Новый подход к диагностике *Varicella Zoster*-вирусной инфекции с использованием ПЦР в режиме реального времени

Х. Ф. Фам, А.В. Сидоров (sashasidorov@ya.ru), А.В. Милованова,
Т.П. Антонова, А.Н. Лисаков, Ф.Г. Нагиева, Г.И. Алаторцева,
О.А. Свитич, А.С. Казанова, В.Ф. Лавров, В.В. Зверев.

ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (instmech@iitp.ru)

Резюме

Целью настоящей работы являлась проверка возможности использования метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для определения ДНК вируса *Varicella Zoster* в образцах периферической крови человека. Для этого исследовали образцы от двух групп пациентов, в результате чего вирусная ДНК была обнаружена в крови 48% больных опоясывающим герпесом и лишь у 4% представителей контрольной группы – практически здоровых доноров, у которых симптомы опоясывающего герпеса отсутствовали. Результаты ПЦР-РВ анализировали путём сравнения данных, полученных от клинических образцов, с калибровочными кривыми стандартных разведений контрольного положительного образца, в качестве которого использовали вирусную ДНК, выделенную из вакцинного препарата Varilrix. В реакциях ПЦР-РВ для амплификации были выбраны два различных фрагмента генома вирусной ДНК, при этом была установлена зависимость получаемых результатов от выбранного для амплификации фрагмента (ОРС 29 или ОРС 38). Как итог, была экспериментально подтверждена возможность использования ПЦР-РВ в качестве молекулярно-биологического метода лабораторной диагностики VZV-инфекции, включая атипичные и субклинические формы заболевания.

Ключевые слова: *Varicella Zoster Virus*, VZV-инфекция, ветряная оспа, опоясывающий герпес, вирусная ДНК, ПЦР в режиме реального времени, молекулярная диагностика

New Approach for Diagnostics of VZV Infection by Using Real-Time PCR

H.Ph. Pham, A.V. Sidorov (sashasidorov@ya.ru), A.V. Milovanova, T.P. Antonova, A.N. Lisakov, F.G. Nagieva, G.I. Alatorceva,
O.A. Svitich, A.C. Kasanova, V.F. Lavrov, V.V. Zverev

Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Moscow, Russia

Abstract

Clinical picture of diseases caused by VZV in immunocompromised patients is often differed from healthy people and has no visible skin damage. Diagnostics in such cases is difficult but it is important to find out real reason of health deterioration for assignment the treatment. That explains usefulness of molecular methods in diagnostics of VZV-infection. So the goal of this study was checking out usefulness of diagnostics based on detection viral DNA in clinical samples by real-time PCR method. We used pools of peripheral blood samples from sick and healthy patients as clinical materials for analysis and Varilrix vaccine sample as a source of positive control viral DNA. Main methods used here were DNA extraction and real-time PCR in the version of TaqMan probes; amplification reactions were made in triplicates for each sample with standard deviation of threshold cycles less than 1.5%. Amplification results of clinical samples from patients were analyzed by comparison with the results from positive control viral DNA. Final resulting figures were slightly varied and dependent on selected for amplification VZV genome fragment (orf 29 or orf 38), and viral DNA had been detected in 48% of sick patients and only in 4% of practically healthy donors without zoster symptoms. Concluding, we approved the possibility of use real-time PCR as a molecular method for laboratory diagnostics VZV-infection including atypical and subclinical disease forms. One of the advantage of the method described is the possibility of DNA detection straight from blood samples (without extra purification steps such as preparation mononuclear cell fraction from blood samples), therefore this approach can accelerate and simplify diagnostic procedure.

Key words: *Varicella Zoster Virus*, VZV-infection, chickenpox, herpes zoster, viral DNA, real-time PCR, molecular diagnostics

Введение

Varicella Zoster Virus (VZV) относится к ДНК-содержащим вирусам, входит в семейство *Herpesviridae*, подсемейство *Alpha-herpesvirinae*. Практически 100% населения Земли к 40-летнему возрасту инфицируются VZV, что подтвержда-

ется серопозитивностью к вирусу [1]. Первичная VZV-инфекция (ветряная оспа) развивается вследствие экзогенного заражения, чаще всего в детском возрасте, сопровождается диссеминированной везикулярной сыпью и некоторыми другими симптомами [2]. Течение ветряной оспы у детей

