



Выявление пестивирусов крупного рогатого скота при помощи мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Нефедченко А.В., Котенева С.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г.

ФГБУН Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН (СФНЦА РАН), Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск, Россия

Введение. Пестивирусы – причина репродуктивных проблем, болезней желудочно-кишечного и респираторного тракта животных. Для крупного рогатого скота значение имеют три вида: *Pestivirus* A, B и H. В настоящее время необходимы быстрые и надёжные методы дискриминации данных патогенов.

Цели и задачи исследования: разработка мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) для одновременного выявления и дифференциации трёх вирусов в режиме реального времени (РТ-ПЦР).

Материал и методы. Мишенью для амплификации служили нуклеотидные последовательности консервативных участков генов 5'-UTR пестивирусов A, B и H.

Результаты. Реакция показала высокую специфичность, чувствительность, воспроизводимость и выявляла РНК вирусов в концентрации не менее 0,6–1,2 Ig ТЦД₅₀/см³. Перекрёстных реакций с другими пестивирусами не наблюдали. РТ-ПЦР подтвердила результаты, полученные ранее в ОТ-ПЦР в режиме гель-электрофореза. При параллельном исследовании 1823 проб биоматериала результаты двух реакций полностью совпали. *Pestivirus* spp. выявлены в 76 пробах: *Pestivirus* A присутствовал в 73 пробах, B – в трёх, а H не обнаружен.

Обсуждение. Разработана двухшаговая РТ-ПЦР для одновременного выявления и типирования трёх пестивирусов. Для первой реакции использовали модифицированные панпраймеры S. Vilcek и соавт., а для типирования – праймеры и зонды собственного дизайна, что обеспечило высокую эффективность реакции.

Заключение. На молочных комплексах по содержанию скота создаются условия для циркуляции патогенных вирусов. В такой ситуации необходимы методы экспресс-диагностики, позволяющие в короткие сроки выявить несколько вирусов. Триплексный анализ в режиме реального времени может быть рекомендован в качестве экспресс-метода при массовых эпизоотологических исследованиях, а также для скрининга эмбриональной сыворотки, используемой для культивирования вирусов в медицине и ветеринарии.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; пестивирусы; виды; мультиплексная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

Для цитирования: Нефедченко А.В., Котенева С.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Выявление пестивирусов крупного рогатого скота при помощи мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(2): 95-102.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-95-102>

Для корреспонденции: Глотов Александр Гаврилович, д-р вет. наук, проф., зав. лабораторией биотехнологии диагностического центра СФНЦА РАН, 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск. E-mail: glotov_vet@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Нефедченко А.В., Глотов А.Г.; сбор и обработка материала – Нефедченко А.В., Глотова Т.И., Котенева С.В.; статистическая обработка данных – Нефедченко А.В.; редактирование – Глотова Т.И.; утверждение окончательного варианта статьи – Глотов А.Г.; ответственность за целостность всех частей статьи – Глотов А.Г.

Поступила 26.02.2020

Принята в печать 31.03.2020

Detection of bovine pestiviruses by a multiplex real-time polymerase chain reaction

Aleksey V. Nefedchenko, Svetlana V. Koteneva, Tatyana I. Glotova, Alexander G. Glotov

Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Biotechnologies of the Russian Academy of Science, Institute of Experimentally Veterinary Medicine of Siberia and Far East, Krasnoobsk, 630501, Russia

Introduction. Pestiviruses are the cause of reproductive problems, diseases of the gastrointestinal and respiratory tracts of animals. Three species are important for cattle: *Pestivirus* A, B, and H. Fast and reliable methods of differentiation of these pathogens are currently needed.

Aims and objectives of the study: the development of multiplex real time PCR for the simultaneous detection and differentiation of three viruses.

Material and methods. The nucleotide sequences of the conserved regions of the 5'-UTR genes of pestiviruses A, B, and H served as a target.

Results. The reaction showed high specificity, sensitivity, reproducibility and was able to detect virus RNA at a concentration of not less than 0.6-1.2 lg TCID_{50/cm³}. Cross-reactions with other pestiviruses were not observed. Real time PCR confirmed the results obtained previously in RT-PCR with gel electrophoresis detection. In a parallel study of 1823 biological samples, the results of the two reactions were completely consistent. *Pestivirus* spp. was detected in 76 samples, *Pestivirus A* was present in 73 samples, *Pestivirus B* – in 3 samples, and *Pestivirus H* was not detected.

Discussion. A two-step real time PCR was developed for the simultaneous detection and differentiation of three pestiviruses. Modified pan primers of S. Vilcek et al. were used for the first reaction, and primers and probes of our own design were used for virus typing, which resulted in high reaction efficiency.

Conclusion. On the big dairy farms for livestock maintenance, there are favorable conditions for the circulation of pathogenic viruses. In this situation, rapid diagnostic methods are needed to quickly identify of several viruses. Real-time triplex analysis can be recommended as the rapid method for mass epidemiological studies, as well as for screening fetal calf serum used for virus cultivation in medicine and veterinary practice.

Keywords: cattle; pestiviruses; species; real-time multiplex PCR.

For citation: Nefedchenko A.V., Koteneva S.V., Glotova T.I., Glotov A.G. Detection of bovine pestiviruses by a multiplex real-time polymerase chain reaction. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology)*. 2020; 65(2): 95-102. (In Russian).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-95-102>

For correspondence: Alexander G. Glotov, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Head of Laboratory Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Science, Krasnoobsk, 630501, Russia. E-mail: glotov_vet@mail.ru

Information about the authors:

Nefedchenko A.V., <http://orcid.org/0000-0002-4181-4268>

Koteneva S.V., <http://orcid.org/0000-0003-2649-7505>

Glotova T.I., <http://orcid.org/0000-0003-3538-8749>

Glotov A.G., <http://orcid.org/0000-0002-2006-0196>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Contribution: research concept and design – Nefedchenko A.V., Glotov A.G.; material collection and processing – Nefedchenko A.V., Glotova T.I., Koteneva S.V.; statistical data processing – Nefedchenko A.V.; editing – Glotova T.I.; approval of the final version of the article – Glotov A.G.; responsibility for the integrity of all parts of the article – Glotov A.G.

