

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АТИПИЧНОГО ПЕСТИВИРУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

С.В. КОТЕНЕВА¹, Р.А. МАКСЮТОВ², Т.И. ГЛОТОВА¹, А.Г. ГЛОТОВ¹

Атипичный НоВи-подобный пестивирус крупного рогатого скота (BVDV3) — неклассифицированный кандидат в члены рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*. Агент выделен впервые в 2004 году из эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, полученной в Бразилии, и проявляет высокую степень сходства с возбудителем вирусной диареи — болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота (ВД-БС КРС). Его присутствие в популяции крупного рогатого скота и диких жвачных животных потенциально может снижать эффективность контрольных программ ВД-БС КРС. Целью наших исследований стала разработка способа выявления атипичного пестивируса при помощи полимеразной цепной реакции в биологических продуктах и изучение его циркуляции среди домашних и диких жвачных. Были подобраны синтетические олигонуклеотидные праймеры, комплементарные позициям 9202-9218 и 9501-9521 генома референтного штамма D32/00_’НоВи’ (AB871953.1), отработан режим постановки реакции и подобраны ее основные компоненты. Диагностическая чувствительность ПЦР составила $7,4 \times 10^{-1}$ копий/мкл. Тест обладает высокой специфичностью и не выявляет РНК вируса вирусной диареи 1-го и 2-го типов, а также близкородственного вируса классической чумы свиней. При помощи разработанной ПЦР исследовали 18 образцов эмбриональных сывороток крупного рогатого скота из различных источников, 11 видов перевиваемых линий клеточных культур, используемых для культивирования вирусов в нескольких научно-исследовательских институтах России, 10 живых вакцин, 1803 пробы биологического материала, из которых 189 — внутренних органов, 1383 — сыворотки крови крупного рогатого скота, 168 — сыворотки крови северных оленей, 63 — крови маралов. Присутствие вируса установлено только в семи образцах (лотах) эмбриональной сыворотки, полученной от двух производителей и изготовленной в Южной Америке. Результаты филогенетического анализа ампликонов показали, что все семь положительных лотов группируются с BVDV-3, штамм D32/00_’НоВи’ (бразильская группа). Вирус не обнаружен в перевиваемых линиях культур клеток, отечественных и импортных вакцинах. Нами не найдено доказательств циркуляции вируса среди крупного рогатого скота различных пород, в том числе иностранных, на территории Краснодарского края, Сибири и Республики Казахстан, а также у северных оленей Таймыра и Ямала, маралов Алтайского края. Однако присутствие вируса в эмбриональной сыворотке, использовавшейся при производстве вакцины, не исключает его распространения на территории России. Полученные данные подтверждают необходимость совершенствования методов диагностики пестивирусов крупного рогатого скота, а также ужесточения правил международной торговли эмбриональной сывороткой.

Ключевые слова: атипичный пестивирус, BVDV3, НоВи-подобный вирус, праймеры, полимеразная цепная реакция, культуры клеток, эмбриональные сыворотки, вакцины, филогенетический анализ, крупный рогатый скот, северные олени, маралы.

Пестивирусные инфекции — одна из основных причин экономических потерь в молочном и мясном скотоводстве во всем мире. Наибольшую актуальность в настоящее время имеют инфекции, вызванные двумя прототипными членами рода: вирусами вирусной диареи — болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота (ВД-БС КРС) 1-го и 2-го типов (BVDV1 и BVDV2). Инфицирование неиммунных животных приводит к субклиническим инфекциям, иммуносупрессии, диарее, респираторным болезням, репродуктивной патологии и болезни слизистых оболочек у персистентно инфицированных телят (1-4).

