



УДК 578.4+578.7

DOI <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2020.31.93>

Исследование наличия ДНК папилломавирусов человека (ВПЧ) в бытовых стоках

А. С. Столбиков^{1,2}, Р. К. Салаяев¹, Н. И. Рекославская¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия

²Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

E-mail: valkir5@yandex.ru

Аннотация. Приведены данные о первичном исследовании бытовых стоков из ряда источников в г. Иркутске на предмет нахождения в них ДНК некоторых патогенных типов вируса папилломы человека (ВПЧ). Идентификация проведена с помощью ПЦР-метода с использованием 3 пар праймеров, специфичных к нуклеиновым последовательностям, кодирующим основной структурный компонент капсида папилломавирусов – белок L1. Установлено присутствие ДНК двух высокопатогенных типов ВПЧ в бытовых стоках.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, бытовые стоки

Для цитирования: Столбиков А. С., Салаяев Р. К., Рекославская Н. И. Исследование наличия ДНК папилломавирусов человека (ВПЧ) в бытовых стоках // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2020. Т. 31. С. 93–98. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2020.31.93>

Согласно экспертной оценке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), заболевания, вызванные группой вирусов папилломы человека, представляют собой широко распространённую во всём мире вирусную инфекцию половых путей. К настоящему времени выявлено около 200 типов ВПЧ, из которых почти 40 типов являются высокоонкогенными. Считается, что до 70 % всех случаев рака и предраковых патологических состояний шейки матки возникают в результате заражения человека в основном двумя высокоонкогенными типами ВПЧ16 и ВПЧ18. Рак шейки матки – второй по распространённости вид рака среди женщин, проживающих в развивающихся странах. Согласно оценкам, в 2018 г. число новых случаев в этих странах составило 570 тыс. (84 % от всех новых случаев в мире), от рака шейки матки умерли около 311 тыс. женщин, причём более 85 % этих смертей произошли в странах с низким и средним уровнем доходов [Human papillomavirus ... , 2019].

ВПЧ присуща достаточно высокая скорость распространения, что может привести к пандемии папилломатозов. Известно, что папилломавирусы достаточно устойчивы к воздействию внешних факторов и поэтому обладают значительными возможностями для длительного сохранения в водной среде. Хотя заражение ВПЧ через контакт с водной средой на сегодняшний день не имеет чёткого научного подтверждения, специалисты всерьёз обес-

покоены фактами нахождения ДНК вирусов папилломы человека в различных водных объектах и бытовых стоках. Исследования вод в расположенных в пределах поселений водоёмах и в бытовых стоках на предмет наличия в них ДНК папилломавирусов (ВПЧ) различных типов стали предприниматься относительно недавно. Весьма важно изучить, насколько вероятно заражение человека папилломавирусами при прямом контакте воды, содержащей ВПЧ, с кожными покровами либо при употреблении её в качестве питьевой.

Исследования, проведённые в Италии, США и других странах, показали присутствие в сточных водах вирусов папилломы человека, отмечены не только широкий спектр встречающихся ВПЧ, включающий редкие и новые типы, но также высокая частота встречаемости высокопатогенных типов этих вирусов [Symonds, Griffin, Breitbart, 2009; Raw sewage harbors ..., 2011; Mucosal and cutaneous human papillomaviruses ..., 2013; Fratini, Di Bonito, La Rosa, 2014; A large spectrum ... , 2015]. Ситуация, связанная с широким распространением ВПЧ, обуславливает необходимость оценить потенциальный риск заражения в связи с вирусным загрязнением водных стоков и водоёмов.

В настоящей работе представлены первые результаты исследований бытовых стоков на предмет наличия в них ДНК высокопатогенных типов папилломавирусов человека.

В ходе работы были исследованы пробы бытовых стоков из ряда источников. Отбор и подготовка образцов бытовых стоков проводились согласно методике, включающей предварительную очистку от нерастворимых частиц и бактериального загрязнения по следующим этапам: пробы помещались в стерильные пластиковые ёмкости объёмом 250 мл с завинчивающейся крышкой, при отборе нескольких образцов из одного водного объекта соблюдался интервал 5 мин; закупоренные ёмкости обрабатывались с поверхности дезинфицирующими растворами (этиловый спирт 96 %, перекись водорода); после маркировки ёмкости упаковывались в непрозрачный контейнер; от крупных частиц пробы очищались путём центрифугирования (4000g, 15 мин при 4 °С) в центрифужных пробирках объёмом 40 мл; от мелких частиц и бактерий пробы очищались путём центрифугирования (10 000g, 15 мин при 4 °С) в центрифужных пробирках объёмом 40 мл; окончательная очистка проведена с помощью фильтрации через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм; очищенные образцы хранились в пробирках объёмом 50 мл, которые при необходимости помещались в низкотемпературный холодильник (-80 °С).

