene Gradient («Ахуген», США).

160 В качестве контрольных материалов при дифференциальной ПЦР
161 использованы: положительный контроль (К+) – ДНК ВЭБ1, ДНК ВЭБ2, ДНК
162 ВГЧ6В, полученная нами в предыдущих исследованиях из лейкоцитов
163 периферической крови пациентов с ОИМ ВЭБ- или ВГЧ6-этиологии;
164 отрицательный контроль (К-) – деионизированная вода I типа.

165 Продукты ПЦР амплификации анализировали с помощью
166 электрофореза в 1,8% агарозном геле, содержащем бромид этидия (0,02% по
167 объему). В качестве стандарта для определения длины двуцепочечных
168 молекул ДНК в интервале 100 – 1500 п.н. использовали маркер длин ДНК
169 (М) «100+ bp DNA Ladder» («Евроген», Россия). Результаты детектировали
170 на трансиллюминаторе InGenius 3 с использованием программного
171 обеспечения GeneSys («Syngene», Великобритания). Полученные данные
172 выражали в качественном формате – положительный или отрицательный.

173

174 *Статистическая обработка данных*

175 Статистическая обработка данных проводилась с использованием
176 языка программирования R версия 4.0.0 (The R Foundation for Statistical
177 Computing, Inc)¹ и среды RStudio версия 1.4.1106 (RStudio, PBC)².

¹ <https://www.R-project.org/>

² <http://www.rstudio.com/>

178 Принадлежность выборок к нормальному распределению определяли с
179 помощью критерия Шапиро-Уилка и графиков квантилей. Для попарного
180 сравнения независимых выборок использован критерий Манна-Уитни и
181 коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для поиска различий способов
182 1 и 2 использовали тест Уилкоксона для зависимых выборок. Рассчитанные
183 значения p корректировали с применением поправки Холма-Бонферрони для
184 множественных сравнений. Различия считали статистически значимыми при
185 скорректированном $p < 0,05$. Полученные концентрации вирусной ДНК
186 представляли в виде $Me [Q1; Q3]$ (где Me – медиана, $Q1$, $Q3$ - первый и
187 третий квартили).

188

189 Результаты исследований

190

191 На первом этапе исследования нами проведено тестирование проб
192 вирусной ДНК, выделенной из цельной слюны без предварительной
193 пробоподготовки (Способ 1).

194 *Количественное определение ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ6А/В*

195 Все образцы цельной слюны были исследованы на наличие ДНК ВЭБ и
196 ДНК ВГЧ6А/В методом количественной ПЦР-РВ. Среди детей с ОИМ ДНК
197 ВЭБ обнаружена в 95% случаев (21/22), а ее концентрация составляла 730
198 455 [118 994; 5 053 700] копий/мл. Только у одного ребенка в слюне ДНК
199 ВЭБ не детектировалась, при этом выявлялась ДНК ВГЧ6А/В в
200 концентрации 4866 копий/мл. В целом ДНК ВГЧ6А/В обнаружена у 82%
201 (18/22) обследованных пациентов при значениях концентрации ДНК вируса
202 15 [0; 5680] копий/мл (только у троих детей она была выше третьего
203 квартиля).

204 В группе здоровых детей положительными на ДНК ВЭБ были 50%
205 (13/26) проб слюны, ДНК ВГЧ6А/В – 81% (21/26). При этом концентрация
206 ДНК ВЭБ была значительно ниже по сравнению с группой ОИМ – 447 [85;
207 2925] копий/мл ($p < 0,001$). Следует отметить, что на фоне отсутствия

208 клинических симптомов у троих детей уровни ДНК ВЭБ отличались
209 наиболее высокими значениями в данной группе обследованных (143 972 –
210 828 020 копий/мл) и были сопоставимы с показателями пациентов с ОИМ.
211 Концентрация ДНК ВГЧ6А/В у здоровых детей составила 27 800 [3742; 53
212 437] копий/мл, что статистически значимо превысило таковую в группе детей
213 с ОИМ ($p=0,009$). При этом результаты измерения тотальной ДНК в группах
214 сравнения не различались ($p=0,359$).

215 Микст-инфекция (ВЭБ+ВГЧ6А/В) по результатам исследования слюны
216 в группе детей с ОИМ выявлялась у 82% (18/22), а в группе здоровых детей –
217 у 46% (12/26) обследованных.

218 *Дифференциальная детекция ВЭБ1/ВЭБ2*

219 На этапе генотипирования ВЭБ дифференциальная детекция ВЭБ1 и
220 ВЭБ2 проводилась не в формате двухраундовой «гнездовой» ПЦР,
221 описанной в статье [42], а в оптимизированном нами однораундовом
222 варианте, который ранее применялся для дифференциальной детекции ВЭБ1
223 и ВЭБ2 в лейкоцитах периферической крови и отличался проведением
224 амплификации в один раунд с использованием праймеров, приведенных в
225 разделе «материалы и методы» (исходно использовались во втором раунде
226 ПЦР). ПЦР-анализ выполнялся для каждой пробы в двух отдельных
227 пробирках и позволил выявлять ВЭБ1 (497 п.н.) и ВЭБ2 (150 п.н.) (рис. 1).

228 В ходе тестирования проб цельной слюны детей с ОИМ был выявлен
229 только ВЭБ1. Установлено, что у здоровых вирусоносителей в слюне также
230 доминировал ВЭБ1. При типировании ВЭБ в однораундовой ПЦР был
231 получен отрицательный результат в одной ВЭБ положительной пробе по
232 результатам ПЦР-РВ.

233 *Раздельная детекция ВГЧ6А/ВГЧ6В*

234 Определение ВГЧ6А и ВГЧ6В проводилось в ходе однораундовой ПЦР
235 в одной пробирке [41]. При обследовании пациентов с ОИМ в цельной слюне
236 выявлялся только ВГЧ6В. Дискордантность результатов увеличилась: 4
237 ВГЧ6А/В позитивные пробы (по результатам ПЦР-РВ) прошли как

238 отрицательные. В группе здоровых детей также единственным выявленным
239 видом стал ВГЧ6В. При исследовании материала в данной группе
240 расхождения результатов не наблюдалось.

241 Проанализировав ситуацию с дискордантными результатами,
242 установлено, что в одном случае концентрация ДНК ВГЧ6А/В составляла 5,8
243 копий в пробе, а в остальных количество вирусной ДНК было ≤ 1 копии в
244 пробе. Следует отметить, что среди других пациентов и в группе здоровых
245 детей при этих же концентрациях регистрировались и положительные
246 результаты.

247 На следующем этапе для оптимизации дифференциальной детекции
248 ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В работа проводилась по двум направлениям: а)
249 обогащение матрицы для ПЦР-анализа на основе оптимизации этапа
250 пробоподготовки слюны; б) проведение второго раунда ПЦР с теми же
251 праймерами, которые использовались в однораундовой ПЦР
252 (реамплификация).

253 *Оптимизация способа пробоподготовки слюны*

254 На основе исследования слюны взрослых здоровых волонтеров
255 выполнен сравнительный анализ трех ее фракций: цельная слюна без
256 предварительной обработки (100 мкл), осадок и надосадочная жидкость,
257 полученные из разных объемов того же образца слюны (300, 500 и 1000 мкл)
258 после пробоподготовки путем центрифугирования при 13000 об/мин в
259 течение 5 минут. Этот же режим центрифугирования дополнительно
260 применялся для последующего выделения вирусной ДНК из осадка слюны на
261 этапе между лизированием проб и преципитацией.

262 На рисунке 2 показано, что в образце одного и того же донора вирусная
263 ДНК в пробах надосадочной жидкости не выявлялась ни при
264 количественном, ни при качественном однораундовом варианте ПЦР-
265 анализа. Отметим, что при отработке метода в отдельных случаях, когда
266 концентрация ДНК ВЭБ в цельной слюне превышала 1000 копий в пробе, в

267 надосадочной жидкости выявлялась вирусная ДНК в количестве 1-2 копии в
268 пробе.