Атипичные пестивирусы — новая, официально не классифицированная группа вирусов рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*, имеющая в литературе различные названия: 3-й тип вируса ВД-БС КРС (BVDV3), атипичный пестивирус (НоВи-подобный) (5). Агент впервые выделен в Европе из эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, импортированной из Бразилии (6). Позднее он был обнаружен в эмбриональных сыворотках, полученных в Австралии, Мексике, США и расфасованных в Европе (7-10). Сообщалось о естественной инфекции крупного рогатого скота и буйволов, вызванной BVDV3 в Юго-Восточной Азии (11-12), Ита-

лии (13-15), Индии (16). Инфекция BVDV3 имеет значительное сходство с ВД-БС КРС и может компрометировать программы ее контроля, в частности приводить к ложноположительным диагностическим результатам и снижению эффективности вакцинопрофилактики (5, 17). Из-за широкого использования эмбриональной сыворотки и торговли племенными животными возможен занос возбудителя в различные регионы мира (5, 18), в связи с чем актуальна разработка современных высокочувствительных и специфичных тестов для выявления вирусов этой группы, а также изучение их циркуляции на различных территориях, в том числе в России. В доступной отечественной литературе нам не удалось найти сообщения о разработке ПЦР для выявления атипичного пестивируса КРС.

Нами впервые в России разработан быстрый и чувствительный способ выявления и идентификации атипичного пестивируса КРС в биологических образцах, с использованием которого обнаружены и секвенированы нуклеотидные последовательности этого вируса в 7 сериях импортной эмбриональной сыворотки.

Целью исследований была разработка способа обнаружения атипичного пестивируса при помощи полимеразной цепной реакции в биологических продуктах и изучение его циркуляции среди домашних и диких жвачных животных.

Методика. Для расчета олигонуклеотидных праймеров проводили выравнивание известных нуклеотидных последовательностей BVDV1, BVDV2, BVDV3, опубликованных в GenBank, с помощью программы ClustalW (19). Использовали четыре штамма BVDV1 — NADL (AJ133738.1), Singer (DQ088995.1), Osloss (M96687.1), PT-810 (AY078406.1), два штамма BVDV2 — US890 (Z79772.1), Giessen-6 (AY379547.1), а также 4 штамма атипичного пестивируса — D32/00 'HoBi' (AY489116.1), Th/04_KhonKaen (NC_012812), SVA/cont-08 (FJ232692.1) и IZSPLV_To (HM151361.1). Химический синтез праймеров осуществляли амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе ASM-102U («Biosset», Россия). Их концентрацию в маточном растворе определяли спектрометрически.

РНК вируса выделяли с использованием коммерческого набора реагентов РИБО-преп (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя. Синтез кДНК осуществляли с помощью набора реагентов РЕВЕРТА-Л (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Полученную суспензию кДНК разбавляли в 2 раза 1× ТЕ-буфером (до 40 мкл) и использовали для постановки ПЦР. Продукты ПЦР анализировали методом горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле в стандартном Трис-боратном буфере (рН 8,0) с бромистым этидием (0,4-0,5 мкг/мл). Результаты учитывали в УФ-свете ($\lambda = 254$ нм) на приборе Трансиллюминатор УВТ-1 («Биоком», Россия). Результаты считали положительными при получении фрагмента амплификации размером 320 п.н.

Положительные контрольные образцы (ПКО) получали методом молекулярной трансформации бактерии *Escherichia coli* плазмидой pDrive, содержащей специфические ДНК-вставки. Концентрацию плазмидной ДНК определяли при помощи набора реагентов Quant-iTdsDNA, HS («Invitrogen», США) на флуориметре QUBIT («Invitrogen», США); в конечном варианте она составила 0,333 мкг/мкл ($7,4 \times 10^{10}$ копий/мкл). Для оценки чувствительности реакции готовили 10-кратные разведения ПКО, которые исследовали в ПЦР. За аналитическую чувствительность принимали последнее разведение ПКО, с которым результат ПЦР-анализа интерпретировался как положительный. Специфичность реакции оценивали со штаммами Oregon C24VBVDV1, БЛ BVDV2 и Ши-Мынь вируса клас-

сической чумы свиней (коллекция СФНЦА РАН).