Received 26 February 2020
Accepted 31 March 2020

Введение

Пестивирусы широко распространены в природе и являются причиной значительного спектра инфекционной патологии, включающей репродуктивные проблемы, болезни желудочно-кишечного и респираторного тракта животных [1–5].

Согласно современной классификации род *Pestivirus* принадлежит к семейству *Flaviviridae* и включает 11 представителей. Для крупного рогатого скота (КРС) основное значение имеют три вида: *Pestivirus A*, *B* и *H*, ранее называвшиеся BVDV-1, -2 и -3 [6].

Все вирусы вызывают сходную патологию у восприимчивых животных и становятся причиной экономически значимых болезней КРС во всём мире, особенно при интенсивном типе ведения животноводства [7–14]. Кроме того, представители данного рода являются контаминантами биологических препаратов (эмбриональной сыворотки, перевиваемых линий культур клеток, вакцин для медицины и ветеринарии, интерферонов, трипсина, биотехнологических препаратов, эмбрионов, стволовых клеток, спермы быков-производителей и др.) [15, 16].

Все пестивирусы имеют сходное строение, их геном представлен однонитевой положительно заряженной РНК размером 12,3 тыс. нуклеотидов. Она имеет одну открытую рамку считывания длиной около 4000 кодонов, кодирующую 12 структурных и неструктурных

белков (Npro-C-Erns-E1-E2-p7-NS2/NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B), фланкированную с 5'- и 3'-концов не-транслируемыми областями 5'-UTR и 3'-UTR [17].

Из всех регионов генома вирусов для дифференциации (сравнительных исследований) и филогенетического анализа широко используют 5'-UTR, N^{pro} и E2 [17]. В связи с этим в качестве основного метода дифференциации пестивирусов применяют секвенирование отдельных фрагментов с последующим филогенетическим анализом [18, 19]. Однако этот метод дорогостоящий и занимает много времени.

Вирус подвержен мутациям, вызванным ошибками РНК-зависимой РНК-полимеразы, и рекомбинациям, приводящим к образованию его различающихся, но близкородственных мутантов (субтипов). В связи с этим патогенность возбудителя варьирует и имеет «штаммовую» зависимость. К настоящему времени известны 21 субтип *Pestivirus A*, 5 субтипов *Pestivirus B* и четыре *Pestivirus H* [20].

Учитывая широкое распространение в последние годы во всём мире нового эмерджентного вида: *Pestivirus H* (BVDV-3), возникает необходимость быстрого выявления и дифференциации всех представителей рода в одной реакции, что имеет значение для дифференциальной диагностики и разработки противоэпизоотических мероприятий в практических условиях [2, 12, 18].

Для выявления пестивирусов, как правило, используют молекулярные методы, в частности, различные модификации полимеразной цепной реакции (ПЦР), в большинстве случаев направленные на обнаружение отдельных вирусов [21, 22]. Широкое распространение во всём мире получили панпраймеры, предложенные S. Vilcek и соавт. для выявления *Pestivirus* spp. с последующим филогенетическим анализом ампликонов [21].

Для прямого выявления и дифференциации отдельных представителей рода *Pestivirus* за рубежом используют мультиплексную ПЦР, в том числе в режиме реального времени (РТ-ПЦР) [23–26]. Однако эти методы позволяют обнаружить и дифференцировать только два вида (*Pestivirus* А, В).

N. Decago и соавт. (2012) разработали способ типирования пестивирусов А, В и Н с помощью «вложенной» двухшаговой ПЦР в формате электрофореза [27]. В дальнейшем авторы разработали высокопроизводительный, чувствительный и специфичный метод мультиплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени, основанный на технологии TaqMan [28]. Предел выявления РНК составил 10^0 – 10^1 копий. Перекрёстных реакций не наблюдали.

Известно о выявлении трёх пестивирусов в сыворотке крови откормочного скота при помощи панпестипраймеров в ОТ-ПЦР в режиме гель-электрофореза [29]. Сообщений о подобных разработках в России мы не нашли. Ранее нами разработаны ОТ-ПЦР в электрофоретическом формате для выявления каждого из трёх вирусов в пробах биологического материала и эмбриональной сыворотки КРС и проведён их филогенетический анализ [30–32].

Цель данной работы – разработка мультиплексной ПЦР для одновременного выявления трёх вирусов КРС рода *Pestivirus* в режиме реального времени в образцах эмбриональной сыворотки КРС и пробах биологического материала, полученного от больных и инфицированных животных.

Материал и методы

Для расчёта олигонуклеотидных праймеров проводили выравнивание известных нуклеотидных последовательностей BVDV-1, -2 и -3, опубликованных в GenBank, с помощью программы ClustalW [33]. Химический синтез праймеров осуществляли амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе ASM-102U. Концентрацию их в маточном растворе определяли спектрометрическим методом.

На начальном этапе проводили анализ нуклеотидных последовательностей 5'-UTR области геномов всех видов рода *Pestivirus* из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и определяли наиболее консервативные участки, специфичные для всех видов, а также для каждого вида в отдельности, и подбирали специфичные олигонуклеотидные праймеры и зонды. Свойства олигонуклеотидных праймеров анализировали с использованием программы Vector NTI 9.0.0 (InforMax).

