

СЕМЕЙНЫЙ СЛУЧАЙ НАСЛЕДУЕМОЙ ХРОМОСОМНОЙ ИНТЕГРАЦИИ ВГЧ-6А С ПРОВЕДЕНИЕМ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

О. В. Голева¹✉, Л. Г. Данилов², А. В. Кусакин^{1,4}, Ю. А. Эйсмонт¹, И. В. Бабаченко¹, Н. С. Тянь¹, А. Б. Чухловин⁵, А. В. Крылов¹, О. С. Готов^{1,3,4}

¹ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д. О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

В статье рассмотрен семейный случай хромосомной интеграции ВГЧ-6А, которая является важной и актуальной темой в области генетики и медицины. Целью исследования было проверить гипотезу о хромосомной интеграции ВГЧ-6А и его вертикальной передаче у пациента с длительным обнаружением вируса во время рекуррентных респираторных заболеваний, а также в бессимптомный период, при отсутствии жалоб на здоровье. Проведено секвенирование геномной ДНК отца пациента, построено филогенетическое дерево путем выравнивания 270 геномных сборок ВГЧ-6А/В из базы данных GenBank. В результате исследования установлен семейный случай передачи хиВГЧ-6А. Показано, что обнаруженный хиВГЧ-6А, наблюдаемый на филогенетическом древе, находится в тесном контакте с двумя другими хромосомно-интегрированными последовательностями ВГЧ-6А, о которых сообщали московские исследователи. Исследование подтвердило хромосомную интеграцию ВГЧ-6А. Дальнейшее точное хромосомное картирование хиВГЧ-6А/В было бы полезно для исключения вероятных соматических заболеваний, связанных с изменением структуры хромосом при интеграции ВГЧ-6, в частности ВГЧ-6А, а также для идентификации участков инсерции, специфичных для различных географических точек.

Ключевые слова: вирус герпеса человека 6А/В (ВГЧ-6А/В), хромосомная интеграция, хиВГЧ-6А/В, унаследованный герпесвирус, филогенетика

Вклад авторов: О. В. Голева, И. В. Бабаченко, Н. С. Тянь — планирование исследования, сбор, анализ, интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; Л. Г. Данилов — проведение биоинформатического анализа, поиск аналитических материалов; А. В. Кусакин — планирование исследования, анализ литературы, сбор, анализ, интерпретация данных, проведение биоинформатического анализа, построение филогенетического древа, подготовка черновика рукописи; Ю. А. Эйсмонт, А. Б. Чухловин — планирование исследования, сбор, анализ, интерпретация данных; А. В. Крылов — сбор, анализ, интерпретация данных; О. В. Готов — курирование исследования, анализ, интерпретация данных, подготовка черновика рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России (протокол № 107 от 27 ноября 2018 г.) и выполнено согласно Хельсинкской декларации последнего пересмотра. Получено письменное информированное согласие пациентов и их законных представителей на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Владимировна Голева
ул. Профессора Попова, д. 9, г. Санкт-Петербург, 197022, Россия; golev.ao@mail.ru

Статья получена: 18.08.2023 **Статья принята к печати:** 19.09.2023 **Опубликована онлайн:** 26.10.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.043

FAMILIAL CASE OF INHERITED HUMAN HERPESVIRUS 6A WITH PHYLOGENETIC ASSESSMENT

Goleva OV¹✉, Danilov LG², Kusakin AV^{1,4}, Eismont YuA¹, Babachenko IV¹, Tian NS¹, Chukhlovina AB⁵, Krylov AV¹, Glotov OS^{1,3,4}

¹ Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases of the Federal Medical Biological Agency, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

³ Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Saint Petersburg, Russia

⁴ ITMO University, Saint Petersburg, Russia

⁵ Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

The paper reports a familial case of HHV-6A chromosomal integration being an important and relevant issue of genetics and medicine. The study was aimed to test the hypothesis of HHV-6A chromosomal integration and vertical transmission in patient with persistent virus detection during recurrent respiratory diseases and the asymptomatic period when there were no health complaints. Sequencing of the patient's father genome DNA was performed, and a phylogenetic tree was constructed by aligning 270 HHV-6A/B genome assemblies from the GenBank database. As a result, a familial case of ciHHV-6A transmission was identified. It was found that the detected ciHHV-6A observed on the phylogenetic tree was closely related to other two chromosomally integrated HHV-6A sequences reported by Moscow researchers. The study confirmed HHV-6A chromosomal integration. Further precise chromosome mapping of ciHHV-6A would be useful in terms of excluding probable somatic disorders associated with the chromosome structure alteration following HHV-6, particularly HHV-6A, integration, as well as for identification of insertion sites specific for various geographic locations.

Keywords: human herpesvirus 6A/B (HHV-6A/B), chromosomal integration, ciHHV-6A/B, inherited herpesvirus, phylogenetics

Author contribution: Goleva OV, Babachenko IV, Tian NS — study planning, data acquisition, analysis and interpretation, manuscript draft; Danilov LG — bioinformatics analysis, search for analytical papers; Kusakin AV — study planning, literature review, data acquisition, analysis and interpretation, bioinformatics analysis, constructing a phylogenetic tree, manuscript draft; Eismont YuA, Chukhlovina AB — study planning, data acquisition, analysis and interpretation; Krylov AV — data acquisition, analysis and interpretation; Glotov OS — research supervision, data analysis and interpretation, manuscript draft.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases of FMBA of Russia (protocol № 107 dated November 27, 2018) and conducted in accordance with the latest edition of the Declaration of Helsinki. Patients and their legal representatives submitted the informed consent to the study participation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga V. Goleva
Professor Popov, 9, Saint Petersburg, 197022, Russia; golev.ao@mail.ru

Received: 18.08.2023 **Accepted:** 19.09.2023 **Published online:** 26.10.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.043

Бетагерпесвирус человека 6A/B (ВГЧ-6A/B) широко распространен в человеческой популяции. В 1986 г. группа ученых из лаборатории Национального института онкологии (США) выделила вирус у больных с лимфопрролиферативными заболеваниями, определив его как В-лимфотропный человеческий вирус, однако позже были установлены его сродство к Т-лимфоцитам и принадлежность к семейству *Herpesviridae*, подсемейство *Betaherpesvirinae*, род *Roseolovirus* [1]. Передача вируса осуществляется преимущественно контактно-бытовым путем со слюной, реже воздушно-капельным, половым путем и при трансплантации органов. Основной клеткой-мишенью вируса является CD4⁺ Т-лимфоцит. ВГЧ-6 проникает в клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, после чего происходит репликация вируса. После первичной инфекции вирусная ДНК сохраняется в мононуклеарных клетках периферической крови [2, 3]. ВГЧ-6A/B может быть триггером иммуносупрессивных и хронических аутоиммунных процессов [4].

