

ISOLATION OF HERPES SIMPLEX VIRUS (HSV) FROM VESICULAR LESIONS

Nguyen Van Duc¹, Tran Minh Chau¹, Nguyen Thanh Nam², Nguyen Thi Thuong^{3*}

¹Hanoi Medical University - 1 Ton That Tung, Kim Lien Ward, Hanoi City, Vietnam

²National Hospital of Dermato-Venereology - 15A Phuong Mai, Kim Lien Ward, Hanoi City, Vietnam

³National Institute of Hygiene and Epidemiology - 1 Yersin, Hai Ba Trung Ward, Hanoi City, Vietnam

Received: 29/10/2025

Revised: 29/12/2025; Accepted: 11/04/2026

ABSTRACT

Objective: To isolate HSV from clinical samples of vesicular lesions on Vero cells.

Methods: A cross-sectional study was conducted on vesicular lesions suspected by HSV.

Results: Twenty strains of HSV (HSV-1 and HSV-2) were isolated on African green monkey kidney cells (Vero) from 37 clinical samples of facial and genital vesicular lesions suspected by HSV (54,1%). Among these, 90% of the strains were isolated from facial herpes. The positivity rate in the group that had not used specific antiviral drugs before sample collection was higher than that had used, although this difference was not statistically significant. The positivity rates also showed no significant difference between males and females. The study obtained 12 strains from patients who had not used specific any antiviral drugs (naïve), which could be used for identification of genetic polymorphisms of HSV strains circulating in Vietnam.

Conclusion: In this study, a relatively high positivity rate (54.1%) was observed when isolating HSV on Vero cells from vesicular skin lesions. Isolated virus strains can be submitted for phenotypic testing of determination of susceptibility of HSV to antiviral drugs and evaluation of the efficacy of new antiviral drugs.

Keywords: HSV, isolation, vesicle, Vero, ACV.

*Corresponding author

Email: ntt1@nihe.org.vn **Phone:** (+84) 836033071 **DOI:** 10.52163/yhc.v67iCD4.4817

PHÂN LẬP HERPES SIMPLEX VIRUS (HSV) TỪ TỔN THƯƠNG BỌNG NƯỚC

Nguyễn Văn Đức¹, Trần Minh Châu¹, Nguyễn Thành Nam², Nguyễn Thị Thường^{3*}

¹Trường Đại học Y Hà Nội - 1 Tôn Thất Tùng, P. Kim Liên, Tp. Hà Nội, Việt Nam
²Bệnh viện Da liễu Trung ương - 15A Phương Mai, P. Kim Liên, Tp. Hà Nội, Việt Nam
³Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương - 1 Yersin, P. Hai Bà Trưng, Tp. Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận: 29/10/2025
Ngày sửa: 29/12/2025; Ngày đăng: 11/04/2026

TÓM TẮT

Mục tiêu: Phân lập HSV từ bệnh phẩm tổn thương bong nước trên tế bào Vero.

Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang thực hiện trên các bệnh phẩm tổn thương bong nước nghi ngờ do HSV.

Kết quả: Hai mươi chủng HSV (HSV-1 và HSV-2) đã được phân lập trên tế bào thường trực thận khỉ xanh châu Phi (Vero) từ 37 bệnh phẩm tổn thương bong nước thể mặt và sinh dục nghi ngờ do HSV (54,1%), trong đó, 90% là các chủng được phân lập từ herpes thể mặt. Tỷ lệ dương tính của nhóm chưa sử dụng thuốc kháng virus đặc hiệu trước khi lấy bệnh phẩm cao hơn ở nhóm đã dùng thuốc mặc dù sự khác biệt này là không có ý nghĩa thống kê. Tỷ lệ dương tính cũng không khác biệt giữa nam và nữ. Nghiên cứu thu được 12 chủng từ bệnh nhân chưa sử dụng thuốc kháng virus đặc hiệu, đây là các chủng có thể sử dụng cho nghiên cứu phát hiện đa dạng di truyền của các chủng HSV lưu hành tại Việt Nam.

