

Научная статья

УДК 578.4: 577.2: 574.5

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-540-548>



Разработка и испытание методик определения наличия в пробах воды ДНК вирусов папилломы человека 6-го и 16-го типов

Алексей Сергеевич Столбиков^{***}, Рюрик Константинович Салаяев^{*},
Наталья Игоревна Рекославская^{*}

^{*}Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, Российская Федерация

^{***}Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Алексей Сергеевич Столбиков, valkir5@yandex.ru

Аннотация. В данном исследовании авторами решались задачи разработки и испытания методик определения в пробах воды ДНК опасных вирусов папилломы человека 6-го и 16-го типов. Биоинформационными методами с помощью базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) и программы BioEdit были изучены консервативные участки нуклеотидных последовательностей HPV6 L1 и HPV16 L1. Всего было исследовано 135 нуклеотидных последовательностей HPV6 L1 и 945 нуклеотидных последовательностей HPV16 L1. На выявленные консервативные участки нуклеотидных секвенсов, с помощью специализированных программ (PerlPrimer v.1.1.21, FastPCR 6.6, Primer3Plus), было разработано 5 пар специфических праймеров. Опробовано несколько методик взятия проб из различных водных объектов, находящихся в районе пос. Листвянка (оз. Байкал). Образцы подвергались комплексной очистке от нерастворимых частиц и бактериального загрязнения, затем исследовались на наличие ДНК ВПЧ с помощью ПЦР-анализа с использованием праймеров, комплементарных генетическим последовательностям ВПЧ6 L1 и ВПЧ16 L1. В результате проведенных исследований в водных пробах были обнаружены ДНК ВПЧ 6-го и 16-го типов. Разработанные и опробованные методики взятия и исследования проб из различных водных источников Байкальской природной территории с последующим проведением ПЦР-анализа позволили получить положительные результаты присутствия опасных вирусов. Полагаем, что предложенные методики тестирования водных проб на наличие в них ВПЧ будут полезны при разработке эффективного мониторинга водных объектов и сточных вод не только Байкальского, но и других регионов.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, ВПЧ6, ВПЧ16, ПЦР-анализ, биоинформационные методы

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

Для цитирования: Столбиков А. С., Салаяев Р. К., Рекославская Н. И. Разработка и испытание методик определения наличия в пробах воды ДНК вирусов папилломы человека 6-го и 16-го типов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 540–548. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-540-548>.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Development and testing of procedures for detecting HPV 6 and HPV 16 DNA in water samples

Aleksey S. Stolbikov^{***}, Ryurik K. Salyaev^{*},
Nataliya I. Rekoslavskaya^{*}

^{*}Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS,
Irkutsk, Russian Federation

© Столбиков А. С., Салаяев Р. К., Рекославская Н. И., 2021

***Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation*

Corresponding author: Aleksey S. Stolbikov, valkir5@yandex.ru

Abstract. The present study aims to develop and test procedures for detecting the DNA of dangerous human papillomaviruses (HPV) types 6 and 16 in water samples. The conserved segments of HPV 6 L1 and HPV 16 L1 nucleic acid sequences were studied using bioinformatic methods with the help of the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database and the BioEdit program. A total of 135 nucleic acid sequences of HPV6 L1 and 945 nucleic acid sequences of HPV16 L1 were examined. Five pairs of specific primers were developed for the identified conserved segments of nucleic acid sequences using specialized programs (PerlPrimer v.1.1.21, FastPCR 6.6, and Primer3Plus). In addition, several procedures for collecting samples from various water bodies located near Listvyanka settlement (Lake Baikal) were tested. The samples were subjected to comprehensive purification from insoluble particles and bacterial contamination to be tested for the presence of HPV DNA via PCR analysis using primers complementary to the nucleic acid sequences of HPV6 L1 and HPV16 L1. The conducted studies revealed HPV 6 and HPV 16 DNA in the water samples. Due to the use of the developed and tested procedures for collecting and examining samples from various water sources in the Baikal Natural Territory followed by a PCR analysis, it was possible to detect the presence of dangerous viruses. The proposed procedure of testing water samples for the presence of HPV can be useful in developing effective monitoring of water bodies and wastewater both in Baikal and other regions.