Выделение РНК вирусов проводили стандартным способом с использованием коммерческого набора «РИБО-сорб» производства ФБУН ЦНИИЭ Роспо-

требнадзора. Реакцию ОТ для получения кДНК проводили с использованием коммерческого набора «Реверта-Л» того же производителя. Для этого в пробирку, содержащую 9,5 мкл реакционной смеси: буфер для ОТ (50 mM Tris-HCl [pH 8,3], 3 mM MgCl₂, 75 mM KCl, 10 mM DTT), 0,1 mM dNTP, 0,1 мкг праймера для ОТ) и 0,5 мкл ревертазы из набора «Реверта-Л», добавляли 10 мкл РНК-пробы, осторожно перемешивали и помещали в термостат 37 °C на 30 мин. Затем добавляли 20 мкл ДНК-буфера, тщательно перемешивали и использовали для постановки ПЦР.

Постановка полимеразной цепной реакции для выявления и дифференциации пестивирусов крупного рогатого скота. Состав реакционной смеси: ПЦР-буфер (60 mM Tris-HCl [pH 8,5], 1,5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 10 mM 2-меркаптанэтанол, 0,1% Тритон X-100), 0,2 mM dNTP, по 0,2 мкг каждого праймера, по 0,1 мкг зонда, 1,25 E Taq-ДНК-полимеразы, 5 мкл кДНК. Температурный режим проведения ПЦР: 95 °C 5 мин – 1 цикл; 95 °C 10 с, 55 °C 15 с, 72 °C 30 с – 45 циклов. Измеряли флуоресценцию при 55 °C на канале FAM. Положительными считали образцы со значением порогового цикла (Ct) ≤ 40.

Реакцию проводили в два раунда. В первом раунде с общими праймерами и зондом (PVsp F, PVsp R, PVsp Z) выявляли все три вируса, во втором раунде проводили три независимые реакции с соответствующими праймерами и зондами для генотипирования каждого из трёх видов пестивирусов.

Определение чувствительности и специфичности ПЦР. Положительные контрольные образцы (ПКО) получали методом молекулярной трансформации компетентных бактериальных клеток *Escherichia coli* плазмидой pDrive, содержащей специфические ДНК-вставки, и использовали их для контроля амплификации отдельно для каждого анализа.

Концентрацию плазмидной ДНК определяли с использованием набора реагентов Quant-iT dsDNA, HS (Invitrogen, США) и флуориметра QUBIT (Invitrogen, США).

Для определения чувствительности реакции готовили 10-кратные разведения (от 10^{-1} до 10^{-7}) контрольных штаммов *Pestivirus* А (Oregon C24V, 6,33 lg ТЦД_{50/см³}), *Pestivirus* В (Blagodatsky, 6,5 lg ТЦД_{50/см³}) и ПКО (*Pestivirus* А, В и Н), каждое разведение исследовали в ПЦР. За аналитическую чувствительность принимали последнее разведение контрольных штаммов и ПКО, с которым результат ПЦР-анализа интерпретировался как положительный.

Специфичность тест-системы определяли с использованием референтных штаммов: Oregon C24V (*Pestivirus* А), Blagodatsky (*Pestivirus* В), ЛК (*Pestivirus* С), РСВ № 3 (*Bovine orthopneumovirus*), Оренбург (*Bovine alphaherpesvirus 1*), SD-1 (*Bovine rhinovirus 1*), BV-10 (*Bovine mastadenovirus A*), а также проб биоматериала, в которых нами ранее были выявлены и подтверждены секвенированием вирусы *Pestivirus* А, В и Н [30–32].

Исследование проб биологического материала. Исследованы образцы коммерческой эмбриональной сыворотки КРС разных производителей, используемые для

культивирования культур клеток и производства био-препаратов в ветеринарии и медицине, а также пробы сыворотки крови, ткани лимфатических узлов, селезёнки, лёгких от животных с подозрением на инфицирование пестивирусами. Пробы сыворотки крови отбирали в объёме не менее 1 мл, из органов и тканей вырезали кусочки размером 1×1×1 см³. Образцы эмбриональной сыворотки и сыворотки крови больных и инфицированных животных использовали для выделения РНК без предварительной подготовки. Пробы органов и тканей перед исследованием гомогенизировали для получения 10% суспензии на физиологическом растворе, центрифугировали при 10·10³ об/мин в течение 5 мин. Для выделения РНК использовали 100 мкл осветлённой надосадочной жидкости.

Всего исследовали 9 образцов эмбриональной сыворотки, 49 проб сыворотки крови и внутренних органов КРС разного возраста, давших положительный результат в предварительных исследованиях методом ОТ-ПЦР в формате гель-электрофореза [30–32].

С целью изучения сравнительной эффективности двух реакций дополнительно исследовали 1823 пробы биоматериала от животных.

Результаты

На первом этапе работ анализировали нуклеотидные последовательности 5'-UTR области геномов всех видов рода *Pestivirus* из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), определяли наиболее консервативные участки, специфичные для всех видов, а также для каждого вида отдельно, и подбирали специфичные олигонуклеотидные праймеры и зонды. Результаты приведены в табл. 1. Моделирование реак-

ции в программе Vector NTI с последовательностями геномов *Pestivirus C* (вирус классической чумы свиней) и *Pestivirus D* (вирус пограничной болезни овец) показало отсутствие реакции с данными вирусами.

Результаты определения аналитической чувствительности с использованием ПКО трёх вирусов представлены в табл. 2.