Определение наличия в водных образцах ДНК высокопатогенных типов папилломавирусов человека проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). После анализа публикаций в качестве специфических к различным типам ВПЧ праймеров были выбраны праймеры, специфичные к нуклеиновым последовательностям, кодирующим основной структурный компонент капсида папилломавирусов белок L1. В отсутствие информации о том, какие штаммы ВПЧ распространены в регионе, было принято решение использовать праймеры GP5+/6+ (150 п. н.), созданные к высококонсер-

вативным участкам HPV11 L1 и HPV6 L1 [The use of general primers ..., 1995]. Также использовались праймеры к HPV16 L1 (isolate European German 131 type, GenBank: AF536179.1) F 5'– ССТАТТGGTTACAAC-GAGCACAGGG-3', R 5'– ССТТТАААТТТАСТТСССАААААGТG-3' (430 п.н.). Полимеразную цепную реакцию осуществляли в ДНК-амплификаторе GENE CYCLER (Bio-Rad, Япония) и Mastercycler Persona (Eppendorf, Германия) с использованием набора для ПЦР ReadyMix (Sigma-Aldrich, США) в следующем температурном режиме: иницирующая денатурация (94 °С, 5 мин); 40 циклов амплификации: денатурация (95 °С, 45 с), отжиг праймеров (55 °С, 45 с) и элонгация (72 °С, 45 с); заключительная элонгация (72 °С, 5 мин).

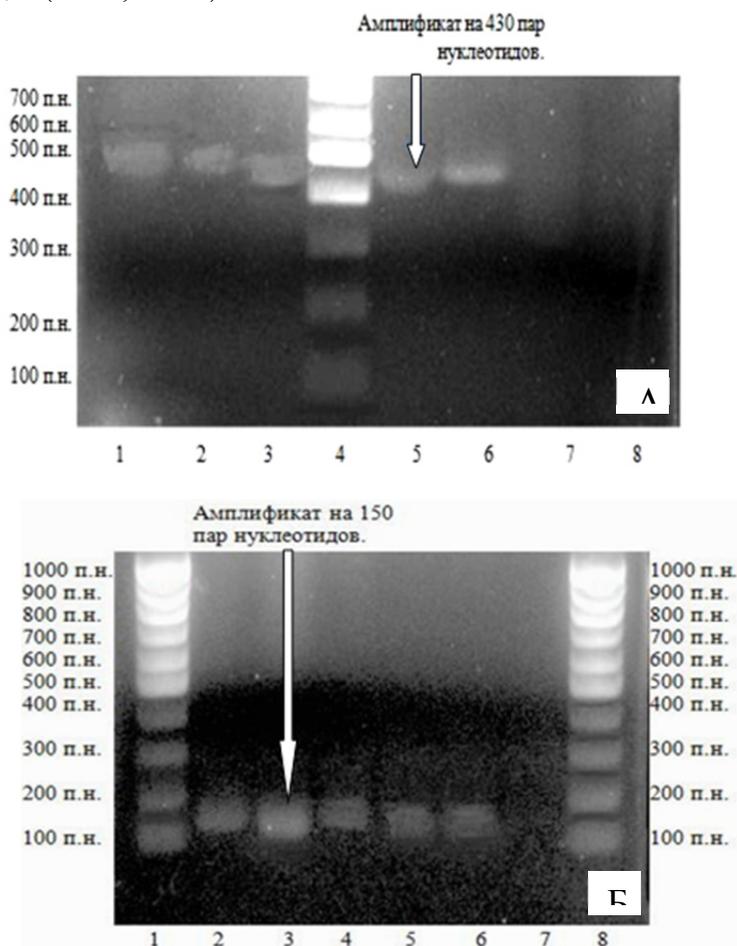


Рис. Электрофореграммы разделения продуктов амплификации, полученных с использованием образцов бытовых стоков. А – пара праймеров к HPV16 L1 (430 п. н.): 4 – ДНК-маркер на 100 бр («СибЭнзим», Россия); 1–3, 5, 6 – образцы сточных вод; 7 – контрольный образец (дистиллированная вода); 8 – контрольный образец (водопроводная вода); Б – пара универсальных праймеров GP5+/6+ к HPV6 L1 (150 п. н.): 1, 8 – ДНК-маркер на 100 бр («СибЭнзим», Россия); 2–6 – образцы бытовых стоков; 7 – контрольный образец (дистиллированная вода)

Качество ПЦР-продукта определяли с помощью аппарата для проведения электрофоретического разделения нуклеиновых кислот Mini-gel Unit (Amersham Biosciences, США) в 1,2%-ном агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием и визуализацией на гель-документирующей системе GelDoc XR+ (Bio-Rad, США).