269 В осадке слюны, наоборот, во всех случаях наблюдалось повышение
270 количества копий вирусной ДНК по сравнению с цельной слюной, что также
271 выражалось в улучшении визуализации ПЦР-фрагментов на
272 электрофореграмме. При этом значения концентрации вирусной ДНК в
273 осадке слюны увеличивались непропорционально объему использованного
274 для анализа образца цельной слюны. Количество копий вирусной ДНК в
275 пробах осадка, полученных из 1000 мкл слюны, было меньше, чем из 300
276 мкл. В процессе отработки метода было установлено, что объем образца
277 более 300 мкл значительно изменял качественные характеристики
278 большинства проб осадка слюны. В этом случае отмечалось снижение
279 специфичности и воспроизводимости выявления вирусной ДНК в триплетах
280 на этапе дифференциального ПЦР-анализа (появление шмеров на
281 электрофореграммах и отсутствие специфических фрагментов в повторах).

282 На основе полученных результатов в ходе дальнейших исследований
283 нами применялся оптимизированный методический подход, основанный на
284 ПЦР-анализе вирусной ДНК, выделенной модифицированным способом из
285 осадка слюны, полученного путем центрифугирования 300 мкл образца
286 (Способ 2).

287 *Результаты сравнения Способа 1 и Способа 2*

288 Способ 2 был применен к тому же набору образцов слюны детей, что и
289 Способ 1. При попарном сравнении результатов количественной ПЦР-РВ,
290 как суммарно среди всех обследованных, так и отдельно по группам детей с
291 ОИМ и без клинических признаков данного заболевания, после применения
292 Способа 2 по сравнению со Способом 1 в пробах получено статистически
293 значимое повышение концентрации ДНК ВЭБ ($p < 0,001$; $p < 0,001$; $p = 0,012$),
294 ДНК ВГЧ6А/В ($p < 0,001$; $p = 0,021$; $p < 0,001$) и тотальной ДНК ($p < 0,001$ для
295 всех вариантов межгруппового сравнения). Корреляция между
296 концентрацией вирусной и тотальной ДНК не установлена.

297 Способ 2 дополнительно позволил выявить ДНК ВЭБ в пяти ранее
298 отрицательных образцах, принадлежащих условно здоровым детям.
299 Аналогичные изменения наблюдались и для ДНК ВГЧ6А/В у двух пациентов
300 с ОИМ и одного здорового ребенка. Как следствие, в группе пациентов с
301 ОИМ повысилась частота обнаружения ДНК ВГЧ6А/В с 82 % до 91% (20/22),
302 ВЭБ+ВГЧ6А/В с 81% до 86% (19/22). Среди условно здоровых детей доля
303 ВЭБ-положительных лиц увеличилась с 50% до 69% (18/26), ВГЧ6А/В-
304 положительных индивидов с 81% до 85% (22/26), а сочетанные формы
305 инфицирования (ВЭБ+ВГЧ6А/В) возросли с 46% до 61,5% (16/26).

306 По результатам однораундового дифференциального ПЦР-анализа
307 после выполнения процедуры дополнительной пробоподготовки слюны
308 ранее дискордантные пробы стали положительными на ВЭБ1 и ВГЧ6В. Как
309 общая тенденция, отмечалось повышение качества визуализации
310 специфических ПЦР-фрагментов на электрофореграмме по мере увеличения
311 концентрации вирусной ДНК в пробах (рис. 3). На примере детекции ВЭБ1
312 показано, что дополнительно выявленные после применения Способа 2 ВЭБ-
313 положительные пробы могут быть дискордантными. Установлено, что в целом
314 подобная картина отмечалась в 5 из 8 аналогичных проб в случае низкого
315 содержания вирусной ДНК (≤ 1 копии в пробе).

316 На рисунке 4-А две пробы, содержащие ВЭБ1, с целевыми для нас
317 концентрациями менее 1 копии в пробе представлены в триплетах. Проведен
318 анализ проб под номером 1* (0,6 копий в пробе) и номером 2 (0,4 копии в
319 пробе), представленных ранее на рисунке 3. Данные свидетельствует о
320 низкой сходимости результатов исследований при установленных
321 предельных значениях чувствительности используемых методов.
322 Обнаружение вирусной ДНК в этих образцах во многом может носить
323 случайный характер независимо от применения Способа 1 или Способа 2.

324 Реамплификация, когда во втором раунде ПЦР используется матрица и
325 праймеры, фигурирующие в первом раунде ПЦР, в пробах с низким
326 содержанием вирусной ДНК (≤ 1 копии в пробе) позволяет повысить

327 эффективность детекции результатов амплификации с помощью
328 горизонтального электрофореза (рис. 4-Б).

329 Таким образом, дифференциальная детекция ВЭБ1/ВЭБ2 и
330 ВГЧ6А/ВГЧ6В в однораундовом варианте ПЦР в сочетании со Способом 2
331 возможна в отношении образцов цельной слюны с минимальной
332 концентрацией вирусной ДНК >33 копий/мл.

333 Следует отметить, что ни в одном из исследуемых образцов слюны, в
334 том числе после оптимизации, ВЭБ2 и ВГЧ6А обнаружены не были.

335 *Исследование динамики выделения ВЭБ и ВГЧ6А/В со слюной*

336 Проведена динамическая оценка концентрации ДНК ВЭБ и ДНК
337 ВГЧ6А/В с помощью количественной ПЦР-РВ в серии образцов слюны,
338 которые собирались ежедневно в течение 14 дней. На рисунке 5
339 представлены результаты сравнительного исследования слюны условно
340 здоровых доноров (взрослого и ребенка) с помощью Способа 1 и Способа 2.

341 Независимо от возраста доноров после применения Способа 1 в
342 исследованных образцах за весь период наблюдения отмечались ежедневные
343 колебания концентрации вирусной ДНК. При этом наиболее выраженный
344 размах значений наблюдался в отношении ДНК ВЭБ: от недетектируемых
345 уровней до 10^2 - 10^3 копий в пробе (или 10^4 - 10^5 копий/мл). В этих же пробах
346 концентрация ДНК ВГЧ6А/В изменялась только в 4-6 раз и
347 характеризовалась более низким уровнем по сравнению с ВЭБ, бóльшим
348 постоянством значений без резких перепадов и отрицательных результатов.
349 Использование Способа 2 позволило повысить концентрацию вирусной ДНК
350 в каждой пробе и исключить период отсутствия детекции ДНК ВЭБ у
351 взрослого донора в 11 и 12 дни наблюдения.

352 Сравнительный анализ результатов применения Способа 2 к
353 исследованию слюны у 6 условно здоровых доноров подтверждает, что
354 профили кривых ежедневного выделения ВЭБ и ВГЧ6А/В различаются и для
355 каждого участника наблюдения индивидуальны (рис. 6).

356 За период наблюдения пиковые концентрации ДНК ВЭБ достигали у
357 разных доноров значений от 1475 до 54627 копий в пробе, а в отношении
358 ДНК ВГЧ6А/В от 72 до 2401 копий в пробе. В то время как некоторые
359 участники (N2, N3, N5) переходили от периодов непрерывного выделения
360 ВЭБ к отсутствию его детекции в слюне, другие (N1, N4, N6) поддерживали
361 обнаруживаемое выделение вируса в течение всего времени наблюдения.
362 Результаты исследования свидетельствуют о том, что в зависимости от дня,
363 на который приходился сбор биоматериала, участники N2, N3 и N5 могли
364 рассматриваться либо как ВЭБ-позитивные лица, выделяющие вирус с
365 разной степенью интенсивности, либо, наоборот, как ВЭБ-негативные
366 индивиды. Для детекции ДНК ВГЧ6А/В применение Способа 2 полностью
367 нивелировало данную проблему.

368 По результатам дифференциального ПЦР-анализа во всех образцах
369 слюны взрослых волонтеров также были обнаружены только ВЭБ1 и ВГЧ6В.

370

371 Обсуждение результатов

372

373 В настоящее время доказана основная роль воздушно-капельного пути
374 передачи в распространении ВЭБ- и ВГЧ6А/В-инфекций [19, 22, 34, 37]. При
375 сравнительном анализе различных биосубстратов ротовой полости (цельная
376 слюна, жидкость десневой щели, секрет отдельных слюнных желез, мазки
377 ротовой полости) наибольшая частота обнаружения вирусной ДНК была
378 установлена в цельной слюне [40, 43]. Кроме того, слюна является
379 легкодоступным клиническим материалом, не требующим инвазивных
380 вмешательств, что особенно актуально при обследовании детей. Именно
381 поэтому в нашей работе биоматериалом для исследования послужила
382 цельная слюна.