Полученные данные показали, что минимальное количество выявляемого ПКО составило 7,2·10 ГЭ на реакцию. Аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР в режиме реального времени была различной и составила 1,6·10² для *Pestivirus spp.*, 7,2·10 для *Pestivirus A*, 9,0·10 для *Pestivirus B* и 1,5·10³ для *Pestivirus H*. Расчётная эффективность амплификации для различных ПКО была ≈89% при достоверности аппроксимации (R²) от 0,9865 до 0,9931. Стандартные отклонения значений пороговых циклов варьировали от 0,12 до 0,60. Средние коэффициенты вариаций значений пороговых циклов при повторных исследованиях не превышали 1,91%, что свидетельствует о высокой повторяемости результатов определения аналитической чувствительности РТ-ПЦР.

Диагностическая чувствительность была определена исследованием 10-кратных разведений референтных штаммов *Pestivirus A* и *B* с известным титром. Все исследования проводили в трёх повторах. Из-за отсутствия штаммов *Pestivirus H* не удалось провести подобные исследования с ним. Данные по определению чувствительности приведены в табл. 3.

Результаты показали, что минимальный титр штамма Oregon C24V (*Pestivirus A*), выявляемый в реакции, равен 1,2 lg ТЦД_{50/см³}, а штамма Blagodatsky – 0,6 lg ТЦД_{50/см³}.

В опыте по определению специфичности реакции со штаммами ЛК (*Pestivirus C*), РСВ № 3 (*Bovine orthopneumovirus*), Оренбург (*Bovine alphaherpesvirus 1*), SD-1 (*Bovine rhinovirus 1*), BV-10 (*Bovine mastadenovirus A*) получены отрицательные результаты во всех реакциях. Специфичность реакции в отношении вируса пограничной болезни овец не проверяли в связи с отсутствием референтного штамма.

На первом этапе исследовали 49 проб биоматериала, в которых ранее с помощью ПЦР в формате гель-электрофореза и секвенирования были выявлены 9 субтипов *Pestivirus A* и *B*, а также 9 образцов эмбриональных сывороток, в 7 из них присутствовал *Pestivirus H* итальянской группы, а в двух – *Pestivirus B*. Все пробы дали положительный результат при исследовании в мультиплексной РТ-ПЦР (табл. 4).

Таблица 1. Последовательности праймеров и зондов, выбранные для выявления и генотипирования пестивирусов

Table 1. Sequences of primers and probes selected for detection and genotyping of *Pestiviruses*

Мишень Target	Праймер Primer	Последовательность (5' → 3') Sequences (5' → 3')	Т отжига, °C Annealing T, °C	Размер ампликона, п.н. The size amplicon, b.p.
Выявление Identification				
<i>Pestivirus</i> spp.	PVspp F	5-ccatrccttagtaggackagc-3	51,8	286–289
	PVspp R	5-tcaactccatgtgccatgtac 3	51,6	
	PVspp Z	5-(FAM)ctcgagatgccaygtggacgagg(BHQ1)-3	62,5	
Генотипирование Genotyping				
<i>Pestivirus A</i>	PVA F	5-ggtagcaacacagtggtaggt-3	50,4	105
	PVA R	5-cgtccacgtggcatctc-3	49,6	
	PVA Z	5-(FAM)tagtcgtcagtggttcgacgacct(BHQ1)-3	59,7	
<i>Pestivirus B</i>	PVB F	5-ctagcgtatgcccttagtag-3	49,4	106–108
	PVB R	5-cgtcgaagcattgacgact-3	50,6	
	PVB Z	5-(FAM)tagcggtagcagtgagtcattggatggcc(BHQ1)-3	63,6	
<i>Pestivirus H</i>	PVsp F	5-ccatrccttagtaggackagc-3	52,3	110
	PVH R	5-tccttgatgcgtcgaacca-3	54,7	
	PVH Z	5-(FAM)tagtggttagcagtgagctccttgat(BHQ1)-3	60,6	

Таблица 2. Аналитическая чувствительность при исследовании положительных контрольных образцов**Table 2.** Analytical sensitivity in the testing of positive control samples

Положительный контрольный образец Positive control sample	Аналитическая чувствительность (геномный эквивалент в реакции) Analytical sensitivity (genomic equivalent per reaction)	Значение Ct в последнем разведении, детектируемом положительно (среднее Ct ± SD) Ct value in the last dilution tested positive (mean Ct ± SD)	Средний коэффициент вариации для всех разведений Average coefficient of variation for all dilutions	Достоверность аппроксимации (R ²) Approximation reliability (R ²)
<i>Pestivirus</i> spp.	1,6 · 10 ²	37,83 ± 0,12	1,48	0,9931
<i>Pestivirus</i> A	7,2 · 10	38,29 ± 0,55	1,91	0,9873
<i>Pestivirus</i> B	9,0 · 10	35,38 ± 0,32	1,63	0,9865
<i>Pestivirus</i> H	1,5 · 10 ³	35,55 ± 0,46	1,31	0,9876

Таблица 3. Диагностическая чувствительность полимеразной цепной реакции в режиме реального времени со штаммами вирусов *Pestivirus* A и B**Table 3.** Diagnostic sensitivity of real time PCR for detection of *Pestivirus* A and B strains