Kết luận: Trong nghiên cứu này, tỷ lệ dương tính khá cao (54,1%), khi phân lập HSV trên tế bào Vero từ các tổn thương bong nước ở da. Các chủng virus phân lập được có thể được dùng cho thử nghiệm xác định tính nhạy cảm của HSV với các thuốc kháng virus và hiệu quả của các thuốc kháng virus mới.

Từ khóa: HSV, phân lập, bong nước, Vero, ACV.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm Herpes simplex virus (HSV) là một nhiễm trùng phổ biến ở các khu vực trên thế giới. Năm 2020, 519 triệu người ở độ tuổi 15-49 nhiễm HSV-1 và 376,2 triệu người nhiễm HSV-2 thể sinh dục [1]. Sau nhiễm tiên phát, virus tồn tại suốt đời trong các hạch thần kinh giao cảm, thường là hạch giao cảm của dây thần kinh sinh ba (HSV-1) và hạch giao cảm cùng (HSV-2), có thể tái hoạt động với những cơ chế chưa rõ ràng nhưng có liên quan đến các yếu tố như căng thẳng, thức khuya, uống nhiều bia rượu, hoặc khi hệ miễn dịch suy giảm.

Herpes simplex virus (HSV) được con người nghiên cứu từ rất sớm và đầy đủ. Xét nghiệm phòng thí nghiệm chẩn đoán virus đa dạng và được phát triển cùng với sự phát triển của khoa học công nghệ. Các phương pháp phòng thí nghiệm phát hiện HSV bao gồm soi kính hiển vi để tìm tổn thương tế bào – tế bào to, tròn, sáng, tụ thành đám như hình chùm nho; phản ứng miễn dịch huỳnh quang phát hiện kháng nguyên đặc hiệu loài; nuôi cấy phân lập virus trên tế bào thường trực và sinh học phân tử - chủ yếu là phản ứng chuỗi polymerase (PCR) phát hiện DNA của HSV. Nuôi cấy phân lập virus trên tế bào, mặc dù có độ nhạy không cao, chi phí lớn, quy trình phức tạp, nhân viên cần có kỹ năng cao và được đào tạo chuyên sâu nhưng là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán HSV. Chu kỳ nhân lên của HSV trên nuôi cấy tế bào ngắn, khoảng 18 giờ nên có thể nhìn thấy huỷ hoại tế bào (CPE) từ sớm. Có thể phân lập HSV trên nhiều dòng tế bào nguồn gốc từ người hoặc khỉ, trong đó, Vero là dòng tế bào được sử dụng nhiều nhất để chẩn đoán và nghiên cứu trong các phòng thí nghiệm Y học. Nuôi cấy phân lập HSV đóng vai trò rất quan trọng, nó cho phép xác định sự có mặt của hạt virus sống trong mẫu bệnh phẩm, và có được chủng virus để làm cơ sở cho các

thử nghiệm khác như xác định tính nhạy cảm của HSV với các thuốc kháng virus (antivirogram – một thử nghiệm tương tự kháng sinh đồ trong vi khuẩn học), phát hiện các đa dạng di truyền hoặc đột biến kháng thuốc.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

Bệnh phẩm là những tổn thương bong nước, trên lâm sàng nghi do HSV, được lấy và chuyển đến Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Da liễu Trung ương để xét nghiệm tế bào, từ 03-06/2025. Sau xét nghiệm tế bào học, bất kể kết quả tế bào học thế nào, bệnh phẩm được giữ lạnh và chuyển đến phòng thí nghiệm để phân lập virus trong vòng 24 giờ.

- Tiêu chí lựa chọn

Bong nước da và niêm mạc nghi do nhiễm HSV trên lâm sàng, cả thể mặt và thể sinh dục, được xét nghiệm tế bào học tại Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Da liễu Trung ương, từ 03-06/2025, với kết quả nghi ngờ nhiễm HSV.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Đây là nghiên cứu mô tả cắt ngang, chọn mẫu thuận tiện.