В 2012 г. Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) ратифицировал разделение ВГЧ-6 на два самостоятельных таксономических варианта — ВГЧ-6A и ВГЧ-6B [5, 6]. Несмотря на то что геномы этих вирусов гомологичны на 90%, они различаются фенотипически, тропны к разным клеточным рецепторам и в большинстве случаев имеют разные клинические проявления [7]. ВГЧ-6A является менее изученным вирусом, его приобретают в более позднем возрасте и чаще выявляют у иммунокомпрометированных лиц. Предполагают, что этот вирус ассоциирован с таким нейрогенеративным заболеванием, как болезнь Альцгеймера [3, 8]. ВГЧ-6B распространен повсеместно, более 90% населения инфицируются им в течение первых трех лет жизни, а реактивация может произойти в любом возрасте [3]. Вирусы имеют различную тропность к иммунокомпетентным клеткам. Так, для проникновения в клетку ВГЧ-6A использует рецепторы CD46 и способен поражать Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты и натуральные киллеры, ВГЧ-6B, напротив, использует CD134-рецепторы и не способен персистировать в цитотоксических Т-лимфоцитах [9, 10].

Геном ВГЧ-6A и В состоит из двухцепочечной ДНК средней длины около 160 кб. Примечательно, что геном ВГЧ-6A короче генома ВГЧ-6B, он составляет приблизительно 159 кб против 162 кб соответственно [11]. Большинство генов расположены в уникальном сегменте, который фланкирован последовательностями прямых повторов (ПП). В свою очередь, ПП окружены *pac1* и *pac2*, которые являются цис-действующими сигналами для упаковки вируса [11, 12]. Число открытых рамок считывания (ОРС) зависит от типа вируса (A/B) и метода детекции. На основе последовательности ранее были предсказаны около 115–119 ОРС [11, 13], но, используя современные методы *Ribo-seq* и *RNA-seq*, ученые [8] смогли обнаружить 268 новых ОРС в ВГЧ-6A и 216 — ВГЧ-6B. Сходство нуклеотидных последовательностей между ВГЧ-6A и ВГЧ-6B в среднем составляет 90%. Наиболее консервативными генами являются *U39* и *U48*, которые кодируют гликопротеины оболочки *gB* и *gH* соответственно. Их нуклеотидные последовательности совпадают на 94%, а аминокислотные последовательности — на 96% [11, 14]. При этом наиболее изменчивые гены расположены ближе к концам генома, они в основном кодируют белки, которые предположительно участвуют в иммуномодуляции, сигнализации (хемотаксис) и проникновении вирусов [12].

Преимущественным методом диагностики ВГЧ-6A/B считается полимеразная цепная реакция (ПЦР), однако на сегодняшний день нет четко установленной границы между определением латентной и активной вирусной инфекции по ее результатам. Отсутствие ДНК ВГЧ-6A/B в плазме или сыворотке крови не означает, что в тканях (например, в сердце, щитовидной железе, головном мозге) нет персистирующих вирусов в низкой концентрации. Диагностическое значение также имеет выявление специфических антител класса IgM и IgG в сыворотке крови [16]. Исследователями [17] предложены тест-системы, учитывающие разные рамки считывания для ВГЧ-6A (*U11*, *p100*) и ВГЧ-6B (*101K*).

Способность ВГЧ-6 интегрироваться в субтеломерную область клеточной хромосомы была обнаружена в 1993 г. [18]. К настоящему времени известно, что интеграция вируса чаще происходит в теломерных участках хромосом 1q, 6q, 9q, 10q, 11p, 17p, 18p, 19q, 22q, Xp, однако механизмы до конца не изучены [19–23]. При встраивании ВГЧ-6 в геном половых клеток возможна передача вируса следующим поколениям с образованием унаследованной хромосомно-интегрированной формы ВГЧ-6A/B (унаследованный хиВГЧ-6A/B) в соответствии с законами Менделя [24]. ХиВГЧ-6A/B также может передаваться при трансплантации клеток, органов и тканей. Распространенность хиВГЧ-6A/B варьирует от 0,2% в Японии и 0,6% в Канаде до 1–3% в Европе и зависит от географических факторов и анализируемой популяции пациентов [25, 26].

Описаны случаи реактивации ВГЧ-6A/B из интегрированного состояния на фоне иммунодефицитных состояний, беременности с развитием клинически манифестных форм [2, 27, 28]. Во время беременности реактивация вируса из хромосомно-интегрированного состояния может приводить к возрастанию риска самопроизвольных абортов [29]. Британское исследование, проведенное в 2020 г., показало, что у женщин с инфицированными хиВГЧ-6A/B плодами в 2,5–3 раза повышен риск преэклампсии [30]. Биологические и медицинские последствия хромосомной интеграции ВГЧ-6A и ВГЧ-6B в настоящее время изучаются. Так, например, теломеры, связанные с эндогенным ВГЧ-6A/B, зачастую склонны к внезапным делециям, которые приводят к их укорочению. В результате наблюдается преждевременное старение клеток и нарушение тканевого гомеостаза [31–33]. Нестабильность генома может быть причиной развития онкологических заболеваний.

Целью работы было проверить гипотезу о хромосомной интеграции ВГЧ-6A и его вертикальной передаче у пациента с длительным обнаружением вируса во время рекуррентных респираторных заболеваний, а также в бессимптомный период, при отсутствии жалоб на здоровье.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования стали пять членов семьи — мать (36 лет), отец (39 лет), трое сыновей (4 года, 6 лет, 14 лет). Семья проживает в г. Кириши Ленинградской области.

Выделение нуклеиновых кислот и выявление ВГЧ-6A/B

При проведении исследования отбирали назофарингеальные мазки и венозную кровь для молекулярно-генетических исследований и иммуноферментного анализа. Для выявления в назофарингеальных мазках специфических фрагментов нуклеиновых кислот (НК) гриппа А, В, респираторно-синцитиального вируса, вирусов парагриппа 1–4 типов,

сезонных коронавирусов, метапневмовируса, риновирусов, а также ДНК аденовирусов групп В, С, Е и бокавирусов использовали реагенты «АмплиСенс Influenzavirus A/B-FL» и «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора; Россия) для мультиплексной ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Выявление ДНК вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), ВГЧ-6А/В и цитомегаловируса (ЦМВ) в крови и мазках слизистой ротоглотки проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени (РВ-ПЦР) с использованием набора «АмплиСенс EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора; Россия). Определение вирусной нагрузки ВГЧ-6А/В в исследуемых биоматериалах регистрировалось в диапазоне 22–38 циклов амплификации (Ct) и выражалось в геном-эквиваленте в 1 мл нативного образца после преаналитической обработки (ГЭ/мл). Диагностически значимыми были результаты в диапазоне 35 циклов (10^3 – 10^4 ГЭ/мл). Для выделения ДНК использовали венозную кровь, помещенную в пробирки К2-ЭДТА для взятия образцов крови. Соскоб со слизистой ротоглотки помещали в «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» («ИЛС»; Россия). ДНК из венозной крови выделяли на автоматической станции для очистки нуклеиновых кислот MagNa Pure (Roche; Швейцария) с использованием стандартного метода прободготовки. Очистку материала из мазка слизистой ротоглотки проводили с помощью набора для выделения «РеалБест экстракция 100» («Вектор-Бест»; Россия). Подготовка образцов, их выделение были выполнены согласно инструкциям производителей. Контроль выделения осуществляли на спектрофотометре NanoStar (BMG; Германия); количественную оценку выделенного материала проводили на флуориметре Quantus (Promega; США).

