



ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-141>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Генетический полиморфизм сибирских изолятов коронавируса крупного рогатого скота (Coronaviridae: *Betacoronavirus*: *Betacoronavirus-1*)

Глотов А.Г.¹, Нефедченко А.В.¹, Южаков А.Г.², Котенева С.В.¹, Глотова Т.И.¹, Комина А.К.², Красников Н.Ю.²

¹ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН)», Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск, Россия;

²ФГБНУ «Федеральный научный центр Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко Российской академии наук», 109428, г. Москва, Россия

Введение. Коронавирусы крупного рогатого скота (BCoV) – причина диарей, респираторных болезней телят и зимней дизентерии коров. Актуально изучение генетического разнообразия этих вирусов.

Цель работы – изучение генетического полиморфизма изолятов BCoV, циркулирующих среди молочного скота в Сибири.

Материалы и методы. В работе использован биоматериал, взятый у падших или вынужденно забитых животных до начала исследования. Мишень для амплификации – нуклеотидные последовательности участков генов *S* и *N*. Филогенетические дендрограммы строили с использованием метода максимального правдоподобия в программе MEGA 7.0.

Результаты. По результатам ОТ-ПЦР геном вируса присутствовал в пробах биоматериала от телят с диарейным (16,3%) и респираторным (9,9%) синдромами. Первичные нуклеотидные последовательности участка гена *S* определили для 18, а гена *N* – для 12 изолятов. На основе гена *S* изоляты разделились на две клады с двумя подкладами в каждой. В первую подкладу первой клады (европейская линия) вошли 11 изолятов. Во вторую подкладу, включающую классические штаммы Квебек и Мёбус, исследуемые изоляты не входили. В первой подкладу второй клады (американо-азиатская линия) оказались 6 исследованных изолятов. Ко второй подкладу (смешанная линия) отнесли один изолят. На основе гена *N* получили две клады, одна из которых включала две подклады. В первую подкладу первой клады вошли 3 изолята (американо-азиатская линия), а во вторую – один (смешанная линия). Во второй кладе (смешанная) оказались 8 изолятов. Различий между диарейными и респираторными изолятами, а также зависимости от их географического местоположения не установили.

Заключение. Исследованная популяция изолятов BCoV носит неоднородный характер. Анализ нуклеотидных последовательностей является полезным инструментом для изучения молекулярной эпизоотологии коронавирусных инфекций и решения вопроса о применении вакцин в конкретном регионе.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; коронавирусы; секвенирование; филогенетический анализ

Для цитирования: Глотов А.Г., Нефедченко А.В., Южаков А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Комина А.К., Красников Н.Ю. Генетический полиморфизм сибирских изолятов коронавируса крупного рогатого скота (Coronaviridae: *Betacoronavirus*: *Betacoronavirus-1*). *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(6): 465-474. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-141>

Для корреспонденции: Глотов Александр Гаврилович, д-р вет. наук, профессор, главный научный сотрудник – заведующий лабораторией биотехнологий диагностическим центром ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий (СФНЦА) РАН», Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, 630501, Новосибирская область, Новосибирский р-н, пос. Краснообск, Россия. E-mail: glovov_vet@mail.ru

Участие авторов: Глотов А.Г. – идея и дизайн исследования, систематизация результатов, написание текста, утверждение окончательного варианта статьи; Нефедченко А.В. – молекулярно-генетические исследования; Южаков А.Г. – молекулярно-генетические исследования, анализ сиквенсов; Котенева С.В. – обработка биологического материала; Глотова Т.И. – анализ литературы, редактирование статьи; Комина А.К. – обработка биологического материала, секвенирование; Красников Н.Ю. – обработка биологического материала, секвенирование.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета в рамках выполнения задания № 0533-2021-0018 (СФНЦА РАН) и части работы по теме № FGUG-2022-18 (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с CONSENSUS AUTHOR GUIDELINES FOR ANIMAL USE (IAVES 23 JULY 2010).

Поступила 25.09.2022
Принята в печать 21.11.2022
Опубликована 30.12.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-141>

Genetic diversity of Siberian bovine coronavirus isolates (Coronaviridae: *Betacoronavirus*: *Betacoronavirus-1*)

Alexander G. Glotov¹, Alexey V. Nefedchenko¹, Anton G. Yuzhakov², Svetlana V. Koteneva¹, Tatyana I. Glotova¹, Alina K. Komina², Nikita Yu. Krasnikov²

¹Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Biotechnologies of the Russian Academy of Science, Institute of Experimentally Veterinary Medicine of Siberia and Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, 630501, Russia;

²Federal Scientific Center All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, 109428, Moscow, Russia

Introduction. Bovine coronaviruses (BCoVs) are causative agents of diarrhea, respiratory diseases in calves and winter cow dysentery. The study of genetic diversity of these viruses is topical issue.

The **purpose** of the research is studying the genetic diversity of BCoV isolates circulating among dairy cattle in Siberia.

Materials and methods. Specimens used in this study were collected from animals that died or was forcedly slaughtered before the start of the study. The target for amplification were nucleotide sequences of S and N gene regions.

Results. Based on the results of RT-PCR testing, virus genome was present in 16.3% of samples from calves with diarrheal syndrome and in 9.9% with respiratory syndrome. The nucleotide sequences of S gene region were determined for 18 isolates, and N gene sequences - for 12 isolates. Based on S gene, isolates were divided into two clades each containing two subclades. First subclade of first clade (European line) included 11 isolates. Second one included classic strains Quebec and Mebus, strains from Europe, USA and Korea, but none of sequences from this study belonged to this subclade. 6 isolates belonged to first subclade of second clade (American-Asian line). Second subclade (mixed line) included one isolate. N gene sequences formed two clades, one of them included two subclades. First subclade included 3 isolates (American-Asian line), and second subclade (mixed) included one isolate. Second clade (mixed) included 8 sequences. No differences in phylogenetic grouping between intestinal and respiratory isolates, as well as according to their geographic origin were identified.

Conclusion. The studied population of BCoV isolates is heterogeneous. Nucleotide sequence analysis is a useful tool for studying molecular epidemiology of BCoV. It can be beneficial for choice of vaccines to be used in a particular geographic region.

Keywords: *cattle; coronaviruses; sequencing; phylogenetic analysis*

For citation: Glotov A.G., Nefedchenko A.V., Yuzhakov A.G., Koteneva S.V. Glotova T.I., Komina K.A., Krasnikov N.Y. Genetic polymorphism of Siberian bovine coronavirus isolates (Coronaviridae: *Betacoronavirus*: *Betacoronavirus-1*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(6): 465-474 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-141>

For correspondence: Alexander G. Glotov, Dr. Sci. (Vet.), Professor, Chief Researcher – Head of Biotechnology Laboratory, Diagnostic Center, FSBI Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences, Institute of Experimental Veterinary Medicine of Siberia and the Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, 630501, Russia. E-mail: glotov_vet@mail.ru

Information about the authors:

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

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

Yuzhakov A.G., <https://orcid.org/0000-0002-0426-9678>

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

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

Komina K.A., <https://orcid.org/0000-0002-7173-5501>

Krasnikov N.Y., <https://orcid.org/0000-0001-8148-3080>

Contribution: Glotov A.G. – the idea and design of the study, systematization of the results, writing the text, approval of the final version of the article; Nefedchenko A.V. – molecular genetic studies; Yuzhakov A.G. – molecular genetic studies, sequence analysis; Koteneva S.V. – processing of biological material; Glotova T.I. – literature analysis, article editing; Komina A.K. – processing of biological material, sequencing; Krasnikov N.Yu. – processing of biological material, sequencing.