Keywords: human papillomavirus, HPV6, HPV16, PCR analysis, bioinformatic methods

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

For citation: Stolbikov A. S., Salyaev R. K., Rekoslavskaya N. I. Development and testing of procedures for detecting HPV 6 and HPV 16 DNA in water samples. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):540-548. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-540-548>.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы папилломы человека (ВПЧ) – это большая группа патогенных генетически разнообразных ДНК-содержащих вирусов, которая получила довольно широкое распространение в человеческой популяции. Сам по себе ВПЧ не является смертельно опасным заболеванием, риск летального исхода возникает при трансформации новообразований в злокачественные опухоли. Поэтому среди папилломавирусов выделяют виды с низким и высоким онкогенным риском.

Наиболее известной формой рака, вызванной ВПЧ, является рак шейки матки, за 70% случаев рака шейки матки ответственны вирусы 16-го и 18-го типов. В ряде стран распространенность ВПЧ-инфекции у женщин оценивается в 40–80%, а вероятность персистенции ВПЧ-инфекции – в 80–90% [1, 2]. По данным Всемирной организации здравоохранения, этот вид рака занимает четвертое место в мире по распространенности и является причиной 7,5% всех случаев смерти от онкологических заболеваний. Например, только в 2018 г. в мире от этого заболевания скончалось 311000 женщин¹. По многолетним наблюдениям российских ученых, смертность от рака шейки матки в нашей стране составила в среднем 6000 женщин ежегодно (в пе-

риод 2005–2015 гг.) [4]. ВПЧ 6-го типа приводит к образованию остроконечных кондилом и может провоцировать развитие респираторного папилломатоза, при котором опухоли образуются в дыхательных путях, идущих от носа и полости рта в легкие.

Основной метод защиты от ВПЧ – своевременная вакцинация. В некоторых странах она проводится девочкам начиная с 9–11 лет, а в США и Канаде прививка делается и мальчикам для снижения числа носителей вируса. Понимая угрозу распространения ВПЧ, в США, например, ежегодные расходы на цели профилактики и борьбы с ВПЧ-ассоциированными болезнями составляют около 3 млрд долл. [5, 6]. В России вакцинация не является обязательной и не входит в национальный календарь профилактических прививок, однако она рекомендована Союзом педиатров России, и многие регионы выделяют средства на бесплатную вакцинацию девочек².

Считается, что папилломавирусы имеют достаточно высокую устойчивость к воздействию внешних факторов: хорошо переносят высокие температуры, воздействие ультрафиолетовых лучей, эфира, хлороформа и других химических веществ [7, 8]. Подтверждением этому служит ряд исследований ученых разных стран, в ходе

¹Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer // World Health Organization (WHO). 24 January 2019. Available from: [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) [Accessed 12th October 2020].

²Кодзаева Н. Лечение ВПЧ [Электронный ресурс] // Медпортал. URL: <https://medportal.ru/enc/infection/std/lechenie-vpch/> (15.04.2021).

которых присутствие ВПЧ обнаружено в водоемах и сточных водах [9–17]. Принято считать, что основным путем передачи инфекций ВПЧ является генитальный контакт. Однако есть подтвержденные случаи инфицирования ВПЧ лиц, не вступавших в половые отношения [7, 8, 18]. Поскольку папилломавирусы могут передаваться не только половым путем, присутствие ВПЧ в водоемах создает потенциальную угрозу передачи инфекции через контакт с водой.

Исследования различных водоемов, находящихся вблизи населенных пунктов, а также сточных вод на наличие в них ВПЧ стали проводиться относительно недавно. Нам не удалось обнаружить информацию о проведении подобных исследований в Байкальском регионе, хотя, согласно медицинской статистике, уровень ВПЧ-ассоциированных заболеваний как в России в целом, так и в Иркутской области остается крайне высоким [4, 19].

Нашей целью являлась разработка и испытание методик взятия проб воды и их комплексной очистки от нерастворимых частиц и бактериального загрязнения с последующим проведением ПЦР-анализа для выявления ДНК вирусов папилломы человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1. Разработка дизайна специфических праймеров, необходимых для проведения ПЦР-анализа:

