

Зоотехния и ветеринария

УДК 619:575:001.608.1:636

DOI: 10.31857/S2500262723040105, EDN: JYGBPU

ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ РАСПРОСТРАНЕНИЯ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ПОЛИМОРФИЗМА ЭКЗОНА 2 ГЕНА *BoLA-DRB3* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР-ПДРФ***Н.А. Безбородова**, кандидат ветеринарных наук, **М.В. Бытов**, **Н.А. Мартынов**, **О.В. Соколова**, доктор ветеринарных наук, **М.В. Петропавловский**, доктор ветеринарных наук, **С.В. Вольская***Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр
Уральского отделения Российской академии наук,
620142, Екатеринбург, ул. Белинского, 112а
E-mail: n-bezborodova@mail.ru*

*BoLA-DRB3 – часть главного комплекса гистосовместимости, который имеет более 100 полиморфных сайтов в экзоне 2. Этот ген связан с иммунологическими признаками, устойчивостью или восприимчивостью к различным заболеваниям, а также ассоциирован с продуктивными признаками крупного рогатого скота. Цель исследований – первичная оценка аллельного полиморфизма экзона 2 гена *BoLA-DRB3* в Уральском регионе с использованием вложенной ПЦР и ПЦР-ПДРФ. Объект исследований – животные голштинской породы крупного рогатого скота (n=55). Длины рестрикционных фрагментов определяли с использованием электрофореза в пластинке агарозного геля. В результате генотипирования по *BoLA-DRB3.2* определены наиболее распространённые генотипы: *23/*24, *24/*24, *16/*16, *24/*28, *9/*38 с частотой распространения от 8,9 % до 26,5 %; генотипы с меньшей частотой распространения – *24/*38, *24/*9, *2/*37, *16/*26. В исследованной выборке большинство аллелей (*2, *9, *26, *37, *38) были нейтральными. В исследованной популяции генотипом, ассоциированным с восприимчивостью к вирусу лейкоза, обладали 56 % особей, с устойчивостью – 29 %, нейтральным – 15 %. Исходя из полученных результатов можно сделать вывод о необходимости генетического скрининга популяций крупного рогатого скота по полиморфизму *BoLA-DRB3*, особенно в эпизоотологически неблагоприятных регионах по заболеваемости лейкозом. Полученные данные могут быть использованы в разведении племенного поголовья на основе селекции для наполнения стад сельскохозяйственных животных аллелями устойчивости к этому инфекционному агенту.*

EVALUATION OF ALLELIC FREQUENCIES DISTRIBUTION OF THE *BoLA-DRB3* GENE POLYMORPHISMS WITHIN EXON 2 USING PCR-RFLP**N.A. Bezborodova, M.V. Bytov, N.A. Martynov, O.V. Sokolova, M.V. Petropavlovsky, S.V. Volskaya***Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre,
Ural Branch of Russian Academy of Sciences,
620142, Ekaterinburg, ul. Belinskogo, 112a
E-mail: n-bezborodova@mail.ru*

*BoLA-DRB3 is part of the major histocompatibility complex, which has more than 100 polymorphic sites in exon 2. This gene is associated with immunological traits, resistance or susceptibility to various diseases and productive traits and milk quality in cattle. The aim of our paper was to conduct a primary assessment of the allelic polymorphism of exon 2 of the *BoLA-DRB3* gene in the Ural region using nested PCR and PCR-RFLP. The object of research were Holstein cattle (n=55). Restriction fragment lengths were determined using electrophoresis in an agarose gel. For the *BoLA-DRB3.2* gene the most common genotypes were identified: *23/*24, *24/*24, *16/*16, *24/*28, *9/*38 with a prevalence from 8.9 % to 26.5 %; genotypes with a lower distribution frequency – *24/*38, *24/*9, *2/*37, *16/*26. In studied samples the majority of identified alleles (*2, *9, *26, *37, *38) were previously proven to be neutral. The results of genotyping of Holstein cattle according to the polymorphism of the *BoLA-DRB3.2* gene were obtained: in the studied population, 56 % of individuals had a genotype associated with susceptibility to the leukemia virus, 29 % associated with resistance and 15 % had neutral genotype. Based on the obtained results, it can be concluded that there is a need for genetic screening of cattle populations for the *BoLA-DRB3* polymorphism, especially in epidemiologically disadvantaged regions for the incidence of leukemia. The obtained data on the genotypes of animals will be used in breeding programs to saturate herds of farm animals with alleles of resistance to the bovine leukemia virus.*

Ключевые слова: *BoLA-DRB3*; генетические маркеры; ПЦР-ПДРФ; лейкоз; крупный рогатый скот; маркер-ориентированная селекция; ДНК.