Funding. The research was carried out at the expense of the state budget within the framework of assignment No. 0533-2021-0018 (SFSC RAS) and the part of the work on the topic No. FGUG-2022-18 (VIEV RAS).

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with CONSENSUS AUTHOR GUIDELINES FOR ANIMAL USE (IAVES 23 JULY 2010).

Received 25 September 2022

Accepted 21 November 2022

Published 30 December 2022

Введение

Коронавирус крупного рогатого скота (Bovine coronavirus – BCoV) принадлежит к порядку Nidovirales, семейству Coronaviridae, роду *Betacoronavirus-1* [1]. Геном вируса представлен одноцепочечной положительно заряженной РНК (рибонуклеиновая кислота) размером около 32 Kb и включает 10 открытых рамок считывания (ORF), фланкированных 5'- и 3'-нетранслируемыми областями [2]. Это оболочечный вирус диаметром примерно 100–120 нм с пятью структурными белками:

- шиповидный гликопротеин (S);
- интегральный мембранный белок (M);
- гликопротеин – гемагглютинин-эстераза (HE);
- малый мембранный белок (E);
- нуклеокапсидный фосфопротеин (N) [3].

Белок N богат основными аминокислотами и напрямую связан с геномной РНК, образуя геликоидальный нуклеокапсид. Он выполняет функции, связанные с вирусным патогенезом, транскрипцией и репликацией. Его часто используют для молекулярной диагностики BCoV, поскольку это высококонсервативный белок, экспрессирующийся в больших количествах во время репликации вируса [4, 5]. Гликопротеин S выполняет две основные биологические функции – прикрепление вируса к клеткам-мишеням и слияние с клеточной мембраной. Ген этого белка менее консервативен, подвергается селективному прессингу со стороны иммунной системы, что используется вирусом для уклонения от иммунного ответа организма, но также пригоден в качестве мишени для молекулярного анализа [6].

BCoV распространены повсеместно [7–11] и, кроме основного хозяина, инфицируют широкий спектр домашних и диких жвачных животных и даже человека, вызывая у них сходный симптомокомплекс [5, 12–15].

Предполагается, что генетическое разнообразие BCoV является низким по сравнению с другими членами семейства, но они принадлежат к группе быстро развивающихся вирусов, для которых характерно постоянное создание новых вариантов [16]. Эта пластичность может обеспечить эволюционное преимущество в быстро меняющихся условиях, позволяя адаптироваться к различным тканям и хозяевам, избегать иммунного ответа хозяина и даже преодолевать межвидовые барьеры [16–18].

Инфекции BCoV связаны с диарейным синдромом у новорожденных телят [19, 20, 26], заболеваниями дыхательных путей у молочных телят и откормочного скота [21–24], а также зимней дизентерией у взрослых животных [5] и приводят к значитель-

ным экономическим потерям в промышленном животноводстве [9].

Несмотря на некоторые различия в гене S между кишечными и респираторными изолятами, до сих пор не выявлены маркеры (антигенные или генетические), позволяющие различать их между собой [14, 15, 18].

Недавнее появление и распространение SARS-CoV-2 вновь привлекло внимание к коронавирусам и их эволюционному потенциалу [25]. Было продемонстрировано, что высокая скорость мутаций и рекомбинаций способствует возникновению генотипической и фенотипической изменчивости коронавирусов других родов [18].

Изменения в различных частях генома этих вирусов являются результатом протяженных генных делеций, гомологичных рекомбинаций РНК и мутаций, напрямую влияющих на тканевый тропизм. Частота мутаций у BCoV является довольно высокой. Независимо от рассматриваемого гена, скорость эволюции оценивается примерно в 10^{-3} – 10^{-4} замен/участок/год, что находится в пределах типичного диапазона этих вирусов [15, 16, 18].

Оценка картины географического распространения свидетельствует о двух генетических кластерах – европейском и американо-азиатском [16], отличающихся друг от друга [18]. Считается, что предок BCoV появился в 1940-е гг. в США и что две географически разные линии разошлись в 1960–1970-е гг., при этом до сих пор не обнаружено генетического смешения [18].

Несмотря на то что коронавирусная инфекция крупного рогатого скота регистрируется в нашей стране с прошлого века [26], исследования по филогенетическому анализу изолятов вируса не проводились.

В связи с этим **целью настоящей работы** являлось изучение генетического полиморфизма изолятов BCoV, циркулирующих среди высокопродуктивного молочного скота в Сибири.

Материалы и методы

Исследования проводили в течение 5 лет на крупных молочных комплексах и молочно-товарных хозяйствах, расположенных в Тюменской, Омской, Томской, Новосибирской, Иркутской областях, Алтайском и Красноярском краях в период вспышек массовых желудочно-кишечных и респираторных болезней животных. На момент исследований вакцинация против данной инфекции не проводилась. Работу вели во время массовых эпизоотологических обследований на наличие возбудителей вирусно-бактериальных инфекций крупного рогатого скота. Всего исследовали 1508 проб биоматериала, полученных до начала исследования от 116 вынужденно убитых и павших телят в возрасте от 10 дней до 6 месяцев.

От каждого животного отбирали пробы органов желудочно-кишечного и респираторного трактов (не менее 15), доставляли в лабораторию в замороженном состоянии или транспортной среде в течение не более 12 ч с момента отбора, где хранили при -80°C . Перед исследованием их гомогенизировали и готовили 10% суспензии на физиологическом растворе, которые центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. Для выделения РНК использовали по 100 мкл осветлённого супернатанта.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с CONSENSUS AUTHOR GUIDELINES FOR ANIMAL USE (IAVES 23 JULY 2010).

Экстракция РНК и обратная транскрипция

РНК выделяли из 100 мкл гомогенизата органов с помощью набора «РИБО-преп» (производства ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Очищенную РНК ресуспендировали в 50 мкл РНК-буфера. Для проведения обратной транскрипции (ОТ) использовали 10 мкл выделенной РНК. Реакцию проводили с помощью набора «Реврта-L» (производства ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. После проведения реакции объём пробы составлял 40 мкл.

