

УДК 577.21; 578.27; 578.56; 578.82/83

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ОБНАРУЖЕНИИ И ГЕНОТИПИРОВАНИИ САПОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

© 2024 г. А. Ю. Кашников¹*, Н. В. Епифанова¹, Н. А. Новикова¹¹Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия

*e-mail: a.kashn@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.04.2024 г.

После доработки 08.05.2024 г.

Принята к публикации 06.05.2024 г.

Саповирус (род *Sapovirus*, семейство *Caliciviridae*), наряду с норовирусом, признается важной причиной острой кишечной инфекции человека. Штаммы саповирусов человека демонстрируют значительное генетическое разнообразие. В настоящее время показано существование 18 генотипов, объединенных в четыре геногруппы (GI, GII, GIV, GV). Для обнаружения саповирусов в клинических образцах широко используются методы ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) из-за их высокой чувствительности и широкой реактивности. Для дальнейшей характеристики выявленных саповирусов проводят генотипирование, которое является основой для построения системы классификации саповирусов человека. Цель данного обзора — освещение современных методов обнаружения и генотипирования саповирусов, основанных на ОТ-ПЦР и секвенировании вирусного генома.

Ключевые слова: саповирусы, ОТ-ПЦР, скрининг, генотипирование, геногруппа, генотип

DOI: 10.31857/S0042132424040043, EDN: PPNQYA

ВВЕДЕНИЕ

Острые кишечные инфекции (ОКИ) продолжают оставаться одной из наиболее серьезных проблем здравоохранения из-за их широкой распространенности и наносимого социально-экономического ущерба. В последние годы в мире возрос интерес к саповирусам, которым в России не уделяется достаточного внимания. Развитие молекулярных методов индикации возбудителей инфекционных заболеваний, в первую очередь полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), позволило установить важную роль саповирусов в этиологии ОКИ как среди детей, так и среди взрослых. В связи с этим целью данного обзора явилось освещение информации о современных молекулярно-генетических методах, с помощью которых можно обнаружить и генотипировать саповирусы человека.

ОТКРЫТИЕ САПОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА, ИХ ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ

Саповирусы впервые выявлены в 1977 г. в образцах фекалий детей в возрасте до 2 лет во

время вспышки гастроэнтерита в детском доме в г. Саппоро (Япония) с помощью электронной микроскопии. Свое название новые вирусы получили по месту их первоначальной идентификации (Chiba et al., 1979; Kogasaka et al., 1981). Эти вирусы имели характерную морфологию в виде звезды Давида, визуально были сходны с открытыми ранее норовирусами (рис. 1) и заметно отличались от других вирусов, выявляемых при электронной микроскопии в фекалиях пациентов с острым гастроэнтеритом (ОГЭ), — ротавирусов, аденовирусов, энтеровирусов. В течение последующих 5 лет в этом же детском доме саповирусы вызвали еще три вспышки ОГЭ. Штамм, выделенный в 1982 г., — Hu/SaV/Sapporo/1982/JPN — стал прототипным штаммом (Sapporovirus) группы SLV3 (Sapporo-like, Саппороподобные вирусы) (Chiba et al., 2000). В 2002 г. Международным комитетом по таксономии представители данной группы вирусов выделены в отдельный род *Sapovirus* семейства *Caliciviridae* (Nakanishi et al., 2011). Саповирусы — безоболочечные вирусы, капсид которых имеет диаметр 27–40 нм, икосаэдрическую симметрию ($T = 3$) и состоит из 90 димеров (180 молекул) капсидного белка VP1 (Vinjé et al., 2019).

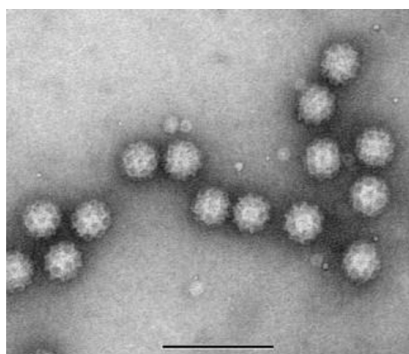


Рис. 1. Трансмиссионная электронная микрофотография частиц саповируса из клинических образцов. Масштабная шкала 100 нм. Источник: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/sapporo-virus>.

Геном саповируса человека представляет собой одноцепочечную молекулу РНК положительной полярности размером от 7.4 до 7.5 тыс. нуклеотидных оснований, 5'-конец которой связан с белком VPg, а 3'-конец имеет поли(А)-тракт. Геномная последовательность имеет две открытые рамки считывания ORFs (open reading frames). ORF1 кодирует 7 неструктурных белков (NS1-NS2-NS3-NS4-NS5-NS6 и NS7) или RdRp (RNA-dependent RNA-polymerase) и главный капсидный белок (VP1), а ORF2 кодирует второстепенный капсидный белок VP2 (Oka et al., 2015). На основании нуклеотидных последовательностей, кодирующих VP1, саповирусы человека подразделяют на четыре геногруппы: GI, GII, GIV и GV. В настоящее время геногруппы GI, GII и GV включают семь, восемь и два генотипа соответственно — GI.1–GI.7, GII.1–GII.8, GV.1–GV.2, геногруппа GIV содержит один генотип — GIV.1 (Oka et al., 2019). Причем саповирусы геногрупп GII и GIV выявлены только у человека, а геногрупп GI и GV обнаружены как у человека, так и у некоторых видов животных. Саповирусы геногрупп GIII и GV–GX1 выявлены у свиней (Scheuer et al., 2013), GV — у морских львов (Li et al., 2011), GXII — у норок (Birch et al., 2021), GXIII — у собак (Stamelou et al., 2022), GXIV, GXVI–GXIX — у летучих мышей (Yinda et al., 2017), GXV — у крыс (Firth et al., 2014) и GI — у шимпанзе (Mombo et al., 2014).