Для проверки наличия и качества ДНК в выделенном образце использовали стандартный клеточный ген GAPDH [34]. Амплификацию проводили на амплификаторе CFX-96 (BioRad; США) с помощью набора «Готовая смесь для ПЦР qPCRmix-HS» («Евроген»; Россия).

Выявление антител классов IgM и IgG к перечисленным герпесвирусам выполняли в рамках стандартного лабораторного обследования методом качественного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов «ВектоВЭБ-VCA-IgM/G» и «ВектоЦМВ-IgM/G» («Вектор-Бест»; Россия) и полуколичественного ИФА с использованием коммерческих наборов «HHV-6-IgM/G-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест»; Россия) на аппарате открытого типа «Lasurit» (Dy nex Technologies Inc.; США). Результат представлен коэффициентом позитивности (КП), выраженным в условных единицах (у.е.) согласно инструкции изготовителя тест-системы.

В качестве дополнительного материала использовали образец спермы, полученной от отца семейства. С помощью среды для выделения жизнеспособных сперматозоидов SupraSperm System (ORIGIO; США) методом центрифугирования в градиенте плотности были получены сперматозоиды. Выделение ДНК из сперматозоидов выполняли путем экстракции ДНК фенол-хлороформом. Оценка качества полученной ДНК выполняли с помощью прибора 4200 TapeStation System и набора Genomic DNA ScreenTape (Agilent Technologies; США), концентрацию измеряли на флуориметре QuantiFluor dsDNA System (Promega; США).

Прочие лабораторные исследования

В дополнение к стандартным диагностическим исследованиям проводили дифференциацию вариантов

ВГЧ-6А/В с использованием праймеров, описанных [34]. Праймеры проверили на выравнивание с эталонными последовательностями ВГЧ-6 с помощью программы BLAST (NCBI; США):

ВГЧ6 A/B FP: 5'-GACAATCACATGCCTGGATAATG-3';
 ВГЧ-6A RP, 5'-TGGTAATGTAATTGTGTGTTGTTTA-3';
 ВГЧ-6B RP, 5'-TGGTAATGTAAGTGTGCGTTATTTTC-3';
 ВГЧ6 probe, 5'-FAM-AGCAGCTGGCGAAAGCTGTGC-TAMRA-3'.

Подготовка NGS библиотек

Библиотеки для секвенирования были подготовлены для двух приборов с целью получения длинных и коротких прочтений. Длинные прочтения получали с помощью прибора MinION (Oxford Nanopore Technologies; Великобритания). Библиотеки готовили согласно протоколу для полногеномного секвенирования с использованием набора реагентов для подготовки образцов SQK-LSK109 (Oxford Nanopore Technologies; Великобритания) и модуля NEBNext (New England Biolabs Inc.; США) для подготовки библиотек Oxford Nanopore Technologies (NEBNext). Короткие прочтения получали в ходе секвенирования на приборе MGISEQ 2000 (MGI Tech Co.; Китай). Подготовку библиотек выполняли согласно руководству [35].

Оценку качества полученных библиотек выполняли при помощи наборов D1000 ScreenTape и High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent Technologies; США), концентрацию измеряли на флуориметре Quantus с использованием набора QuantiFluor dsDNA System (Promega; США).

Секвенирование ДНК

Для полногеномного секвенирования на приборе MinION использовали проточную ячейку для нанопорового секвенирования R10 (FLO-MIN111) (Agilent Technologies; США).

Полногеномное секвенирование на приборе MGISEQ 2000 было выполнено с помощью комплекта расходных материалов и реагентов DNBSEQ-G400 CoolMPS High-throughput Sequencing Set (PE100, 320 G) (MGI Tech Co.; Китай). Для полногеномного секвенирования была выделена одна дорожка.

Сборка генома

Данные, полученные с платформы Nanopore, использовали для сборки вирусного генома. Сборка генома была выполнена с использованием пользовательского конвейера: связанные с герпесвирусом прочтения извлекли с помощью программы Cookiecutter [36], используя в качестве референса московский штамм (GenBank ID: MK630134, MK630133) [37], так как он характеризуется большой глубиной покрытия (500x). Далее в исследовании использовали только участок гена gB (U39), который в этих последовательностях собран полностью. Прочтения были собраны с помощью программы SPAdes [38], собранные контиги скомпонованы вручную посредством поиска полной референсной последовательности в BLAST [39].

Филогенетический анализ

Нуклеотидная последовательность гена ВГЧ-6А glycoprotein В (gB, U39) (Gene ID: 1487917) была использована для филогенетического анализа. В анализ были включены все доступные последовательности из 270 сборок вирусов

Таблица 1. Лабораторные маркеры герпесвирусных инфекций при поступлении в стационар

Биоматериал	Маркеры герпесвирусной инфекции	Результаты обследования пациентов	
		С.Т., 4 года	С.А., 6 лет
Кровь	ДНК ВЭБ IgG (VCA) ВЭБ	Положительно Положительно	Положительно Положительно
Кровь	ДНК ВГЧ-6А	Отрицательно	105*
Соскоб с ротоглотки	ДНК ВГЧ-6А	Отрицательно	104*
Кровь	ДНК ВГЧ-6В	103*	Отрицательно
Соскоб с ротоглотки	ДНК ВГЧ-6В	104*	Отрицательно
Кровь	IgG ВГЧ-6	Отрицательно	6,9**

Примечания: * — ГЭ/мл; ** — у. е.