Quy trình nghiên cứu

Thu thập và bảo quản bệnh phẩm

Cạo lớp tế bào đáy của tổn thương da nghi do HSV bằng dụng cụ chuyên dụng và cho vào ống chứa 3 ml môi trường vận chuyển virus và bảo quản ở 4-8oC, vận chuyển về phòng thí nghiệm để phân lập virus trong vòng 24 giờ. Tại phòng thí nghiệm, bệnh phẩm được xử lý bằng rử bỏ tâm bông, lọc 0,45µm, được chia ra 2 ống nhỏ vào bảo quản ở -80oC cho đến khi tiến hành phân lập.

*Tác giả liên hệ

Email: ntt1@nihe.org.vn Điện thoại: (+84) 836033071 DOI: 10.52163/yhc.v67iCD4.4817

Quy trình nuôi cấy

Tế bào Vero được nuôi trong các ống nhựa nuôi cấy tế bào (Nunc) 16x125 mm, sử dụng môi trường phát triển MEM (Minimum Essential Media, Gibco – Mỹ) có 10% huyết thanh bê bào thai (Gibco – Mỹ), ở 37oC, khí trường 5% CO₂. Cây bệnh phẩm khi tế bào kín 85-90%.

Xử lý bệnh phẩm: làm tan bằng bệnh phẩm ở nhiệt độ phòng dưới vòi nước chảy, lọc vô trùng 45 µm.

Trước khi cấy, rửa tế bào bằng môi trường MEM 0% FBS. Cấy 200 µl/ống tế bào, ủ ống nuôi cấy 1 tiếng ở 37°Cx5%-CO₂, cứ 15 phút lắc ống nuôi cấy một lần. Sau 1 tiếng, bỏ dịch cấy và thêm môi trường duy trì (MEM có 2% FBS) và ủ các ống nuôi cấy ở 37°Cx5%CO₂. Kiểm tra hằng ngày để phát hiện CPE. Kết luận là phân lập âm tính nếu sau 14 ngày không có CPE. Khi CPE đạt 80-90%, tiến hành gặt virus bằng cách nhẹ nhàng loại bỏ dịch nổi, thêm 1 ml dung dịch MEM 10% FBS, dùng pipette đánh nhẹ nhàng để tế bào bong khỏi bề mặt ống nuôi cấy và xé vào 2 ống

để cất giữ chủng ở -80°C cho tới khi làm các thử nghiệm tiếp theo. Nếu sau 1 tuần, CPE thưa, cấy chuyển sang một chai nuôi cấy 25 cm² (Nunc), gặt virus khi CPE đạt 80-90% - chủng P2. Kháng định HSV bằng PCR với môi đặc hiệu HSV và giải trình tự gen.

2.3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được chấp thuận bởi Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học, Bệnh viện Da liễu Trung ương, số 4/HĐĐĐ – BVDLTW. Thông tin người bệnh chỉ dùng cho mục đích nghiên cứu và chỉ được phép tiếp cận bởi những người trực tiếp tham gia nghiên cứu.

3. KẾT QUẢ

Trong nghiên cứu này, 37 mẫu đã được thu thập và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Thông tin người bệnh và kết quả nuôi cấy được đề cập tại Bảng 1.