Для подтверждения специфичности полученных фрагментов РНК определяли их нуклеотидную последовательность с дальнейшей очисткой на сефадексе G-50 superfine («GE Healthcare», США). Секвенирование ПЦР-фрагментов проводили по обеим цепям ДНК. Первичные данные секвенирования расшифровывали с помощью программы Sequencher v.4.0.5 («Gene Codes Corporation», США). Реакцию секвенирования осуществляли с использованием набора BigDye 3.1 («Applied Biosystems», США) в соответствии с указаниями фирмы-производителя. Реакционная смесь (объем 5 мкл) содержала 2 мкл раствора из набора для проведения секвенирующей реакции, 5 пкмоль олигонуклеотидного праймера и 0,5 мкг ДНК. Реакцию проводили в программируемом термостате GeneAmp PCR-system 6700 («Applied Biosystems Inc.», США) по следующей программе: 10 с при 96 °С, 15 с при 50 °С, 4 мин при 50 °С (30 циклов). После амплификации реакционную смесь очищали от невключившихся флуоресцентно меченных нуклеотидов очисткой на сефадексе G-50 superfine. Секвенирование проводили по обеим цепям ДНК. Первичные данные секвенирования (хроматограмм) расшифровывали с помощью программы Sequencher v.4.0.5. Для секвенирования использовали высококонсервативный регион пестивирусов 5'-UTR. Анализ нуклеотидных последовательностей синтезированных фрагментов проводили методами выравнивания с опубликованными последовательностями других штаммов BVDV-3 (в частности, BVDV3_D32/00 и BVDV3_Th/04_Khonkaen) в программе ClustalW (19).

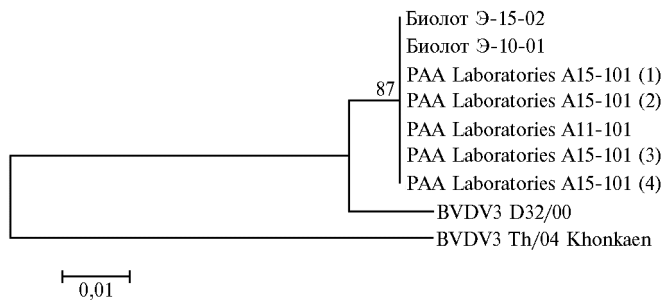
Тестировали 18 серий эмбриональных сывороток КРС, изготовленных в Южной Америке, США и Новой Зеландии (соответственно, 12, 5 и 1). Исследовали культуры перевиваемых линий клеток коронарных сосудов теленка КСТ, почки теленка MDBK и Taigus, тестикул эмбриона коровы ТЭБ, почки кролика РК-13, почки африканской зеленой мартышки Vero, фибробластов мыши L929 и МФ, почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21, трахеи эмбриона бычка FBT, почки эмбриона овцы FLK, почки котенка FK-81 (коллекции научно-исследовательских институтов). Дополнительно изучали 10 живых вакцин для медицины и ветеринарии. Пробы биоматериала (внутренние органы, кровь, сыворотка крови) отбирали у животных разных половозрастных групп из хозяйств Новосибирской, Тюменской, Омской, Кемеровской и Курганской областей, Алтайского, Красноярского и Краснодарского края, Республики Казахстан, а также от северных оленей Таймыра и Ямала и маралов Алтайского края.

Дендрогаммы строили без укоренения методом ближайшего соседа (Neighbor Joining, NJ) с использованием 2-параметрической модели Кимуры в программе MEGA v.4 (20). Для оценки достоверности топологии использовался бутстрэп-тест (1000 репликаций) (21).

Результаты. Для BVDV3 были найдены несколько видоспецифичных районов. С помощью программы Oligo v.6.31 внутри каждого мы подобрали олигонуклеотидные праймеры, обеспечивающие специфическую амплификацию его РНК. В результате предварительных испытаний наиболее удачными (по качеству получившихся ПЦР-продуктов) были праймеры, комплементарные позициям 9202-9218 и 9501-9521 генома прототипного штамма D32/00_НоВи' (AB871953.1): SEQIDNO:1 — 5'-TTTGCAGCCGA-GCGTAG-3', SEQIDNO:2 — 5'-CCTCCTGCATACTGTACCTT-3'. Дальнейшие исследования проводили с ними. Чувствительность разработанной ПЦР составила $7,4 \times 10^{-1}$ копий/мкл; фрагменты других вирусов в процессе реакции не амплифицировались. Большинство исследователей используют для секвенирования регион 5'-UTR. Это дает наиболее точные результаты, особенно в

отношении распределения изолятов вирусов по видам или типам (генотипам). Из 5'-UTR последовательностей чаще всего выбираются праймеры (8, 10, 11, 18). Мы тоже использовали в качестве мишени этот регион. Полученные нами праймеры обладали чувствительностью и специфичностью, схожими с описанными в литературе, а секвенирование выявило наличие вируса бразильской группы в исследованных партиях эмбриональной сыворотки.