в большинстве случаев благоприятно, однако после выздоровления вирус в латентном состоянии пожизненно персистирует в ганглиях спинномозговых, черепно-мозговых нервов, а также ганглиях чревного и подчревного сплетений вегетативной нервной системы [3, 4]. При снижении функциональной активности клеточного иммунитета, вследствие стресса, травмы, в результате ятрогенной или приобретенной иммуносупрессии, преимущественно в возрасте 60 и более лет, возможна эндогенная реактивация вируса, его антероградное распространение по нервным волокнам к коже, с развитием самостоятельного заболевания – опоясывающего герпеса (*Herpes Zoster*). Для этой, как правило, тяжелой, изнуряющей человека болезни, характерны везикулярные, зудящие, болезненные высыпания в пределах 1 – 3 дерматомов [2]. После редукции высыпаний заболевание более чем в 40% случаев осложняется хроническим болевым синдромом – постгерпетической невралгией, которая возникает вследствие репликации вируса в чувствительных нервных ганглиях, приводит к некрозу и последующему фиброзу этих образований [5]. К другим тяжелым осложнениям опоясывающего герпеса относят васкуло- и миелопатии, острый некроз сетчатки и церебеллит [6]. Адаптивный иммунитет к VZV может подавлять кожные проявления болезни, однако неврологические симптомы остаются и возникает т.н. *Zoster sine herpete* [7, 8]. Около 10% заболеваний, связанных с реактивацией VZV, имеют атипичное, субклиническое или диссеминированное течение, что актуализирует использование различных методов лабораторной диагностики VZV-инфекции.

Своевременная диагностика заболевания зачастую бывает затруднена в случаях атипичного или бессимптомного течения инфекции (в частности, без кожных высыпаний), нередко наблюдаемого у лиц с нарушением иммунитета, например, у ВИЧ-инфицированных. При этом очень важно вовремя установить, что ухудшение состояния здоровья пациентов с иммунодефицитом происходит на фоне развития у них VZV-инфекции и назначить им соответствующее лечение. Кроме того, известно, что свободная циркуляция вируса в крови при различных формах VZV-инфекции носит, как правило, ограниченный по времени характер. Это обосновывает применение молекулярных методов диагностики VZV-инфекции даже в случае атипичных и бессимптомных форм заболевания.

Цель данного исследования – обоснование возможности использования ПЦР-РВ в качестве молекулярно-биологического теста, позволяющего выявлять ДНК вируса ветряной оспы и опоясывающего герпеса в цельных образцах периферической крови больных различными формами VZV-инфекции.

Материалы и методы

Клинические группы. В данном исследовании изучались образцы периферической крови

36 пациентов с диагнозом «опоясывающий герпес» (группа 1), находящихся на стационарном лечении в Московской инфекционной клинической больнице № 1. В группу сравнения вошли практически здоровые 32 человека (группа 2), не имеющих симптомов опоясывающего герпеса, как минимум в течение шести последних месяцев.

Материалы. В качестве контрольного стандартного источника ДНК VZV использовали живую вакцину Varilrix (PY №ЛСР-001354/08, Glaxo Smith Kline Biologicals, s.a., Бельгия), приготовленную на основе штамма vOka, предназначенную для специфической профилактики ветряной оспы.

При постановке ПЦР-РВ использовали Taq полимеразу, смеси нуклеотидтрифосфатов и буферные растворы производства фирмы «Синтол» (Россия). Синтез и очистку праймеров и зондов для ПЦР-РВ также заказывали в фирме «Синтол».

Методы. Сбор образцов цельной периферической крови проводили согласно методике, описанной ранее [9]. ДНК выделяли из крови [10], используя метод фенол-хлороформной экстракции [11], или с помощью коммерческого набора реактивов для выделения ДНК «Diatom DNA Prep 100» «Изоген» (Россия) согласно протоколу производителя. На последней стадии ДНК осаждали двукратным объемом этанола из водного раствора, содержащего 2М ацетата аммония. После центрифугирования осадок промывали 70% этанолом, подсушивали на воздухе и растворяли в 100 мкл буферного раствора трис-HCl (10 mM, pH 8.0). Неспецифическая амплификация контрольной ДНК проводилась способом, описанным ранее [12], с использованием набора реагентов «GENomi-PhiDNA Amplification Kit» (GENeHealthcare Biosciences, США) согласно протоколу производителя. Качество полученной ДНК оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле; содержание вирусной ДНК в общем пуле оценивали с помощью ПЦР с праймерами, специфичными к фрагменту ORC 38, с последующей визуализацией продуктов ПЦР в 2% агарозном геле в присутствии интеркалирующего красителя этидиум бромид, а также используя ПЦР в реальном времени в варианте Taq Man. ПЦР ставили в объеме 25 мкл, на буферном растворе фирмы-производителя Taq полимеразы, конечная концентрация хлористого магния в котором составляла 1,5 mM, с добавлением 0,25 mM смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов, 1 mM праймеров и 0,5 ед. фермента. Программа амплификации: 94 °C – 2 мин; 30 циклов: 94 °C – 20 сек, 60 °C – 20 сек, 72 °C – 20 сек; 72 °C – 2 мин.

Биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей, а также конструирование праймеров и зондов для ПЦР-РВ проводили с помощью пакета программ Vector NTI (Vector NTI Advance, ver. 11.0, Invitrogen).

В реакциях использовали готовые смеси фирмы «Синтол», а также указанные ниже праймеры и зонды для фрагментов ORC 29 и ORC 38: прай-

Рисунок 1.
Анализ образцов ДНК после неспецифической амплификации

меры, OPC 29 – CAGGTATTTTCAGTCCTCTTCAAGTG и TTAGACGTGGAGTTGACATCGTT; зонды для ПЦР, OPC 29 – FAM-TACCGCCCGTGGAGCGCG-BHQ' [13]; праймеры, OPC 38 – AAGTCCCCCGTTTCGC и TGGACTTGAAGATGAACCTTAATGAAGC; зонды для ПЦР, OPC 38 – FAM-CCGCAACAACGCAGTATATATCGTCTCA-BHQ1 [14].

Определение вирусной ДНК с помощью ПЦР-РВ в варианте Taq Man проводили на термоциклере ДТ 96 («ДНК Технология», РФ), используя протокол, рекомендованный производителем термоциклера: предварительный прогрев реакционных смесей объемом 25 мкл в течение 3-х минут при 95 °С; далее 45 циклов: 15 секунд, 95 °С; 1 минута, 60 °С.

Эксперименты были повторены трижды. Результаты работы представлены в пороговых циклах. Статистическая обработка данных проводилась в программе Microsoft Excel 2007. Результаты выражали как среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение. Отклонение в величинах пороговых циклов с одним и тем же образцом не превышало 1,5%.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований использовали ПЦР-РВ в качестве количественного метода определения вирусной ДНК в цельных образцах крови пациентов с VZV-инфекцией. Для этого применяли методику калибровочных кривых для подсчета в образце относительного содержания искомой ДНК при сравнении сигнала от образца с сигналами, полученными от стандартных разведений контрольной ДНК. Предполагалось в качестве контроля использовать вирусную ДНК, выделенную из вакцинных препаратов Varilrix и OkaVax. Однако выяснилось, что содержание вирусной ДНК в этих препаратах является экстремально низким, а в некоторых образцах за пределами чувствительности используемого нами метода. Для повышения в кон-

трольных образцах концентрации вирусной ДНК нами применялся метод неспецифической амплификации, то есть амплификации с многократными замещениями (multiple displacement amplification) со случайными праймерами и ДНК-полимеразой нечётного бактериофага phi29 [15].

На рисунке 1 представлены результаты исследования с помощью ПЦР контрольных образцов ДНК, выделенных из вакцин Varilrix и OkaVax после неспецифической амплификации (см. раздел Методы). В этом случае при постановке реакции с Taq полимеразой были использованы праймеры, специфичные к фрагменту гена OPC 38. Как видно на рисунке, наиболее предпочтительной по количеству и специфичности продукта ПЦР матричной ДНК, является выделенная из вакцины Varilrix вирусная ДНК, которая впоследствии была использована в качестве контрольного образца.

В экспериментах с применением ПЦР-РВ были амплифицированы фрагменты генов открытых рамок считывания 29 и 38. Размер продуктов амплификации составил 78 нуклеотидных остатков для OPC 29 [13] и 82 – для OPC 38 [14]. Нами был использован вариант ПЦР-РВ с TaqMan зондами, при котором сигнал появляется благодаря экзонуклеазной активности Taq-полимеразы, отщепляющей от зонда в каждом цикле расположенную на 5'-конце флуоресцентную метку, гибридизованную с комплементарной цепью ДНК. При этом в исходной пробе происходит гашение сигнала с помощью находящегося на 3'-конце олигонуклеотида – так называемого «тушителя» флуоресценции.