Выявление ВСоV с помощью ПЦР

Для выявления РНК ВСоV использовали праймеры и зонд 5-CTAGTAACCAGGCTGATGTCAATACC-3, 5-GGCGGAAACCTAGTCGGAATA-3, 5-(FAM)CGGCTGACATTCTCGATC-(BHQ1)-3 [27]. Для контроля эффективности полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали праймеры и зонд на ген *GAPDH* крупного рогатого скота (5-GATGGTGAAGGTCGGAGTGAAC-3, 5-GTCATTGATGGCGACGATGT-3, 5-(ROX)-CTGGTCAACAGGGCTGCTT-3 (BHQ2)) [28]. ПЦР проводили в 30 мкл смеси, содержащей 5 мкл кДНК (комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота), 10 пмоль каждого праймера и зонда, готовую смесь реактивов «Био-Мастер ОТ-ПЦР-РВ» («Биолабмикс», Россия). Программа амплификации: 5 мин 95°C , затем 45 циклов 95°C 15 с и 60°C 1 мин.

ПЦР-амплификация генов S и N

Фрагменты генов *S* и *N* амплифицировали в образцах ВСоV-положительных проб. Для амплификации фрагмента гипервариабельного участка гена *S* размером 622 пары нуклеотидов (п.н.) использовали праймеры S1 (СТТАААГТГСССССАААСТААТ) и S2 (ССТАСТГТГАГАТСАТАТГТТТГ) [27]. Для амплификации фрагмента гена *N* размером 454 п.н. использовали праймеры ВСоV1 (CGATGAGGCTATTCGAC и ВСоV2 (TGTGGGTGCGAGTTCTGC) [29]. ПЦР проводили по программе для выявления ВСоV. Продукты амплификации разделяли в агарозном ге-

ле и очищали с помощью набора Omega Biotek Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek, Inc., США) в соответствии с инструкцией производителя.

Полученные нуклеотидные последовательности анализировали при помощи пакетов программ Lasergene 11.1.0 (DNASTAR, США). Выравнивание последовательностей проводили с использованием метода MUSCLE. Филогенетическая дендрограмма была построена с использованием метода максимального правдоподобия в программе MEGA 7.0. Топологию ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (1000 шагов репликации) [30]. Для построения деревьев использовали модель General Time Reversible (GTR), гамма-распределение вариации частот между сайтами (G + I).

Результаты

Всего за 5-летний период обследовали 69 молочных хозяйств из пяти областей и двух краёв Западной и Восточной Сибири. По результатам ОТ-ПЦР геном вируса был обнаружен в 246 (16,3%) пробах биоматериала от телят с диареей и в 149 (9,9%) пробах с респираторным синдромом, из которых первичные нуклеотидные последовательности удалось определить для 18. Данные суммированы в **таблице**.

Для 12 исследуемых изолятов были получены последовательности нуклеотидов участков генов *S* и *N*, ещё для 6 изолятов – только последовательности участка гена *S*. Нуклеотидная идентичность полученных последовательностей составила 96,1–100% по гену *N* и 91,9–100% по гену *S*. Секвенированные последовательности были депонированы в базу данных GenBank под номерами OP651999–OP652028.

В результате анализа полученных последовательностей с использованием метода максимального правдоподобия (модель GTR) были построены филогенетические дендрограммы с низкой статистической поддержкой клад.

На основе филогенетического анализа участка последовательности гена гликопротеина *S* исследуемые изоляты и референтные штаммы разделились на две клады с двумя подкладами в каждой. В первую подкладу (1.1) первой клады входили 11 исследуемых изолятов (S16, S22, S24, S25, S26, S27, S29, S34, S35, S36 и S49), а также референтные штаммы из Европы и Израиля (европейская линия). Во вторую подкладу (1.2) входили классические штаммы вируса Квебек и Мёбус, а также штаммы из Европы, США и Южной Кореи. Исследованные изоляты к ней не относились. В первой подкладу второй клады (2.1) оказались 6 исследуемых изолятов (S3, S5, S7, S8, S13 и S20), а также штаммы из США, Китая и Южной Кореи (американо-азиатская линия). Ко второй подкладу (2.2) отнесли один исследуемый изолят (S46) и штаммы из Южной Кореи, Европы, США (смешанная линия). Данные представлены на **рис. 1**.

На основе филогенетического анализа участка последовательности гена нуклеокапсида *N* исследуемые изоляты и референтные штаммы разделились на две клады, одна из них включала две подклады. В первую

Таблица. Результаты выявления коронавируса методом ПЦР в режиме реального времени в пробах биоматериала от телят в регионе Сибири и секвенирования**Table. The results of detection of coronavirus by real-time PCR in samples from calves in the Siberian region and sequencing**

Регион Region	Исследовано проб/хозяйств, <i>n</i> Researched samples/farms, <i>n</i>	Количество положительных проб, % Number of positive samples, %		Номера секвенированных последовательностей в GenBank Numbers of obtained sequences deposited in GenBank	
		диарейный синдром diarrheal syndrome	респираторный синдром respiratory syndrome	ген <i>S</i> gene <i>S</i>	ген <i>N</i> gene <i>N</i>
Тюменская область Tyumen	280/12	2,8	1,9	OP652009, OP652020, OP652022	OP652010, OP652021
Омская область Omsk	196/6	2,1	1,2	OP652007, OP652017	OP652008
Томская область Tomsk	97/6	1,1	1,4	OP652027	OP652028
Новосибирская область Novosibirsk	250/12	3,2	1,6	OP652004, OP652023	OP652024
Алтайский край Altay	470/23	4,1	2,5	OP651999, OP652001, OP652003, OP652005, OP652006, OP652013, OP652015, OP652018	OP652000, OP652002, OP652014, OP652016, OP652019
Красноярский край Krasnoyarsk	125/6	1,8	0,7	OP652025	OP652026
Иркутская область Irkutsk	90/4	1,2	0,6	OP652011	OP652012
Всего Total	1508/69	16,3	9,9	18	12

подкладу (1.1) входили 3 исследуемых штамма (N3, N5 и N20), а также штаммы из Китая, Южной Кореи, Таиланда, США и Бразилии (американо-азиатская линия). Во вторую подкладу (1.2) входил один исследуемый изолят (N34), классические штаммы Квебек и Мёбус, а также штаммы из Германии, Южной Кореи, Китая и Индии (смешанная линия). Во второй кладе (2) оказались 8 исследуемых штаммов (N22, N 24, N25, N26, N29, N36, N46 и N49), а также штаммы из Китая, Европы, Ирана и Индии (смешанная линия). Данные представлены на **рис. 2**.

Различий в географическом распространении изолятов вируса не обнаружили. Изоляты, относящиеся к одной кладе, были распространены в различных регионах, не связанных между собой.

Обсуждение

Для определения и сравнения биологических, антигенных и генетических характеристик штаммов BCoV, выделенных от крупного рогатого скота с респираторными и кишечными инфекциями, были проведены многочисленные исследования [31–38]. Филогенетические деревья, построенные на основе частичных последовательностей участков генов *S* и *N*, показали, что происхождение образцов из дыхательной или пищеварительной систем не оказало существенного влияния на размещение в них.

Нами исследованы образцы из семи регионов Сибири, взятые у животных из хозяйств с интенсивным типом ведения животноводства. В часть из них осу-

ществлялся завоз высокопродуктивных животных из стран Европы и Северной Америки, но большая часть проб была получена от аборигенного скота. Различий между кишечными и респираторными изолятами, полученными из хозяйств с разным типом ведения скотоводства, а также зависимости от географического местоположения региона и страны происхождения животных также не установлено.