В результате проведения ПЦР с использованием подготовленных согласно вышеописанной методике водных образцов были выявлены амплификаты искомой размерности (см. рис.), что свидетельствует о наличии в исследуемых пробах ДНК вирусов папилломы человека.

В бытовых стоках из отдельных источников установлено присутствие ДНК ВПЧ высокопатогенных типов 6 и 16. Присутствие ДНК папилломы человека типа 11 в анализированных образцах выявлено не было, что, однако, требует дополнительной проверки, поскольку отсутствие ВПЧ этого типа может быть обусловлено ограниченным числом исследованных образцов.

Установленное присутствие высокопатогенных разновидностей ВПЧ в бытовых стоках г. Иркутска свидетельствует о необходимости расширения масштабов исследования, поскольку результаты настоящей работы, основанной на использовании праймеров на небольшое число типов вируса, пока не позволяют уверенно определить набор высокопатогенных разновидностей ВПЧ, содержащихся в бытовых стоках и водных объектах региона. Перспективные исследования сточных вод наиболее крупных поселений, а также прибрежной зоны оз. Байкал на участках, подверженных высокой рекреационной нагрузке, позволят выяснить актуальную картину распространения ВПЧ в водной среде.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Иркутской области в рамках научного проекта № 20-44-380001.

The reported study was funded by RFBR and the Government of the Irkutsk Region, project no. 20-44-380001.

Список литературы

A large spectrum of alpha and beta papillomaviruses are detected in human stool samples / P. Di Bonito, S. D. Libera, S. Petricca, M. Iaconelli, M. Sanguinetti, R. Graffeo, L. Accardi, G. La Rosa // J. Gen. Virol. 2015. Vol. 96. P. 607–613. <https://doi.org/10.1099/vir.0.071787-0>

Fratini M., Di Bonito P., La Rosa G. Oncogenic Papillomavirus and Polyomavirus in Water Environments: Is There a Potential for Waterborne Transmission? // Food Environ. Virol. 2014. Vol. 6. P. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9134-0>

Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer // World Health Organization review. 24.01.2019. URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer).

Mucosal and Cutaneous Human Papillomaviruses Detected in Raw Sewages / G. La Rosa, M. Fratini, L. Accardi, G. D'Oro, S. D. Libera, M. Muscillo, P. Di Bonito // PLOS ONE. 2013. Vol. 5, N 1. P. e52391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052391>

Raw Sewage Harbors Diverse Viral Populations / P. G. Cantalupo, B. Calgua, G. Zhao, A. Hundesa, A. D. Wier, J. P. Katz, M. Grabe, R. W. Hendrix, R. Girones, D. Wang, J. M. Pipas // mBio. 2011. Vol. 2, N 5. P. e00180-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00180-11>

Symonds E. M., Griffin D. W., Breitbart M. Eukaryotic Viruses in Wastewater Samples from the United States // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. Vol. 75, N 5. P. 1402–1409. <https://doi.org/10.1128/AEM.01899-08>

The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3 ends with adjacent highly conserved sequences improves HPV detection / A. M. de Roda Husman, J. M. Walboomers, A. J. van den Brule, C. J. Meijer, P. J. Snijders // *J. Gen. Virol.* 1995. Vol. 76, N 4. P. 1057–1062. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-4-1057>