Впервые Nobli-like вирус был выделен и охарактеризован в Германии Н.С. Schirrmeyer с соавт. (6) в партии эмбриональной сыворотки, собранной в Бразилии и расфасованной в Европе. Изолят, названный D32/00_'HoBi', был признан прототипным для бразильской группы вирусов. Затем идентифицировали генетически различающиеся подтипы, имеющие региональное распространение, в частности тайскую группу (11, 12). N. Mishra с соавт. (16) предположили существование третьей, индийской группы штаммов. Возможно наличие четвертой группы вирусов, выделенных за пределами индийского региона, в частности в Италии (13-15). То есть к настоящему



Филогенетическое древо, построенное без укоренения методом Neighbor Joining с использованием модели Кимуры в программе MEGA v.4. В узлах ветви показан коэффициент поддержки бутстрэп-теста. Пробы PAA Laboratories A15-101 (1-4) поступили из разных источников.

времени идентифицированы четыре генетических группы вируса. В доступной отечественной литературе имеется сообщение о выявлении атипичного пестивируса в коммерческой вакцине против чумы мелких жвачных животных на территории Республики Таджикистан (22). Мы выявили геном Nobli-like вируса в 7 образцах эмбриональной сыворотки от двух производителей из Южной Америки (рис.). Согласно результатам филогенетического анализа, все изученные образцы группировались со штаммом D32/00_'HoBi' (бразильская группа).

Нами также было показано отсутствие BVDV3 в 10 живых вакцинах, предназначенных для иммунизации человека, продуктивных и мелких домашних животных, и 11 перевиваемых линиях культур клеток. Геном вируса не удалось выявить в 189 пробах внутренних органов и 1383 пробах сыворотки крови КРС различных пород, в том числе поступивших по импорту, в 168 пробах сыворотки крови северных оленей и 63 крови маралов. Несмотря на то, что мы не установили циркуляцию атипичного пестивируса на территории обследованных регионов, его присутствие в стране не исключается. С учетом контаминации 7 образцов эмбриональных сывороток, использовавшихся в течение нескольких лет в четырех научно-исследовательских институтах России, в том числе для производства вакцин, подобная возможность существует.

Таким образом, на основе ПЦР с обратной транскрипцией нами разработан высокочувствительный специфичный метод выявления и идентификации атипичного пестивируса в биологическом материале. Применение синтетических олигонуклеотидных праймеров, комплементарных позициям 9202-9218 и 9501-9521 генома референтного штамма D32/00_'HoBi' (AB871953.1), позволяет обнаруживать последовательности вируса с чувствительностью $7,4 \times 10^{-1}$ копий/мкл. Установлена контаминация BVDV3 семи образцов эмбриональных сывороток из Южной Америки. Филогенетический анализ

выявил сходство обнаруженных вирусов между собой и со штаммом BVDV3 D32/00_'HoBi' (бразильская группа). Мы не нашли доказательств циркуляции атипичного пестивируса среди домашних и диких животных на территории нескольких областей России и Республики Казахстан. Полученные данные подтверждают необходимость постоянного обновления и совершенствования методов диагностики пестивирусов КРС, пересмотра правил международной торговли эмбриональной сывороткой и строгого контроля их соблюдения.