383 По данным литературы обращает внимание тот факт, что результаты
384 ПЦР-исследований сильно контрастируют. Так, при ОИМ частота выявления
385 ДНК ВЭБ в слюне у детей составляет у разных авторов от 69% [5] до 100%

386 [11]. Несмотря на то, что ИМ – полиэтиологичное заболевание, определение
387 ВГЧ6А/В в контексте этиологической расшифровки проводилось лишь в
388 единичных работах, а данные о частоте обнаружения вируса варьировали от
389 31% до 52% случаев [1, 5]. Среди условно здоровых детей ДНК ВЭБ и
390 ВГЧ6А/В в слюне обнаруживалась по данным одних авторов у 28% и 35%
391 обследованных [16], по другим – у 90% [35] и 66% [13, 14], соответственно.
392 Концентрация вирусной ДНК также значительно варьирует и составляет от
393 <2-1377 до 9300 копий/мл ДНК ВЭБ в слюне здоровых детей [25, 30].

394 В числе возможных причин этих различий специалисты чаще всего
395 отмечают популяционные особенности исследуемых групп из разных
396 географических регионов, отсутствие стандартизированных лабораторных
397 протоколов, представление количественных результатов в разных единицах
398 измерения, наличие в слюне ингибиторов, которые мешают амплификации
399 ДНК и обуславливают ложноотрицательные результаты [30, 31]. Еще одним
400 важным аспектом данной проблемы, на который мало обращают внимание,
401 является недостаточность информации об особенностях динамики выделения
402 вируса со слюной. В зарубежных исследованиях сообщается о выраженном
403 стохастическом характере обнаружения ДНК ВЭБ как в течение суток [24],
404 так и ежедневно [17], еженедельно [33], ежемесячно [29]. В то время как
405 одни авторы демонстрировали 30-кратную разницу между максимальным и
406 минимальным количеством ВЭБ за один день [24], другие установили
407 колебания его концентрации до 5 логарифмов в течение более длительного
408 периода наблюдения, вплоть до перемежающихся отрицательных
409 результатов детекции [23]. Мониторинг вирусной нагрузки ВГЧ6А/В в слюне
410 проводился преимущественно в проспективных исследованиях,
411 посвященных изучению времени первичного инфицирования детей [22, 33,
412 34], реже при обследовании здоровых вирусоносителей [36]. Как правило,
413 выделение ВГЧ6А/В отличалось непрерывным характером и относительно
414 низкой вирусной нагрузкой [33]. Механизмы, лежащие в основе регуляции

415 выделения ВЭБ и ВГЧ6А/В со слюной, остаются до конца не изученными [9,
416 23, 26].

417 Результаты собственных исследований подтверждают, что применение
418 разных методических подходов при тестировании одних и тех же образцов
419 генерирует отличающиеся по своей сути данные. Применение
420 оптимизированного нами способа пробоподготовки слюны позволило
421 повысить концентрацию вирусной и тотальной ДНК в пробах, и, как
422 следствие, частоту выявления ДНК ВЭБ на 19%, ДНК ВГЧ6А/В на 4-9%,
423 сочетанных форм инфекции на 15,5% (по результатам количественной ПЦР-
424 РВ). Достигнутые преимущества отразились в том числе на эффективности
425 обнаружения ДНК вирусов, минимизируя вероятность получения
426 ложноотрицательных результатов при динамическом исследовании образцов
427 слюны в течение 14 дней. На примере исследования образцов слюны
428 вирусоносителей (детей и взрослых) показано, что для ВЭБ характерны
429 резкие колебания вирусной нагрузки вплоть до недетектируемых уровней, а
430 также более высокие пиковые концентрации в сравнении с ВГЧ6А/В. Таким
431 образом, инфицированность или интенсивность выделения ВЭБ у каждого
432 человека не может быть надежно определена из исследования единственного
433 образца слюны. Однако в клинической и, в частности, педиатрической
434 практике, однократный забор биологического материала является наиболее
435 распространенным диагностическим подходом. В то время как механизмы
436 регуляции выделения ВЭБ со слюной являются отдельным направлением
437 зарубежных исследований [23, 26], для ВГЧ6А/В этот вопрос в литературе не
438 освещен. Мы полагаем, что более постоянный и равномерный характер
439 обнаружения ВГЧ6А/В у здоровых волонтеров может быть следствием
440 латенции вируса в эпителиальных клетках слюнных желез и/или ротоглотки
441 в уникальной для него хромосомно-интегрированной форме.

442 Полученные нами данные о частоте обнаружения вирусной ДНК
443 свидетельствуют о высокой доле здоровых вирусоносителей ВЭБ и ВГЧ6А/В
444 среди детей – жителей Нижегородского региона (69% и 85%,

445 соответственно). В более раннем исследовании нижегородских ученых
446 распространенность ВЭБ составляла 52% [2], что согласуется с нашими
447 данными (50%), полученными с помощью Способа 1. Микст-инфекция
448 детектировалась у 61,5% обследованных, в то время как более ранние
449 наблюдения российских исследователей свидетельствуют о том, что у детей
450 разного возраста инфицированность ВЭБ+ВГЧ6А/В изменяется от 25% до
451 60% [7].

452 Установлено, что концентрация ДНК ВЭБ в группе детей с ОИМ
453 достигала высоких значений – 730 455 [118 994; 5 053 700] копий/мл. В этой
454 же группе концентрация ДНК ВГЧ6А/В отличалась наименьшими, даже по
455 сравнению со здоровыми детьми, показателями (15 [0; 5680] против 27 800
456 [3742; 53 437] копий/мл; $p=0,009$). Следует отметить, что на этапе дизайна
457 данного исследования был сделан выбор в пользу использования отдельных
458 (ориентированных на конкретный вирус), а не мультиплексных тест-систем
459 для количественной ПЦР. Именно поэтому можно предположить, что
460 выявленные особенности отражают существующие механизмы
461 конкурентного взаимодействия ВЭБ и ВГЧ6А/В в организме человека при
462 определенных условиях. Подобные наблюдения описаны ранее в
463 публикациях, посвященных исследованиям ВГЧ6 и ВИЧ [18], а также ВЭБ и
464 вируса саркомы Капоши [38] и требуют дальнейшего изучения.

465 В России типирование ВЭБ и ВГЧ6А/В в слюне до настоящего времени
466 не проводилось. По результатам зарубежных исследователей у детей и
467 взрослых в слюне доминирующим типом ВЭБ во всем мире является ВЭБ1
468 (70-90%) [28, 44]. В современных работах продемонстрирована
469 принципиальная возможность обнаружения в слюне детей ВГЧ6А и ВГЧ6В
470 [30, 32, 34, 36]. В основном преобладает ВГЧ6В (96-100%), а ВГЧ6А
471 детектируется значительно реже. Однако встречаются публикации, согласно
472 которым ВГЧ6А выделяется со слюной у большей части детей в возрасте до
473 4-х лет [32]. Открытым остается вопрос, обусловлена ли частота
474 обнаружения преимущественно ВГЧ6В какими либо техническими и

475 физиологическими детерминантами или является реальным отражением
476 более активного участия данного вида вируса в развитии инфекционной
477 патологии человека по сравнению с ВГЧ6А [14].

478 Оптимизированный в данной работе методический подход позволяет
479 отдельно детектировать ВГЧ6А, ВГЧ6В и основные типы ВЭБ по единому
480 лабораторному протоколу, а в сочетании с предварительной
481 пробоподготовкой слюны повышает диагностическую чувствительность
482 ПЦР-анализа, минимизирует долю дискордантных и ложноотрицательных
483 результатов.

484 Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что среди
485 обследованных детей Нижегородского региона доминирует ВЭБ1 и ВГЧ6В,
486 что согласуется с существующими представлениями об их географическом
487 распределении на прилегающих территориях [8, 12]. ВЭБ2 и ВГЧ6А в слюне
488 не были обнаружены ни в одной из исследуемых групп детей, а также среди
489 взрослых.