Последовательные 10-кратные разведения контрольной ДНК были протестированы в ПЦР-РВ и результаты представлены на рисунке 2. Сравнительный анализ калибровочных кривых OPC 29 и OPC 38 показал, что эффективность ПЦР, определяемая в первом приближении углом наклона

Рисунок 2.**Кривые флуоресценции, полученные для последовательных 10-кратных разведений контрольной ДНК**

линейной части кривой, когда наблюдается экспоненциальный рост флуоресценции, была несколько выше для OPC 38, чем при использовании праймеров и зонда к OPC 29. Кроме того, при постановке реакций с использованием OPC 38 был обнаружен интересный феномен, который заключался в том, что после очередного достаточно высокого разведения ДНК, и 2 – 3-х последующих разведений, мы наблюдали практически одинаковый сигнал, то есть нарушалась линейная зависимость между высотой сигнала флуоресценции и степенью разведения образца. При этом сигнал флуоресценции не исчезал, как можно было ожидать, при значительных разведениях контрольных образцов, полностью отсутствовал в отрицательном контрольном образце (без ДНК). Этот факт указывает на специфичность сигнала флуоресценции. При амплификации же OPC 29 линейная зависимость «сигнал-разведение» сохранялась. При значительном разведении наблюдали полное исчезновение сигнала флуоресценции, как при контрольном образце.

Далее, представленный методический подход использовали для исследования цельных образцов периферической крови. В результате выяснилось, что концентрация вирусной ДНК в крови довольно низкая – на уровне последнего значимого раз-

ведения контрольного образца, что не позволяло нам достоверно определять в образце крови количество вирусной ДНК. В связи с этим было решено отказаться от ПЦР-РВ в качестве количественного теста определения ДНК VZV, а использовать для качественного анализа, указывающего на наличие или отсутствие в образце крови исследуемого вирусной ДНК. Результаты этих опытов представлены на рисунке 3. При постановке реакции наряду с исследуемыми образцами в качестве отрицательного контроля использовали воду, положительными контролями служили последние 3 – 4 значимых десятикратных разведения контрольной ДНК. Следует отметить довольно высокую степень воспроизводимости результатов, получаемых с помощью ПЦР-РВ. Так, в ДНК-положительных образцах периферической крови пациентов стандартное отклонение порогового цикла при 3-х кратном повторении реакции составляло менее 1,5%. Однако при интерпретации первичных данных, полученных при амплификации различных фрагментов вирусной ДНК, в том числе OPC 29 или OPC 38, были использованы несколько иные подходы. Как уже отмечалось, при амплификации фрагмента OPC 38, при использовании в качестве матричной высоких разведений контрольной ДНК, линейная зависимость

Рисунок 3.**Пример кривых флуоресценции, полученных для образцов ДНК, выделенной из клинического материала**

«сигнал-разведение» нарушалась. При анализе результатов амплификации (см. рис. 3, справа) мы обратили внимание на то, что образцы, дающие положительные сигналы, можно условно разделить на два отдельных кластера – внутри и вне калибровочных кривых. Принимая во внимание, что в контрольных образцах при сверхвысоких разведениях сигнал не исчезает, было решено считать положительными образцы, дающие сигнал внутри калибровочных кривых, а отрицательными – образцы, не дающие сигнала, либо дающие сигнал с пороговым циклом (при 3-х кратном повторении) достоверно выше сигнала от последнего разведения контрольного образца. Например, если наиболее высокое разведение контрольной ДНК давало пороговый цикл 36, а образец – 38, то такой образец считался отрицательным. После отбраковки сомнительных данных по приведенному выше алгоритму, вирусная ДНК была выявлена в 8 из 16 (50%) образцов крови, полученных у больных с характерными симптомами опоясывающего герпеса и только в одном из 16 (6%) образцов крови, взятых у доноров, не имеющих признаков данного заболевания.

При анализе результатов амплификации фрагмента OPC 29 образец считали положительным, то есть содержащим вирусную ДНК, при наличии воспроизводимого (при 3-х кратном повторении) сигнала флуоресценции (см. рис. 3, слева), а при отсутствии сигнала – отрицательным. При этом были получены следующие результаты: ДНК VZV была обнаружена в 13 (46%) из 28 исследованных образцов крови больных опоясывающим герпесом. В контрольной группе, из 32 исследованных образцов положительным оказался 1 образец (3%).

Обобщая результаты тестирования вирусной ДНК с помощью ПЦР-РВ, можно сделать вывод, что в образцах цельной периферической крови у 21 из 44 (48%) пациентов с диагнозом «опоясывающий герпес» выявлялась вирусная ДНК. У практически здоровых доноров без признаков данного заболевания ДНК VZV была выявлена в 2-х из 48 образцов (4%).