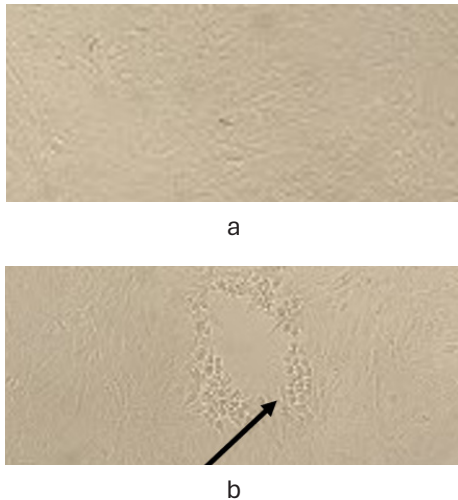
Bảng 1. Thông tin người bệnh và kết quả nuôi cấy

Mẫu	Tuổi	Giới	Thể lâm sàng	Kết quả	Chủng	Định type	Dùng ACV trước khi lấy mẫu
25001	30	Nam	Sinh dục	Âm tính			Chưa dùng
25002	1	Nữ	Ngón tay	Dương tính	P1	HSV-1	Chưa dùng
25003	14	Nam	Mặt	Dương tính	P1	HSV-1	Chưa dùng
25004	72	Nữ	Mặt	Âm tính			Chưa dùng
25005	29	Nữ	Mặt	Âm tính			Đã dùng
25006	45	Nữ	Mặt	Âm tính			Chưa dùng
25007	12	Nam	Mặt	Âm tính			Đã dùng
25008	37	Nữ	Sinh dục	Dương tính	P1	HSV-2	Đã dùng
25009	21	Nữ	Mặt	Dương tính	P1	HSV-1	Chưa dùng
25010	19	Nữ	Mặt	Dương tính	P1	HSV-1	Chưa dùng
25011	69	Nam	Mặt	Dương tính	P2	HSV-1	Chưa dùng
25012	3	Nam	Mặt	Dương tính	P1	HSV-1	Chưa dùng
25013	22	Nữ	Mặt	Dương tính	P1	HSV-1	Chưa dùng
25014	34	Nữ	Sinh dục	Dương tính	P2	HSV-2	Đã dùng
25015	19	Nữ	Mặt	Âm tính			Đã dùng
25016	39	Nữ	Mặt	Dương tính	P1	HSV-2	Đã dùng
25017	28	Nữ	Mặt	Âm tính			Chưa dùng
25018	20	Nam	Mặt	Dương tính	P1	HSV-1	Đã dùng
25019	52	Nam	Mặt	Âm tính			Đã dùng
25020	31	Nữ	Mặt	Âm tính			Đã dùng
25021	63	Nữ	Mặt	Dương tính	P1	HSV-1	Chưa dùng
25022	14	Nữ	Mặt	Âm tính			Chưa dùng
25023	8	Nam	Mặt	Dương tính	P1	HSV-1	Chưa dùng
25024	35	Nam	Mặt	Âm tính			Chưa dùng
25025	2	Nữ	Mặt	Âm tính			Đã dùng
25026	68	Nữ	Mặt	Dương tính	P2	HSV-1	Không có thông tin

Mẫu	Tuổi	Giới	Thể lâm sàng	Kết quả	Chủng	Định type	Dùng ACV trước khi lấy mẫu
25027	23	Nữ	Mặt	Âm tính			Chưa dùng
25028	11	Nữ	Mặt	Dương tính	P2	HSV-1	Chưa dùng
25029	75	Nữ	Mặt	Âm tính			Chưa dùng
25030	7	Nữ	Mặt	Âm tính			Chưa dùng
25031	25	Nữ	Mặt	Dương tính	P2	HSV-2	Chưa dùng
25032	26	Nữ	Mặt	Dương tính	P1	HSV-1	Chưa dùng
25033	26	Nam	Sinh dục	Âm tính			Chưa dùng
25034	26	Nam	Sinh dục	Âm tính			Chưa dùng
25035	31	Nam	Mặt	Dương tính	P1	HSV-1	Chưa dùng
25036	30	Nam	Mặt	Dương tính	P1	HSV-1	Chưa dùng
25037	46	Nữ	Mặt	Dương tính	P1	HSV-1	Chưa dùng

Người bệnh trong nghiên cứu có độ tuổi từ 1-72, tuổi trung vị 26. Có 24 bệnh nhân nữ (64,86%) và 13 bệnh nhân nam (35,14%). Ba mươi một bệnh phẩm thể mặt (83,78%), năm bệnh phẩm thể sinh dục (13,51%) và một mẫu từ ngón tay (2,7%).