– *множественное нуклеотидное выравнивание различных изолятов HPV6 L1, HPV16 L1.* Поиск нуклеотидных последовательностей различных изолятов ВПЧ6 и ВПЧ16 осуществляли с помощью крупнейшей базы данных генетических последовательностей NCBI (GenBank). Информация в NCBI находится в свободном доступе. Для получения необходимых нуклеотидных сиквенсов использовался персональный компьютер с доступом в сеть «Интернет». Последовательности HPV6 L1 и HPV16 L1, кодирующие основной поверхностный белок L1 папилломавирусов человека, сохранялись в виде массивов данных в формате txt. Определение консервативных участков в нуклеотидных последовательностях HPV6 L1 и HPV16 L1 осуществляли с помощью редактора множественного выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей BioEdit (версия 7.2.5.) и программы Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Для множественного нуклеотидного выравнивания HPV6 L1 использовали 139 сиквенсов. Выравнивание проводили относительно “HG793924.1” Human papillomavirus type 6 complete genome, isolate 116 (NCBI). Множественное нуклеотидное выравнивание проводили с использованием 945 сиквенсов HPV16 L1. Выравнивание осуществляли относительно “U37217.1” Human papillomavirus type 16 variant L1 and L2 capsid protein

genes, complete cds (NCBI);

– *подбор специфических праймеров к HPV6 L1 и HPV16 L1 с помощью бионформационных программ.* Дизайн специфических праймеров, необходимых для проведения ПЦР-анализа, разрабатывали с помощью специализированных программ PerlPrimer (версия 1.1.21), FastPCR (версия 6.6) и Primer3Plus. Для этого нуклеотидные сиквенсы HPV6 L1 и HPV16 L1 загружали в указанные выше программы, которые позволяли вычислять оптимальные пары специфических праймеров. Из предложенных вариантов праймеров отбирались те пары, которые были комплементарны выявленным консервативным участкам последовательностей ДНК папилломавирусов.

2. Методики взятия и обработки образцов из различных водных источников:

а) *методика взятия проб воды и последующая их очистка от нерастворимых частиц и бактериального загрязнения:*

– в стерильные пластиковые емкости объемом 500 мл (Corning) помещали образцы бытовых стоков; взятие образцов производили из разных водных объектов или из одного, но с интервалом 5 мин; всего использовали 6 пластиковых емкостей на одну точку пробоотбора;

– после взятия образцов пластиковые емкости закупоривались, их поверхность обрабатывалась дезинфицирующим раствором 96%-го этилового спирта и 3%-й перекиси водорода);

– после маркировки пластиковые емкости с пробами воды упаковывались в теплоизоляционный контейнер, не пропускающий солнечный свет;

– очистка образцов от крупных частиц осуществлялась с помощью центрифугирования в следующих условиях: 4000 g, 15 мин при 4 °C (KR 22i Jouan, Франция, центрифужные пробирки на 50 мл);

– очистка образцов от мелких частиц и бактерий производилась путем центрифугирования в следующих условиях: 10000 g, 15 мин при 4 °C (KR 22i Jouan, Франция, центрифужные пробирки также на 50 мл);

– окончательная очистка образцов бытовых стоков от бактерий осуществлялась с помощью фильтрации через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (Whatman, GE Healthcare);

– выделение вирусной ДНК из очищенных образцов осуществляли с помощью ультрацентрифужных модулей Amicon Ultra-15 (Millipore, Ирландия), для этого использовалась центрифуга CM-6M.01 (ELMI, Латвия) с адаптером для пробирок типа Фалькон на 50 мл.

Дополнительным этапом было концентрирование и очистка вирусной ДНК с помощью реактива TRI REAGENT (Molecular Research Center, Inc., США). Образцы вирусной ДНК переносились в пробирки объемом 50 мл типа Фалькон (SARSTEDT, Германия), которые при необходимости помеща-

лись в низкотемпературный холодильник на -80 °С.

б) методика взятия образцов из различных водных источников, включая сточные воды, с помощью набора “для концентрирования вирусов из расфасованных вод и экстрактов пищевых продуктов” (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь):

- водные образцы помещались в стерильные пластиковые емкости;

- во вскрытые в стерильных условиях емкости вносили по 0,25 г адсорбента из набора; емкости закрывали и помещали на шуттель-аппарат или шейкер для встряхивания;

- пробирку с адсорбентом центрифугировали при 2000 об./мин, после чего удаляли супернатант, а осадок промывали в 3 мл стерильной бидистиллированной воды, затем центрифугировали при 2000 об./мин;

- адсорбент заливали 3-мя мл элюента из набора и встряхивали на шуттель-аппарате или шейкере, затем центрифугировали при 2000 об./мин; отбирали супернатант в пробирку, куда помещали ПЭГ-6000 из набора; смесь перемешивали и инкубировали при 4 °С в течение 12 ч;

- после инкубации суспензию центрифугировали при 4000 об./мин в течение 1,5 ч; супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 200 мкл стерильной бидистиллированной воды и замораживали при -20 °С.