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

493

494 Заключение

495

496 На основе метода ПЦР оптимизированы методические подходы для
497 дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В в слюне.

498 Впервые в России проведен отдельный анализ ВГЧ6А, ВГЧ6В и
499 основных типов ВЭБ в слюне. Представлены первые результаты 14-
500 тидневного динамического мониторинга выделения вирусов со слюной у
501 здоровых вирусоносителей (взрослые и дети). Установлено, что цельная
502 слюна является доступным, неинвазивным клиническим материалом для
503 выделения вирусной ДНК с целью изучения генетического разнообразия ВЭБ

504 и ВГЧ6А/В. Показано, что определение ДНК ВЭБ в единственном образце
505 слюны не позволяет достоверно оценить инфицированность лиц или
506 интенсивность выделения ВЭБ. ВГЧ6А/В характеризуется более постоянным
507 и равномерным выделением.

508 Оптимизация отдельной детекции основных типов ВЭБ, а также видов
509 ВГЧ6А и ВГЧ6В основывалась на использовании комплексного подхода,
510 включающего применение однораундового варианта ПЦР вместо
511 двухраундового, а также единого лабораторного протокола исследования для
512 разных вирусов, что существенно упрощает диагностический процесс и
513 делает его экономически целесообразным. Другой аспект оптимизации
514 направлен на концентрирование вирусной ДНК в образцах цельной слюны с
515 целью обогащения матрицы для ПЦР-анализа, что особенно важно при
516 низкой вирусной нагрузке и позволяет повысить чувствительность
517 исследования, а также снизить долю ложноотрицательных результатов.

518 Среди пациентов с ОИМ и в контрольной группе установлено
519 преобладание ВЭБ1 и ВГЧ6В. ВЭБ2 и ВГЧ6А не детектировались ни в
520 одном из исследованных образцов слюны.

521 Описанный в рамках настоящего исследования методический подход
522 может применяться в диагностических, эпидемиологических и научно-
523 исследовательских целях.