Hai mươi mẫu có CPE (54,1%), tất cả được khẳng định là HSV bằng PCR với mỗi đặc hiệu HSV và giải trình tự gen (hình ảnh không được chỉ ra trong bài báo này). Hủy hoại tế bào là các tế bào sáng, to, tròn (Hình 1b, mũi tên). Có 17/31 mẫu thể mặt (54,84%), 2/5 mẫu thể sinh dục (40,0%) và 1/1 mẫu ở ngón tay dương tính. Tỷ lệ dương tính ở các bệnh nhân đã dùng thuốc là 40,0% (4/10) và chưa dùng thuốc là 57,7% (15/26). Nghiên cứu này gặt được 15 chủng P1 (75%), trong đó có 12 trường hợp chưa được điều trị thuốc kháng virus đặc hiệu trước khi lấy mẫu (80,0%).



Hình 1. (a) Tế bào Vero lành. (b) CPE của HSV trên tế bào Vero sau 24 giờ cấy (mũi tên).

4. BÀN LUẬN

Herpes simplex virus lây bệnh qua tiếp xúc trực tiếp, nhân lên trong tế bào biểu mô nơi virus xâm nhập, sau đó virus được vận chuyển tới hạch của tế bào thần kinh giao cảm theo hướng hướng tâm và ngủ tại đây ở dạng episome. Khi virus tái hoạt động, nó lại đi theo hướng ly tâm và gây tái nhiễm tại vị trí xâm nhập ban đầu hoặc ở gần đó. Thay đổi bệnh lý trong nhiễm HSV gồm những tế bào phồng to, tròn, nhân tế bào xuất hiện những nhiễm sắc thể đậm đặc và sau đó bị phát hủy. Trong bọt nước hầu như không có

hạt virus sống mà nó chủ yếu có mặt ở ranh giới giữa lớp tế bào chết và lành. Trong nghiên cứu này, bệnh phẩm được lấy bằng cách cạo ở đáy tổn thương, là nơi có nhiều hạt virus sống nhất, sau đó được cho vào môi trường vận chuyển đặc hiệu cho virus nói chung và HSV nói riêng nên tỷ lệ phân lập của nghiên cứu này có thể cao hơn một số nghiên cứu khác (54,1%).

Virus có thể tồn tại tiềm tàng suốt đời ở dạng episome của bào tương tế bào thần kinh giao cảm và nó có thể nhân lên, được đào thải và kể cả tái hoạt động không triệu chứng. Người mang virus do đó trở thành nguồn lây quan trọng và nhiễm HSV là một nhiễm trùng hay gặp. Ở một số cộng đồng, ghi nhận tỷ lệ mang kháng thể đặc hiệu kháng HSV-1 lên tới trên 95% [2]. Trong nghiên cứu này, bệnh nhân dương tính có độ tuổi từ 1-69, tuổi trung vị là 26, điều này hoàn toàn phù hợp với Y văn là herpes simplex virus gây bệnh trên cả trẻ em và người có tuổi.

Tỷ lệ dương tính chung là 54,1% (đã được khẳng định bằng PCR với mỗi đặc hiệu HSV và giải trình tự gen – hình ảnh không được chỉ ra trong bài báo này), trong đó ở nam là 61,54% và nữ là 50,0%, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (χ^2 , $p = 0,77$). Tỷ lệ dương tính của các mẫu thể mặt là 54,84%, cao hơn so với các mẫu thể sinh dục là 40,0%.