Анализируя первичные данные амплификации различных фрагментов вирусной ДНК следует отметить более простую интерпретацию результатов для фрагмента OPC 29, чем для фрагмента OPC 38. Подчеркиваем, что применяя ПЦР-РВ в качестве одного из молекулярно-диагностических тестов, следует помнить об определенном элементе субъективизма в интерпретации получаемых результатов. В инструкции к набору реагентов для выявления ДНК VZV в клиническом материале с помощью ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Ампли Сенс® VZV-FL» говорится следующее: «результат амплификации по каналу считается положительным, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в «реальном времени» S-образный вид и однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции. Результат амплификации по каналу считается отрицательным в случае отсутствия кривой

типичной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения Ct)». Как видно на рисунках 2 и 3, кривые флуоресценции для OPC 29 имеют более «типичный для ПЦР-РВ S-образный» вид, чем соответствующие кривые для OPC 38.

При анализе возможных причин формирования кривых флуоресценции не совсем обычного вида и более низкой эффективности ПЦР-РВ для OPC 38 (эффективность реакции, в первом приближении, пропорциональна углу наклона кривой в линейной области, на рисунках 2 и 3 хорошо видно, что угол наклона для OPC 38 заметно меньше, чем угол наклона для OPC 29) следует иметь в виду, что при анализе генома VZV методами полногеномного секвенирования было выявлено 3 гипервариабельных участка: OPC 1 – 3, OPC 35 – 38, OPC 57 – 68 [16], в один из которых входит изучаемый нами фрагмент. Действительно, оказалось, что Taq Map зонд к OPC 38 содержит последовательность CTGCAG, анализ которой провёл Лопарев с соавт. при генотипировании образцов вирусной ДНК [17] с помощью метода полиморфизма (точечных замен) в сайтах рестрикции эндонуклеаз (BglI в ORF54 и PstI в ORF38). При этом оказалось, что сайт Pst I CTGCAG (как в зонде) в некоторых образцах исчезает (замена на CTGCGG). PstI минус мутация (CTGCGG) была описана авторами как минорная CTGCGG, встречающаяся, приблизительно, в составе 10 – 25% всех генотипов. С помощью программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – средство поиска основного локального выравнивания) анализировалось сходство нуклеотидных последовательностей зонда OPC 38 в нуклеотидных базах NCBI (National Centre for Biotechnology Information – Национальный центр биотехнологической информации, США) получены следующие результаты: первые 100 последовательностей из различных вирусных изолятов являются «А» мутантами (Pst I плюс). В их число входят лабораторный штамм Ellen, российский изолят Sveta, вакцинные штаммы vOka (вакцина Varilrix). При анализе варианта «G» зонда (CCGCAACAAGTGGGTATATATCGTCTCA) из первых 100 последовательностей только 40 оказались «G» мутантами (Pst I минус). D.P. Depledge с соавт. [13] описывает эту мутацию как одну из 224 аллельных замен, встречающихся как в родительских, так и в вакцинных штаммах. Тем не менее, при использовании праймеров и зонда OPC 38 нельзя исключать возможность влияния полиморфизма на качество результатов ПЦР-РВ.

Относительно невысокое количество положительных проб (50%) от пациентов с опоясывающим герпесом можно объяснить особенностями течения VZV-инфекции. В частности, при первичной VZV-инфекции ассоциированная с клетками виремия возникает в последние дни инкубационного периода и продолжается в первые дни после появления сыпи, как правило, длится недолго и обычно заканчивается через 24 – 72 часов после появления кожных высыпаний [18]. В опытах, проведенных *in vitro* было показа-

но, что существует возможность выделения из мононуклеаров периферической крови инфекционного вируса. Жизнеспособный вирус находился в 11 – 24% образцов крови, взятых спустя менее, чем через 24 часа после появления сыпи у пациентов с признаками первичной инфекции [19]. Кроме того, С.М. Koropchak с соавт. показал, что при использовании методов гибридизации *in situ* [20] или ПЦР [21] ДНК вируса обнаруживается в 67 – 74% образцов крови. Таким образом, согласно данным литературы, по крайней мере при первичной VZV-инфекции вирус циркулирует в крови относительно недолго, что может ограничивать возможность применения молекулярно-диагностических методов определения вирусной ДНК в рамках лабораторного тестирования. Следует также отметить, что в описанных выше экспериментах нами были созданы достаточно жёсткие условия отбора положительных проб. Так, начальные данные по ОРС 29 (без подтверждения 3-х кратными повторами) указывали на обнаружение вирусной ДНК у 23 из 29 пациентов (79%) с симптомами опоясывающего герпеса, а также у 4 из 32 (12%) практически здоровых доноров. Около 30% случаев (примерно 50% положительных образцов от больных опоясывающим герпесом) можно было трактовать как сомнительные, требующие дальнейшей проверки.