герпеса (как 6А, так и 6В), имеющих в базе данных GenBank. Для выравнивания последовательностей использовали алгоритм MAFFT v7.505 с моделью замещения параметров Кимуры – 1 [40]. Затем полученные выравнивания были упорядочены для построения дерева с помощью метода Neighbor-Joining (Jukes-Cantor, Bootstrap resampling = 100) [41].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В декабре 2018 г. ребенок С. А., 6 лет, вместе с братом С. Т., 4 года, поступили в Детский научно-клинический центр инфекционных болезней с первичным диагнозом «острый ринофарингит, тонзиллит, средней степени тяжести». В мазках со слизистой ротоглотки методом ПЦР не были обнаружены маркеры респираторных вирусов, а также бактериологическим методом не были выявлены бактериальные возбудители. Учитывая положительные результаты ПЦР-анализа на герпесвирусы, диагноз был уточнен как «герпесвирусная инфекция сочетанной этиологии (ВГЧ-6 + ВЭБ), острый ринофарингитотонзиллит, средней степени тяжести». В периферической крови обоих пациентов была обнаружена ДНК ВГЧ-6А/В и ВЭБ. Положительные тесты на ДНК ВЭБ в клетках крови, наряду с поздними IgG к капсидному антигену (VCA) ВЭБ в сыворотке крови, доказали реактивацию вируса. Данные лабораторных анализов, представленные в табл. 1, были получены при обследовании в первые дни после поступления детей в стационар.

Маркеры ЦМВ (ДНК, IgM, IgG) у пациентов обнаружены не были. Между тем, генотипирование ВГЧ-6 в крови и мазках из ротоглотки подтвердило наличие варианта ВГЧ-6А у С. А. и ВГЧ-6В в диагностически значимых концентрациях у его брата С. Т. При этом у С. Т. антитела к ВГЧ-6А/В в сыворотке крови отсутствовали, что могло быть связано с ранним периодом острой вирусной инфекции, до начала синтеза антител, или с их низкой

концентрацией, находившейся за пределами аналитической чувствительности используемой диагностической тест-системы, тогда как у 6-летнего пациента выявлены высокие концентрации IgG к ВГЧ-6А/В (6,9 у.е.), что может указывать на большую длительность течения инфекции.

Повторное обследование этих пациентов было проведено во время контрольного визита 14 августа 2019 г. (табл. 2).

При обследовании обоих пациентов через восемь месяцев ДНК ВЭБ в крови не обнаружили. Антитела класса IgG к ВГЧ-6А/В в крови определяли в диагностических концентрациях, однако у ребенка С.А. в крови и соскобе из ротоглотки регистрировали в динамике сохранение вирусной нагрузки ВГЧ-6А, в то время как у ребенка С. Т. ДНК ВГЧ-6В ни в крови, ни в соскобе обнаружен не был. Оба ребенка на момент повторного обследования были клинически здоровы. Факт постоянного выделения ВГЧ-6А из крови и соскоба ротоглотки у наблюдаемого 6-летнего пациента мог быть связан с интеграцией генома вируса в ДНК человеческих клеток, что требовало дальнейшего подтверждения.

Чтобы доказать хромосомную интеграцию ВГЧ-6А, на обследование пригласили родителей (мать, 36 лет, отца, 39 лет) и старшего брата наблюдаемых пациентов (С. А., 14 лет), не предъявлявших жалоб на состояние здоровья на момент проведения скрининговых тестов (табл. 3).

Таким образом, мы обнаружили, что клинически бессимптомные отец и старший брат пациента также характеризовались высокой вирусной нагрузкой ВГЧ-6А в крови и мазках из ротоглотки в диагностически значимых концентрациях. При этом ДНК ВГЧ-6А и ВГЧ-6В не были обнаружены в биоматериале матери. В связи с обнаружением одинаково высокого содержания ДНК ВГЧ-6А в биопробах двух старших братьев и отца мы заподозрили наследственную передачу хВГЧ-6А от отца к детям. Из-за технической невозможности выполнения исследований волосных фолликулов, ногтевых пластин

Таблица 2. Лабораторные маркеры герпесвирусных инфекций при повторном обследовании через восемь месяцев

Биоматериал	Маркеры герпесвирусной инфекции	Результаты обследования пациентов	
		С.Т., 4 года	С.А., 6 лет
Кровь	ДНК ВЭБ	Отрицательно	Отрицательно
Кровь	ДНК ВГЧ-6А	Отрицательно	106*
Соскоб с ротоглотки	ДНК ВГЧ-6А	Отрицательно	104*
Кровь	ДНК ВГЧ-6В	Отрицательно	Отрицательно
Соскоб с ротоглотки	ДНК ВГЧ-6В	Отрицательно	Отрицательно
Кровь	IgG ВГЧ-6	5,4**	6,1**

Примечания: * — ГЭ/мл; ** — у. е.

Таблица 3. Лабораторные маркеры герпесвирусной инфекции у других членов семьи

Биоматериал	Маркеры герпесвирусной инфекции	Результаты обследования пациентов		
		С. А., 14 лет	Мать, 36 лет	Отец, 39 лет
Кровь	ДНК ВГЧ-6А	106*	Отрицательно	106*
Соскоб с ротоглотки	ДНК ВГЧ-6А	104*	Отрицательно	105*
Семенная жидкость	ДНК ВГЧ-6А	–	–	106*
Кровь	ДНК ВГЧ-6В	Отрицательно	Отрицательно	Отрицательно
Соскоб с ротоглотки	ДНК ВГЧ-6В	Отрицательно	Отрицательно	Отрицательно

Примечания: * — ГЭ/мл.

для получения ответа на вопрос о возможной вертикальной передаче хВГЧ-6А было решено получить биоматериал от родителя, отличный от крови, в котором отсутствовали бы лейкоциты и цитоплазматическая ДНК, то есть сперму, как в исследовании [42]. ДНК сперматозоидов подвергали РВ-ПЦР, отделяли от остального эякулята, после чего выделяли ДНК. После этого была выявлена нагрузка ВГЧ-6А в 106 ГЭ/мл, что эквивалентно концентрации вируса в других биоматериалах. Это также подтверждает факт хромосомной интеграции.

Впоследствии мы попытались собрать геном этого изолята ВГЧ-6А. Для подтверждения хромосомной интеграции ВГЧ-6А и проведения филогенетического анализа был секвенирован геном ВГЧ-6А с получением коротких и длинных прочтений областей вирусных генов.

Структура генома и положение на филогенетическом древе

Мы получили сборку генома ВГЧ-6А, однако покрытие прочтений не превышало 3–4 прочтения на каждый нуклеотид, поэтому сборку генома для отдельных генов проводили вручную.