*¹ФГБУН Сибирский федеральный научный центр
агробиотехнологий РАН, Институт экспериментальной
ветеринарии Сибири и Дальнего Востока,
630501 Россия, Новосибирская обл., Новосибирский р-н,
р.п. Краснообск, СФНЦА РАН, а/я 463, e-mail: t-glotova@mail.ru;
²ФБУН Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»,
630559 Россия, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, р.п. Кольцово*

*Поступила в редакцию
4 июля 2017 года*

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2017, V. 52, № 6, pp. 1259-1264

IDENTIFICATION OF THE BOVINE ATYPICAL PESTIVIRUS IN BIOLOGICAL SAMPLES

S.V. Koteneva¹, R.A. Maksyutov², T.I. Glotova¹, A.G. Glotov¹

¹Siberian Federal Research Center for Agrobiotechnologies RAS, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Federal Agency of Scientific Organizations, PO Box 463, Krasnoobsk, Novosibirsk Province 630501, Russia, e-mail t-glotova@mail.ru (corresponding author);

²State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Koltsovo, Novosibirsk Province 630559, Russia

ORCID:

*Koteneva S.V. orcid.org/0000-0003-2649-7505
Maksyutov R.A. orcid.org/0000-0003-1314-281X*

*Glotova T.I. orcid.org/0000-0003-3538-8749
Glotov A.G. orcid.org/0000-0002-2006-0196*

The authors declare no conflict of interests

Received July 4, 2017

doi: 10.15389/agrobiologia.2017.6.1259eng

Abstract

Atypical cattle pestivirus (BVDV3; HoBi-like) is an unclassified candidate for the genus *Pestivirus* of the *Flaviviridae* family. The agent was isolated for the first time in 2004 from fetal bovine serum from Brazil, and shows a high degree of similarity with the BVDV1 and BVDV2. Its presence in the cattle populations can potentially reduce the effectiveness of control programs of bovine viral diarrhea. The article presents the results of developing a method for identifying of BVDV3 in the biological samples based on polymerase chain reaction. Synthetic oligonucleotide primers complementary to positions 9202-9218 and 9501-9521 of the reference strain D32/00_'HoBi' genome were selected. The basic parameters of the reaction have been worked out. The sensitivity of PCR was 7.4×10^{-1} copies/ μ l. It has high specificity and does not reveal RNA of the BVDV1, BVDV2 and classical swine fever virus. With the help of the developed PCR 18 samples of fetal bovine serum (FBS) from various sources, 11 types of continuous cell culture lines used for virus cultivation in several Russian research institutes, 10 attenuated live vaccines, 189 internal organs, 1383 blood sera from cattle, 168 blood sera from reindeer, and 63 blood samples from red deers were investigated. The virus was revealed only in seven lots of FBS obtained from two manufacturers and produced in South America. Phylogenetic analysis of amplicons showed all positive lots grouped with BVDV-3 strain D32/00_'HoBi' (Brazilian group). Given the potential risk of using contaminated fetal serum, further research of the spread of BVDV3 in Russia is needed. The virus was not found in continuous cell culture lines, vaccines used for human, cattle and small domestic animals. Additionally, no evidence has been found out of virus circulation among cattle of various breeds, including those imported from another countries, reindeers and red deers in the Krasnodar territory, Siberia and the Republic of Kazakhstan. The presence of the virus in the FBS used in the production of vaccines does not exclude its spread in Russia. The findings confirm the need for continuous updating and improvement of methods for diagnosing pestiviruses and tightening the rules for the international FBS trading.

Keywords: atypical pestivirus, BVDV3, HoBi-like virus, primers, polymerase chain reaction, cell cultures, fetal bovine serum, vaccines, phylogenetic analysis, cattle, reindeers, red deer.