Дополнительным этапом было концентрирование и очистка вирусной ДНК с помощью реактива TRI REAGENT.

в) методика взятия образцов из различных водных источников, включая сточные воды, с помощью набора “для концентрирования вирусов из питьевой воды в системе децентрализованного хозяйственно-питьевого водоснабжения, поверхностных и сточных вод” (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь):

- пакет с адсорбентом из набора помещали в водоисточник на глубину 10–15 см от поверхности на 24 ч;

- для элюирования вирусных частиц пакет с адсорбентом помещали в чашку Петри и вскрывали его; к адсорбенту приливали 3 мл элюента, затем полученную взвесь инкубировали при комнатной температуре;

- взвесь адсорбента помещали в пробирку и центрифугировали при 2000 об./мин; супернатант помещали в пробирку и добавляли 2 объема хлороформа; полученную смесь встряхивали, а затем центрифугировали при 2000 об./мин; супернатант помещали в стерильную пробирку и хранили при -20 °С.

Дополнительным этапом было концентрирование и очистка вирусной ДНК с помощью TRI REAGENT.

г) методика взятия образцов из различных водных источников, включая сточные воды, с помощью набора “для концентрирования виру-

сов из, поверхностных вод, водоисточников и колодцев” (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь):

- волокнистый фильтр помещали в водоисточник на глубину 10–15 см; время экспозиции фильтра зависело от скорости течения воды и могло варьировать от 2 до 10 ч;

- для элюирования вирусных частиц в емкость с фильтром приливали 45 мл элюента и инкубировали;

- к полученному элюату добавляли ПЭГ-6000 из набора. Смесь перемешивали и помещали на 10–12 ч для инкубации при температуре 4-6 °С;

- г)** полученную суспензию центрифугировали при 3000 об./мин. Супернатант удаляли, а для исследования оставляли нижнюю фазу объемом 5 мл;

- д)** удаление бактериальной флоры осуществляли с помощью хлороформа.

Дополнительным этапом было концентрирование и очистка вирусной ДНК с помощью TRI REAGENT.

3. ПЦР-анализ проб воды. Для определения в образцах водных проб наличия ДНК высокопатогенных типов папилломавирусов использовали 8 пар праймеров. Так как мы не обладали информацией о том, какие изоляты ВПЧ распространены в нашем регионе, было принято решение использовать праймеры GP5+/6+, созданные к высококонсервативным участкам HPV6 L1 и HPV16 L1 [20, 21]. Использовались также 5 пар праймеров собственного дизайна.

Полимеразную цепную реакцию осуществляли в ДНК-амплификаторах GENE CYCLER (Bio-Rad, Япония) и Mastercycler personal (Eppendorf, Германия). Для ПЦР использовали 3 вида наборов: ReadyMix (Sigma-Aldrich, США), K001 и K002 (SibEnzyme, Россия).

Этапы ПЦР-анализа с использованием набора ReadyMix проводили в следующих температурных режимах:

- иницирующая денатурация – 94 °С, 5 мин;
- 35 циклов амплификации: денатурация – 95 °С, 45 с (отжиг для каждой пары праймеров подбирался индивидуально, 45 с), и элонгация – 72 °С, 2 мин;
- заключительная элонгация – 72 °С, 5 мин.

ПЦР с использованием наборов K001 и K002 проводили в следующем температурном режиме:

- иницирующая денатурация (94 °С, 3 мин., 80 °С, 30 сек);
- 30 циклов амплификации: денатурация (95 °С, 15 сек), отжиг для каждой пары праймеров подбирался индивидуально (30 сек) и элонгация (72 °С, 2 мин);

Качество ПЦР-продукта определяли с помощью аппарата для проведения электрофоретического разделения нуклеиновых кислот Mini gel unit, (Amersham Biosciences, США) в 1,2–1,7%-м

агарозном геле (GE Healthcare, Швеция; Диаэм, Россия; Biotechnology, США) с окрашиванием бромистым этидием и визуализацией на геле-документирующей системе GelDoc XR+ (Bio-Rad, США).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате нуклеотидного выравнивания были определены консервативные участки сиквенса HPV6 L1 и HPV16 L1. При выявлении консервативных участков у HPV16 L1 возникли некоторые сложности, связанные с большим количеством выравниваемых последовательностей, при которых наблюдалось значительное различие между сиквенсами. В итоге удалось обнаружить малое количество участков, которые у всех 945 нуклеотидных последовательностей были идентичны. Успешная разработка эффективных праймеров в таких условиях показалась маловероятной, поэтому было решено в качестве консервативных участков остановиться на тех, в которых при множественном выравнивании обнаружены минимальные различия (1 нуклеотид) у единичных изолятов.