Для определения филогенетического положения нового изолята вируса мы выбрали ген gB, который традиционно используют для сравнения филогенетических деревьев вируса герпеса [43]. Для этого сходные последовательности этого гена искали среди родственных геномных сборок с помощью программы локального выравнивания BLAST, а затем на основе полученных результатов проводили ручную сборку. Для анализа филогенетической идентичности были использованы последовательности из 270 геномных сборок вируса герпеса. Согласно филогении, построенной для гена gB, полученный штамм вируса оказался очень похожим на два штамма, представленные московской группой (GenBank ID: MK630134, MK630133) (рис.). Важной особенностью этих штаммов является то, что они интегрированы в геном человека. Этот вывод может подтвердить наши результаты, которые свидетельствуют об интеграции нового описанного штамма в геном хозяина.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первый случай интеграции ВГЧ-6А/В в хромосому был описан еще в первой половине 90-х годов. После этого вирус неоднократно обнаруживали в ряде человеческих хромосом: 1q, 6q, 9q, 10q, 11p, 17p, 18p, 19q, 22q и Xp [19–23]. Отмечают, что интеграция свойственна как ВГЧ-6А, так и ВГЧ-6В, она наблюдается в теломерных участках хромосомы. В работе [43] показано, что интегрированный ВГЧ-6А существует в неактивном состоянии до конца жизни человека. Интегрированный вирус может реактивироваться

под воздействием различных факторов, что более характерно для ВГЧ-6В, и запустить инфекционный процесс. Показано, что хВГЧ-6А/В разбивается на клады, характеризующиеся определенными хромосомой и локусом, в которые встраивается вирус.

В ходе выполнения исследования мы столкнулись со случаем длительного выявления ДНК ВГЧ-6А в биоматериале (венозная кровь и назофарингеальный мазок) пациента, проводя исследования как при первичном поступлении в стационар, так и повторно, через восемь месяцев, в период отсутствия жалоб на состояние здоровья. При этом вирусная нагрузка в венозной крови и назофарингеальном мазке оставалась высокой (10^5 – 10^6 ГЭ/мл и 10^4 ГЭ/мл соответственно). На основе полученных данных была заподозрена хромосомная интеграция ВГЧ-6А. Последующее клиническое и лабораторное обследование остальных членов семьи позволило выявить сопоставимые высокие значения вирусной нагрузки в аналогичных биоматериалах как старшего брата, так и отца пациента. Кроме того, у отца ВГЧ-6А был обнаружен в половых клетках. Таким образом, была выдвинута гипотеза, что вирус мог не только интегрирован в хромосому, но и передан наблюдаемому ребенку по наследству по отцовской линии.

Для уточнения происхождения ВГЧ-6А, обнаруженного в половых клетках отца, был проведен филогенетический анализ на основе последовательности гена gB, кодирующего один из гликопротеинов оболочки вируса. Установлено, что исследуемый ВГЧ-6А находится в близком родстве с двумя собранными последовательностями хВГЧ-6А, выделенного группой исследователей [37] в Москве в 2017 г. (GenBank ID: MK630134, MK630133). Полученные данные подтвердили родство исследованного нами вируса с другими хВГЧ-6А, включенными в базу данных GenBank.

ВЫВОДЫ

Актуальным направлением дальнейших исследований может стать определение точного расположения хВГЧ-6А в локусе хромосомы методом FISH для исключения возможного развития соматических патологий, вызванных нарушением структуры хромосомы при встраивании в нее ВГЧ-6А, с течением времени, а также для установления закономерности встраивания в зависимости от географического местоположения выявляемых случаев. Дальнейшие исследования также позволят принять или опровергнуть выдвинутую ранее гипотезу соответствия последовательности вирусного генома месту встраивания в хромосому человека, что поможет избежать использования дорогостоящего и трудозатратного метода FISH и адаптировать исследования для клинической практики.

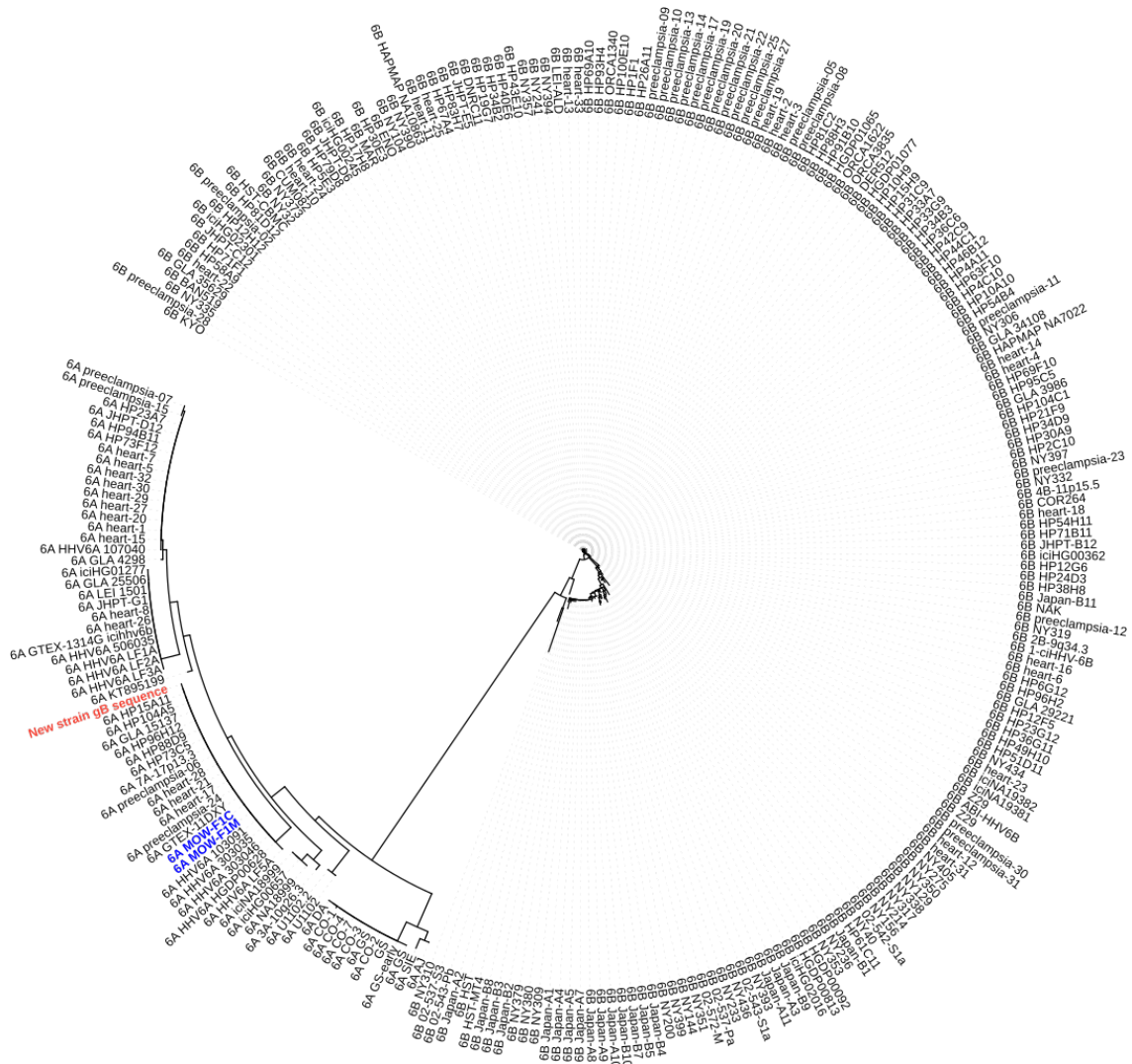


Рис. Филогенетическое положение нового штамма вируса герпеса 6 типа по отношению к другим штаммам герпеса на основе гена gB: положение нового вируса выделено на дереве красным, два штамма вируса из Москвы отмечены синим