Результаты показали неодинаковое распределение нескольких изолятов вируса по кладам и подкладам. Так, изоляты S3, S5, S20 по гену *S* относились к подкладе 2.1, а по гену *N* – к подкладе 1.1. Изоляты S22, S24, S25, S26, S27, S29, S36 и S49 по гену *S* классифицировались как 1.1, а по гену *N* отнеслись к кладе 2. Изолят S34 по гену *S* относился к подкладе 1.1, а по гену *N* – к подкладе 1.2. Большая часть из них была выделена от аборигенного скота, а меньшая – от импортированного. Так, изолят S22, отнесённый нами к подкладе 1.1 по гену *S* и кладе 2 по гену *N* (европейские штаммы), был выделен от животных, завезённых из Германии и Канады и смешанных в одном хозяйстве. Изоляты S46 и S49, принадлежащие к подкладе 2.2 по гену *S* (европейские штаммы) и кладе 2 по гену *N* (смешанные штаммы), выделены от телят, завезённых из стран Европы.

Таким образом, исследованная популяция сибирских изолятов BCoV носит неоднородный характер, так как одни и те же изоляты были отнесены к различным кладам и подкладам. По гену *S* большая часть изолятов была отнесена к европейской линии, а меньшая – к аме-

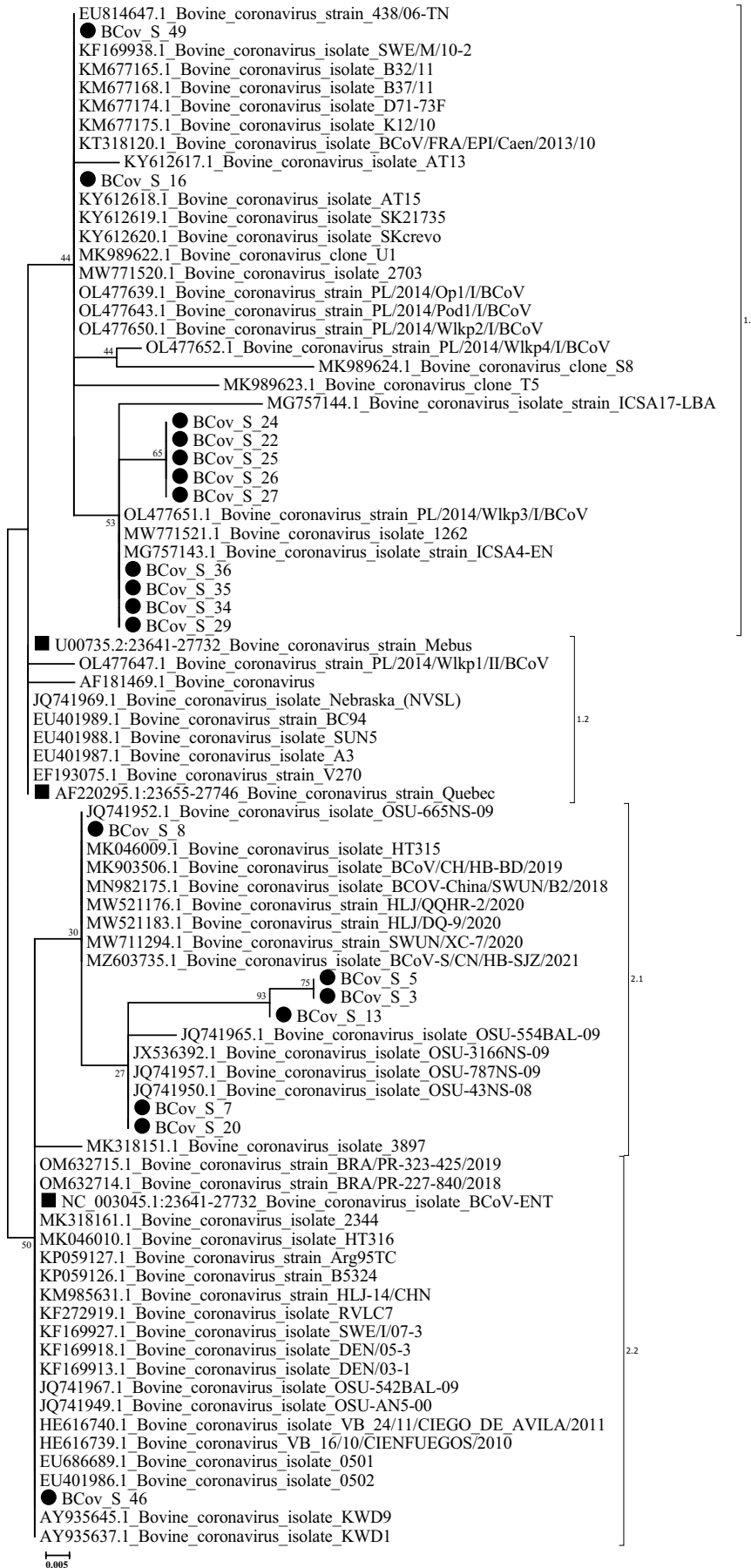


Рис. 1. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка последовательности гена гликопротеина S коронавируса крупного рогатого скота. Бутстрэп-поддержка указана около каждого узла дендрограммы. Штаммы, полученные в данной работе, отмечены чёрным кругом (●). Референтные штаммы отмечены чёрным квадратом (■). Штаммы из базы данных GenBank, присутствующие на рис. 1 и 2, отмечены белым треугольником (▲). Для штаммов из базы данных GenBank указаны название и идентификационный номер. Номер клады указан справа от квадратной скобки.

Fig. 1. Phylogenetic dendrogram based on the bovine coronavirus glycoprotein S gene sequence region. Bootstrap support is indicated near each node of the dendrogram. The strains obtained in this work are marked with a black circle (●). Reference strains are marked with a black square (■). Strains from the GenBank database present in fig. 1 and 2 are marked with a white triangle (▲). For strains from the GenBank database, the name and identification number are indicated. The clade numbers are indicated to the right of the square brackets.