Nuôi cấy phân lập là kỹ thuật vàng trong chẩn đoán HSV. Có thể phân lập HSV từ tổn thương bọt nước mới, CPE có thể xuất hiện sớm, chỉ sau 1-2 ngày nuôi cấy do chu kỳ nhân của virus ngắn. Nuôi cấy phân lập có thể phát hiện những hạt virus có khả năng gây nhiễm thực sự. Herpes simplex virus là virus, đặc biệt lại có vỏ nên nó cần môi trường bảo quản và vận chuyển virus tối ưu. Trong nghiên cứu này, ngoài sử dụng môi trường bảo quản và vận chuyển virus thông thường, sorbitol được thêm vào để bảo vệ thành phần vỏ ngoài của virus. Đây cũng là một trong số các yếu tố góp phần làm tỷ lệ dương tính khá cao. Vero – tế bào thường trực thận khỉ xanh Châu Phi – là tế bào có phổ phân lập rộng, được sử dụng phổ biến, cho thấy hiệu quả tốt trong phân lập HSV. Độ đặc hiệu của nuôi cấy phân lập rất cao, đạt 100%, tương tự với nghiên cứu của P. V. Coyle và Soumyabrata Nag [3,4]. Tỷ lệ dương tính chung là 54,1% (20/37), trong nghiên cứu của P. V. Coyle và Soumyabrata Nag lần lượt là 16,42% (22/134) và 15,38% (8/52). Mặc dù cùng phân lập virus trên tế bào Vero, từ các tổn thương được chẩn đoán lâm sàng do HSV, tỷ lệ dương tính trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn đáng kể so với P. V. Coyle (χ^2 , $p < 0,01$) và Soumyabrata Nag (χ^2 , $p < 0,01$).

Các thể lâm sàng của HSV rất đa dạng như thể mặt, sinh dục, mắt, viêm não, herpes sơ sinh, herpes ngón tay (Whitlow), herpes ở vận động viên, herpes lan tỏa ở người

suy giảm miễn dịch và là tác nhân có thể lây truyền từ mẹ sang con ở cả 3 giai đoạn là trong tử cung, lúc sinh và thời kỳ chu sinh, trong đó, phân lập HSV từ tổn thương da là ít khó khăn nhất. Nghiên cứu này chỉ làm trên các mẫu tổn thương da và niêm mạc, trong đó phần lớn là herpes thể mắt, điều này cũng giải thích tỷ lệ phân lập của nghiên cứu này có thể cao hơn một số nghiên cứu khác.

Chẩn đoán HSV bằng lâm sàng không phải là phương pháp có độ đặc hiệu cao, tỷ lệ dương tính trong phân lập phụ thuộc vào thể lâm sàng, loại bệnh phẩm, tuổi của tổn thương, kinh nghiệm của bác sĩ, kinh nghiệm lấy bệnh phẩm, môi trường, điều kiện bảo quản vận chuyển bệnh phẩm, cách xử lý bệnh phẩm, độ nhạy của dòng tế bào phân lập, môi trường và thường quy nuôi cấy và các yếu tố khác. Điều này là một trong những lý do giải thích tỷ lệ nuôi cấy dương tính khác nhau giữa các nghiên cứu. Tỷ lệ dương tính của herpes thể mắt cao hơn thể sinh dục có thể do nhiễm HSV-2 có tỷ lệ thấp hơn nhiều so với HSV-1, những tổn thương ở cơ quan sinh dục thường gây quan ngại hơn so với các tổn thương thể mắt nên thường bệnh nhân có tổn thương sinh dục sẽ đi khám nhiều, sớm hơn và sử dụng ACV ngay tại các cơ sở điều trị phụ khoa. Tuy nhiên, sự khác biệt này là không có ý nghĩa thống kê (χ^2 , $p = 0.893$).