Литература

1. Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, Kaplan M, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 1986; 234 (4776): 596–601. DOI: 10.1126/science.2876520.
2. Eliassen E, Krueger G, Luppi M, Ablashi D. Lymphoproliferative syndromes associated with human herpesvirus-6a and human herpesvirus-6b. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2018;10 (1): e2018035. DOI: 10.4084/MJHID.2018.035.
3. King O, Al Khalili Y. Herpes Virus Type 6. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540998/>.
4. Broccolo F, Fusetti L, Ceccherini-Nelli L. Possible role of human herpesvirus 6 as a trigger of autoimmune disease. *Scientific World Journal*. 2013; (2013): 867389. DOI: 10.1155/2013/867389.
5. Adams MJ, Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012). *Arch Virol*. 2012; 157 (7): 1411–22. DOI:10.1007/s00705-012-1299-6.
6. International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV [Internet]. 2023 [cited 2023 Sep 13]. Available from: <https://ictv.global/vmr>.
7. Eliassen E, Hemond CC, Santoro JD. HHV-6-associated neurological disease in children: epidemiologic, clinical, diagnostic, and treatment considerations. *Pediatr Neurol*. 2020; (105): 10–20. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2019.10.004.
8. Finkel Y, Schmiel D, Tai-Schmiel J, Nachshon A, Winkler R, Dobesova M, et al. Comprehensive annotations of human herpesvirus 6A and 6B genomes reveal novel and conserved genomic features. *Elife*. 2020; (9): e50960. DOI: 10.7554/eLife.50960.
9. Mori Y. Recent topics related to human herpesvirus 6 cell tropism. *Cellular microbiology*. 2009; (11): 1001–6. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01312.x.
10. Tang H, Serada S, Kawabata A, Ota M, Hayashi E, Naka T, et al. CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110 (22): 9096–9. DOI: 10.1073/pnas.1305187110.
11. Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol*. 1999; 73 (10): 8040–52. DOI: 10.1128/JVI.73.10.8040-8052.1999.
12. Gompels UA, Kasolo FC. HHV-6 Genome: similar and different. In: Kreuger G, Ablashi DV, editors. *Human Herpesvirus-6*. London: Elsevier; 2006. pp. 23–46.

13. Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol.* 1999; 73 (10): 8053–63. DOI: 10.1128/JVI.73.10.8053-8063.1999.
14. Achour A, Malet I, Le Gal F, Dehée A, Gautheret-Dejean A, Bonnafous P, et al. Variability of gB and gH genes of human herpesvirus-6 among clinical specimens. *J Med Virol.* 2008; 80 (7): 1211–21. DOI: 10.1002/jmv.21205.
15. HHV-6 Foundation [Internet]. HHV-6A/B Testing [cited 2022 March 16]. Available from: <https://hhv-6foundation.org/patients/hhv-6-testing-for-patients>.
16. Agut H, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28 (2): 313–35. DOI: 10.1128/CMR.00122-14.
17. Higashimoto Y, Ohta A, Nishiyama Y, Ihira M, Sugata K, Asano Y, et al. Development of a human herpesvirus 6 species-specific immunoblotting assay. *J Clin Microbiol.* 2012; 50 (4): 1245–51. DOI: 10.1128/JCM.05834-11.
18. Luppi M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari S, Ceccherini-Nelli L, Batoni G, et al. Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J Med Virol.* 1993; 40 (1): 44–52. DOI: 10.1002/jmv.1890400110.
19. Daibata M., Taguchi T, Nemoto Y, et al. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood.* 1999; (94): 1545–9. DOI: 10.1182/blood.V94.5.1545.
20. Nacheva EP, Ward KN, Brazma D, et al. Human herpesvirus 6 integrates within telomeric regions as evidenced by five different chromosomal sites. *J Med Virol.* 2008; (80): 1952–8. DOI: 10.1002/jmv.21299.
21. Clark DA, Nacheva EP, Leong HN, Brazma D, Li YT, Tsao EH, et al. Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: implications for laboratory diagnosis. *J Infect Dis.* 2006; 193 (7): 912–6. DOI: 10.1086/500838.
22. Hubacek P, Virgili A, Ward KN, Pohlreich D, Keslova P, Goldova B, et al. HHV-6 DNA throughout the tissues of two stem cell transplant patients with chromosomally integrated HHV-6 and fatal CMV pneumonitis. *Br J Haematol.* 2009; 145 (3): 394–8. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07622.x
23. Ohye T, Kawamura Y, Inagaki H, Yoshikawa A, Ihira M, Yoshikawa T, et al. A simple cytogenetic method to detect chromosomally integrated human herpesvirus-6. *J Virol Methods.* 2016; (228): 74–8. DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.11.001.
24. Мелехина Е. В., Домонова Э. А., Гоптарь И. А., Шигулина О. Ю., Горелов А. В. Первый в России случай наследственной передачи хромосомно-интегрированного вируса герпеса человека 6В (Human betaherpesvirus 6В). Вопросы практической педиатрии. 2019; 14 (1): 33–40. DOI: 10.20953/1817-7646-2019-1-33-40.
25. Greninger AL, Naccache SN, Pannaraj P, Jerome KR, Dien Bard J, Ruderman JW. The brief case: inherited chromosomally integrated human herpesvirus-6 (HHV-6) in the age of multiplex HHV-6 testing. *J Clin Microbiol.* 2019; 57 (10): e02016–18. DOI: 10.1128/JCM.02016-18.
26. Clark DA. Clinical and laboratory features of human herpesvirus 6 chromosomal integration. *Clin Microbiol Infect.* 2016; 22 (4): 333–9. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.12.022.
27. Prusty BK, Krohne G, Rudel T. Reactivation of chromosomally integrated human herpesvirus-6 by telomeric circle formation. *PLoS Genet.* 2013; 9 (12): e1004033. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004033.
28. Endo A, Watanabe K, Ohye T, Suzuki K, Matsubara T, Shimizu N, et al. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated human herpesvirus 6A in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency. *Clin Infect Dis.* 2014; 59 (4): 545–8. DOI: 10.1093/cid/ciu323.
29. Miura H, Kawamura Y, Ohye T, Hattori F, Kozawa K, Ihira M, et al. Inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6 is a risk factor for spontaneous abortion. *J Infect Dis.* 2021; 223 (10): 1717–23. DOI: 10.1093/infdis/jiaa606.
30. Gaccioli F, Lager S, de Goffau MC, Sovio U, Dopierala J, Gong S, et al. Fetal inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 predisposes the mother to pre-eclampsia. *Nat Microbiol.* 2020; 5 (7): 901–8. DOI: 10.1038/s41564-020-0711-3.
31. Kumata R, Ito J, Sato K. Inherited chromosomally integrated HHV-6 possibly modulates human gene expression. *Virus Genes.* 2020; 56 (3): 386–9. DOI: 10.1007/s11262-020-01745-5.
32. Kaufner BB, Flamand L. Chromosomally integrated HHV-6: impact on virus, cell and organismal biology. *Curr Opin Virol.* 2014; (9): 111–8. DOI: 10.1016/j.coviro.2014.09.010.
33. Huang Y, Hidalgo-Bravo A, Zhang E, Cotton VE, Mendez-Bermudez A, Wig G, et al. Human telomeres that carry an integrated copy of human herpesvirus 6 are often short and unstable, facilitating release of the viral genome from the chromosome. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42 (1): 315–27. DOI: 10.1093/nar/gkt840.
34. Gravel A, Sinnett D, Flamand L. Frequency of chromosomally-integrated human herpesvirus 6 in children with acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One.* 2013; 8 (12): e84322. DOI: 10.1371/journal.pone.0084322.
35. MGI Documents [Internet]. Available from: https://en.mgi-tech.com/download/files/hao_id/1/type_id/1/p/1.
36. Starostina E, Tamazian G, Dobrynin, P, O'Brien S, Komissarov A. Cookiecutter: a tool for kmer-based read filtering and extraction. *BioRxiv.* 2015: 024679. DOI: 10.1101/024679.
37. Домонова Э. А., Сильвейстрова О. Ю., Гоптарь И. А., Кулешов К. В., Пасхина И. Н., Никифорова А. В. и др. Первый случай выявления и лабораторного подтверждения наследственной передачи хромосомно-интегрированного Human betaherpesvirus 6A в Российской Федерации. *Инфекционные болезни.* 2019; 17 (3): 5–14.
38. Pribelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A. Using SPAdes de novo assembler. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2020; 70 (1): e102. DOI: 10.1002/cpbi.102.
39. Madden T. The BLAST sequence analysis tool. National Centre for Biotechnology Information. Bethesda, 2003. 15 p.
40. Rozewicki J, Li S, Amada KM, Standley DM, Katoh K. MAFFT-DASH: integrated protein sequence and structural alignment. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47 (W1): W5–W10. DOI: 10.1093/nar/gkz342.
41. Robinson O, Dylus D, Dessimoz C. Phylo.io: Interactive viewing and comparison of large phylogenetic trees on the web. *Mol Biol Evol.* 2016; 33 (8): 2163–6. DOI: 10.1093/molbev/msw080.
42. Godet AN, Soignon G, Koubi H, Bonnafous P, Agut H, Poirot C, et al. Presence of HHV-6 genome in spermatozoa in a context of couples with low fertility: what type of infection? *Andrologia.* 2015; 47 (5): 531–5.
43. Aswad A, Aimola G, Wight D, et al. Evolutionary history of endogenous human herpesvirus 6 reflects human migration out of Africa. *Mol Biol Evol.* 2021; (38): 96–107. DOI: 10.1093/molbev/msaa190.