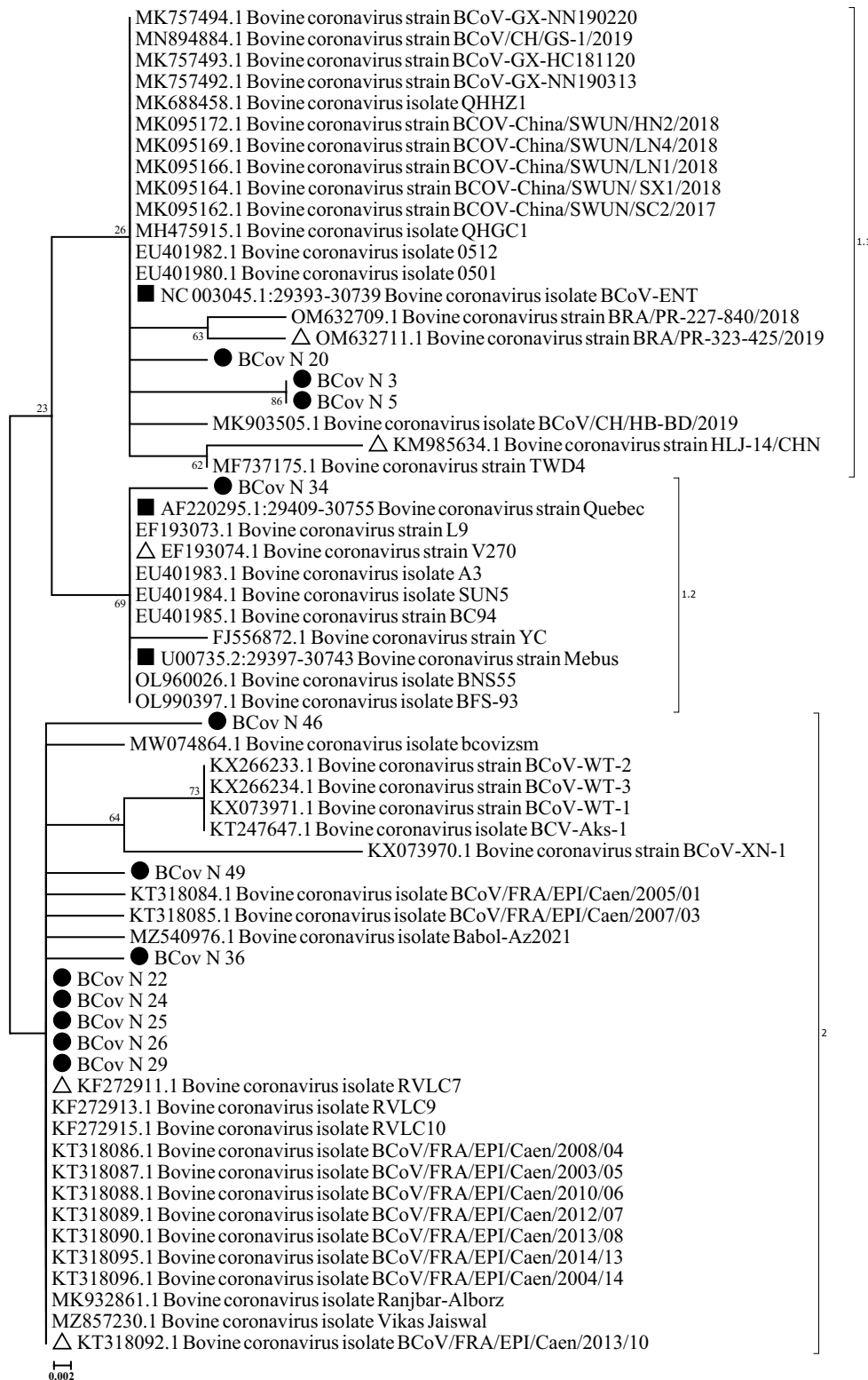


Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка последовательности гена нуклеокапсида N коронавируса крупного рогатого скота. Бутстрэп-поддержка указана около каждого узла дендрограммы. Штаммы, полученные в данной работе, отмечены чёрным кругом (●). Референтные штаммы отмечены чёрным квадратом (■). Штаммы из базы данных GenBank, присутствующие на рис. 1 и 2, отмечены белым треугольником (△). Для штаммов из базы данных GenBank указаны название и идентификационный номер. Номер клады указан справа от квадратной скобки.

Fig. 2. Phylogenetic dendrogram based on the bovine coronavirus nucleocapsid N gene sequence region. Bootstrap support is indicated near each node of the dendrogram. The strains obtained in this work are marked with a black circle (●). Reference strains are marked with a black square (■). Strains from the GenBank database present in fig. 1 and 2 are marked with a white triangle (△). For strains from the GenBank database, the name and identification number are indicated. The clade numbers are indicated to the right of the square brackets.

рикано-азиатской. Один изолят (S46) был отнесён нами к смешанному кластеру. По гену *N* практически все изоляты показали смешанный генетический профиль.

Наши данные в общем виде согласуются с результатами иранских исследователей, которые показали, что филогенетический анализ одних и тех же штаммов вирусов по разным генам *S* и *N* даёт разные формы деревьев. Анализ по гену *S* даёт 4 кластера, в которых просматривается географическая связь между изолятами в кластере. Анализ тех же штаммов по гену *N* не даёт соответствующей картины [31].

Кроме того, используемые в нашей работе референтные штаммы вирусов, присутствующие на обоих рисунках (отмечены белым треугольником Δ), также относятся к разным кластерам на разных деревьях. Так, штамм RVL7C из Ирландии и штамм BRA/PR-323-425 из Бразилии относятся к одному подкластеру (2.2) по гену *S*, а по гену *N* – к кластеру 2 и подкластеру 1.1 соответственно. Возможно, это может объясняться как разной скоростью накопления мутаций в разных генах бетакоронавирусов, так и потенциальным влиянием рекомбинационных событий между штаммами, следы которых находят в геномах BCoV [15, 16, 38]. Показано, например, что ген *S* SARS-CoV-2 мутирует в 5 раз быстрее других кодирующих областей генома, находясь под давлением иммунной системы хозяина, тогда как ген *N* более стабилен [32].

Филогеографический анализ изолятов BCoV из разных стран мира показывает следующее. На территории Южной Кореи, Америки и Аргентины циркулируют изоляты, близкие к американской и европейской ветвям [35]. Бразильские изоляты вируса, циркулирующие среди мясных телят в пяти штатах, на основе анализа гена, кодирующего белок *N*, разделились на два отдельных кластера и были тесно связаны с азиатскими штаммами [37]. Уругвайские штаммы сгруппированы в две разные линии: одна с аргентинскими штаммами, а другая – с бразильскими. Предполагается, что обе линии BCoV проникли в Уругвай в 2013 г.: одна из них – из Бразилии (интервал максимальной плотности вероятности (HPD) 95%: 2011–2014 гг.), а другая – из Аргентины (интервал HPD 95%: 2010–2014 гг.). Линии отличались по четырём аминокислотным заменам, и обе – от эталонного штамма Мёбус.

Ирландские штаммы на основе данных секвенирования по гену *S* относятся к европейской группе вирусов [34].

Иранские изоляты и штаммы полностью находились в независимых кластерах и не принадлежали ни к одному из кластеров со штаммами, выделенными в других странах. При этом они сильно отличались от штаммов из других частей мира, но с точки зрения родства эти вирусы показали некоторое сходство с европейскими штаммами, например, обнаруженными во Франции, Хорватии, Дании и Швеции [31].

Турецкие штаммы вируса, выделенные от животных из нескольких отдалённых друг от друга ферм, были близки другим штаммам из Европы [36].