В течение нескольких десятилетий после открытия саповирусов и до начала 2000-х гг. для диагностики саповирусной инфекции применялись электронная микроскопия (ЭМ), обладающая относительно низкой чувствительностью, и иммуноферментный анализ (ИФА), имеющий существенные ограничения в связи с антигенным разнообразием саповирусов и отсутствием доступных тест-систем (Oka et al., 2015). С появлением ОТ-ПЦР возможности индикации

саповирусов существенно расширились. Так, сравнительное исследование (Pang et al., 2014) показало, что методом ПЦР саповирусы выявлены в 4.2% исследованных образцов фекалий больных с гастроэнтеритом, а методом ЭМ саповирус в данных образцах обнаружить не удалось. Чувствительность ИФА при выявлении саповирусов относительно однораундовой и вложенной ПЦР (Hansman et al., 2006) составляет только 60 и 25% соответственно.

Разработка молекулярно-генетических методов обнаружения саповирусов расширила возможности изучения их распространенности, которая существенно недооценивалась, по сравнению с другими кишечными вирусами (Becker-Dreps et al., 2020). По оценкам (Сагалова, 2009), молекулярно-генетические методы, в сравнении с традиционно применяемыми в учреждениях практического здравоохранения, позволяют более чем в 2 раза повысить эффективность диагностики кишечных вирусных инфекций у взрослых при спорадических заболеваниях и значительно улучшить этиологическую расшифровку вспышек (Сагалова, 2009).

Исследования с использованием ОТ-ПЦР, проведенные в России в начале 2000-х гг., показали относительно низкую инфицированность саповирусами больных с ОКИ. При изучении этиологии ОКИ у детей в московских инфекционных стационарах в 2002–2004 гг. обнаружены (Подколзин и др., 2004) саповирусы у 10 из 2080 обследованных больных (0.48% случаев). При обследовании (Сагалова и др., 2008) 753 больных ОГЭ в возрасте 15–90 лет, госпитализированных в инфекционное отделение стационара при спорадической заболеваемости в Челябинске, выявлены саповирусы у семи больных (0.996% случаев). В наших исследованиях, проведенных в 2003–2007 и в 2008–2009 гг., саповирусы у детей, госпитализированных с ОГЭ в Нижнем Новгороде, выявлены в единичных случаях — 3/2312 и 3/839 соответственно (Епифанова и др., 2009; Луковникова и др., 2009). Вероятно, полученные результаты обусловили отсутствие в последующие годы интереса у российских исследователей к изучению циркуляции саповирусов.

Исследования, проводимые за рубежом, показывают широкую распространенность саповирусной инфекции среди населения планеты. В частности, в Финляндии в 2009–2011 гг. саповирусы обнаружены в 3.1% образцов стула (31/999) (Pitkänen et al., 2022), в Германии в 2008–2009 гг. — в 8.8% (30/342) и в 2008–2018 гг. — в 2.0% (112/5555) (Mann et al., 2019), в Испании в 2010–2011 гг. — в 15.6% (417/2667) (Varela et al., 2019) и в 2018–2020 гг. — в 8% (203/2545) (De Oliveira-Tozetto et al., 2021), в Японии в 2009–2019 гг. — в 5.6% (318/5697)

(Hoque et al., 2022), в Перу в 2007–2011 гг. — в 11.5% (192/1669) (Sanchez et al., 2018), в Никарагуа в 2009–2010 гг. — 17% (57/330) (Bucardo et al., 2014), в Буркина-Фасо в 2009–2010 гг. — в 18.0% (56/309) (Matussek et al., 2015). По наблюдениям во Вьетнаме, после внедрения вакцинации против ротавирусной инфекции и снижения циркуляции ротавирусов доли саповирусов и норовирусов в этиологической структуре ОКИ имеют тенденцию к росту (Mai et al., 2023).

ВАРИАНТЫ ПЦР-МЕТОДИК ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ САПОВИРУСОВ

В связи с этим представляется значимым рассмотреть развитие методических подходов к выявлению и генотипированию саповирусов, основанных на ПЦР и секвенировании, для дальнейшего их использования в работе по изучению саповирусной инфекции в России на современном этапе.

Скрининг фекальных проб на присутствие саповирусов человека может быть осуществлен с помощью обычной (однораундовой), вложенной или гнездовой (двухраундовой) ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации и количественной ОТ-ПЦР (в режиме реального времени) (Oka et al., 2006; Okada et al., 2006; Mann et al., 2019; De Oliveira-Tozetto et al., 2021; Pitkänen et al., 2022).

Однораундовую ПЦР применяли в ряде скрининговых исследований на наличие саповирусов (Yan et al., 2003; Romani et al., 2012; Kumthip et al., 2020; Zaki et al., 2021). При этом, если в одних исследованиях однораундовый анализ ограничивался электрофоретической детекцией продуктов амплификации (Yan et al., 2003; Zaki et al., 2021), то в других — продукты ПЦР из образцов, положительных на РНК саповируса, далее генотипировали с помощью секвенирования (Romani et al., 2012; Kumthip et al., 2020). Однораундовую ОТ-ПЦР чаще проводят с использованием пары праймеров SLV5317 и SLV5749, нацеленных на фрагмент области гена вирусного капсида размером 434 н.о.

В ряде работ (Okada et al., 2006; Mann et al., 2019; De Oliveira-Tozetto et al., 2021) использована техника вложенной ОТ-ПЦР для обнаружения саповирусов.