РИСУНКИ

Рисунок 1

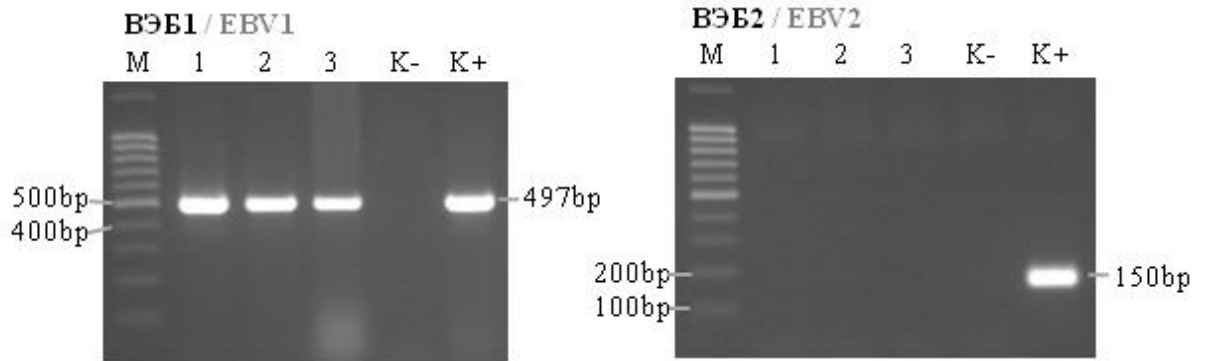


Рисунок 2

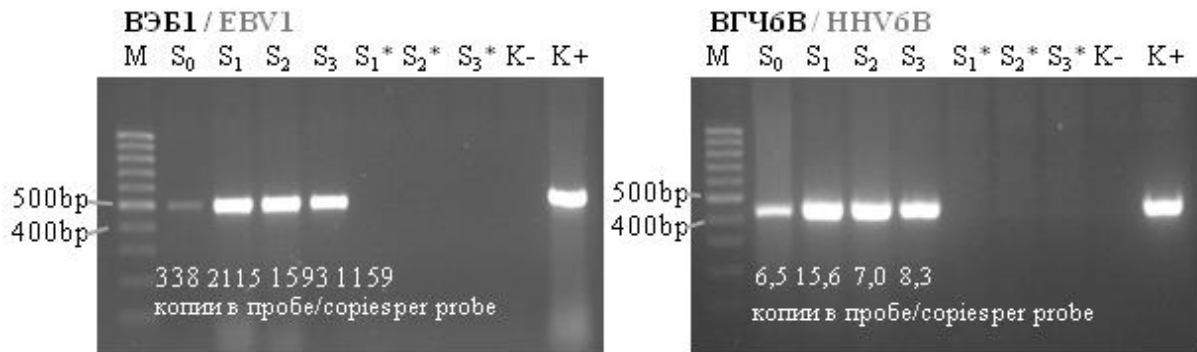


Рисунок 3

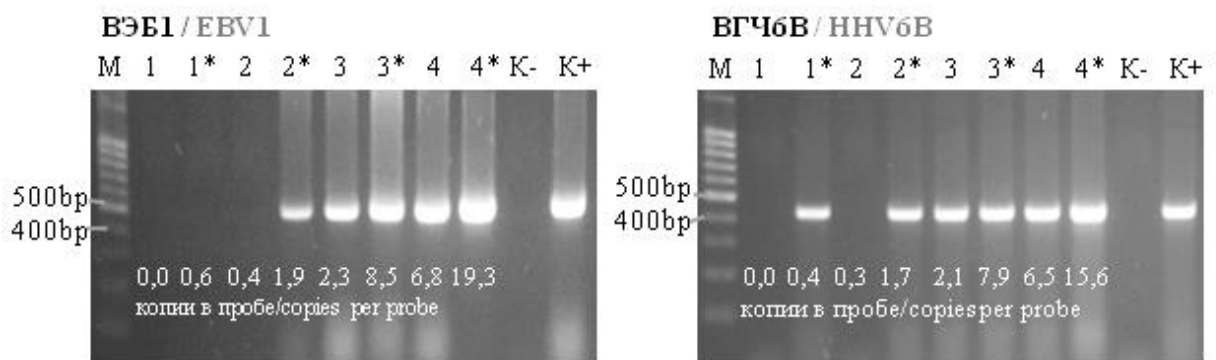


Рисунок 4

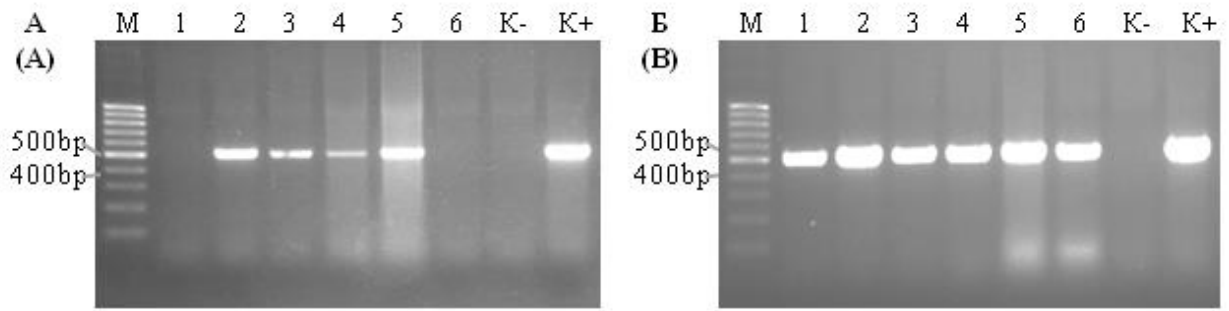


Рисунок 5

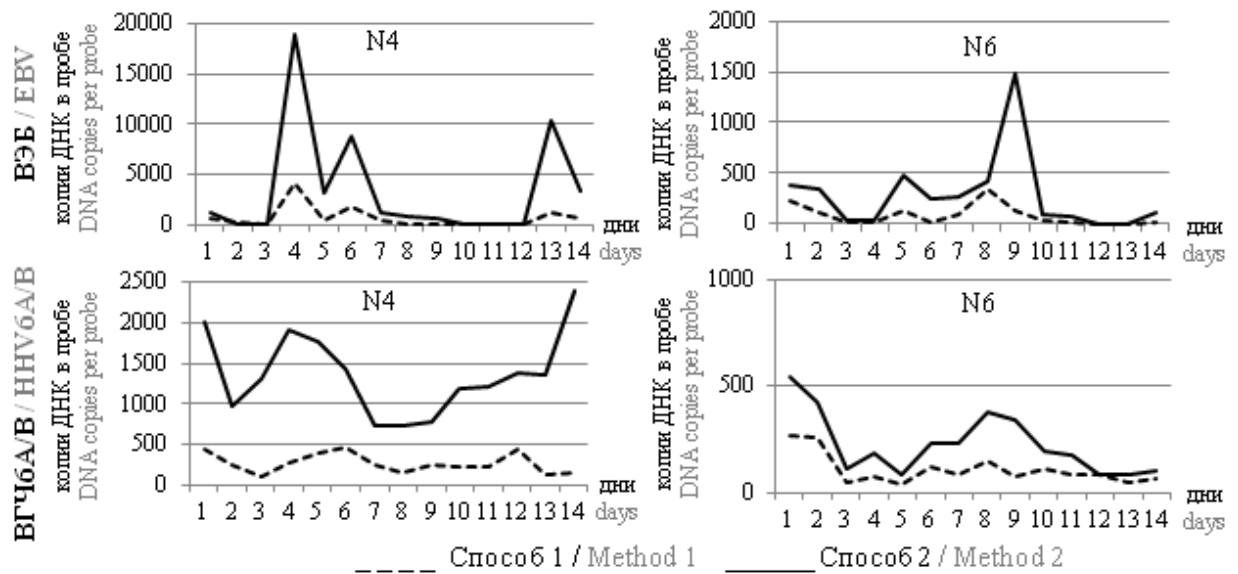
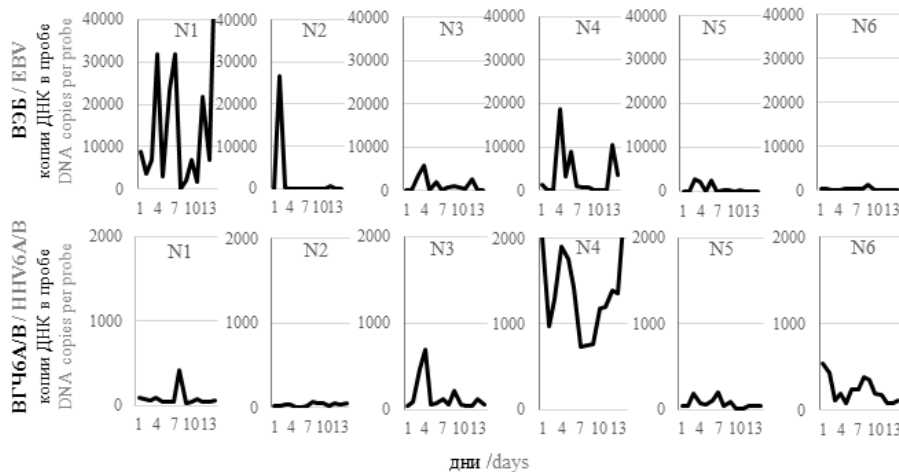


Рисунок 6



ПОДПИСИ К РИСУНКАМ

Рисунок 1. Результаты оптимизированной однораундовой ПЦР для дифференциальной детекции ВЭБ1 и ВЭБ2 в пробах цельной слюны пациентов с острым ВЭБ-инфекционным мононуклеозом

Figure 1. Optimized one-round PCR results for differential detection of EBV1 and EBV2 in whole saliva samples from patients with acute EBV-infectious mononucleosis

ВЭБ1

EBV1

ВЭБ2

EBV2

Рисунок 2. Сравнение результатов определения ВЭБ1 и ВГЧ6В во фракциях слюны, полученных из разных объемов образца одного донора

Figure 2. Comparison of the results on determining EBV1 and HHV6B in saliva fractions obtained from different sample volumes from the same donor

Примечания. Цельная слюна - проба S_0 (100 мкл); осадок слюны – пробы S_1 (300 мкл), S_2 (500 мкл), S_3 (1000 мкл); надосадочная жидкость – пробы S_1^* (300 мкл), S_2^* (500 мкл), S_3^* (1000 мкл)

Notes. Whole saliva - sample S_0 (100 μ l); saliva sediment - samples S_1 (300 μ l), S_2 (500 μ l), S_3 (1000 μ l); supernatant - samples S_1^* (300 μ l), S_2^* (500 μ l), S_3^* (1000 μ l)

ВЭБ1

EBV1

HHV6B

копии в пробе

copies per probe

Рисунок 3. Сравнение результатов детекции ВЭБ1 и ВГЧ6В в пробах слюны с разными концентрациями вирусной ДНК до и после применения Способа 2
Figure 3. Comparison of the results on detecting EBV1 and HHV6B in saliva samples with varying viral DNA concentrations before and after using Method 2

Примечания. Способ 1 – пробы 1, 2, 3, 4; Способ 2 – пробы 1*, 2*, 3*, 4*

Notes. Method 1 - samples 1, 2, 3, 4; Method 2 - samples 1*, 2*, 3*, 4*

ВЭБ1

EBV1

ВГЧ6В

HHV6B

копии в пробе

copies per probe

Рисунок 4. Результаты детекции ВЭБ1 в пробах с низкой концентрацией вирусной ДНК (≤ 1 копии в пробе)

А) детекция в триплетах при концентрации ДНК 0,6 (линии 1, 2, 3) и 0,4 копии в пробе (линии 4, 5, 6); Б) реамплификация при концентрации ДНК 0,6 (линии 1, 2, 3) и 0,4 копии в пробе (линии 4, 5, 6)

Figure 4. Results of EBV1 detection in samples with low viral DNA concentration (≤ 1 copies per probe)

A) detected in triplets at DNA concentration of 0.6 (lines 1, 2, 3) and 0.4 copies per probe (lines 4, 5, 6); B) reamplification at DNA concentration of 0.6 (lines 1, 2, 3) and 0.4 copies per probe (lines 4, 5, 6)

Рисунок 5. Сравнение Способа 1 и Способа 2 в ходе динамического наблюдения за выделением ВЭБ и ВГЧ6А/В со слюной

Figure 5. Comparison of Method 1 and Method 2 in dynamic monitoring for EBV and HHV6A/B shedding in saliva

Примечания. N4 – взрослый донор; N6 – здоровый ребенок

Notes. N4 - adult donor; N6 - healthy child

ВЭБ

EBV

ВГЧ6А/В

HHV6A/B

копии ДНК в пробе

DNA copies per probe

Способ 1

Method 1

Способ 2

Method 2

дни

days

Рисунок 6. Профиль ежедневного выделения ВЭБ и ВГЧ6А/В со слюной у здоровых доноров в течение 14 дней наблюдения (применен Способ 2)

Figure 6. Daily profile of EBV and HHV6A/B shedding in saliva of healthy donors within 14 day-observation (Method 2 applied)

Примечания. N1, N2, N3, N4, N5 – взрослые доноры; N6 – здоровый ребенок

Notes. N1, N2, N3, N4, N5 – adult donors; N6 – healthy child

ВЭБ

EBV

ВГЧ6А/В

HHV6A/B

копии ДНК в пробе

DNA copies per probe

дни

days

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТДААННЫЕ

Методические подходы к дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В в слюне

Methodological approaches to differential detection of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B in saliva

Блок 1. Информация об авторе, ответственном за переписку

Попкова Мария Игоревна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии

Popkova Mariia Igorevna, PhD (Medicine), Leading Researcher of Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора

Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology

603950, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, д. 71

603950, Nizhny Novgorod, Malaya Yamskaya st., 71

Телефон: +7(831) 469-79-46, моб.: +7-906-352-60-15, факс: +7(831) 469-79-20

E.mail: popmarig@mail.ru

Phone: +7(831) 469-79-46, Mob.: +7-906-352-60-15, Fax: +7(831) 469-79-20

E.mail: popmarig@mail.ru

Блок 2. Информация об авторах

- Попкова М.И., кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, popmarig@mail.ru, ORCID: 0000-0001-5864-5862