Анализ японских изолятов BCoV по последовательности участка гена *S* также показал наличие четырёх

генетических кластеров. Как и исследованные нами изоляты, полевые японские изоляты относились к трём генетическим кластерам; в кластере, включающем классические штаммы Мёбус и Квебек, полевых изолятов из России и Японии не было [33]. Часть изолятов также относилась к американским штаммам. Интересно, что вирусы из Японии также кластеризовались по годам выделения и хозяйствам, где они были выделены, но независимо от клинического проявления болезни.

В Китае характер проявления инфекции был связан с типом ведения животноводства, возрастом животных и плотностью размещения скота. Из 203 BCoV-положительных образцов от больных телят 20 изолятов успешно секвенировали по гену *S*. Все они имели гомологию нуклеотидов на уровне 97,7–100,0%, а их N-концевой домен субъединицы *S1* генетически отличался от эталонных штаммов из Южной Кореи и Европы. Все штаммы отнесли к группе «Азия – Северная Америка». На основе китайских штаммов авторы сформировали три клады в филогенетическом дереве. Один штамм был отнесён к европейской группе. В то же время была зафиксирована рекомбинация между двумя разными штаммами, что привело к образованию рекомбинантного штамма BCoV-AKS-01. По мнению авторов, полученные данные обеспечивают лучшее понимание эпидемиологии и эволюции BCoV в Китае [38].

Практически все авторы отмечали наличие корреляции выделения вирусов с географической локацией, но не с формой болезни. Мы не выявили различий в географическом распределении изолятов. Изоляты, относящиеся к одной кладе, были распространены в различных областях и краях Сибири, не связанных между собой. Респираторные изоляты чаще выявляли на крупных молочных комплексах по производству молока как с наличием, так и отсутствием завезённых животных, а кишечные – в мелких и средних хозяйствах с наличием аборигенных животных.

В нашем исследовании происхождение изолятов установить было невозможно, однако два из них – S22 (подклада 1.1) и S46 (подклада 2.2) – имели явное европейское происхождение и были связаны с завозом животных из нескольких стран Европы (Германия, Словения), которые не имели контакта с местным скотом. Интерес представляет изолят S46, который вызвал тяжёлую вспышку респираторной болезни у телят 2–5-месячного возраста на молочном комплексе в сочетании с вирусной диареей (Pestivirus A) (данные не представлены). Наши результаты показывают, что сибирские изоляты ближе к иранским и китайским вариантам. Эпизоотическая ситуация наиболее близка к наблюдаемой в Китае.

Заключение

Результаты исследований показали широкое распространение и молекулярно-генетическое разнообразие коронавируса крупного рогатого скота на молочных комплексах Сибири. Популяция сибирских изолятов вируса неоднородна, носит смешанный характер и представлена двумя кладами с двумя подкладами в каждой по гену *S* и двумя кладами по гену *N*.

Подтверждена идентичность изолятов вируса, вызывающих кишечную и респираторную форму инфекции в регионе. Полученные данные показывают, что сравнительный анализ нуклеотидной последовательности является полезным инструментом для изучения молекулярной эпизоотологии инфекций, вызванных коронавирусом крупного рогатого скота (BCoV). Исследования по молекулярной эпизоотологии BCoV в конкретном регионе можно использовать с целью оптимизации и выбора стратегии контрольных мероприятий на региональном уровне и решения вопроса о применении вакцин. Это особенно важно при реализации программ вакцинации животных, когда генетические типы вакцинных штаммов не совпадают с типами, циркулирующими среди животных на конкретной территории. Полученная в ходе таких исследований информация может быть полезной при изучении молекулярной эпизоотологии вирусов, разработке более точных диагностических тестов, эффективных вакцин и программ контроля инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). New MSL including all taxonomy; updates since the 2018b release. Berlin; 2019. Available at: <https://ictv.global>
- Suzuki T., Otake Y., Uchimoto S., Hasebe A., Goto Y. Genomic characterization and phylogenetic classification of bovine coronaviruses through whole genome sequence analysis. *Viruses*. 2020; 12(2): 183. <https://doi.org/10.3390/v12020183>
- Masters P.S. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2006; 66: 193–292. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)
- Saif L.J. Bovine respiratory coronavirus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(2): 349–64. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.005>
- Vlasova A.N., Saif L.J. Bovine coronavirus and the associated diseases. *Front. Vet. Sci.* 2021; 8: 643220. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.643220>
- Liu L., Hagglund S., Hakhverdyan M., Alenius S., Larsen L.F., Belak S. Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(3): 957–60. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.957-960.2006>
- Zhu Q., Li B., Sun D. Advances in bovine coronavirus epidemiology. *Viruses*. 2022; 14(5): 1109. <https://doi.org/10.3390/v14051109>
- Мищенко В.А., Думова В.В., Черных О.Ю., Киселев М.Ю., Мищенко А.В., Бакунов И.Н. и др. Распространение коронавируса крупного рогатого скота у жвачных животных. *Ветеринария*. 2010; (9): 18–21.
- Алипер Т.И. *Актуальные инфекционные болезни крупного рогатого скота: Руководство*. М.; 2021. <https://doi.org/10.31016/viev-2021-6>
- Орлянкин Б.Г., Власова А.Н., Мухин А.Н., Алипер Т.И. Коронавирусные инфекции животных: эпизоотология и патогенез. *Ветеринария*. 2022; (3): 3–13. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2022.25.3.03-13>
- Saif L.J. Bovine respiratory coronavirus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(2): 349–64. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.005>
- Беспалова Т.Ю., Блохин А.А. Коронавирусы животных (обзор). *Ветеринария*. 2020; (9): 3–10. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.9.03-10>