Используя выявленные консервативные участки сиквенса HPV6 L1 и HPV16 L1, с помощью биоинформационных программ было разработано 5 пар праймеров.

Для последовательности HPV6 L1:

1-ая пара:

Forward: 5'-TGTTGTGCCAAAGGTGTCAG-3'

(20 п.н.) Tm= 61,52 °C;

Revers: 5'-GTGTCAACCATATCGCCATCC-3'

(21 п.н.) Tm= 61,64 °C;

2-ая пара:

Forward: 5'-ATGGCTGCAGACCCATATGG-3'

(20 п.н.) Tm= 59,9 °C;

Revers: 5'-AGGTAATGGCCTGTGACTGC-3'

(20 п.н.) Tm= 60 °C.

Для последовательности HPV16 L1:

1-ая пара:

Forward: 5'-CTGTGTAGGTGTTGAGGTAGG-3'

(21 п.н.) Tm=59,94 °C;

Revers: 5'-TGTAGAGGTAGATGAGGTGG-3'

(20 п.н.) Tm=57,73 °C;

2-ая пара:

Forward: 5'-CTGTGTAGGTGTTGAGGTAGG-3'

(21 п.н.) Tm=59,94 °C;

Revers: 5'-AGCCTGTAATGTAGTAAAGTCC-3'

(22 п.н.) Tm=57,74 °C;

3-я пара:

Forward: 5'-CTACTTGCAGTTGGACATCCC-3'

(21 п.н.) Tm= 56,19 °C;

Revers: 5'-CAGCCGCTGTGTATCTGGATT-3'

(21 п.н.) Tm= 56,7 °C.

Для испытания представленных выше методик были взяты водные образцы из оз. Байкал в районе п. Листвянка. Отмечено, что все методики взятия образцов оказались достаточно эффективными и позволили получить искомые результаты. При этом методики **а** и **б** являются наиболее универсальными и позволяют брать пробы из любых водоисточников и с любой глубины, а методика **б** является также более простой в реализации и позволяет получать не только вирусную ДНК, но и вирусные частицы. Методика **в** дает возможность брать пробы с небольшой глубины и позволяет обнаружить даже небольшое количество вирусного материала в большом объеме воды. Методику **г** целесообразно применять для водоисточников с умеренным и сильным потоком воды.

В результате ПЦР-анализа водных проб, взятых в районе пляжа п. Листвянка у береговой черты, были обнаружены ДНК папилломавирусов 6-го и 16-го типов (рис. 1, 2).

Амплификат на 571 пару нуклеотидов.

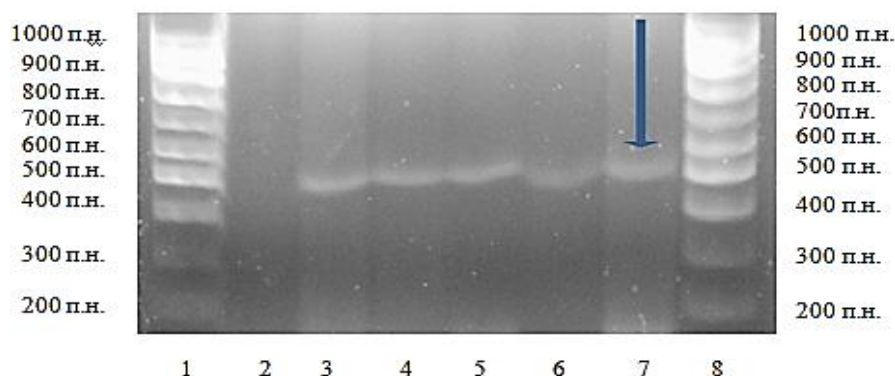


Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации, полученных с использованием образцов, взятых в районе пляжа в п. Листвянка (оз. Байкал). Пара праймеров к HPV6 L1 (571 п.н.). Примечание: 1, 8 – ДНК маркер на 100 bp (СибЭнзим); 2 – контрольный образец (дистиллированная вода); 3-7 – исследуемые образцы