References

1. Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, Kaplan M, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science.* 1986; 234 (4776): 596–601. DOI: 10.1126/science.2876520.
2. Eliassen E, Krueger G, Luppi M, Ablashi D. Lymphoproliferative syndromes associated with human herpesvirus-6a and human herpesvirus-6b. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2018;10 (1): e2018035. DOI: 10.4084/MJHID.2018.035.
3. King O, Al Khalili Y. Herpes Virus Type 6. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540998/>.
4. Broccolo F, Fusetti L, Ceccherini-Nelli L. Possible role of human herpesvirus 6 as a trigger of autoimmune disease. *Scientific World Journal.* 2013; (2013): 867389. DOI: 10.1155/2013/867389.
5. Adams MJ, Carstens EB. Ratification vote on taxonomic

- proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012). *Arch Virol.* 2012; 157 (7): 1411–22. DOI:10.1007/s00705-012-1299-6.
6. International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV [Internet]. 2023 [cited 2023 Sep 13]. Available from: <https://ictv.global/vmr>.
 7. Eliassen E, Hemond CC, Santoro JD. HHV-6-associated neurological disease in children: epidemiologic, clinical, diagnostic, and treatment considerations. *Pediatr Neurol.* 2020; (105): 10–20. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2019.10.004.
 8. Finkel Y, Schmiedel D, Tai-Schmiedel J, Nachshon A, Winkler R, Dobesova M, et al. Comprehensive annotations of human herpesvirus 6A and 6B genomes reveal novel and conserved genomic features. *Elife.* 2020; (9): e50960. DOI: 10.7554/eLife.50960.
 9. Mori Y. Recent topics related to human herpesvirus 6 cell tropism. *Cellular microbiology.* 2009; (11): 1001–6. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01312.x.
 10. Tang H, Serada S, Kawabata A, Ota M, Hayashi E, Naka T, et al. CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110 (22): 9096–9. DOI: 10.1073/pnas.1305187110.
 11. Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol.* 1999; 73 (10): 8040–52. DOI: 10.1128/JVI.73.10.8040-8052.1999.
 12. Gompels UA, Kasolo FC. HHV-6 Genome: similar and different. In: Kreuger G, Ablashi DV, editors. *Human Herpesvirus-6*. London: Elsevier; 2006. pp. 23–46.
 13. Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol.* 1999; 73 (10): 8053–63. DOI: 10.1128/JVI.73.10.8053-8063.1999.
 14. Achour A, Malet I, Le Gal F, Dehée A, Gautheret-Dejean A, Bonnafous P, et al. Variability of gB and gH genes of human herpesvirus-6 among clinical specimens. *J Med Virol.* 2008; 80 (7): 1211–21. DOI: 10.1002/jmv.21205.
 15. HHV-6 Foundation [Internet]. HHV-6A/B Testing [cited 2022 March 16]. Available from: <https://hhv-6foundation.org/patients/hhv-6-testing-for-patients>.
 16. Agut H, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28 (2): 313–35. DOI: 10.1128/CMR.00122-14.
 17. Higashimoto Y, Ohta A, Nishiyama Y, Ihira M, Sugata K, Asano Y, et al. Development of a human herpesvirus 6 species-specific immunoblotting assay. *J Clin Microbiol.* 2012; 50 (4): 1245–51. DOI: 10.1128/JCM.05834-11.
 18. Luppi M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari S, Ceccherini-Nelli L, Batoni G, et al. Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J Med Virol.* 1993; 40 (1): 44–52. DOI: 10.1002/jmv.1890400110.
 19. Daibata M., Taguchi T, Nemoto Y, et al. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood.* 1999; (94): 1545–9. DOI: 10.1182/blood.V94.5.1545.
 20. Nacheva EP, Ward KN, Brazma D, et al. Human herpesvirus 6 integrates within telomeric regions as evidenced by five different chromosomal sites. *J Med Virol.* 2008; (80): 1952–8. DOI: 10.1002/jmv.21299.
 21. Clark DA, Nacheva EP, Leong HN, Brazma D, Li YT, Tsao EH, et al. Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: implications for laboratory diagnosis. *J Infect Dis.* 2006; 193 (7): 912–6. DOI: 10.1086/500838.
 22. Hubacek P, Virgili A, Ward KN, Pohreich D, Keslova P, Goldova B, et al. HHV-6 DNA throughout the tissues of two stem cell transplant patients with chromosomally integrated HHV-6 and fatal CMV pneumonitis. *Br J Haematol.* 2009; 145 (3): 394–8. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07622.x
 23. Ohye T, Kawamura Y, Inagaki H, Yoshikawa A, Ihira M, Yoshikawa T, et al. A simple cytogenetic method to detect chromosomally integrated human herpesvirus-6. *J Virol Methods.* 2016; (228): 74–8. DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.11.001.