Штамм Oregon C24V, lg ТЦД _{50/см³} Strain Oregon C24V, lg TCD _{50/cm³}	Значение порогового цикла при различных концентрациях вируса (среднее Ct ± SD) The value of the threshold cycle at different concentrations of the virus (mean Ct ± SD)		Штамм Blagodatsky, lg ТЦД _{50/см³} Strain Blagodatsky, lg TCD _{50/cm³}	Значение порогового цикла при различных концентрациях вируса (среднее Ct ± SD) The value of the threshold cycle at different concentrations of the virus (mean Ct ± SD)	
	<i>Pestivirus</i> spp.	<i>Pestivirus</i> A		<i>Pestivirus</i> spp.	<i>Pestivirus</i> B
6,2	20,92 ± 0,30	19,47 ± 0,46	5,6	22,20 ± 0,20	18,12 ± 0,46
5,2	23,82 ± 0,20	22,26 ± 0,58	4,6	26,07 ± 0,13	22,36 ± 0,86
4,2	27,70 ± 0,12	26,45 ± 0,46	3,6	29,12 ± 0,62	24,39 ± 0,44
3,2	30,99 ± 0,86	29,44 ± 0,37	2,6	32,11 ± 0,85	28,94 ± 0,69
2,2	33,84 ± 0,66	32,71 ± 0,32	1,6	35,53 ± 0,32	33,79 ± 0,55
1,2	37,84 ± 0,66	35,76 ± 0,31	0,6	39,53 ± 0,32	38,76 ± 0,87
0,2	Отрицательно Negative	Отрицательно Negative	0,06	Отрицательно Negative	Отрицательно Negative

Таблица 4. Оценка специфичности полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с пробами биоматериала от животных**Table 4.** The assessment of specificity of real time PCR based on testing of biological samples from animals

Проба Sample	Количество проб Number of samples	Результаты реакции Reaction results				
		<i>Pestivirus</i> spp.	<i>Pestivirus</i> A	<i>Pestivirus</i> B	<i>Pestivirus</i> H	нетипируемые Untypable
Эмбриональная сыворотка, положительная на <i>Pestivirus</i> H <i>Pestivirus</i> H Positive Embrional Serum	7	7	0	0	7	0
Эмбриональная сыворотка, положительная на <i>Pestivirus</i> B <i>Pestivirus</i> B Positive Embrional Serum	2	2	0	2	0	0
Сыворотка крови КРС* Serum of cattle	15	15	15	0	0	0
Пробы органов КРС Samples from cattle	34	34	30	4	0	0
Всего... Total...	58	58	45	6	7	0

Примечание. * КРС – крупный рогатый скот.

Результаты сравнительного исследования 1823 проб биоматериала от животных двумя методами – разработанной нами РТ-ПЦР и ПЦР в варианте электрофореза представлены в табл. 5.

По данным табл. 5, последовательности *Pestivirus* spp. выявлены в 76 пробах биоматериала, при этом результаты двух ПЦР полностью совпали. *Pestivirus* A присутствовал в 73 пробах, *Pestivirus* B – только в трёх, а *Pestivirus* H и нетипируемые образцы не выявлены.

Для подтверждения специфичности полученных результатов определяли нуклеотидную последовательность ампликонов с использованием набора

BigDye 3.1 (Applied Biosystems, США) с последующей очисткой на сефадексе G-50 Superfine. Секвенирование ПЦР-фрагментов проводили по обеим цепям ДНК. Расшифровку первичных данных секвенирования (хроматограмм) проводили с помощью программы Sequencher 4.0.5 (Gene Codes Corporation, США). Анализировали нуклеотидные последовательности синтезируемых фрагментов методами выравнивания с опубликованными последовательностями штаммов пестивирусов с помощью программы ClustalW, согласно J. Thompson и соавт. [33].

В результате исследований в пробах органов больных животных и сыворотках крови КРС выявили и генотипировали только *Pestivirus A* и *B*.

Таким образом, разработанная РТ-ПЦР высокочувствительна, специфична и эффективна при выявлении и дифференциации трёх пестивирусов в образцах эмбриональной сыворотки, в сыворотке крови и пробах органов КРС.

Обсуждение

Для быстрого выявления *Pestivirus A*, *B* и *H* в клинических образцах было разработано несколько высокочувствительных методик на основе ПЦР, но только некоторые из них могли одновременно дифференцировать *Pestivirus A* и *B* [23–28]. Открытие нового *Pestivirus H*, вызывающего сходные клинические признаки у животных с *Pestivirus A* и *B*, вызвало ряд опасений относительно способности существующих методик эффективно обнаруживать его. ОТ-ПЦР с панпести-праймерами 324/326, разработанная S. Vilcek и соавт. [21], обычно используемая для молекулярного скрининга вирусов этого рода, в некоторых случаях была низкоэффективной в отношении *Pestivirus H* из-за несоответствия на 3'-конце праймера 324, что препятствовало его правильному отжигу [28].

М. Вахи и соавт. (2006) разработали одноступенчатую ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием технологии SmartCycler и TaqMan-зондов. Общие и видоспецифические праймеры были выбраны из последовательностей генома 5'-UTR. Анализ в реальном времени выявлял 10–100 ТЦД₅₀ вируса со значениями коэффициента корреляции (r^2) 0,998 и 0,999 для *Pestivirus A* и *B* соответственно. Анализ ранее типированных 54 штаммов BVDV и полевых изолятов показал высокую эффективность метода, а специфичность

зондов TaqMan дополнительно продемонстрирована отсутствием перекрёстных реакций с вирусом классической чумы свиней и вирусом пограничной болезни овец. Были показаны высокая воспроизводимость методики, а также совпадение с результатами выделения вирусов [25]. Авторы предположили, что одностадийный анализ ОТ-ПЦР в реальном времени – быстрый, чувствительный и специфический тест для выявления и типирования пестивирусов.

В 2008 г. была разработана методика выявления пестивирусов на основе анализа TaqMan, специфичного *Pestivirus H*, но не позволяющего провести одновременную дифференциацию *Pestivirus A* и *B*, показавшую частичную перекрёстную реакцию со штаммами *Pestivirus B* с высоким титром. Кроме того, 3 из 15 положительных на *Pestivirus B* образцов проявили перекрёстные реакции с *Pestivirus H* [19].