Ранее мы показали возможность использования двухступенчатой ПЦР (nested PCR) для выявления вирусной ДНК в моноцитах периферической крови пациентов [10]. Необходимо отметить, что процент образцов, в которых была обнаружена вирусная ДНК, оказалось практически таким же, как и в настоящей работе. Так, положительными оказались 17 из 35 (49%) исследуемых образцов, полученных у больных и 1 из 20 (5%) у практически

здоровых лиц. В этом исследовании уже выдвигались предположения о наиболее вероятных причинах выявления вирусной ДНК в образцах крови лиц, не имеющих признаков VZV-инфекции. Вероятнее всего, персистенция вируса в крови, возникшая вследствие его эндогенной реактивации, носила кратковременный характер и не сопровождалась соответствующей симптоматикой.

Таким образом, нами продемонстрирована принципиальная возможность использования ПЦР-РВ в качестве молекулярно-диагностического метода детекции вирусной ДНК в образцах цельной крови пациентов с VZV-инфекцией. Данный метод может быть использован в лабораторной практике как дополнительный (подтверждающий) тест, в том числе при верификации атипичных и субклинических форм VZV-инфекции [7], первичной инфекции у ВИЧ-инфицированных детей [22], болевом синдроме без сыпи [23, 24] и др., а также при проведении эпидемиологического мониторинга.

Выводы

1. У больных с диагнозом «опоясывающий герпес», вирусная ДНК выявлялась в 48% образцов крови, что позволяет рекомендовать ПЦР-РВ в качестве одного из методов лабораторной диагностики VZV-инфекции, в частности, при верификации атипичных и субклинических форм заболевания.
2. Преимуществом использования ПЦР-РВ в лабораторной диагностике VZV-инфекции является возможность определения вирусной ДНК в образцах цельной крови (без выделения мононуклеарных клеток), что значительно ускоряет процесс диагностики.

Литература

1. Reynolds M.A., Kruszon-Moran D., Jumaan A., Schmid D.S., McQuillan G.M. Varicella seroprevalence in the U.S.: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 – 2004. *Public Health Rep.* 2010, 125 (6): 860 – 869.
2. Лавров В.Ф., Казанова А.С., Кузин С.Н., Дубоделов Д.В. Ветряная оспа и опоясывающий лишай: особенности заболеваемости и клинических проявлений. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2011, 3: 54 – 60.
3. Eshleman E., Shahzad A., Cohrs R.J. Varicella zoster virus latency. *Future Virol.* 2011; 6 (3): 341 – 355.
4. Gilden D.H., Gesser R., Smith J., Wellish M., Laquardia J.J., Cohrs R.J., Mahalingam R. Presence of VZV and HSV-1 DNA in human nodose and celiac ganglia. *Virus Genes.* 2001, 23 (2): 145 – 147.
5. Казанова А.С., Лавров В.Ф., Зверев В.В. Випус *Varicella Zoster* и заболевания сосудов центральной нервной системы. *Журн. микробиол.* 2015; 3: 106 – 116.
6. Amlie-Lefond C., Jubelt B. Neurologic manifestations of *Varicella Zoster* virus infections. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2009; 9 (6): 430 – 434.
7. Gilden D., Cohrs R.J., Mahalingam R., Nagel M.A. Neurological disease produced by varicella zoster virus reactivation without rash. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 2010, 342: 243 – 253.
8. Gilden D.H., Dueland A.N., Devlin M.E., Mahalingam R., Cohrs R. Varicella-zoster virus reactivation without rash. *J. Infect. Dis.* 1992; 166 (Suppl. 1): 30 – 34.
9. Казанова А.С., Лавров В.Ф., Кузин С.Н., Эбралидзе Л.К., Ведунова С.Л., Малышев Н.А. и др. Сравнительная оценка эффективности традиционного серологического и модифицированного методов лабораторной диагностики опоясывающего герпеса. *Журн. микробиол.* 2013; 2: 83 – 90.
10. Фам Х.Ф., Боровикова Е.А., Сидоров А.В., Каратаева А.В., Антонова Т.П., Зверев В.В. Возможность использования двухступенчатой полимеразной цепной реакции в диагностике заболеваний, вызываемых вирусом *VaricellaZoster*. *Журн. микробиол.* 2015, 3: 25 – 30.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Москва: Мир. 1984: 402 – 407.
12. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Амиантова И.И., Доценко В.В. и др. Получение рекомбинантного аналога гликопротеина Е вируса *Varicella Zoster*: клонирование, экспрессия и исследование антигенных свойств. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2016; 15 (1): 77 – 86.
13. Depledge D.P., Palser A.L., Watson S.J., Yi-Chun Lail, Gray E.R., Grant P. et al. Specific capture and whole-genome sequencing of viruses from clinical samples. *PloS One* 2011; 6 (11): e27805.
14. Watzinger F., Suda M., Preuner S., Baumgartner R., Ebner K., Baskova L. et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42 (11): 5189 – 5198.
15. Dean F.B., Hosono S., Fang L., Wu X., Faruqi A.F., Bray-Ward P. et al. Comprehensive Human Genome Amplification Using Multiple Displacement Amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99 (8): 5261 – 5266.
16. Tyler S.D., Peters G.A., Grose C., Severini A., Gray M.J., Upton C. et al. Genomic cartography of varicella-zoster virus: a complete genome-based analysis of strain variability with implications for attenuation and phenotypic differences. *Virology.* 2007, 359: 447 – 458.