Fig. 1. Electrophoretic separation of amplification products obtained using samples taken in the beach area in Listvyanka (Lake Baikal). A pair of primers for HPV6 L1 (571 bp): 1, 8 – DNA marker per 100 bp (SibEnzyme); 2 – control sample (distilled water); 3-7 – tested samples

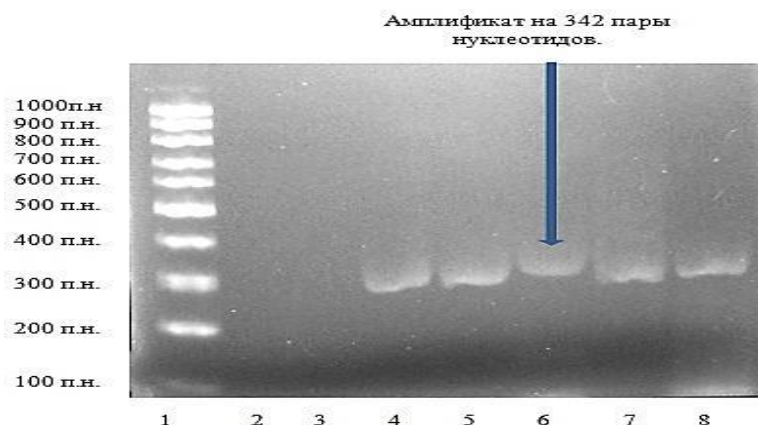


Рис. 2. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации, полученных с использованием образцов, взятых в районе пляжа п. Листвянка (оз. Байкал). Пара праймеров к HPV16 L1 (342 п.н.):
 1 – ДНК маркер на 100 bp (Bioron, Германия); 2 – контрольный образец (дистиллированная вода);
 3 – контрольный образец (водопроводная вода); 4–8 – исследуемые образцы

Fig. 2. Electrophoretic separation of amplification products obtained using samples taken in the beach area of Listvyanka (Lake Baikal). A pair of primers for HPV16 L1 (342 bp):
 1 – DNA marker at 100 bp (Bioron, Germany); 2 – control sample (distilled water);
 3 – control sample (tap water); 4–8 – tested samples

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опробованные нами методики взятия и исследования проб из различных водных источников в районе п. Листвянка с последующим проведением ПЦР-анализа позволили получить искомые положительные результаты. Анализ прибрежных вод, проведенный с помощью указанных выше методик, показал присутствие ДНК

патогенных вирусов папилломы человека 6-го и 16-го типов.

Полагаем, что предложенные методики тестирования водных проб на наличие в них ВПЧ будут полезны при разработке эффективного мониторинга водных объектов и сточных вод не только Байкальского, но и других регионов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Костин А. А., Старинский В. В., Самсонов Ю. В., Асратов А. Т. Анализ статистических данных о злокачественных новообразованиях, ассоциированных с вирусом папилломы человека // Исследования и практика в медицине. 2016. Т. 3. N 1. С. 66–78. <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2016-3-1-9>.
2. Bosch F. X., Broker T. R., Forman D., Moscicki A.-B., Gillison M. L., Doorbar J., et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases // Vaccine. 2013. Vol. 31, suppl. 7. P. H1–H31. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.003>.
3. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Mathers C., Parkin D. M., Piñeros M., et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods // International Journal of Cancer. 2019. Vol. 144, no. 8. P. 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>.
4. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, В. Г. Петровой. М.: Изд-во МНИОИ им. П. А. Герцена, 2017. 250 с.
5. McLaughlin-Drubin M. E., Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses // Virus Research. 2009. Vol. 143, no. 2. P. 195–208. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.06.008>.
6. Chesson H. W., Blandford J. M., Gift T. L., Tao G., Irwin K. L. The estimated direct medical cost of sexually transmitted diseases among American youth, 2000 // Perspectives on Sexual and Reproductive Health. 2004. Vol. 36, no. 1. P. 11–19. <https://doi.org/10.1363/psrh.36.11.04>.
7. Ryndock E. J., Meyers C. A risk for non-sexual transmission of human papillomavirus? // Expert Review of Anti-infective Therapy. 2014. Vol. 12, no. 10. P. 1165–1170. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.959497>.
8. Meyers J., Ryndock E., Conway M. J., Meyers C., Robison R. Susceptibility of high-risk human papillomavirus type 16 to clinical disinfectants // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2014. Vol. 69, no. 6. P. 1546–1550. <https://doi.org/10.1093/jac/dku006>.
9. Di Bonito P., Libera S. D., Petricca S., Iaconelli M., Sanguinetti M., Graffeo R., et al. A large spectrum of alpha and beta papillomaviruses are detected in human stool samples // Journal of General Virology. 2015. Vol. 96, no. 3. P. 607–613. <https://doi.org/10.1099/vir.0.071787-0>.
10. Fratini M., Di Bonito P., La Rosa G. Oncogenic Papillomavirus and Polyomavirus in Water Environments: Is There a Potential for Waterborne Transmission? // Food and Environmental Virology. 2014. Vol. 6, no. 1. P. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9134-0>.