Применение двухраундовой ПЦР позволяет увеличить чувствительность ПЦР, а также с помощью специфичных в отношении геногруппы праймеров получить во втором раунде ампликоны различной длины и таким образом осуществить дифференциацию саповирусов на ге-

ногруппы без последующего секвенирования ампликонов (Okada et al., 2006).

Однако, являясь более чувствительным и специфичным методом, чем однораундовая ОТ-ПЦР, вложенная ОТ-ПЦР требует больше времени, и при ее использовании присутствует риск контаминации (Oka et al., 2006). Поэтому для обнаружения саповирусов чаще используют ОТ-ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) — количественный метод, который отличается не только повышенной чувствительностью, но и быстротой исполнения (Oka et al., 2006), минимизированным риском контаминации продуктами ПЦР и позволяет измерить относительную величину вирусной нагрузки по числу циклов амплификации генетического материала. Известно, что генотипирование саповирусов более успешно при высокой вирусной нагрузке с пороговым циклом $Ct < 30$ (Sanchez et al., 2018; Varela et al., 2019; Becker-Dreps et al., 2020).

В последние годы при выявлении саповирусов исследователи сочетают ПЦР-РВ и двухраундовую ОТ-ПЦР (Sanchez et al., 2018; Mann et al., 2019; Su et al., 2023).

Для обнаружения саповирусов человека разработано множество праймеров. Эти праймеры предназначены для амплификации частичной области RdRp, зоны соединения RdRp-VP1 или частичной области VP1. Из-за высокого генетического разнообразия саповирусов большинство анализов включают множественные или вырожденные праймеры (Oka et al., 2015).

Для первоначального выявления саповирусов чаще всего применяют ОТ-ПЦР, нацеленную на участок соединения генов, кодирующих РНК-зависимую РНК-полимеразу и капсидный белок. Это обусловлено тем, что участок RdRp-VP1 является самым консервативным в геноме саповирусов человека, и праймеры, направленные на данный участок, позволяют выявлять широкий спектр генетически разнообразных штаммов саповирусов человека (Oka et al., 2015).

В 2006 г. разработана первая система ОТ-ПЦР в реальном времени, которая могла обнаруживать саповирусы человека всех геногрупп (Oka et al., 2006). Однако несколько штаммов саповируса (классифицированных как GI.2, GI.7, GII.7, GII.8 и GV.2) плохо выявлялись с помощью этой системы. Чтобы преодолеть эти технические ограничения, авторы (Oka et al., 2019) позднее модифицировали праймеры и зонды на основе доступных нуклеотидных последовательностей саповирусов 18 генотипов и разработали анализ ОТ-ПЦР в реальном времени на саповирусы человека с широким спектром реактивности (табл. 1).

Таблица 1. Праймеры и зонды, использованные для разработанного анализа ОТ-ПЦР в реальном времени на саповирус человека (Oka et al., 2019)

	Название	Последовательность (5'–3') (a)	Направление праймера (b)	Положение
Праймеры	HuSaV-F1	GGCHCTYGCCACCTAYAAYG	“+”	5079–5098 (d)
	HuSaV-F2	GACCARGCHCTCGCYACCTAYGA	“+”	5078–5100 (e)
	HuSaV-F3	GCWRYKGCWTGYTAYAACAGC	“+”	5121–5141 (f)
	HuSaV-R	CCYTCCATYTCAAACACTA	“–”	5159–5177 (d)
Зонды (c)	HuSaV-TP-a	FAM-CCNCCWATRWACCA-MGB-NFQ	“–”	5101–5114 (d)
	HuSaV-TP-b	FAM-CCNCCWACRWACCA-MGB-NFQ	“–”	5101–5114 (f)

Примечание: (a) — буквы в праймерах и зондах соответствуют нуклеотидам: H = A/C/T, Y = C/T, R = A/G, W = A/T, K = G/T, N = A/C/G/T; (b) — “+” — прямой; “–” — обратный; (c) — зонды помечены репортерным красителем FAM на 5'-конце и MGB-NFQ — на 3'-конце олигонуклеотида; (d) — положение нуклеотидов в полноразмерном геноме штамма GI.1 Manchester (X86560); (e) — положение нуклеотидов в полноразмерном геноме штамма GII.1 Bristol (AJ249939); (f) — положение нуклеотидов в полноразмерном геноме штамма GV.1 Ehime475 (DQ366344).

Таблица 2. Праймеры для детекции саповирусов человека по участку RdRp

Праймер	Последовательность (5'–3')	Направление праймера	Позиции в геноме	Номер регистрации
P289	TGACAATGTAATCATCACCATA	“–”	4663–4684	X86560
P290	GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC	“+”	4354–4376	X86560
Sapp35	GCAGTGGGTTTGAGACCAAAG	“–”	4740–4760	AB614356
Sapp36	GTTGCTGTTGGCATTAACA	“+”	4273–4291	X86560

Другой консервативный участок в геноме саповирусов человека — ген RdRp. На использовании данной области генома основан двухэтапный методический подход к диагностике норовирусной и саповирусной инфекций (Епифанова и др., 2009; Луковникова и др., 2009). Этот подход включает первоначальный скрининг фекальных образцов на наличие калицивирусов с использованием универсальной пары праймеров P290 и P289 (Jiang et al., 1999), фланкирующих участок гена полимеразы, с последующим тестированием положительных проб с помощью праймеров, специфичных в отношении норовирусов геногрупп I, II и саповирусов. Для индикации саповирусов используют праймеры Sapp35 и Sapp36 (Berke et al., 1997) (табл. 2).