Popkova M.I., PhD (Medicine), Leading Researcher of Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny

Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology,
popmarig@mail.ru, ORCID: 0000-0001-5864-5862

- Уткин О.В., кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, utkino2004@mail.ru, ORCID: 0000-0002-7571-525X

Utkin O.V., PhD (Biology), Head of Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, utkino2004@mail.ru, ORCID: 0000-0002-7571-525X

- Брызгалова Д.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, moskvinadara7@gmail.com, ORCID: 0000-0002-6663-8440

Bryzgalova D.A., Junior Researcher of Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, moskvinadara7@gmail.com, ORCID: 0000-0002-6663-8440

- Сенатская А.О., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, seanna@bk.ru, ORCID: 0000-0003-2024-4283

Senatskaia A.O., Junior Researcher of Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, seanna@bk.ru, ORCID: 0000-0003-2024-4283

- Соболева Е.А., врач-инфекционист, ассистент кафедры инфекционных болезней Приволжского исследовательского медицинского университета. Fullofcarrot@pimunn.ru, ORCID: 0000-0003-3591-9618
Soboleva E.A., MD. Assistant of the Infectious Diseases department, Privolzhsky Research Medical University. Fullofcarrot@pimunn.ru, ORCID: 0000-0003-3591-9618
- Сахарнов Н.А., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, saharnov@nniem.ru, ORCID: 0000-0003-3965-2033
Sakharnov N.A., Researcher of Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, saharnov@nniem.ru, ORCID: 0000-0003-3965-2033
- Филатова Е.Н., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, filatova@nniem.ru, ORCID: 0000-0002-6683-7191
Filatova E.N., PhD (Biology), Leading Researcher of Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, filatova@nniem.ru, ORCID: 0000-0002-6683-7191
- Кулова Е.А., кандидат медицинских наук, врач инфекционист, аллерголог-иммунолог ООО «Тонус Кроха и семейная СТОМАТОЛОГИЯ» (г. Нижний Новгород), dr_kulova@mail.ru, ORCID: 0000-0002-5207-1164
Kulova E.A., PhD (Medicine), Infectious Disease Physician, Allergologist and Immunologist of «Tonus Krokha i Semeynaya STOMATOLOGIYA» (Nizhniy Novgorod), dr_kulova@mail.ru, ORCID: 0000-0002-5207-1164

Блок 3. Метаданные статьи

Сокращенное название:

Детекция ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В

Shortened name: Detection of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B

Ключевые слова: ВЭБ1, ВЭБ2, ВГЧ6А, ВГЧ6В, слюна, ПЦР, генотипирование, дифференциальная детекция.

Key words: EBV1, EBV2, HHV6A, HHV6B, saliva, PCR, genotyping, differential detection.

Страниц - 18, рисунков – 6.

Раздел журнала: Оригинальная статья

27.10.2021

Г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

По-ряд-ко- вый но-мер ссыл-ки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или DOI
1	Бабаченко И.В., Шарипова Е.В., Мурина Е.А. Современные подходы к диагностике инфекционного мононуклеоза у детей // Лининская больница. 2012. №4 (03). С. 62–66.	Babachenko I.V., Sharipova E.V., Murina E.A. Contemporary approaches to the diagnosis of infectious mononucleosis in children. The hospital, 2012, no. 4, pp. 62–66. (In Russ.)	https://med122.com/about/structure/pages/kb_magazine_4.pdf
2	Бруснигина Н.Ф., Сперанская Е.В., Черневская О.М., Махова М.А., Орлова К.А., Клеина Н.Н. Анализ распространенности вирусов семейства Herpesviridae среди	Brusnigina N.F., Speranskaya E.V., Chernevskaya O.M., Makhova M.A., Orlova K.A., Klenina N.N. Analysis of the prevalence of viruses of the Herpesviridae family among	https://cyberleninka.ru/article/n/analiz-rasprostranennosti-virusov-semeystva-herpesviridae-sredi-detey-nizhnego-novgoroda

	детей Нижнего Новгорода // Медицинский альманах. 2013. № 2. С. 99–103.	children of Nizhny Novgorod. Medical Almanac, 2013, no. 2, pp. 99–103. (In Russ.)	
3	Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики: методические рекомендации. М.: ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012. 34 с.	1. Taking, transportation, storage of clinical material for PCR diagnostics: methodological recommendations. Moscow: Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2012. 34 p. (In Russ.)	https://www.crie.ru/pdf/clinmat.pdf
4	Демина О.И., Тихомиров Д.С., Чеботарёва Т.А., Мазанкова Л.Н., Туполева Т.А. Клиническая значимость вирусологических методов верификации этиологии	2. Demina O.I., Tikhomirov D.S., Chebotareva T.A., Mazankova L.N., Tupoleva T.A. Clinical relevance of virological verification methods for the etiology of infectious	https://detinf.elpub.ru/jour/article/view/504 [doi: 10.22627/2072-8107-2020-19-2-29-37]

	инфекционного мононуклеоза // Детские инфекции. 2020. Т. 19, № 2. С. 29–37.	mononucleosis. CHILDREN INFECTIONS, 2020, vol. 19, no. 2, pp. 29–37. (In Russ.)	
5	Климова Р.Р., Сотников И.А., Чичев Е.В., Егорова Н.Ю., Околышева Н.В., Кистенева Л.Б., Учайкин В.Ф., Кушч А.А. Сравнительный анализ частоты встречаемости маркеров герпесвирусных инфекций в клинических материалах у детей с различными инфекционными патологиями // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2014. № 4. С. 33–38.	Klimova R.R., Sotnikov I.A., Chichev E.V., Egorova N.Yu., Okolysheva N.V., Kisteneva L.B., Uchaikin V.F., Kushch A.A. Comparative analysis of the frequency of herpesvirus infection markers in clinical samples 3. from children with various infectious diseases. Epidemiologiya i infektsionnyye bolezni. Aktual'nyye voprosy, 2014, no. 4, pp. 33–38. (In Russ.)	https://epidemiology- journal.ru/ru/archive/article/29917

6	Лысенкова М.Ю., Мелехина Е.В., Каражас Н.В., Свитич О.А., Веселовский П.А., Рыбалкина Т.Н., Бошьян Р.Е., Косенчук В.В., Музыка А.Д., Горелов А.В., Усенко Д.В., Иванова М.Ю. Клинико-эпидемиологические особенности ВГЧ-6А - и ВГЧ-6В-инфекции у детей г. Москвы // Детские инфекции. 2019. Т. 18, № 1. С. 11–16.	Lysenkova M.Yu., Melekhina E.V., Karazhas N.V., Svitich O.A., Veselovsky P.A., Rybalkina T.N., Boshyan R.E., Kosenchuk V.V., Muzyka A.D., Gorelov A.V., Usenko D.V., Ivanova M.Yu. The clinical and epidemiological features of HHV-6A and HHV-6B infections in children of Moscow. CHILDREN INFECTIONS, 2019, vol. 18, no. 1, pp. 11–16. (In Russ.)	https://detinf.elpub.ru/jour/article/view/401 [doi: 10.22627/2072-8107-2019-18-1-11-16]
7	Мелехина Е.В., Николаева С.В., Солдатова Е.Ю., Музыка А.Д., Горелов А.В. Место инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6А/В, в	Melehina E.V., Nikolaeva S.V., Soldatova E.Ju., Muzyka A.D., Gorelov A.V. Human herpesvirus 6 variant A/B infections in child population. RMJ, 2019, no. 10,	https://www.rmj.ru/articles/infektsionnye_bolezni/Mesto_infekcii_vyzvannoy_virusom_gerpеса_cheloveka_6AV_v_detskoy_populyacii/