11. Symonds E. M., Griffin D. W., Breitbart M. Eukaryotic Viruses in Wastewater Samples from the United States // *Applied and Environmental Microbiology*. 2009. Vol. 75, no. 5. P. 1402–1409. <https://doi.org/10.1128/AEM.01899-08>.
12. Hamza H., Hamza I. A. Oncogenic papillomavirus and polyomavirus in urban sewage in Egypt // *Science of The Total Environment*. 2018. Vol. 610–611. P. 1413–1420. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.218>.
13. Cantalupo P. G., Calgua B., Zhao G., Hunders A., Wier A. D., Katz J. P., et al. Raw sewage harbors diverse viral populations // *mBio*. 2011. Vol. 2, no. 5. e00180-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00180-11>.
14. Di Bonito P., Iaconelli M., Gheit T., Tommasino M., Della Libera S., Bonadonna L., et al. Detection of oncogenic viruses in water environments by a Luminex-based multiplex platform for high throughput screening of infectious agents // *Water Research*. 2017. Vol. 123. P. 549–555. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.088>.
15. La Rosa G., Della Libera S., Petricca S., Iaconelli M., Briancesco R., Paradiso R., et al. First detection of papillomaviruses and polyomaviruses in swimming pool waters: unrecognized recreational water-related pathogens? // *Journal of Applied Microbiology*. 2015. Vol. 119, no. 6. P. 1683–1691. <https://doi.org/10.1111/jam.12925>.
16. Bonadonna L., La Rosa G. A review and update on waterborne viral diseases associated with swimming pools // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019. Vol. 16, no. 2. Article number 166. <https://doi.org/10.3390/ijerph16020166>.
17. Iaconelli M., Petricca S., D Libera S., Di Bonito P., La Rosa G. First detection of human papillomaviruses and human polyomaviruses in river Waters in Italy // *Food and Environmental Virology*. 2015. Vol. 7, no. 4. P. 309–315. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9203-7>.
18. La Rosa G., Fratini M., Accardi L., D'Oro G., Della Libera S., Muscillo M., et al. Mucosal and cutaneous human papillomaviruses detected in raw sewages // *PLOS ONE*. 2013. Vol. 8, no. 1. P. e52391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052391>.
19. Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, В. Г. Петровой. М.: Изд-во МНИОИ им. П. А. Герцена, 2016. 250 с.
20. 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 // *Journal of General Virology*. 1995. Vol. 76, no. 4. P. 1057–1062. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-4-1057>.
21. Qu W., Jiang G., Cruz Y., Chang C. J., Ho G. Y., Klein R. S., et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems // *Journal of Clinical Microbiology*. 1997. Vol. 35, no. 6. P. 1304–1310. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.6.1304-1310.1997>.
1. Kostin A. A., Starinskiy V. V., Samsonov Y. V., Asratov A. T. The analysis of statistical data on malignant neoplasms associated with human papillomavirus. *Issledovaniya i Praktika v Meditsine = Research'n Practical Medicine Journal*. 2016;3(1):66–78. (In Russian). <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2016-3-1-9>.
2. Bosch F. X., Broker T. R., Forman D., Moscicki A.-B., Gillison M. L., Doorbar J., et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases // *Vaccine*. 2013. Vol. 31, suppl. 7. P. H1–H31. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.003>.
3. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Mathers C., Parkin D. M., Piñeros M., et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*. 2019;144(8):1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>.
4. Kaprin A. D., Starinskii V. V., Petrova G. V. (eds.) *Malignant neoplasms in Russia in 2015 (morbidity and mortality)*. Moscow: MNIОI im. P. A. Gertsena; 2017. 250 p. (In Russian).
5. McLaughlin-Drubin M. E., Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Research*. 2009;143(2):195–208. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.06.008>.
6. Chesson H. W., Blandford J. M., Gift T. L., Tao G., Irwin K. L. The estimated direct medical cost of sexually transmitted diseases among American youth, 2000. *Perspectives on Sexual and Reproductive Health*. 2004;36(1):11–19. <https://doi.org/10.1363/3psrh.36.11.04>.
7. Ryndock E. J., Meyers C. A risk for non-sexual transmission of human papillomavirus? *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2014;12(10):1165–1170. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.959497>.
8. Meyers J., Ryndock E., Conway M. J., Meyers C., Robison R. Susceptibility of high-risk human papillomavirus type 16 to clinical disinfectants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(6):1546–1550. <https://doi.org/10.1093/jac/dku006>.
9. Di Bonito P., Libera S. D., Petricca S., Iaconelli M., Sanguinetti M., Graffeo R., et al. A large spectrum of alpha and beta papillomaviruses are detected in human stool samples. *Journal of General Virology*. 2015;96(3):607–613. <https://doi.org/10.1099/vir.0.071787-0>.
10. Fratini M., Di Bonito P., La Rosa G. Oncogenic Papillomavirus and Polyomavirus in Water Environments: Is There a Potential for Waterborne