17. Loparev V.N., Gonzalez A., Deleon-Carnes M., Tipples G., Fickenscher H., Torfason E.G. et al. Global identification of three major genotypes of *varicella-zoster* virus: longitudinal clustering and strategies for genotyping. *J. Virol.* 2004; 78: 8349 – 8358.
18. Ozaki T., Ichikawa T., Matsui Y., Kondo H., Nagai T., Asano Y. et al. Lymphocyte-associated viremia in varicella. *J. Med. Virol.* 1986; 19: 249 – 253.
19. Asano Y., Itakura N., Kajita Y., Suga S., Yoshikawa T., Yazaki T. et al. Severity of viremia and clinical findings in children with varicella. *J. Infect. Dis.* 1990; 161 (6): 1095 – 1098.
20. Koropchak C.M., Solem S.M., Diaz P.S., Arvin A.M. Investigation of varicella-zoster virus infection of lymphocytes by in situ hybridization. *J. Virol.* 1989; 63: 2392-2395.
21. Koropchak C.M., Graham G., Palmer J., Winsberg M., Ting S.F., Wallace M. et al. Investigation of varicella-zoster virus infection by polymerase chain reaction in the immunocompetent host with acute varicella. *J. Infect. Dis.* 1991; 163: 1016 – 1022.
22. Kelley R., Mancao M., Lee F., Sawyer M., Nahmias A., Nesheim S. Varicella in children with perinatally acquired human immunodeficiency virus infection. *J. Pediatr.* 1994; 124 (2): 271 – 273.
23. Schott G.D. Triggering of delayed-onset postherpetic neuralgia. *Lancet* 1998; 351: 419 – 420.
24. Amlic-Lefond C., Mackin G.A., Ferguson M., Wright R.R., Mahalingam R., Gilden D.H. Another case of virologically confirmed zoster sine herpete, with electrophysiologic correlation. *J. Neurovirol.* 1996; 2: 136 – 138.