	детской популяции // РМЖ. 2019. № 10. С. 17–21.	pp. 17–21. (In Russ.)	
8	4. 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.	5. 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. <i>Pediatrics</i> , 2019, vol. 98, no. 1, pp. 53–56. (In Russ.)	https://www.researchgate.net/publication/331022650_Molecular_and_biological_characteristics_of_human_herpes_virus_type_6_in_patients_with_different_variants_of_the_disease_course [doi: 10.24110/0031-403X-2019-98-1-53-56]
9	Пермякова А.В., Сажин А.В., Мелехина Е.В., Горелов А.В.	Permyakova A.V., Sazhin A.V., Melekhina E.V., Gorelov A.V.	https://doi.org/10.24110/0031-403X-2020-99-6-226-231

	Возможности биологического и математического моделирования инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр // Педиатрия им. Г.Н. Сперанского. 2020. Т. 99, № 6. С. 226–231.	Possibilities of biological and mathematical modeling of the infection caused by Epstein–Barr virus. <i>Pediatrics n.a. G.N. Speransky</i> , 2020, vol. 99, no. 6, pp. 226–231. (In Russ.)	[doi: 10.24110/0031-403X-2020-99-6-226-231]
10	Попкова М.И., Уткин О.В., Брызгалова Д.А. Сравнительная характеристика бета-герпес-вирусов человека 6А и 6В. Современный взгляд на проблему // Журнал инфектологии. 2021. Т. 13, № 3. С. 5-18.	6. Popkova M.I., Utkin O.V., Bryzgalova D.A. Comparative characteristics of human betaherpesviruses 6A and 6B. A modern view on the problem. <i>Journal Infectology</i> , 2021, vol. 13, no. 3, pp. 5-18. (In Russ.)	https://journal.niidi.ru/jofin/article/view/1235/912 [doi: 10.22625/2072-6732-2021-13-3-5-18]
11	Попова О.А., Хохлова З.А. Персистенция ДНК ВЭБ у детей, перенесших	7. Popova O.A., Khokhlova Z.A. Persistence of VEB DNA in Children after the Infectious	https://www.rusimmun.ru/jour/article/view/835 [doi:10.31857/S102872210002654-4]

	инфекционный мононуклеоз // Российский иммунологический журнал. 2018. Т. 12, № 4. С. 728–730.	Mononucleosis. Russian Journal of Immunology, 2018, vol. 12, no. 4, pp. 728-730. (In Russ.)	
12	Смирнова К.В., Сенюта Н.Б., Лубенская А.К., Душенькина Т.Е., Гурцевич В.Э. Древние варианты вируса Эпштейна–Барр (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): гипотезы и факты // Вопросы вирусологии. 2020. Т. 65, № 2. С. 77–86.	8. Smirnova K.V., Senyuta N.B., Lubenskaya A.K., Dushenkina T.E., Gurtsevich V.E. Ancient variants of the Epstein–Barr virus (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): hypotheses and facts. Problems of Virology, 2020, vol. 65, no. 2, pp. 77–86. (In Russ.)	https://virusjour.elpub.ru/jour/article/view/282?locale=ru_RU [doi:10.36233/0507-4088-2020-65-2-77-86]
13	Ablashi D., Agut H., Alvarez-Lafuente R., Clark D. A., Dewhurst S., DiLuca D., Flamand L., Frenkel N., Gallo	–	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4750402/ [doi: 10.1007/s00705-013-1902-5]

	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. Archives of Virology, 2014, vol. 159, pp. 863–870.		
14	Agut H., Bonnafous P., Gautheret-Dejean A. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. Clin. Microbiol. Rev., 2015, vol. 28, no. 2, pp. 313-335.	9. –	https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00122-14?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed [doi: 10.1128/CMR.00122-14]
15	Ahmadi M., Karimi A., Rafiei Tabatabaei S., Fallah F., Shiva F. Detection of 5 Latent Herpes	–	https://sites.kowsarpub.com/apid/articles/20201.html [doi: 10.5812/pedinfect.11509]

	Viruses and Pneumocystis Jirovecii in Saliva of Healthy Children by PCR. Arch. Pediatr. Infect. Dis., 2014, vol. 2, no. 1, pp. 160–163.		
16	Bartolini L., Piras E., Sullivan K., Gillen S., Bumbut A., Lin C.-T. M., Leibovitch E.C., Graves J.S., Waubant E.L., Chamberlain J.M., Gaillard W.D., Jacobson S. Detection of HHV-6 and EBV and Cytokine Levels in Saliva From Children With Seizures: Results of a Multi-Center Cross-Sectional Study. Front. Neurol., 2018, vol. 9: 834.	–	https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2018.00834/full [doi: 10.3389/fneur.2018.00834]
17	Byrne C.M., Johnston C., Orem J., Okuku F., Huang M.L.,	10.–	https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1009

	Rahman H., Wald A., Corey L., Schiffer J.T., Casper C., Coombs D., Gantt S. Examining the dynamics of Epstein-Barr virus shedding in the tonsils and the impact of HIV-1 coinfection on daily saliva viral loads. PLoS Comput. Biol., 2021, vol. 17, no. 6: e1009072.		072 [doi: 10.1371/journal.pcbi.1009072]
18	Catusse J., Parry C.M., Dewin D.R., Gompels U.A. Inhibition of HIV-1 infection by viral chemokine U83A via high-affinity CCR5 interactions that block human chemokine-induced leukocyte chemotaxis and receptor internalization. Blood, 2007, vol. 109, no. 9, pp. 3633–	11.–	https://ashpublications.org/blood/article/109/9/3633/23612/Inhibition-of-HIV-1-infection-by-viral-chemokine [doi: 10.1182/blood-2006-08-042622]

	3639.		
19	Cederberg L.E., Rabinovitch M.D., Grimm-Geris J.M., Schmeling D.O., Filtz E.A., Condon L.M., Balfour H.H. Jr. Epstein-Barr Virus DNA in Parental Oral Secretions: A Potential Source of Infection for Their Young Children. Clin. Infect. Dis., 2019, vol. 68, no. 2, pp. 306–312.	12.–	https://academic.oup.com/cid/article/68/2/306/5017239 [doi: 10.1093/cid/ciy464]
20	Dambaugh T., Hennessy K., Chamnankit L., Kieff E. U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1984, vol.	–	https://www.pnas.org/content/81/23/7632.long [doi: 10.1073/pnas.81.23.7632]

	81, pp. 7632–7636.		
21	Dunn N., Kharlamova N., Fogdell-Hahn A. The role of herpesvirus 6A and 6B in multiple sclerosis and epilepsy. Scand. J. Immunol., 2020, vol. 92, no. 6: e12984.	–	https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/sji.12984 [doi: 10.1111/sji.12984]
22	Gantt S., Orem J., Krantz E.M., Morrow R.A., Selke S., Huang M.L., Schiffer J.T., Jerome K.R., Nakaganda A., Wald A., Casper C., Corey L. Prospective Characterization of the Risk Factors for Transmission and Symptoms of Primary Human Herpesvirus Infections Among Ugandan Infants. J. Infect. Dis., 2016, vol. 214, no. 1, pp. 36–44.	13.–	https://academic.oup.com/jid/article/214/1/36/2469747 [doi: 10.1093/infdis/jiw076]

23	Hadinoto V., Shapiro M., Sun C.C., Thorley-Lawson D.A. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. PLoS Pathog., 2009, vol. 5, no. 7: e1000496.	14.–	https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000496 [doi: 10.1371/journal.ppat.1000496]
24	Holden D.W., Gold J., Hawkes C.H., Giovannoni G., Saxton J.M., Carter A., Sharrack B. Epstein Barr virus shedding in multiple sclerosis: Similar frequencies of EBV in saliva across separate patient cohorts. Mult. Scler. Relat. Disord., 2018, vol. 25, pp. 197–199.	15.–	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221103481830261X [doi: 10.1016/j.msard.2018.07.041]
25	Hug M., Dorner M., Fröhlich F.Z. Gysin C., Neuhaus D.,	16.–	https://academic.oup.com/jid/article/202/8/1192/927200