Thuốc đầu tay trong điều trị HSV là đồng phân acyclic guanosine, điển hình là acyclovir (ACV), ngoài ra còn có valacyclovir, gancyclovir, penciclovir... và có hiện tượng kháng chéo giữa các thuốc của cùng nhóm đồng phân. Acyclovir được phosphoryl hóa bởi enzyme thymidine kinase của virus, trở thành acyclovir triphosphate, là dạng có hoạt tính. Acyclovir triphosphate là chất ức chế cạnh tranh của enzyme DNA polymerase, làm kết thúc sớm quá trình tổng hợp DNA, ức chế sự nhân lên của virus. Acyclovir có nhiều dạng đóng gói như viên uống, mỡ bôi, dung dịch nhỏ mắt, thuốc tiêm... Thuốc có hiệu quả cao và ít tác dụng phụ, có thể sử dụng để điều trị từ các thể nhẹ trên da và niêm mạc, tới các trường hợp nặng như viêm não do HSV [5]. Thuốc cũng làm giảm thời gian bị bệnh và giảm tỷ lệ tái phát. Acyclovir được chứng minh làm giảm đáng kể tải lượng virus ở tổn thương và do đó có thể làm giảm độ nhạy của phương pháp nuôi cấy [6,7]. Điều này có thể giải thích tỷ lệ dương tính ở nhóm bệnh nhân chưa sử dụng ACV trước khi xét nghiệm là 57,7%, cao hơn nhóm đã sử dụng thuốc là 40,0%.

Các chủng HSV phân lập từ những bệnh nhân chưa sử dụng thuốc kháng virus đặc hiệu sẽ mở đường cho các nghiên cứu tiếp theo là xác định tính nhạy cảm của HSV với thuốc kháng virus, xác định các đa dạng di truyền của các chủng HSV lưu hành tại Việt Nam và đột biến kháng thuốc (nếu có kháng thuốc kiểu hình).

5. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ dương tính khá cao (54,1%), khi phân lập HSV (HSV-1 và HSV-2) trên tế bào Vero từ các tổn thương bong nước ở da, cả hai thể herpes thể mắt và herpes thể sinh dục. Kết quả của nghiên cứu này có thể là cơ sở cho một số nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Looker KJ, Johnston C, Welton NJ, James C, Vickerman P, Turner KME, et al. The global and regional burden of genital ulcer disease due to herpes simplex virus: a natural history modelling study. *BMJ Glob Health*. 2020;5(3):e001875.
- [2] de Oliveira Bonfim FF, Villar LM, Croda J, Pereira JG, Guimarães ACS, da Silva SR, et al. High silent prevalence of human herpesvirus 1 (HSV-1) infection affecting the indigenous reservation of the municipality of Dourados, Central-West Brazil. *BMC Infect Dis*. 2024 July 17;24(1):700.
- [3] Coyle PV, Desai A, Wyatt D, McCaughey C, O'Neill HJ. A comparison of virus isolation, indirect immunofluorescence and nested multiplex polymerase chain reaction for the diagnosis of primary and recurrent herpes simplex type 1 and type 2 infections. *J Virol Methods*. 1999 Dec;83(1-2):75-82.
- [4] Nag S, Sengupta M, Sarkar S, Ray Y, Chattopadhyay D, Sengupta M. Isolation, characterization and acyclovir susceptibility of herpes simplex virus isolates among immunocompromised patients. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*. 2021;42(1):19-23.
- [5] Harfouche M, AlMukdad S, Alareeki A, Osman AMM, Gottlieb S, Rowley J, et al. Estimated global and regional incidence and prevalence of herpes simplex virus infections and genital ulcer disease in 2020: mathematical modelling analyses. *Sex Transm Infect*. 2025 May 19;101(4):214-23.
- [6] Field HJ, Bell SE, Elion GB, Nash AA, Wildy P. Effect of acycloguanosine treatment of acute and latent herpes simplex infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 1979 Apr;15(4):554-61.
- [7] Lewis ME, Warren KG, Jeffrey VM, Tyrrell DL. Effects of prolonged cultivation in the presence of acyclovir on recovery of latent herpes simplex virus from human trigeminal ganglia. *Antimicrob Agents Chemother*. 1983 Mar;23(3):487-9.