Transmission? *Food and Environmental Virology*. 2014;6(1):1–12. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9134-0>.

11. Symonds E. M., Griffin D. W., Breitbart M. Eukaryotic Viruses in Wastewater Samples from the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(5):1402–1409. <https://doi.org/10.1128/AEM.01899-08>.

12. Hamza H, Hamza I. A. Oncogenic papillomavirus and polyomavirus in urban sewage in Egypt. *Science of The Total Environment*. 2018;610–611:1413–1420. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.218>.

13. Cantalupo P. G., Calgua B., Zhao G., Hunders A., Wier A. D., Katz J. P., et al. Raw sewage harbors diverse viral populations. *mBio*. 2011;2(5):e00180-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00180-11>.

14. Di Bonito P., Iaconelli M., Gheit T., Tomasino M., Della Libera S., Bonadonna L., et al. Detection of oncogenic viruses in water environments by a Luminex-based multiplex platform for high throughput screening of infectious agents. *Water Research*. 2017;123:549–555. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.088>.

15. La Rosa G., Della Libera S., Petricca S., Iaconelli M., Briancesco R., Paradiso R., et al. First detection of papillomaviruses and polyomaviruses in swimming pool waters: unrecognized recreational water-related pathogens? *Journal of Applied Microbiology*. 2015;119(6):1683–1691. <https://doi.org/10.1111/jam.12925>.

16. Bonadonna L., La Rosa G. A review and update on waterborne viral diseases associated with

swimming pools. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019;16(2). Article number 166. <https://doi.org/10.3390/ijerph16020166>.

17. Iaconelli M., Petricca S., D Libera S., Di Bonito P., La Rosa G. First detection of human papillomaviruses and human polyomaviruses in river Waters in Italy. *Food and Environmental Virology*. 2015;7(4):309–315. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9203-7>.

18. La Rosa G., Fratini M., Accardi L., D'Oro G., Della Libera S., Muscillo M., et al. Mucosal and cutaneous human papillomaviruses detected in raw sewages. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e52391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052391>.

19. Kaprin A. D., Starinskii V. V., Petrova G. V. (eds.) *Malignant neoplasms in Russia in 2014 (morbidity and mortality)*. Moscow: MNI OI im. P. A. Gertsena; 2016. 250 p. (In Russian).

20. 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. *Journal of General Virology*. 1995;76(4):1057–1062. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-4-1057>.

21. Qu W., Jiang G., Cruz Y., Chang C. J., Ho G. Y., Klein R. S., et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997;35(6):1304–1310. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.6.1304-1310.1997>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

А. С. Столбиков,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация;
доцент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1,
Российская Федерация,
valkir5@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6392-9365>

Р. К. Салыев,

д.б.н., член-корреспондент РАН,
советник РАН,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
salyaev@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7602-7301>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Aleksey S. Stolbikov,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation;
Associate Professor,
Irkutsk State University,
1, K. Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
valkir5@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6392-9365>

Ryurik K. Salyaev,

Dr. Sci. (Biology), Corresponding Member
of RAS, Advisor of RAS,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
salyaev@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7602-7301>

Н. И. Рекославская,

д.б.н., главный научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
rekoslavskaya@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3480-9855>

Nataliya I. Rekoslavskaya,

Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
rekoslavskaya@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3480-9855>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 20.10.2020.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.

Information about the article

The article was submitted 20.10.2020.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.