 24. Melehina EV, Domonova JeA, Goptar IA, Shipulina OJu, Gorelov AV. Pervyj v Rossii sluchaj nasledstvennoj peredachi hromosomno-integrirovannogo virusa gerpesa cheloveka 6B (Human betaherpesvirus 6B). *Voprosy prakticheskoy pediatrii.* 2019; 14 (1): 33–40. DOI: 10.20953/1817-7646-2019-1-33-40.
 25. Greninger AL, Naccache SN, Pannaraj P, Jerome KR, Dien Bard J, Ruderman JW. The brief case: inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6 (HHV-6) in the age of multiplex HHV-6 testing. *J Clin Microbiol.* 2019; 57 (10): e02016–18. DOI: 10.1128/JCM.02016-18.
 26. Clark DA. Clinical and laboratory features of human herpesvirus 6 chromosomal integration. *Clin Microbiol Infect.* 2016; 22 (4): 333–9. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.12.022.
 27. Prusty BK, Krohne G, Rudel T. Reactivation of chromosomally integrated human herpesvirus-6 by telomeric circle formation. *PLoS Genet.* 2013; 9 (12): e1004033. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004033.
 28. Endo A, Watanabe K, Ohye T, Suzuki K, Matsubara T, Shimizu N, et al. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated human herpesvirus 6A in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency. *Clin Infect Dis.* 2014; 59 (4): 545–8. DOI: 10.1093/cid/ciu323.
 29. Miura H, Kawamura Y, Ohye T, Hattori F, Kozawa K, Ihira M, et al. Inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6 is a risk factor for spontaneous abortion. *J Infect Dis.* 2021; 223 (10): 1717–23. DOI:10.1093/infdis/jiaa606.
 30. Gaccioli F, Lager S, de Goffau MC, Sovio U, Dopierala J, Gong S, et al. Fetal inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 predisposes the mother to pre-eclampsia. *Nat Microbiol.* 2020; 5 (7): 901–8. DOI:10.1038/s41564-020-0711-3.
 31. Kumata R, Ito J, Sato K. Inherited chromosomally integrated HHV-6 possibly modulates human gene expression. *Virus Genes.* 2020; 56 (3): 386–9. DOI:10.1007/s11262-020-01745-5.
 32. Kaufert BB, Flamand L. Chromosomally integrated HHV-6: impact on virus, cell and organismal biology. *Curr Opin Virol.* 2014; (9): 111–8. DOI: 10.1016/j.coviro.2014.09.010.
 33. Huang Y, Hidalgo-Bravo A, Zhang E, Cotton VE, Mendez-Bermudez A, Wig G, et al. Human telomeres that carry an integrated copy of human herpesvirus 6 are often short and unstable, facilitating release of the viral genome from the chromosome. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42 (1): 315–27. DOI:10.1093/nar/gkt840.
 34. Gravel A, Sinnett D, Flamand L. Frequency of chromosomally-integrated human herpesvirus 6 in children with acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One.* 2013; 8 (12): e84322. DOI: 10.1371/journal.pone.0084322.
 35. MGI Documents [Internet]. Available from: https://en.mgi-tech.com/download/files/ha0_id/1/type_id/1/p/1.
 36. Starostina E, Tamazian G, Dobrynin, P, O'Brien S, Komissarov A. Cookiecutter: a tool for kmer-based read filtering and extraction. *BioRxiv.* 2015: 024679. DOI: 10.1101/024679.
 37. Domonova JeA, Silvestrova OJu, Goptar IA, Kuleshov KV, Pashina IN, Nikiforova AV, et al. Pervyj sluchaj vyjavlenija i laboratornogo podtverzhenija nasledstvennoj peredachi hromosomno-integrirovannogo Human betaherpesvirus 6A v Rossijskoj Federacii. *Infekcionnye bolezni.* 2019; 17 (3): 5–14.
 38. Prijbelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A. Using SPAdes de novo assembler. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2020; 70 (1): e102. DOI:10.1002/cpbi.102.
 39. Madden T. The BLAST sequence analysis tool. *National Centre for Biotechnology Information.* Bethesda, 2003. 15 p.
 40. Rozewicki J, Li S, Amada KM, Standley DM, Katoh K. MAFFT-DASH: integrated protein sequence and structural alignment. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47 (W1): W5–W10. DOI:10.1093/nar/gkz342.
 41. Robinson O, Dylus D, Dessimoz C. Phylo.io: Interactive viewing and comparison of large phylogenetic trees on the web. *Mol Biol Evol.* 2016; 33 (8): 2163–6. DOI:10.1093/molbev/msw080.
 42. Godet AN, Soignon G, Koubi H, Bonnafous P, Agut H, Poirot C, et al. Presence of HHV-6 genome in spermatozoa in a context of couples with low fertility: what type of infection? *Andrologia.* 2015; 47 (5): 531–5.
 43. Aswad A, Aimola G, Wight D, et al. Evolutionary history of endogenous human herpesvirus 6 reflects human migration out of Africa. *Mol Biol Evol.* 2021; (38): 96–107. DOI:10.1093/molbev/msaa190.