Study of the Presence of Human Papillomavirus (HPV) DNA in Domestic Sewages

A. S. Stolbikov^{1,2}, R. K. Salyaev¹, N. I. Rekoslavskaya¹

¹ *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation*

² *Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation*

Abstract. Human papillomavirus (HPV) appears to be significant danger for mankind because of having very high widespread and might revealing the pandemy of papillomatoses. To the present time, about 200 types of HPV have been found, 40 types of which announced as high-risk cancerogenic. It was learned that papillomaviruses are very resistant to impacts of environmental factors because they possesses many possibilities for long surviving in polluted water conditions. Nevertheless, the infection of HPV through the contact with contaminated water areas still does not to be prove with strong scientific data, foreign scientists are seriously bothering about facts of finding of DNA of human papillomaviruses in sewage water and in different deteriorated water objects. Our opinion is based on the necessity of the comprehensive investigation of the presence of the high-risk oncogenic types of HPV in sewage water. The present study is devoted for the first time to the data of finding of DNA of several high-risk oncogenic HPV in sewage water. Three pairs of primers were used in the study, between them 2 pairs of universal primers (GP5+/6+) which were very specific to nucleic sequences encoded the main structural element of the HPV capsid, the “late” protein L1 (HPV6 L1, HPV11 L1 and HPV16 L1). As the result, the presence of DNA of high-risk oncogenic papillomaviruses of types 6 and 16 was shown in sewage water. Further, the scope of investigations directed to finding of the presence of HPV components is planned to be arranged not only for sewage water but for other water areas of Irkutsk Region of East Siberia as well around water areas of the Lake Baikal.

Keywords: Human papillomavirus, domestic sewages.

For citation: Stolbikov A.S., Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I. Study of the Presence of Human Papillomavirus (HPV) DNA in Domestic Sewages. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2020, vol. 31, pp. 93-98. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2020.31.93> (in Russian)

References

Di Bonito P., Libera S.D., Petricca S., Iaconelli M., Sanguinetti M., Graffeo R., Accardi L., La Rosa G. A large spectrum of alpha and beta papillomaviruses are detected in human stool samples. *J. Gen. Virol.*, 2015, vol. 96, pp. 607-613. <https://doi.org/10.1099/vir.0.071787-0>

Fratini M., Di Bonito P., La Rosa G. Oncogenic Papillomavirus and Polyomavirus in Water Environments: Is There a Potential for Waterborne Transmission? *Food Environ. Virol.*, 2014, vol. 6, pp. 1-12. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9134-0>

Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. World Health Organization review. 24.01.2019. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)

La Rosa G., Fratini M., Accardi L., D'Oro G., Libera S.D., Muscillo M., Di Bonito P. Mucosal and Cutaneous Human Papillomaviruses Detected in Raw Sewages. *PLOS ONE*, 2013, vol. 5, no. 1, pp. e52391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052391>

Cantalupo P.G., Calgua B., Zhao G., Hundesa A., Wier A.D., Katz J.P., Grabe M., Hendrix R.W., Girones R., Wang D., Pipas J.M. Raw Sewage Harbors Diverse Viral Populations. *mBio*, 2011, vol. 2, no. 5, pp. e00180-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00180-11>

Symonds E.M., Griffin D.W., Breitbart M. Eukaryotic Viruses in Wastewater Samples from the United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, vol. 75, no. 5, pp. 1402-1409. <https://doi.org/10.1128/AEM.01899-08>

de Roda Husman A.M., Walboomers J.M., van den Brule A.J., Meijer C.J., Snijders P.J. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3 ends with adjacent highly conserved sequences improves HPV detection. *J. Gen. Virol.*, 1995, vol. 76, no. 4, pp. 1057-1062. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-4-1057>

Столбиков Алексей Сергеевич
кандидат биологических наук,
научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
Россия, 664033, г. Иркутск,
ул. Лермонтова, 132
доцент
Иркутский государственный университет
Россия, 664003, Иркутск, ул. К. Маркса, 1
e-mail: valkir5@yandex.ru

Stolbikov Aleksey Sergeevich
Candidate of Science (Biology),
Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
Russian Federation
Assistant Professor
Irkutsk State University
5, K. Marx st., Irkutsk, 664033,
Russian Federation
e-mail: valkir5@yandex.ru

Салаяев Рюрик Константинович
член-корреспондент РАН,
доктор биологических наук,
советник РАН
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
Россия, 664033, г. Иркутск,
ул. Лермонтова, 132
e-mail: salyaev@sifibr.irk.ru

Salyaev Ryurik Konstantinovich
Corresponding Member for RAS,
Doctor of Science (Biology),
Advisor for RAS
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
Russian Federation
e-mail: salyaev@sifibr.irk.ru

Рекославская Наталья Игоревна
доктор биологических наук,
главный научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
Россия, 664033, г. Иркутск,
ул. Лермонтова, 132
e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

Rekoslavskaya Nataliya Igorevna
Doctor of Sciences (Biology),
Principal Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
Russian Federation
e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

Дата поступления: 15.01.2020

Received: January, 15, 2020