В последние годы в связи с обнаружением новых генетических вариантов саповируса человека возросла необходимость их генетической классификации, для которой важна вариабель-

ность анализируемого участка генома. Поэтому, когда ставится задача молекулярной характеристики (генотипирования) саповирусов человека методом ОТ-ПЦР или секвенирования, предпочтение исследователей отдается области генома саповируса, кодирующей белок капсида VP1 (Oka et al., 2015). Данная область, являясь наиболее вариабельным участком генома (Oka et al., 2006), дает больше информации для генотипирования саповирусов, чем консервативная область RdRp, генетическая информация с которой менее разнообразна. Полная нуклеотидная последовательность гена VP1 нужна для генетической классификации саповирусов, для выявления новых геногрупп и генотипов (Wang et al., 2018; Mann et al., 2019; Oka et al., 2019; Yan et al., 2020; Zhuo et al., 2021; Su et al., 2023).

Кроме ограниченной вариабельности области RdRp, в настоящее время в распоряжении исследователей имеется значительно меньше

доступных полных последовательностей гена RdRp, по сравнению с геном VP1 (Oka et al., 2015). Однако дальнейшая характеристика разнообразия саповирусов будет основываться и на нуклеотидных последовательностях гена полимеразы, по аналогии с близким в таксономическом плане норовирусом, для генетической классификации которого применяется двойное генотипирование (Rahman et al., 2021).

ПОДБОР КОМБИНАЦИЙ ПРАЙМЕРОВ С ШИРОКИМ ДИАПАЗОНОМ ИНДИКАЦИИ САПОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА

Далеко не все из разработанных исследователями праймеров обладают широким диапазоном узнавания всего спектра нуклеотидных последовательностей саповирусов человека. Кроме этого, комплементарность большинства праймеров распространяется на геномы других кишечных вирусов (норовирусы, ротавирусы, астровирусы и аденовирусы) (Oka et al., 2015). Как отмечалось выше, недавно японскими исследователями предложен анализ ПЦР-РВ широкого диапазона, позволяющий выявлять все 18 идентифицированных в настоящее время генотипов саповируса человека (Oka et al., 2019). Однако слишком малый размер ампликонов, получаемых с помощью данного анализа (приблизительно 100 п.н.), не позволяет осуществлять генетическую характеристику выявленных саповирусов, для которой необходим анализ более протяженных участков генома.

В последующих исследованиях (Oka et al., 2020) проведена экспериментальная оценка реактивности одиннадцати различных систем для ПЦР-анализа с использованием опубликованных и недавно разработанных модифицированных праймеров и показано, что четыре системы с различными комбинациями праймеров амплифицировали все протестированные генотипы саповируса человека с использованием либо синтетической ДНК, либо кДНК, полученной из положительных на саповирусы человека образцов кала. Эти четыре ПЦР-анализа дали сходные результаты, когда кДНК находилась в диапазоне примерно от 10^7 до 10^2 копий/реакция (диапазон значений Ct: 18–37/реакция). Прямые праймеры в данных комбинациях комплементарны участку соединения RdRp-VP1, а обратные — последовательности гена VP1 (табл. 3).

Первая комбинация состоит из праймеров, разработанных ранее (Okada et al., 2006) применительно к мультиплексной ПЦР. Эти праймеры специфичны для геногрупп саповирусов человека, поскольку генерируют ПЦР-продукты

разной длины: GI (500 п.н.), GII (430 п.н.), GIV (360 п.н.) и GV (290 п.н.), что позволяет не только выявить саповирусы, но и дифференцировать их на геногруппы с помощью электрофореза в агарозном геле при мультиплексной постановке по размеру ПЦР-продуктов без необходимости секвенирования ампликонов.

Предложены (Oka et al., 2020) вторая, третья и четвертая комбинации праймеров. Вторая комбинация также позволяет получить ПЦР-продукты разного размера в зависимости от геногруппы: GI (450 п.н.), GII (380 п.н.), GIV (310 п.н.) и GV (240 п.н.).

Третья и четвертая комбинации амплифицируют продукты ПЦР одинакового размера (приблизительно 460 и 380 п.н. соответственно) независимо от геногруппы и генотипа и поэтому не позволяют с помощью электрофореза дифференцировать саповирусы человека на геногруппы в мультиплексной постановке. Причем, если в третьей комбинации три прямых праймера группоспецифичны, а обратный праймер универсален, то в четвертой комбинации оба праймера (прямой и обратный) универсальные.

Три последних комбинации праймеров модифицированы присоединением 5'-хвостовых последовательностей из 18 н.о. (5'-tgtaaacgacggccagt-3' — для прямых праймеров M13F и 5'-caggaacagctatgacc-3' — для обратных праймеров M13R). Цель модификации — уменьшение неспецифической амплификации и улучшение качества секвенирования продуктов ПЦР. Отмечено, что с применением данных комбинаций праймеров не наблюдается перекрестной реактивности с образцами, положительными на норовирусы GI и GII, астровирусы типов I и IV, ротавирусы A и C, аденовирусы человека типа 40/41. Данные группы праймеров могут использоваться в качестве улучшенных широкореактивных скрининговых тестов, а также для генотипирования путем амплификации фрагментов с последующим секвенированием (Oka et al., 2020).

СЕКВЕНИРОВАНИЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ САПОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА

Для детальной характеристики вируса его генотипируют с применением метода секвенирования. Секвенирование позволяет идентифицировать конкретный генетический вариант, а также новые, ранее не описанные, геноварианты вируса. Нарботанные в ОТ-ПЦР ампликоны после очистки в геле со специальным набором реагентов и мечения секвенируют в автоматическом генетическом анализаторе с использовани-

Таблица 3. Наборы праймеров с широким диапазоном узнавания для индикации и генотипирования саповирусов человека (Oka et al., 2020, с изменениями)

№ набора	Название праймера	Последовательность (5'–3')	Направление праймера	Локализация в геноме саповируса	Регистрационный номер GenBank
I	SV-F13	GAY YWG GCY CTC GCY ACC TAC	“+”	5074–5094	X86560
	SV-F14	GAA CAA GCT GTG GCA TGC TAC	“+”	5074–5094	X86560
	SV-G1-R	CCC BGG TGG KAY GAC AGA AG	“–”	5561–5580	X86560
	SV-G2-R	CCA NCC AGC AAA CAT NGC RCT	“–”	5483–5503	AY237420
	SV-G4-R	GCG TAG CAG ATC CCA GAT AA	“–”	5413–5432	DQ058829
	SV-G5-R	TTG GAG GWT GTT GCT CCT GTG	“–”	5384–5404	AY646856
II	M13F-SaV 1245Rfwd	TAG TGT TTG ARA TGG AGG G	“+”	5159–5177	X86560
	M13R-SV-G1-R	CCC BGG TGG KAY GAC AGA AG	“–”	5561–5580	X86560
	M13R-SV-G2-R	CCA NCC AGC AAA CAT NGC RCT	“–”	5483–5503	AY237420
	M13R-SV-G4-R	GCG TAG CAG ATC CCA GAT AA	“–”	5413–5432	DQ058829
	M13R-SV-G5-R	TTG GAG GWT GTT GCT CCT GTG	“–”	5384–5404	AY646856
III	M13F-HuSaV-F1	GGC HCT YGC CAC CTA YAA YG	“+”	5079–5098	X86560
	M13F-HuSaV-F2	GAC CAR GCH CTC GCY ACC TAY GA	“+”	5078–5100	AJ249939
	M13F-HuSaV-F3	GCW RYK GCW TGY TAY AAC AGC	“+”	5121–5141	DQ366344
	M13R-HuSaV-5498R	CCC CAN CCN GCV HAC AT	“–”	5482–5498	X86560
IV	M13F-HuSaV-5159F	TAG TGT TTG ARA TGG ARG G	“+”	5159–5177	X86560
	M13R-HuSaV-5498R	CCC CAN CCN GCV HAC AT	“–”	5482–5498	X86560

Примечание: H = A/C/T, Y = C/T, R = A/G, W = A/T, K = G/T, N = A/C/G/T.

ем, как правило, тех же, что и в ПЦР, прямых и обратных праймеров. Данные секвенирования вначале анализируют в целях поиска родственных им последовательностей, сопоставляя и выравнивая полученные последовательности с зарегистрированными в GenBank с помощью программ Clustal X 2.0 (Larkin et al., 2007), MEGA X (Kumar et al., 2018) или других. Затем проводят филогенетический анализ исследуемых саповирусов, позволяющий на основе сравнения установленных и референсных последовательностей гена капсидного белка разделить их на кластеры, соответствующие геногруппе или генотипу саповируса (De Oliveira-Tozetto et al., 2021). Филогенетические деревья демонстрируют степень родства между геномами саповирусов человека, относящимися к разным геногруппам и генотипам, которые выделены в разных странах, и отражают глобальную циркуляцию и широкое распространение саповирусов среди населения планеты.

Недавно сообщалось о применении независимых от праймеров подходов метагеномного секвенирования для идентификации саповирусов человека. Метагеномный анализ позволяет не только выявить саповирусы разных геногрупп, но и получить их полногеномные нуклеотидные последовательности при исследовании образцов стула детей с ОГЭ в провинции Цзянсу, Китай (Li et al., 2020), при вспышках и sporadических случаях ОГЭ в США, Никарагуа, Перу и Гватемале (Diez-Valcarce et al., 2018), а также при обследовании детей с острым вялым параличом в Нигерии (George et al., 2024). Вирусная метагеномика оказалась эффективным методом обнаружения новых вирусов и расширения понимания разнообразия вирусов, обнаруженных в клинических образцах, включая идентификацию новых штаммов саповирусов человека и животных (Balázs et al., 2024). Анализ полного генома, а не коротких последовательностей, позволяет отслеживать передачу вирусной

инфекции и проводить эффективные эпидемиологические исследования (Yang et al., 2022; George et al., 2024). В целях диагностики метагеномный анализ пока не получил широкого применения, но может быть использован в будущем, когда стоимость такого анализа и обработки данных будет сравнима с традиционными ПЦР-методами.

К настоящему времени с помощью специально разработанных наборов праймеров, а также на основе высокопроизводительного секвенирования амплифицированы и секвенированы полные геномы ряда саповирусов человека (Yan et al., 2020; Li et al., 2022; Ji et al., 2024). По состоянию на 01.04.2024 г. в GenBank находятся 155 нуклеотидных последовательностей полных (почти полных) геномов саповирусов человека, относящихся к геногруппе GI, 81 — к GII, 42 — к GIV и 13 — к GV (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