N. Decaro и соавт. (2012) разработали ПЦР-анализ для одновременного выявления трёх пестивирусов. Этот метод был специфичным и надёжным, но трудоёмким, поскольку требовал двух отдельных этапов: ОТ-ПЦР с последующей вложенной амплификацией. Кроме того, он представлял определённый риск перекрёстного загрязнения положительных и отрицательных образцов [27].

Чтобы преодолеть ограничения существующих методов V. Mari и соавт. (2016) разработали РТ-ПЦР на основе технологии TaqMan в режиме реального времени для дифференциации трёх пестивирусов в одной реакции. Реакция была чувствительной и показала воспроизводимые результаты, а предел выявления РНК вирусов составил 10⁰–10¹ копий РНК. Перекрёстных реакций между вирусами не наблюдали. При исследовании полевых образцов от животных с инфекцией *Pestivirus A*, *B* и *H* реакция показала приблизительно

Таблица 5. Диагностическая эффективность двух вариантов полимеразной цепной реакции при исследовании проб биологического материала от животных

Table 5. Diagnostic efficiency of two variants of PCR in the testing of biological samples from animals

Проба Sample	Количество проб Number samples	Результаты реакции Reaction results					
		электрофорезный вариант electrophoresis option	РТ-ПЦР				нетипируемые untypable
			<i>Pestivirus</i> spp.	<i>Pestivirus A</i>	<i>Pestivirus B</i>	<i>Pestivirus H</i>	
Сыворотка крови новорождённых телят Blood serum of newborn calves	870	4	4	4	0	0	0
Пробы органов телят с респираторной патологией Samples of calf organs with respiratory pathology	389	47	47	47	0	0	0
Абортированные плоды и мертворождённые телята Aborted fetuses and stillborn calves	23	7	7	6	1	0	0
Коровы с гинекологической патологией Cows with gynecological pathology	74	18	18	16	2	0	0
Сперма быков-производителей Semen from bulls	467	0	0	0	0	0	0
Всего... Total...	1823	76	76	73	3	0	0

одинаковую чувствительность и достоверно различала все вирусы. При анализе 159 положительных проб биоматериала от КРС и тестированного ранее в ПЦР *Pestivirus A* и *B* были обнаружены в 103 и 15 пробах соответственно. 41 проба материала, полученного от животных из двух разных стад на юге Италии, была положительной на BVDV-3. Чувствительность выявления РНК составила: $4,02 \cdot 10^1 - 7,26 \cdot 10^7$ (*Pestivirus A*), $5,78 \cdot 10^1 - 8,45 \cdot 10^6$ (*Pestivirus B*) и $3,72 \cdot 10^1 - 2,75 \cdot 10^7$ (*Pestivirus H*) [28]. По сравнению с ПЦР анализ ОТ-ПЦР в реальном времени был одинаково или чуть более чувствительным и занимал меньше времени.

Мы разработали двухшаговую ОТ-ПЦР для одновременного выявления и типирования трёх пестивирусов в режиме реального времени. Мы модифицировали панпестипраймеры 324/326 S. Vilcek и соавт. [21] для более эффективного выявления всех вирусов, а для типирования видов применили праймеры и зонды собственного дизайна, что обеспечило высокую чувствительность и специфичность реакции. Нами не отмечено перекрёстных реакций между пестивирусами и положительного сигнала с вирусами других нозологических групп. Минимальное количество ПКО составило $7,2 \cdot 10^3$ ГЭ на реакцию. Аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР в режиме реального времени была различной и составила $1,6 \cdot 10^2$ для *Pestivirus spp.*, $7,2 \cdot 10$ для *Pestivirus A*, $9,0 \cdot 10$ для *Pestivirus B* и $1,5 \cdot 10^3$ для *Pestivirus H*. Расчётная эффективность амплификации для разных ПКО была $\approx 89\%$ при достоверности аппроксимации (R^2) от 0,9865 до 0,9931. Стандартные отклонения значений пороговых циклов варьировали от 0,12 до 0,60. Средние коэффициенты вариаций значений пороговых циклов при повторных исследованиях не превышали 1,91%, что свидетельствует о высокой повторяемости результатов определения аналитической чувствительности РТ-ПЦР. Наши результаты не уступают зарубежным аналогам.

Ранее нами была установлена циркуляция на территории Сибири семи субтипов BVDV-1 (1a, 1b, 1c, 1d, 1f, 1i, 1p) и двух субтипов BVDV-2 (2b и 2c). Преобладающим субтипом у животных был BVDV1-b, а в перевиваемых линиях культур клеток чаще выявляли BVDV-1a. Присутствие BVDV-3 итальянской группы установили в семи лотах эмбриональной сыворотки, полученной от двух производителей [30–32]. В настоящей работе все пробы биоматериала, давшие положительный результат в гель-электрофорезной реакции, были подтверждены мультиплексной РТ-ПЦР.

Сравнительные испытания двух вариантов реакций показали полное совпадение их результатов. Последовательности *Pestivirus spp.* выявили в 76 пробах биоматериала. Из них *Pestivirus A* присутствовал в 73 пробах, *Pestivirus B* – в 3 пробах, а *Pestivirus H* и нетипируемые образцы не были выявлены.

Теоретически, ограничением данного исследования является то, что анализируемые штаммы пестивирусов были географически однородными, поскольку выделены только в регионе Сибири. Поэтому теоретически менее распространённые подтипы или дивергентные вирусы, циркулирующие в других регио-

нах страны, могут показать другие результаты. В таких случаях возможно дополнительное проведение филогенетического анализа. Однако результаты выявления BVDV-3 в пробах эмбриональной сыворотки обнадеживают и служат доказательством специфичности разработанного нами метода. Потенциальным ограничением метода может быть вирус пограничной болезни овец, выявленный у КРС [34], однако пробы биоматериала были получены от животных, содержащихся на мегафермах, где их контакт с овцами полностью исключен, и эпизоотическая ситуация не требовала включения данного вируса в протокол реакции. Моделирование реакции в программе Vector NTI с последовательностями геномов вирусов классической чумы свиней и пограничной болезни овец, опубликованных в GenBank, дало отрицательные результаты.