REFERENCES

1. Ridpath J.F. Bovine viral diarrhea virus: global status. *Vet. Clin. North Am. Food Anim.*

- Pract.*, 2010, 26(1): 105-121 (doi: 10.1016/j.cvfa.2009.10.007).
2. Ridpath J. The contribution of infections with bovine viral diarrhoea viruses to bovine respiratory disease. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 2010, 26(2): 335-348 (doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.003).
 3. Glotov A.G., Glotova T.I. *Veterinariya*, 2015, 4: 3-8 (in Russ.).
 4. Gulyukin M.I., Yurov K.P., Glotov A.G., Donchenko N.A. *Voprosy virusologii*, 2013, 6: 13-18 (in Russ.).
 5. Bauermann F.V., Ridpath J.F., Weiblen R., Flores E.F. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013, 25(1): 6-15 (doi: 10.1177/1040638712473103).
 6. Schirrmeyer H., Strebelow G., Depner K., Hoffmann B., Beer M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.*, 2004, 85: 3647-3652 (doi: 10.1099/vir.0.80238-0).
 7. Rodrigues W.B., Otonel R.A., Fritzen J.T. Natural infection of calf with an atypical bovine pestivirus (BVDV-3). In: *Proc. XXII National Meeting of Virology & VI Mercosur Meeting of Virology (Atibaia, Brazil)*. Virus Rev. Res., 2011, 16: 74.
 8. Avalos-Ramirez R., Orlich M., Thiel H.-J., Becher P. Evidence for the presence of two novel *Pestivirus* species. *Virology*, 2001, 286: 456-465 (doi: 10.1006/viro.2001.1001).
 9. Larska M., Polak M.P., Riitho V. Kinetics of single and dual infection of calves with an Asian atypical bovine pestivirus and a highly virulent strain of bovine viral diarrhoea virus 1. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2012, 35: 381-390 (doi: 10.1016/j.cimid.2012.03.003).
 10. Xia H., Vijayaraghavan B., Belák S., Liu L. Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches. *PLoS ONE*, 2011, 6(12): e28553 (doi: 10.1371/journal.pone.0028553).
 11. Stehl K., Kampa J., Alenius S., PerssonWadman A., Baule C., Aiumlamai S., Belák S. Natural infection of cattle with an atypical "HoBi"-like pestivirus—implications for BVD control and for the safety of biological products. *Vet. Res.*, 2007, 38: 517-523 (doi: 10.1051/vetres:2007012).
 12. Haider N., Rahman M.S., Khan S.U., Mikolon A., Gurley E.S., Osmani M.G., Shanta I.S., Paul S.K., Macfarlane-Berry L., Islam A., Desmond J., Epstein J.H., Daszak P., Azim T., Luby S.P., Zeidner N., Rahman M.Z. Identification and epidemiology of a rare HoBi-like pestivirus strain in Bangladesh. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2014, 61(3): 193-198 (doi: 10.1111/tbed.12218).
 13. Decaro N., Lucente M.S., Mari V., Cirone F., Cordioli P., Camero M., Sciarretta R., Losurdo M., Lorusso E., Buonavoglia C. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, 17: 1549-1552 (doi: 10.3201/eid1708.101447).
 14. Decaro N., Lucente M.S., Mari V., Sciarretta R., Pinto P., Buonavoglia D., Martella V., Buonavoglia C. Hobi-like pestivirus in aborted bovine fetuses. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, 50(2): 509-512 (doi: 10.1128/JCM.05887-11).
 15. Decaro N., Mari V., Pinto P., Lucente M.S., Sciarretta R., Cirone F., Colaianni M.L., Elia G., Thiel H.J., Buonavoglia C. "Hobi"-like pestivirus: Both biotypes isolated from diseased animal. *J. Gen. Virol.*, 2012, 93: 1976-1983 (doi: 10.1099/vir.0.044552-0).
 16. Mishra N., Rajukumar K., Pateriya A., Kumar M., Dubey P., Behera S.P., Verma A., Bhardwaj P., Kulkarni D.D., Vijaykrishna D., Reddy N.D. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Vet. Microbiol.*, 2014, 174(1-2): 239-246 (doi: 10.1016/j.vetmic.2014.09.017).
 17. Glotov A.G., Glotova T.I. Atypical bovine pestiviruses (review). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2015, 50(4): 399-408 (doi: 10.15389/agrobiol.2015.4.399eng) (in Engl.).
 18. Xia H., Larska M., Giammarioli M., DeMia G.M., Cardeti G., Zhou W., Alenius S., Belák S., Liu L. Genetic detection and characterization of atypical bovine pestiviruses in foetal bovine sera claimed to be of Australian origin. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2013, 60(3): 284-288 (doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01341.x).
 19. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22: 4673-4680.
 20. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 2007, 24: 1596-1599.
 21. Felsenstein J. Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist*, 1985, 125(1): 1-15.
 22. Yurov K.P., Anoyatbekova A.M., Alekseenkova S.V. *Veterinariya*, 2016, 10: 8-10 (in Russ.).