В последние годы продолжается и развитие иммунологических подходов для диагностики вирусных инфекций. В частности, недавно появился новый усовершенствованный вариант метода иммунохроматографии LFIC (lateral flow immunochromatography) для выявления норовирусов (Gao et al., 2024). Он разработан в целях преодоления недостатков старого метода, связанных с низкой чувствительностью и отсутствием возможности количественного определения вирусной нагрузки. Новая версия отличается быстротой, точностью измерения и большей чувствительностью, по сравнению со старой версией LIFC и может стать многообещающим вариантом для тестирования на месте оказания медицинской помощи в будущем (Gao et al., 2024). Этот инструмент, вероятно, может быть модифицирован и для быстрой диагностики саповирусной инфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с появлением в последние годы новых более чувствительных молекулярно-генетических методов, возросла частота выявления при диарейных заболеваниях саповирусов, отличающихся широким разнообразием генетических вариантов. К настоящему времени открыто 18 генотипов саповирусов человека, относящихся к четырем геногруппам и подобраны четыре комбинации праймеров, спектр реактивности которых распространяется на все 18 аннотированных в GenBank геновариантов. С данными комбинациями праймеров не наблюдается перекрестной реактивности с образцами, положительными на другие кишечные вирусы, и в настоящее время их можно использовать не только в качестве более совершенных скрининговых

тестов, но и для более успешного генотипирования саповирусов человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Епифанова Н.В., Луковникова Л.Б., Новикова Н.А. Молекулярная диагностика норовирусной и саповирусной инфекции у детей с гастроэнтеритом // Сб. науч. тр. / Ред. Е.И. Ефимов. НН: ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной, 2009. С. 133–137.
- Луковникова Л.Б., Епифанова Н.В., Новиков Д.В., Новикова Н.А. Генетическое разнообразие калицивирусов человека, обнаруженных у детей с гастроэнтеритом в Нижнем Новгороде // Вopr. вирусол. 2009. Т. 54 (6). С. 24–28 [Lukovnikova L.B., Epifanova N.V., Novikov D.V., Novikova N.A. Genetic diversity of human caliciviruses found in children with gastroenteritis in Nizhny Novgorod // Vopr. Virol. 2009. T. 54 (6). C. 24–28. In Russ].
- Подколзин А.Т., Мухина А.А., Шипулин Г.А. и др. Первый опыт выявления саповирусов у детей с острыми кишечными инфекциями в Москве в 2002–2003 гг. // Генодиагностика инфекционных болезней. Т. 2 (5) / Мат. V Всерос. науч.-практ. конф. (Москва, 19–21 октября 2004 г.). М.: Медицина для всех, 2004. С. 109–110 [Podkolzin A.T., Mukhina A.A., Shipulin G.A. et al. The first experience of identifying sapoviruses in children with acute intestinal infections in Moscow in 2002–2003 // Gene diagnostics of infectious diseases. 2004. V. 2 (5). P. 109–110. In Russ.].
- Сагалова О.И. Клинико-иммунологическая характеристика кишечных инфекций вирусной этиологии у взрослых // Автореф. дис... док. мед. наук. М.: РМАНПО, 2009. 43 с. <https://viewer.rsl.ru/ru/rsl01003479765?page=1&rotate=0&theme=white>
- Сагалова О.И., Подколзин А.Т., Абрамичева Н.Ю. и др. Роль саповирусов в этиологии диарейных заболеваний у взрослых // 75 лет кафедры инфекционных бо-