- Готов А.Г., Глотова Т.И. Коронавирусы жвачных животных. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2020; (3): 49–61. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2020-3-5>
- Liu X., Wu Q., Zhang Z. Global diversification and distribution of coronaviruses with furin cleavage sites. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 649314. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.649314>
- Islam A., Ferdous J., Islam S., Sayeed M.A., Dutta Choudhury S., Saha O., et al. Evolutionary dynamics and epidemiology of endemic and emerging coronaviruses in humans, domestic animals, and wildlife. *Viruses*. 2021; 13(10): 1908. <https://doi.org/10.3390/v13101908>
- Franzo G., Drigo M., Legnardi M., Grassi L., Pasotto D., Menandro M.L., et al. Bovine coronavirus: variability, evolution, and dispersal patterns of a no longer neglected betacoronavirus. *Viruses*. 2020; 12(11): 1285. <https://doi.org/10.3390/v12111285>
- Burimuah V., Sylverken A., Owusu M., El-Duah P., Yeboah R., Lamptey J., et al. Molecular-based cross-species evaluation of bovine coronavirus infection in cattle, sheep and goats in Ghana. *BMC Vet. Res.* 2020; 16(1): 405. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02606-x>
- Salem E., Dhanasekaran V., Cassard H., Hause B., Maman S., Meyer G., et al. Global transmission, spatial segregation, and recombination determine the long-term evolution and epidemiology of bovine coronaviruses. *Viruses*. 2020; 12(5): 534. <https://doi.org/10.3390/v12050534>
- Нефедченко А.В., Котенева С.В., Глотова Т.И., Готов А.Г. Роль коронавируса в этиологии желудочно-кишечной и респираторной патологии телят на молочных комплексах. *Ветеринария*. 2022; (1): 18–23. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2022.25.1.18-23>
- Dall Agnol A.M., Lorenzetti E., Leme R.A., Ladeia W.A., Mainardi R.M., Bernardi A., et al. Severe outbreak of bovine neonatal diarrhoea in a dairy calf rearing unit with multifactorial etiology. *Braz. J. Microbiol.* 2021; 52(4): 2547–53. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00565-5>
- Rahe M.C., Magstadt D.R., Groeltz-Thrush J., Gauger P.C., Zhang J., Schwartz K.J., et al. Bovine coronavirus in the lower respiratory tract of cattle with respiratory disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2022; 34(3): 482–8. <https://doi.org/10.1177/10406387221078583>
- Soules K.R., Rahe M.C., Purtle L., Moeckly C., Stark P., Samson C., et al. Bovine coronavirus infects the respiratory tract of cattle challenged intranasally. *Front. Vet. Sci.* 2022; (9): 878240. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.878240>
- Blakebrough-Hall C., Hick P., Mahony T.J., González L.A. Factors associated with bovine respiratory disease case fatality in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 2022; 100(1): skab361. <https://doi.org/10.1093/jas/skab361>
- Deepak Aly S.S., Love W.J., Blanchard P.C., Crossley B., Van Eenennaam A.L., Lehenbauer T.W. Etiology and risk factors for bovine respiratory disease in pre-weaned calves on California dairies and calf ranches. *Prev. Vet. Med.* 2021; 197: 105506. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105506>
- Львов Д.К., Альховский С.В., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И. Этиология эпидемической вспышки COVID-19 в г. Ухань (провинция Хубэй, Китайская Народная Республика, ассоциированной с вирусом 2019-nCoV (Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus, подрод Sarbecovirus): уроки эпидемии SARS-CoV. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(1): 6–15. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15>
- Коромыслов Г.Ф., Авиллов В.С., Гоголев М.М. Ротавирусная и коронавирусная инфекция телят. *Вестник сельскохозяйственной науки*. 1984; (7): 129–36.
- Decaro N., Elia G., Campolo M., Desario C., Mari V., Radogna A., et al. Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. *J. Virol. Methods*. 2008; 151(2): 167–71. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.05.01>
- Zhao H., Liu J., Li Y., Yang C., Zhao S., Liu J., et al. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in Bovine PBMCs transformed and non-transformed by Theileria annulata. *Korean J. Parasitol.* 2016; 54(1): 39–46. <https://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.1.39>
- Takiuchi E., Stipp D.T., Alfieri A.F., Alfieri A.A. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. *J. Virol. Methods*. 2006; 131(2): 148–54. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.08.005>
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 7(33): 1870–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw0544>
- Lotfollahzadeh S., Madadgar O., Reza Mohebbi M., Reza Mokhter Dezfouli M., George W.D. Bovine coronavirus in neonatal calf diarrhoea in Iran. *Vet. Med. Sci.* 2020; 6(4): 686–94. <https://doi.org/10.1002/vms3.277>
- Kanno T., Hatama S., Ishihara R., Uchida I. Molecular analysis of the S glycoprotein gene of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. *J. Gen. Virol.* 2007; 88(Pt. 4): 1218–24. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82635-0>
- Amicone M., Borges V., Alves M.J., Isidro J., Zê-Zê L., Duarte S., et al. Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution. *Evol. Med. Public Health*. 2022; 10(1): 142–55. <https://doi.org/10.1093/emph/eoac010>
- Gunn L., Collins P.J., O'Connell M.J., O'Shea H. Phylogenetic investigation of enteric bovine coronavirus in Ireland reveals partitioning between European and global strains. *Irish Vet. J.* 2015; 68: 31. <https://doi.org/10.1186/s13620-015-0060-33>
- Bok M., Miño S., Rodríguez D., Badaracco A., Nuñez I., Souza S.P., et al. Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994–2010. *Vet. Microbiol.* 2015; 181(3–4): 221–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.017>
- De Mira Fernandes A., Brandão P.E., Dos Santos Lima M., de Souza Nunes Martins M., da Silva T.G., da Silva Cardoso Pinto V., et al. Ge-