Заключение

На фоне экономических реформ, сопровождающихся интенсификацией молочного и мясного животноводства и ростом количества мегаферм, особую актуальность приобретают вирусные инфекции, характеризующиеся многообразием клинических форм и синдромов. Большое значение они имеют для хозяйств, куда постоянно или периодически вводят новых животных из разных источников и происходит их перемещение внутри хозяйств, что создаёт условия для циркуляции патогенных вирусов среди восприимчивых категорий. В такой ситуации необходимы методы экспресс-диагностики, позволяющие в короткие сроки выявить несколько вирусов, в частности мультиплексные ПЦР в режиме реального времени. Актуально также определение контаминации широкого спектра биологических препаратов пестивирусами.

Мечение видоспецифических зондов флуорофорами позволяет достоверно определить характеристики пестивирусных штаммов, содержащихся в клинических образцах. Кроме того, 96-луночный формат планшетов для ПЦР в реальном времени обеспечивает высокую пропускную способность с возможностью одновременного тестирования нескольких образцов. Разработанный анализ представляет собой закрытую систему, в которой пробирка никогда не открывается после амплификации, и это снижает вероятность перекрёстного загрязнения новых образцов предварительно амплифицированными продуктами.

Мультиплексный анализ TaqMan в режиме реального времени может быть рекомендован для экспресс-диагностики болезней КРС, вызванных пестивирусами, для массовых эпизоотологических исследований с целью выявления персистентно инфицированных животных при реализации программ контроля, а также для скрининга пулов эмбриональной сыворотки, используемой для культивирования вирусов в медицине и ветеринарии.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 4-7; 13, 14; 16-29; 33, 34 см. REFERENCES)

- Глотов А.Г., Глотова Т.И., Шуляк А.Ф. Пестивирусы жвачных животных. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(2): 59-2. DOI: <http://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-2-59-62>

3. Гулюкин М.И., Юров К.П., Глотов А.Г., Донченко Н.А. Стратегия борьбы с вирусной диареей – болезнью слизистых крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах российской федерации. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(6): 13-8.
8. Верховская А.Е., Сергеев В.А., Алипер Т.И., Иванов Е.В. Особенности диагностики и профилактики вирусной диареи крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2009; (8): 3-7.
9. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Петрова О.Г., Нefeldchenko A.B., Татарчук А.Т., Котенева С.В. и др. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2002; (3): 17-1.
10. Шилова Е.Н., Ряпосова М.В., Шкуратова И.А., Вялых Е.В. Вирусная диарея – болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота в Уральском регионе. *Ветеринария*. 2014; (5): 19-21.
11. Черных О.Ю., Шевченко А.А., Джаилиди Г.А., Мищенко В.А., Мищенко А.В., Шевкопляс В.Н. Проблемы вирусной диареи крупного рогатого скота. *Труды Кубанского государственного аграрного университета*. 2016; (58): 194-8.
12. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Атипичные пестивирусы крупного рогатого скота. *Сельскохозяйственная биология*. 2015; 50(4): 399-408. DOI: <http://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.4.399rus>
15. Урываев Л.В., Ионова К.С., Дедова А.В., Дедова Л.В., Селиванова Т.К., Парасюк Н.А. и др. Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(5): 15-21.
30. Глотов А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Максюттов Р.А., Забережный А.Д. Филогенетический анализ пестивирусов крупного рогатого скота, выявленных в Сибири. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(4): 185-91. DOI: <http://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-185-191>
31. Котенева С.В., Максюттов Р.А., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Идентификация атипичного пестивируса крупного рогатого скота в биологических образцах. *Сельскохозяйственная биология*. 2017; 52(6): 1259-64. DOI: <http://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.6.1259rus>
32. Котенева С.В., Нefeldchenko A.B., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Генетический полиморфизм возбудителя вирусной диареи (болезни слизистых оболочек) крупного рогатого скота на молочных комплексах Сибири. *Сельскохозяйственная биология*. 2018; 53(6): 1238-46. DOI: <http://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.6.1238rus>