- лезней РМАНПО / Сб. науч. тр. М.: РМАНПО, 2008. С. 125–128.
- Balázs B., Boros Á., Pankovics P. *et al.* Detection and complete genome characterization of a genogroup X (GX) sapovirus (family Caliciviridae) from a golden jackal (*Canis aureus*) in Hungary // *Arch. Virol.* 2024. V. 169 (5). P. 100.
<https://doi.org/10.1007/s00705-024-06034-2>
- Becker-Dreps S., González F., Bucardo F. Sapovirus: an emerging cause of childhood diarrhea // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2020. V. 33. P. 388–397.
<https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000671>
- Berke T., Golding B., Jiang X. *et al.* Phylogenetic analysis of the caliciviruses // *J. Med. Virol.* 1997. V. 52 (4). P. 419–424.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9071\(199708\)52:4<419::aid-jmv13>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(199708)52:4<419::aid-jmv13>3.0.co;2-b)
- Birch J., Leijon M., Nielsen S.S. *et al.* Visualization of intestinal infections with astro- and sapovirus in mink (*Neovison vison*) kits by *in situ* hybridization // *FEMS Microbes.* 2021. V. 2. P. xtab005.
<https://doi.org/10.1093/femsmc/xtab005>
- Bucardo F., Reyes Y., Svensson L., Nordgren J. Predominance of norovirus and sapovirus in Nicaragua after implementation of universal rotavirus vaccination // *PLoS One.* 2014. V. 9 (5). P. 1–8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098201>
- Chiba S., Sakuma Y., Kogasaka R. *et al.* An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home // *J. Med. Virol.* 1979. V. 4. P. 249–254.
<https://doi.org/10.1002/jmv.1890040402>
- Chiba S., Nakata S., Numata-Kinoshita K., Honma S. Sapporo virus: history and recent findings // *J. Infect. Dis.* 2000. V. 181 (2). P. 303–308.
<https://doi.org/10.1086/315574>
- De Oliveira-Tozetto S., Santiso-Bellón C., Ferrer-Chirivella J. M. *et al.* Epidemiological and genetic characterization of sapovirus in patients with acute gastroenteritis in Valencia (Spain) // *Viruses.* 2021. V. 13 (2). P. 184.
<https://doi.org/10.3390/v13020184>
- Diez-Valcarce M., Castro C.J., Marine R.L. *et al.* Genetic diversity of human sapovirus across the Americas // *J. Clin. Virol.* 2018. V. 104. P. 65–72.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.05.003>
- Firth C., Bhat M., Firth M.A. *et al.* Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City // *mBio.* 2014. V. 5 (5). P. e01933-14.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01933-14>
- Gao J., Xue L., Li Y. *et al.* Rapid and sensitive lateral flow biosensor for the detection of GII human norovirus based on immunofluorescent nanomagnetic microspheres // *J. Med. Virol.* 2024. V. 96 (3). P. e29487.
<https://doi.org/10.1002/jmv.29487>
- George U.E., Faleye T.O.C., De Coninck L. *et al.* Metagenomic detection and genetic characterization of human sapoviruses among children with acute flaccid paralysis in Nigeria // *Pathogens.* 2024. V. 13 (3). P. 264.
<https://doi.org/10.3390/pathogens13030264>
- Hansman G.S., Guntapong R., Pongsuwanna Y. *et al.* Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens // *Arch. Virol.* 2006. V. 151. P. 551–561.
<https://doi.org/10.1007/s00705-005-0630-x>
- Hoque S.A., Nishimura K., Thongprachum A. *et al.* An increasing trend of human sapovirus infection in Japan, 2009 to 2019: an emerging public health concern // *J. Infect. Public. Health.* 2022. V. 15 (3). P. 315–320.
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2022.01.019>
- Ji X., Guo C., Dai Y. *et al.* Genomic characterization and molecular evolution of sapovirus in children under 5 years of age // *Viruses.* 2024. V. 16 (1). P. 146.
<https://doi.org/10.3390/v16010146>
- Jiang X., Huang P.W., Zhong W.M. *et al.* Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR // *J. Virol. Methods.* 1999. V. 83 (1–2). P. 145–154.
[https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(99\)00114-7](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(99)00114-7)
- Kogasaka R., Nakamura S., Chiba S. *et al.* The 33- to 39-nm virus-like particles, tentatively designed as Sapporo agent, associated with an outbreak of acute gastroenteritis // *J. Med. Virol.* 1981. V. 8 (3). P. 187–193.
- Kumar S., Stecher G., Li M. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35 (6). P. 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kumthip K., Khamrin P., Ushijima H. *et al.* Genetic recombination and diversity of sapovirus in pediatric patients with acute gastroenteritis in Thailand, 2010–2018 // *PeerJ.* 2020. V. 8. P. e8520.
<https://doi.org/10.7717/peerj.8520>
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0 // *Bioinformatics.* 2007. V. 23 (21). P. 2947–2948.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Li L., Shan T., Wang C. *et al.* The fecal viral flora of California sea lions // *J. Virol.* 2011. V. 85 (19). P. 9909–9917.
<https://doi.org/10.1128/JVI.05026-11>
- Li W., Dong S., Xu J. *et al.* Viral metagenomics reveals sapoviruses of different genogroups in stool samples from children with acute gastroenteritis in Jiangsu, China // *Arch. Virol.* 2020. V. 165 (4). P. 955–958.
<https://doi.org/10.1007/s00705-020-04549-y>
- Li T.C., Kataoka M., Doan Y.H. *et al.* Characterization of a human sapovirus genotype GII.3 strain generated by a reverse genetics system: VP2 is a minor structural protein of the virion // *J. Viruses.* 2022. V. 14 (8). P. 1649.
<https://doi.org/10.3390/v14081649>
- Mai C.T.N., Ly L.T.K., Doan Y.H. *et al.* Prevalence and characterization of gastroenteritis viruses among hospitalized children during a pilot rotavirus vaccine introduction in Vietnam // *Viruses.* 2023. V. 15 (11). P. 2164.
<https://doi.org/10.3390/v15112164>