- netic diversity of BCoV in Brazilian cattle herds. *Vet. Med. Sci.* 2018; 4(3): 183–9. <https://doi.org/10.1002/vms3.102>
37. Zhu Q., Su M., Li Z., Wang X., Qi S., Zhao F., et al. Epidemiological survey and genetic diversity of bovine coronavirus in Northeast China. *Virus Res.* 2022; 308: 198632. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198632>
 38. Castells M., Giannitti F., Caffarena R.D., Casaux M.L., Schild C., Castells D., et al. Bovine coronavirus in Uruguay: genetic diversity, risk factors and transboundary introductions from neighboring countries. *Arch. Virol.* 2019; 164(11): 2715–24. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04384-w>
- ### REFERENCES
1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). New MSL including all taxonomy; updates since the 2018b release. Berlin; 2019. Available at: <https://ictv.global>
 2. Suzuki T., Otake Y., Uchimoto S., Hasebe A., Goto Y. Genomic characterization and phylogenetic classification of bovine coronaviruses through whole genome sequence analysis. *Viruses.* 2020; 12(2): 183. <https://doi.org/10.3390/v12020183>
 3. Masters P.S. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2006; 66: 193–292. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)
 4. Saif L.J. Bovine respiratory coronavirus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(2): 349–64. <https://doi.org/10.1016/j.cv-fa.2010.04.005>
 5. Vlasova A.N., Saif L.J. Bovine coronavirus and the associated diseases. *Front. Vet. Sci.* 2021; 8: 643220. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.643220>
 6. Liu L., Hagglund S., Hakhverdyan M., Alenius S., Larsen L.F., Belak S. Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(3): 957–60. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.957-960.2006>
 7. Zhu Q., Li B., Sun D. Advances in bovine coronavirus epidemiology. *Viruses.* 2022; 14(5): 1109. <https://doi.org/10.3390/v14051109>
 8. Mishchenko V.A., Dumova V.V., Chernykh O.Yu., Kiselev M.Yu., Mishchenko A.V., Bakunov I.N., et al. Bovine coronavirus distribution in ruminants. *Veterinariya.* 2010; (9): 18–21. (in Russian)
 9. Aliper T.I. *Actual Infectious Diseases of Cattle: Guideline [Aktual'nye infektsionnye bolezni krupnogo rogatogo skota: Rukovodstvo]*. Moscow; 2021. <https://doi.org/10.31016/viev-2021-6> (in Russian)
 10. Orlyankin B.G., Vlasova A.N., Mukhin A.N., Aliper T.I. Coronavirus infections in animals: epizootology and pathogenesis. *Veterinariya.* 2022; (3): 3–13. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2022.25.3.03-13> (in Russian)
 11. Faustino R., Faria M., Teixeira M., Palavra F., Sargento P., do Céu Costa M. Systematic review and meta-analysis of the prevalence of coronavirus: One health approach for a global strategy. *One Health.* 2022; 14: 100383. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2022.100383>
 12. Bepalova T.Yu., Blokhin A.A. Coronaviruses of animals (review). *Veterinariya.* 2020; (9): 3–10. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.9.03-10> (in Russian)
 13. Glotov A.G., Glotova T.I. Coronaviruses in ruminants. *Sibirskiy vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki.* 2020; (3): 49–61. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2020-3-5> (in Russian)
 14. Liu X., Wu Q., Zhang Z. Global diversification and distribution of coronaviruses with furin cleavage sites. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 649314. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.649314>
 15. Islam A., Ferdous J., Islam S., Sayeed M.A., Dutta Choudhury S., Saha O., et al. Evolutionary dynamics and epidemiology of endemic and emerging coronaviruses in humans, domestic animals, and wildlife. *Viruses.* 2021; 13(10): 1908. <https://doi.org/10.3390/v13101908>
 16. Franzo G., Drigo M., Legnardi M., Grassi L., Pasotto D., Menandro M.L., et al. Bovine coronavirus: variability, evolution, and dispersal patterns of a no longer neglected betacoronavirus. *Viruses.* 2020; 12(11): 1285. <https://doi.org/10.3390/v12111285>
 17. Burimuah V., Sylverken A., Owusu M., El-Duah P., Yeboah R., Lamptey J., et al. Molecular-based cross-species evaluation of bovine coronavirus infection in cattle, sheep and goats in Ghana. *BMC Vet. Res.* 2020; 16(1): 405. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02606-x>
 18. Salem E., Dhanasekaran V., Cassard H., Hause B., Maman S., Meyer G., et al. Global transmission, spatial segregation, and recombination determine the long-term evolution and epidemiology of bovine coronaviruses. *Viruses.* 2020; 12(5): 534. <https://doi.org/10.3390/v12050534>
 19. Nefedchenko A.V., Koteneva S.V., Glotova T.I., Glotov A.G. The role of bovine coronavirus in the etiology of gastrointestinal and respiratory diseases of calves in big dairy farms. *Veterinariya.* 2022; (1): 18–23. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2022.25.1.18-23> (in Russian)
 20. Dall Agnol A.M., Lorenzetti E., Leme R.A., Ladeia W.A., Mainardi R.M., Bernardi A., et al. Severe outbreak of bovine neonatal diarrhea in a dairy calf rearing unit with multifactorial etiology. *Braz. J. Microbiol.* 2021; 52(4): 2547–53. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00565-5>
 21. Rahe M.C., Magstadt D.R., Groeltz-Thrush J., Gauger P.C., Zhang J., Schwartz K.J., et al. Bovine coronavirus in the lower respiratory tract of cattle with respiratory disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2022; 34(3): 482–8. <https://doi.org/10.1177/10406387221078583>
 22. Soules K.R., Rahe M.C., Purtle L., Moeckly C., Stark P., Samson C., et al. Bovine coronavirus infects the respiratory tract of cattle challenged intranasally. *Front. Vet. Sci.* 2022; (9): 878240. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.878240>
 23. Blakebrough-Hall C., Hick P., Mahony T.J., González L.A. Factors associated with bovine respiratory disease case fatality in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 2022; 100(1): skab361. <https://doi.org/10.1093/jas/skab361>
 24. Deepak Aly S.S., Love W.J., Blanchard P.C., Crossley B., Van Eenennaam A.L., Lehenbauer T.W. Etiology and risk factors for bovine respiratory disease in pre-weaned calves on California dairies and calf ranches. *Prev. Vet. Med.* 2021; 197: 105506. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105506>
 25. L'vov D.K., Al'khovskiy S.V., Kolobukhina L.V., Burtseva E.I. Etiology of epidemic outbreaks covid-19 in Wuhan, Hubei province, Chinese people republic associated with 2019-nCoV (Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus, subgenus Sarbecovirus): lessons of SARS-COV outbreak. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(1): 6–15. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15> (in Russian)
 26. Koromyslov G.F., Avilov V.S., Gogolev M.M. Rotavirus and coronavirus infection of calves. *Vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki.* 1984; (7): 129–36. (in Russian)
 27. Decaro N., Elia G., Campolo M., Desario C., Mari V., Radogna A., et al. Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. *J. Virol. Methods.* 2008; 151(2): 167–71. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.05.01>
 28. Zhao H., Liu J., Li Y., Yang C., Zhao S., Liu J., et al. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in Bovine PBMCs transformed and non-transformed by Theileria annulata. *Korean J. Parasitol.* 2016; 54(1): 39–46. <https://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.1.39>
 29. Takiuchi E., Stipp D.T., Alfieri A.F., Alfieri A.A. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. *J. Virol. Methods.* 2006; 131(2): 148–54. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.08.005>
 30. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 7(33): 1870–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw0544>
 31. Lotfollahzadeh S., Madadgar O., Reza Mohebbi M., Reza Mokher Dezfouli M., George W.D. Bovine coronavirus in neonatal calf diarrhoea in Iran. *Vet. Med. Sci.* 2020; 6(4): 686–94. <https://doi.org/10.1002/vms3.277>
 32. Kanno T., Hatama S., Ishihara R., Uchida I. Molecular analysis of the S glycoprotein gene of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. *J. Gen. Virol.* 2007; 88(Pt. 4): 1218–24. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82635-0>
 33. Amicone M., Borges V., Alves M.J., Isidro J., Zê-Zê L., Duarte S., et al. Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution. *Evol. Med. Public Health.* 2022; 10(1): 142–55. <https://doi.org/10.1093/emph/eaoc010>
 34. Gunn L., Collins P.J., O'Connell M.J., O'Shea H. Phylogenetic investigation of enteric bovine coronavirus in Ireland reveals partitioning between European and global strains. *Irish Vet. J.* 2015; 68: 31. <https://doi.org/10.1186/s13620-015-0060-33>
 35. Bok M., Miño S., Rodríguez D., Badaracco A., Nuñez I., Souza S.P., et al. Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994–2010. *Vet. Microbiol.* 2015; 181(3–4): 221–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.017>
 36. De Mira Fernandes A., Brandão P.E., Dos Santos Lima M., de Souza Nunes Martins M., da Silva T.G., da Silva Cardoso Pinto V., et al. Genetic diversity of BCoV in Brazilian cattle herds. *Vet. Med. Sci.* 2018; 4(3): 183–9. <https://doi.org/10.1002/vms3.102>
 37. Zhu Q., Su M., Li Z., Wang X., Qi S., Zhao F., et al. Epidemiological survey and genetic diversity of bovine coronavirus in Northeast China. *Virus Res.* 2022; 308: 198632. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198632>
 38. Castells M., Giannitti F., Caffarena R.D., Casaux M.L., Schild C., Castells D., et al. Bovine coronavirus in Uruguay: genetic diversity, risk factors and transboundary introductions from neighboring countries. *Arch. Virol.* 2019; 164(11): 2715–24. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04384-w>