REFERENCES

1. Evans C.A., Piniar B., Larska M., Graham D., Schweizer M., Guidarini C., et al. Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66(2): 640-52. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13068>
2. Glotov A.G., Glotova T.I., Shulyak A.F. Pestiviruses in ruminants. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(2): 59-2. DOI: <http://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-2-59-62> (in Russian)
3. Gulyukin M.I., Yurov K.P., Glotov A.G., Donchenko N.A. Bovine viral diarrhoea control in Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(6): 13-8. (in Russian)
4. Ridpath J.F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(1): 105-21. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.007>
5. Bauermann F.V., Ridpath J.F., Weiblen R., Flores E.F. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2013; 25(1): 6-15. DOI: <http://doi.org/10.1177/1040638712473103>
6. Simmonds P., Becher P., Bukh J., Gould E.A., Meyers G., Monath T., et al. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(1): 2-3. DOI: <http://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>
7. Piniar B., Firth C.L., Richter V., Lebl K., Trauffer M., Dzieciol M., et al. A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. *Prev. Vet. Med.* 2017; 137(Pt. A): 77-92. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.12.014>
8. Verkhovskaya A.E., Sergeev V.A., Aliper T.I., Ivanov E.V. Features of diagnosis and prevention of cattle viral diarrhoea. *Veterinariya*. 2009; (8): 3-7. (in Russian)
9. Glotov A.G., Glotova T.I., Petrova O.G., Nefeldchenko A.V., Tatarchuk A.T., Koteneva S.V., et al. The spread of viral respiratory diseases of cattle. *Veterinariya*. 2002; (3): 17-1. (in Russian)
10. Shilova E.N., Ryaposova M.V., Shkuratova I.A., Vyalykh E.V. Bovine viral diarrhoea in the Ural region. *Veterinariya*. 2014; (5): 19-21. (in Russian)
11. Chernykh O.Yu., Shevchenko A.A., Dzhailedi G.A., Mishchenko V.A., Mishchenko A.V., Shevkoplyas V.N. Problems of viral diarrhoea in cattle. *Tруды Кубанского государственного аграрного университета*. 2016; (58): 194-8. (in Russian)
12. Glotov A.G., Glotova T.I. Atypical cattle pestiviruses. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2015; 50(4): 399-408. DOI: <http://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.4.399rus> (in Russian)
13. Evermann J.F., Ridpath J.F. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the northwestern United States. *Vet. Microbiol.* 2002; 89(2-3): 129-39. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00178-5](http://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00178-5)
14. Bauermann F.V., Ridpath J.F., Weiblen R., Flores E.F. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2013; 25(1): 6-15. DOI: <http://doi.org/10.1177/1040638712473103>
15. Uryvaev L.V., Ionova K.S., Dedova A.V., Dedova L.V., Selivanova T.K., Parasyuk N.A., et al. Analysis of the cell tissue culture contamination with the bovine viral diarrhoea virus and mycoplasmas. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(5): 15-21. (in Russian)
16. Giangaspero M. Pestivirus species potential adventitious contaminants of biological products. *Trop. Med. Surg.* 2013; 1(6). DOI: <http://doi.org/10.4172/2329-9088.1000153>
17. Simmonds P., Becher P., Collett M.S., Gould E.A., Heinz F.X., Meyers G. Family Flaviviridae. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Science; 2011: 1003-20.
18. Bauermann F.V., Flores E.F., Ridpath J.F. Antigenic relationships between Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and control. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2012; 24(2): 253-61. DOI: <http://doi.org/10.1177/1040638711435144>
19. Liu L., Xia H., Wahlberg N., Belák S., Baule C. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology*. 2009; 385(2): 351-7. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.004>
20. Yesilbag K., Alpaly G., Becher P. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus. *Viruses*. 2017; 9(6): E128. DOI: <http://doi.org/10.3390/v9061028>
21. Vilcek S., Herring A.J., Herring J.A., Nettleton P.F., Lowings J.P., Paton D.J. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 1994; 136(3-4): 309-23. DOI: <http://doi.org/10.1007/bf01321060>
22. Nagai M., Hayashi M., Sugita S., Sakoda Y., Mori M., Murakami T., et al. Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses using five different genetic regions. *Virus. Res.* 2004; 99(2): 103-13. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.10.006>
23. Gilbert S.A., Burton K.M., Prins S.E., Dereg D. Typing of bovine viral diarrhoea viruses directly from blood of persistently infected cattle by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(6): 2020-3.
24. Letellier C., Kerkhofs P. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods*. 2003; 114(1): 21-7. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.08.004>
25. Baxi M., McRae D., Baxi S., Greiser-Wilke I., Vilcek S., Amoako K., et al. A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses. *Vet. Microbiol.* 2006; 116(1-3): 37-44. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.03.026>
26. La Rocca S.A., Sandvik T. A short target real-time RT-PCR assay for detection of pestiviruses infecting cattle. *J. Virol. Methods*. 2009; 161(1): 122-7. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.06.005>
27. Decaro N., Sciarretta R., Lucente M.S., Mari V., Amorisco F., Colaianni M.L., et al. A nested PCR approach for unambiguous typing of Pestiviruses infecting cattle. *Mol. Cell. Probes*. 2012; 26(1): 42-6. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.11.003>
28. Mari V., Losurdo M., Lucente M.S., Lorusso E., Elia G., Martella V., et al. Multiplex real-time RT-PCR assay for bovine viral diarrhoea virus type 1, type 2 and HoBi-like pestivirus. *J. Virol. Methods*. 2016; 229: 1-7. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.12.003>
29. Monteiro F.L., Cargnelutti J.F., Martins B., Noll J.G., Weiblen R., Flores E.F. Detection of bovine pestiviruses in sera of beef calves by a RT-PCR based on a newly designed set of pan-bovine pestivirus primers. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2019; 31(2): 255-8. DOI: <http://doi.org/10.1177/1040638719826299>
30. Glotov A.G., Koteneva S.V., Glotova T.I., Yuzhakov A.G., Maksyutov R.A., Zaberezhnyy A.D. Phylogenetic analysis of bovine pestiviruses detected in Siberia. *Voprosy virusologii*. 2018; 63(4): 185-91. DOI: <http://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-185-191> (in Russian)
31. Koteneva S.V., Maksyutov R.A., Glotova T.I., Glotov A.G. Identification of the bovine atypical pestivirus in biological samples. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2017; 52(6): 1259-64. DOI: <http://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.6.1259rus> (in Russian)
32. Koteneva S.V., Nefeldchenko A.V., Glotova T.I., Glotov A.G. Genetic polymorphism of the bovine viral diarrhoea viruses in big dairy farms in Siberia. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2018; 53(6): 1238-46. DOI: <http://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.6.1238rus> (in Russian)
33. 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(22): 4673-80. DOI: <http://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
34. Strong R., La Rocca S.A., Ibata G., Sandvik T. Antigenic and genetic characterisation of border disease viruses isolated from UK cattle. *Vet. Microbiol.* 2010; 141(3-4): 208-15. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.010>