- Mann P., Pietsch C., Liebert U.G. Genetic diversity of sapoviruses among inpatients in Germany, 2008–2018 // *Viruses*. 2019. V. 11 (8). P. 726.
<https://doi.org/10.3390/v11080726>
- Matussek A., Dienus O., Djeneba O. et al. Molecular characterization and genetic susceptibility of sapovirus in children with diarrhea in Burkina Faso // *Infect. Genet. Evol.* 2015. V. 32. P. 396–400.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.039>
- Mombo I.M., Berthet N., Bouchier C. et al. Characterization of a genogroup I sapovirus isolated from chimpanzees in the Republic of Congo // *Genome Announc.* 2014. V. 2 (4). P. e00680-14.
<https://doi.org/10.1128/genomeA.00680-14>
- Nakanishi K., Tatsumi M., Kinoshita-Numata K. et al. Full sequence analysis of the original Sapporo virus // *Microbiol. Immunol.* 2011. V. 55 (9). P. 657–660.
<https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00358.x>
- Oka T., Katayama K., Hansman G.S. et al. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction // *J. Med. Virol.* 2006. V. 78. P. 1347–1353.
<https://doi.org/10.1002/jmv.20699>
- Oka T., Wang Q., Katayama K., Saijb L.J. Comprehensive review of human sapoviruses // *Clin. Microbiol. Rev.* 2015. V. 28 (1). P. 32–53.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00011-14>
- Oka T., Iritani N., Yamamoto S.P. et al. Broadly reactive real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of human sapovirus genotypes // *J. Med. Virol.* 2019. V. 91 (3). P. 370–377.
<https://doi.org/10.1002/jmv.25334>
- Oka T., Yamamoto S.P., Iritani N. et al. Polymerase chain reaction primer sets for the detection of genetically diverse human sapoviruses // *Arch. Virol.* 2020. V. 165 (10). P. 2335–2340.
<https://doi.org/10.1007/s00705-020-04746-9>
- Okada M., Yamashita Y., Oseto M., Shinozaki K. The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers // *Arch. Virol.* 2006. V. 151 (12). P. 2503–2509.
<https://doi.org/10.1007/s00705-006-0820-1>
- Pang X.L., Preiksaitis J.K., Lee B.E. Enhanced enteric virus detection in sporadic gastroenteritis using a multi-target real-time PCR panel: a one-year study // *J. Med. Virol.* 2014. V. 86. P. 1594–1601.
<https://doi.org/10.1002/jmv.23851>
- Pitkänen O., Markkula J., Hemming-Harlow M. Sapovirus, norovirus and rotavirus detections in stool samples of hospitalized Finnish children with and without acute gastroenteritis // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2022. V. 41 (5). P. e203–e207.
<https://doi.org/10.1097/INF.0000000000003493>
- Rahman R., Rahman S., Afrad Md.M.H. et al. Epidemiology and genetic characterization of human sapovirus among hospitalized acute diarrhea patients in Bangladesh, 2012–2015 // *J. Med. Virol.* 2021. V. 93 (11). P. 6220–6228.
<https://doi.org/10.1002/jmv.27125>
- Romani S., Azimzadeh P., Mohebbi S.R. et al. Prevalence of sapovirus infection among infant and adult patients with acute gastroenteritis in Tehran, Iran // *Gastroenterol. Hepatol. Bed. Bench.* 2012. V. 5 (1). P. 43–48.
- Sanchez G.J., Mayta H., Pajuelo M.J. et al. Epidemiology of sapovirus infections in a birth cohort in Peru // *Clin. Infect. Dis.* 2018. V. 66 (12). P. 1858–1863.
<https://doi.org/10.1093/cid/cix1103>
- Scheuer K.A., Oka T., Hoet A.E. et al. Prevalence of porcine noroviruses, molecular characterization of emerging porcine sapoviruses from finisher swine in the United States, and unified classification scheme for sapoviruses // *J. Clin. Microbiol.* 2013. V. 51 (7). P. 2344–2353.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00865-13>
- Stamelou E., Giantsis I.A., Papageorgiou K.V. et al. First report of canine astrovirus and sapovirus in Greece, hosting both asymptomatic and gastroenteritis symptomatic dogs // *Virol. J.* 2022. V. 19 (1). P. 58.
<https://doi.org/10.1186/s12985-022-01787-1>
- Su L., Mao H., Sun Y. et al. The analysis of the genotype of sapovirus outbreaks in Zhejiang Province // *Virol. J.* 2023. V. 20. P. 268.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3049589/v1>
- Varela M.F., Rivadulla E., Lema A. et al. Human sapovirus among outpatients with acute gastroenteritis in Spain: a one-year study // *Viruses*. 2019. V. 11 (2). P. 144.
<https://doi.org/10.3390/v11020144>
- Vinje J., Estes M.K., Esteves P. et al. ICTV virus taxonomy profile: Caliciviridae // *J. Gen. Virol.* 2019. V. 100 (11). P. 1469–1470.
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.001332>
- Wang J., Li Y., Kong X. et al. Two gastroenteritis outbreaks caused by sapovirus in Shenzhen, China // *J. Med. Virol.* 2018. V. 90 (11). P. 1695–1702.
<https://doi.org/10.1002/jmv.25236>
- Yan H., Yagyu F., Okitsu S. et al. Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR // *J. Virol. Methods*. 2003. V. 114 (1). P. 37–44.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.08.009>
- Yan Y., Li Y., Shi W. et al. An outbreak of gastroenteritis associated with a novel GII.8 sapovirus variant-transmitted by vomit in Shenzhen, China, 2019 // *BMC Infect. Dis.* 2020. V. 20 (1). P. 911.
<https://doi.org/10.1186/s12879-020-05643-x>
- Yang S., He Y., Zhang J. et al. Viral metagenomics reveals diverse viruses in the fecal samples of children with diarrhea // *Virol. Sin.* 2022. V. 37 (1). P. 82–93.
<https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.01.012>
- Yinda C.K., Conceição-Neto N., Zeller M. et al. Novel highly divergent sapoviruses detected by metagenomics analysis in straw-colored fruit bats in Cameroon // *Emerg. Microbes Infect.* 2017. V. 6. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1038/emi.2017.20>
- Zaki M.E.S., Shrief R., Hassan R.H. Molecular detection of sapovirus in children under five years with acute gastroenteritis in Mansoura, Egypt between January 2019 and February 2020 // *F1000Res*. 2021. V. 10. P. 123.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.29991.4>
- Zhuo R., Ding X., Freedman S.B. et al. Molecular epidemiology of human sapovirus among children with acute gastroenteritis in Western Canada // *J. Clin. Microbiol.* 2021. V. 59 (10). P. e00986-21.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00986-21>

Molecular Genetic Methods for Detection and Genotyping of Human Sapoviruses (Review)

A. Yu. Kashnikov^{a, *}, N. V. Epifanova^a, N. A. Novikova^a

^a*Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia*

**e-mail: a.kashn@yandex.ru*

Sapovirus (genus *Sapovirus*, family Caliciviridae), along with norovirus, is recognized as an important cause of acute intestinal infection (AEI) in humans. Human sapovirus strains exhibit significant genetic diversity. Currently, the existence of 18 genotypes, combined into four genogroups (GI, GII, GIV, GV), has been shown. Reverse transcription-PCR (RT-PCR) techniques are widely used for the detection of sapoviruses in clinical samples due to their high sensitivity and broad reactivity. To further characterize the identified sapoviruses, genotyping is carried out, which is the basis for constructing a classification system for human sapoviruses. The purpose of this review was to highlight modern methods for the detection and genotyping of sapoviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction and viral genome sequencing.

Keywords: sapoviruses, RT-PCR, screening, genotyping, genogroup, genotype