References

1. Reynolds M.A., Kruszon-Moran D., Jumaan A., Schmid D.S., McQuillan G.M. Varicella seroprevalence in the U.S.: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 – 2004. *Public Health Rep.* 2010; 125 (6): 860 – 869.
2. Lavrov V.F., Kazanova A.S., Kuzin S.N., Dubodelov D.V. Varicella and herpes zoster: morbidity and clinical manifestations. *Jepidemiologija i infekcionnye bolezni. Aktual'nye voprosy.* [Epidemiol. Infect. Dis. Curr. Items]. Moscow. 2011; 3: 54 – 60 (in Russian).
3. E., Shahzad A., Cohrs R.J. *Varicella zoster* virus latency. *Future Virol.* 2011; 6 (3): 341 – 355.
4. Gilden D.H., Gesser R., Smith J., Wellish M., LaGuardia J.J., Cohrs R.J., Mahalingam R. Presence of VZV and HSV-1 DNA in human nodose and celiac ganglia. *Virus Genes.* 2001; 23 (2): 145 – 147.
5. Kazanova A.S., Lavrov V.F., Zverev V.V. Varicella Zoster virus and diseases of central nervous system vessels. *Zhurnal mikrobiologii.* [Journal of microbiology]. Moscow. 2015; 3: 106 – 116 (in Russian).
6. Amlic-Lefond C., Jubelt B. Neurologic manifestations of *Varicella Zoster* virus infections. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2009; 9 (6): 430 – 434.
7. Gilden D., Cohrs R.J., Mahalingam R., Nagel M.A. Neurological disease produced by varicella zoster virus reactivation without rash. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 2010; 342: 243 – 253.
8. Gilden D.H., Dueland A.N., Devlin M.E., Mahalingam R., Cohrs R. Varicella-zoster virus reactivation without rash. *J. Infect. Dis.* 1992; 166 (Suppl. 1): 30 – 34.
9. Kazanova A.S., Lavrov V.F., Kuzin S.N., Ebralidze L.K., Vedunova S.L., Malyshev N.A. et al. Comparative evaluation of effectiveness of traditional serologic and modified methods of herpes zoster laboratory diagnostics. *Zhurnal mikrobiologii* [Journal of microbiology]. Moscow. 2013; 2: 83 – 90 (in Russian).
10. Fam H.Ph., Borovikova E.A., Sidorov A.V., Karataeva A.V., Antonova T.P., Zverev V.V. Possibility of using nested polymerase chain reaction for diagnostics of diseases caused by *Varicella Zoster* Virus. *Zhurnal mikrobiologii* [Journal of microbiology]. Moscow. 2015; 3: 25 – 30 (in Russian).
11. Maniatis, T., Fritsch, E., J. Sambrook. Methods of genetic engineering. Molecular cloning. Moscow: Mir. 1984: 402 – 407.
12. Alatorseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., Luhverchik L.N., Amiantova I.I., Docenko V.V. et al. Recombinant Analogue of Varicella Zoster Virus Glycoprotein E: Cloning, Expression and Studying of Antigen Properties. *Zh. Epidemiol. Vac. Prevent.* (Moscow). 2016, 15(1): 77-86 (in Russian).
13. Depledge D.P., Palser A.L., Watson S.J., Yi-Chun Lail., Gray E.R., Grant P. et al. Specific capture and whole-genome sequencing of viruses from clinical samples. *PLoS One* 2011; 6 (11): e27805.
14. Watzinger F., Suda M., Preuner S., Baumgartner R., Ebner K., Baskova L. et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (11): 5189 – 5198.
15. Dean F.B., Hosono S., Fang L., Wu X., Faruqi A.F., Bray-Ward P. et al. Comprehensive Human Genome Amplification Using Multiple Displacement Amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99 (8): 5261 – 5266.
16. Tyler S.D., Peters G.A., Grose C., Severini A., Gray M.J., Upton C. et al. Genomic cartography of varicella-zoster virus: a complete genome-based analysis of strain variability with implications for attenuation and phenotypic differences. *Virology.* 2007; 359: 447 – 458.
17. Loparev V.N., Gonzalez A., Deleon-Carnes M., Tipples G., Fickenscher H., Torfason E.G. et al. Global identification of three major genotypes of *varicella-zoster* virus: longitudinal clustering and strategies for genotyping. *J. Virol.* 2004; 78: 8349 – 8358.
18. Ozaki T., Ichikawa T., Matsui Y., Kondo H., Nagai T., Asano Y. et al. Lymphocyte-associated viremia in varicella. *J. Med. Virol.* 1986; 19: 249 – 253.
19. Asano Y., Itakura N., Kajita Y., Suga S., Yoshikawa T., Yazaki T. et al. Severity of viremia and clinical findings in children with varicella. *J. Infect. Dis.* 1990; 161 (6): 1095 – 1098.
20. Koropchak C.M., Solem S.M., Diaz P.S., Arvin A.M. Investigation of varicella-zoster virus infection of lymphocytes by in situ hybridization. *J. Virol.* 1989; 63: 2392-2395.
21. Koropchak C.M., Graham G., Palmer J., Winsberg M., Ting S.F., Wallace M. et al. Investigation of varicella-zoster virus infection by polymerase chain reaction in the immunocompetent host with acute varicella. *J. Infect. Dis.* 1991; 163: 1016 – 1022.
22. Kelley R., Mancao M., Lee F., Sawyer M., Nahmias A., Nesheim S. Varicella in children with perinatally acquired human immunodeficiency virus infection. *J. Pediatr.* 1994; 124 (2): 271 – 273.
23. Schott G.D. Triggering of delayed-onset postherpetic neuralgia. *Lancet* 1998; 351: 419 – 420.
24. Amlic-Lefond C., Mackin G.A., Ferguson M., Wright R.R., Mahalingam R., Gilden D.H. Another case of virologically confirmed zoster sine herpete, with electrophysiologic correlation. *J. Neurovirol.* 1996; 2: 136 – 138.