	Nadal D., Berger C. Pediatric Epstein-Barr virus carriers with or without tonsillar enlargement may substantially contribute to spreading of the virus. J. Infect. Dis., 2010, vol. 202, no. 8, pp. 1192–1199.		[doi: 10.1086/656335]
26	Huynh G.T., Rong L. Modeling the dynamics of virus shedding into the saliva of Epstein-Barr virus positive individuals. J. Theor. Biol., 2012, vol. 310, pp. 105-114.	17.–	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519312002743 [doi: 10.1016/j.jtbi.2012.05.032]
27	Kourieh A., Gheit T., Tommasino M., Dalstein V., Clifford G.M., Lacau St Guily J., Clavel C., Franceschi S., Combes J.D.; SPLIT study	–	https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.25338?__cf_chl_jschl_tk__=pmd_NN9nT45HW_bIG5QIA1_OfeBANUvrfKuQiJCKjOAK6Dw-1635256289-0-

	group. Prevalence of human herpesviruses infections in nonmalignant tonsils: The SPLIT study. J. Med. Virol., 2019, vol. 91, no. 4, pp. 687–697.		gqNtZGzNAiWjcnBszQ99 [doi: 10.1002/jmv.25338]
28	Kwok H., Chan K.W., Chan K.H., Chiang A.K. Distribution, persistence and interchange of Epstein-Barr virus strains among PBMC, plasma and saliva of primary infection subjects. PLoS One, 2015, vol. 10, no. 3: e0120710.	–	https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0120710 [doi: 10.1371/journal.pone.0120710]
29	Lee J.S., Lacerda E.M., Nacul L., Kingdon C.C., Norris J., O'Boyle S., Roberts C.H., Palla L., Riley E.M. Cliff J.M. Salivary DNA Loads for Human	18.–	https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.656692/full [doi: 10.3389/fmed.2021.656692]

	Herpesviruses 6 and 7 Are Correlated With Disease Phenotype in Myalgic Encephalomyelitis. Chronic Fatigue Syndrome. Front. Med. (Lausanne), 2021, vol. 8: 656692.		
30	Leibovitch E.C., Lin C.M., Billioux B.J., Graves J., Waubant E., Jacobson S. Prevalence of salivary human herpesviruses in pediatric multiple sclerosis cases and controls. Mult. Scler., 2019, vol. 25, no. 5, pp. 644–652.	19.–	https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1352458518765654 [doi: 10.1177/1352458518765654]
31	Magalhães I.M., Martins R.V., Cossatis J.J., Cavaliere R.M., Afonso L.A., Moysés N.,	–	https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762010000700015&lng=en&tlng=e

	Oliveira S.A., Cavalcanti S.M. Detection of human herpesvirus 6 and 7 DNA in saliva from healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 2010, vol. 105, no. 7, pp. 925–927.		n [doi: 10.1590/s0074-02762010000700015]
32	Magalhães Ide M., Martins R.V., Vianna R.O., Moysés N., Afonso L.A., Oliveira S.A., Cavalcanti S.M. Detection of human herpesvirus 7 infection in young children presenting with exanthema subitum. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 2011, vol. 106, no. 3, pp. 371–373.	20.–	https://www.scielo.br/j/mioc/a/WK9t4ZpFBkBhssSzSx3jvVk/?lang=en [doi: 10.1590/s0074-02762011000300020]
33	Matrajt L., Gantt S. , Mayer B.T. , Krantz E.M. , Orem	21.–	https://www.nature.com/articles/s41598-017-12994-0#citeas

	J., Wald A., Corey L., Schiffer J.T., Casper C. Virus and host-specific differences in oral human herpesvirus shedding kinetics among Ugandan women and children. <i>Sci. Rep.</i> , 2017, vol. 7, no. 1: 13105.		[doi: 10.1038/s41598-017-12994-0]
34	Mayer B.T., Krantz E.M., Wald A., Corey L., Casper C., Gantt S., Schiffer J.T. Estimating the Risk of Human Herpesvirus 6 and Cytomegalovirus Transmission to Ugandan Infants from Viral Shedding in Saliva by Household Contacts. <i>Viruses</i> , 2020, vol. 12, no. 2: 171.	22.–	https://www.mdpi.com/1999-4915/12/2/171 [doi: 10.3390/v12020171]
35	Mbulaiteye S.M., Walters M., Engels E.A., Bakaki P.M.,	23.–	https://academic.oup.com/jid/article/193/3/422/2191799

	Ndugwa C.M., Owor A.M., Goedert J.J., Whitby D., Biggar R.J. High levels of Epstein-Barr virus DNA in saliva and peripheral blood from Ugandan mother-child pairs. J. Infect. Dis., 2006, vol. 193, no. 3, pp. 422–426.		[doi: 10.1086/499277]
36	Miura H., Ihira M., Kozawa K. Kawamura Y., Higashimoto Y. Hattori F., Yoshikawa T. Effect of Lactococcus lactis Strain Plasma on HHV-6 and HHV-7 Shedding in Saliva: A Prospective Observational Study. Microorganisms, 2021, vol. 9, no. 8: 1683.	24.–	https://www.mdpi.com/2076-2607/9/8/1683 [doi: 10.3390/microorganisms9081683]
37	Miyazaki Y., Namba H., Torigoe	25.–	https://onlinelibrary.wiley.com/doi/ep

	S., Watanabe M., Yamashita N., Ogawa H., Morishima T., Yamada M. Monitoring of human herpesviruses-6 and -7 DNA in saliva samples during the acute and convalescent phases of exanthem subitum. J. Med. Virol., 2017, vol. 89, no. 4, pp. 696–702.		df/10.1002/jmv.24690# [doi: 10.1002/jmv.24690]
38	Newton R., Labo N., Wakeham K., Marshall V., Roshan R., Nalwoga A., Sebina I., Muhangi L., Webb E.L., Miley W, Rochford R., Elliott A.M., Whitby D. Determinants of Gammaherpesvirus Shedding in Saliva Among Ugandan Children and Their Mothers. J. Infect.	26.–	https://academic.oup.com/jid/article/218/6/892/4995546 [doi: 10.1093/infdis/jiy262]

	Dis., 2018, vol. 218, no. 6, pp. 892–900.		
39	Palser A.L., Grayson N.E., White R.E., Corton C., Correia S., Ba Abdullah M.M., Watson S.J., Cotten M., Arrand J.R., Murray P.G., Allday M.J., Rickinson A.B., Young L.S., Farrell P.J., Kellam P. Genome Diversity of Epstein-Barr Virus from Multiple Tumor Types and Normal Infection. <i>J. Virol.</i> , 2015, vol. 89, no. 10, pp. 5222–5237.	–	https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.03614-14 [doi: 10.1128/JVI.03614-14]
40	Pereira C.M., Gasparetto P.F., Corrêa M.E., Costa F.F., de Almeida O.P., Barjas-Castro M.L. Human herpesvirus 6 in	–	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996904001281?via%3Dihub [doi:

	oral fluids from healthy individuals. Arch. Ora. Biol., 2004, vol. 49, no. 12, pp. 1043–1046.		10.1016/j.archoralbio.2004.06.002]
41	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. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2005, vol. 11, no.7, pp. 530-541.	27.–	https://www.bbmt.org/article/S1083-8791(05)00266-1/fulltext [doi:10.1016/j.bbmt.2005.04.010]
42	Smatti M.K., Yassine H.M., Abu Odeh R., Al Marawani A., Taleb S.A., Althani A.A., Nasrallah G.K. Prevalence and molecular	–	https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0189033 [doi: 10.1371/journal.pone.0189033]

	profiling of Epstein Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar. PLoS One, 2017, vol. 12, no. 12: e0189033.		
43	Yap T., Khor S., Kim J.S., Kim J., Kim S.Y., Kern J.S., Martyres R., Varigos G., Chan H.T., McCullough M.J., Thomas M.L., Scardamaglia L. Intraoral human herpes viruses detectable by PCR in majority of patients. Oral Dis., 2021, vol. 27, no. 2, pp. 378–387.	28.–	https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/odi.13523 [doi: 10.1111/odi.13523]
44	Yea C., Tellier R., Chong P., Westmacott G., Marrie R.A., Bar-Or A., Banwell B.; Canadian Pediatric Demyelinating Disease	29.–	https://n.neurology.org/content/81/16/1392.long [doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a841e4]

	Network. Epstein-Barr virus in oral shedding of children with multiple sclerosis. Neurology, 2013, vol. 81, no. 16, pp. 1392–1399.		
--	--	--	--