Key words: *BoLA-DRB3*; genetic markers; PCR-RFLP; leukemia; cattle; marker-associated selection; DNA.

В современных условиях цель селекционной работы в молочном скотоводстве – увеличение продуктивности сельскохозяйственных животных, что зачастую приводит к повышению интенсивности обменных процессов у коров, метаболическим нарушениям и снижению устойчивости к различным заболеваниям [1, 2, 3].

Одно из наиболее распространенных инфекционных

заболеваний крупного рогатого скота – энзоотический лейкоз (EBL), вызываемый РНК-содержащим вирусом семейства Retroviridae рода Deltaretrovirus [4]. На сегодняшний день имеются исследования, указывающие на значительную иммунную дисфункцию у животных, находящихся как на начальных, так и на заключительных стадиях течения лейкозного процесса [5, 6].

*работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России № 0532–2022–0001 «Разработка технологии для маркер-ориентированной селекции крупного рогатого скота по генам, ассоциированным с устойчивостью к заболеваниям».

Распространение заболевания внутри стада приводит к экономическим потерям, связанным с сокращением объемов производства продукции, увеличением выбраковки животных, снижением репродуктивной функции у инфицированных вирусом лейкоза животных [7, 8], уменьшением эффективности вакцинопрофилактики, увеличением частоты возникновения маститов и других инфекционных и незаразных патологий [9]. Одновременно происходит снижение качества молочной и мясной продукции, получаемой от инфицированных животных. Кроме того, в научной среде ведется дискуссия о том, что лейкоз крупного рогатого скота служит дополнительным фактором риска развития неопластических изменений у человека [10, 11].

Установлено, что интенсивность провирусной нагрузки лейкоза крупного рогатого скота (*bovine leukemia virus*, BLV) различается в зависимости от генетической устойчивости животных к инфекционным заболеваниям и в том числе связана с разными вариантами полиморфизма в главном комплексе гистосовместимости (МНС) крупного рогатого скота. МНС крупного рогатого скота – бычий лейкоцитарный антиген (*bovine leukocyte antigen*, BoLA) локализован на 23 хромосоме и включает три гена DRB класса II. Единственным функционально активным из них – *BoLA-DRB3*. Полиморфизм этого гена связан с иммунологическими признаками, степенью восприимчивости и устойчивости к различным заболеваниям (лейкоз крупного рогатого скота, мастит, дерматофитоз), а также отвечает за продуктивные признаки [12, 13]. Известно, что второй экзон *BoLA-DRB3* имеет более 100 полиморфных сайтов.

Цель исследования – оценка распространения аллельных вариантов полиморфизма 2 экзона гена *BoLA-DRB3*, ассоциированного с уровнем восприимчивости и резистентностью к BLV в популяции голштинского крупного рогатого скота Урала.

Методика. Объектом исследований были животные голштинской породы крупного рогатого скота (n=55). Отбор крови осуществляли из хвостовой вены. Проведение исследований было одобрено Комитетом по институциональной этике ФГБУН «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук» (протокол № 497 от 20 декабря 2022 г.). Выделение ДНК из цельной крови животных проводили с использованием «Diatom DNA Prep 200» (ООО «ИзоГен», Россия). Анализ комбинаций аллелей гена *BoLA-DRB3.2* у животных осуществляли в соответствии с модифицированным протоколом, предложенным в 2020 г. Morales J. P. A. с соавторами [13]. Для типирования особей крупного рогатого скота по гену *BoLA-DRB3* применяли метод вложенной ПЦР с использованием соответствующих праймеров (см. табл.). Конечный ампликон составлял 284 п.н. фрагмента экзона 2 гена *BoLA-DRB3*.

Последовательность праймеров гена *BoLA-DRB3.2*

Этапы ПЦР	Праймеры
1 этап ПЦР	HL030: 5'-TCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3' HL031: 5'-ATTTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3'
2 этап ПЦР	HL030: 5'-TCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3' HL032: 5'-TCGCCGCTGCACAGTGAACCTCTC-3'

В состав реакционной смеси для 1 этапа ПЦР входили SE-буфер производства SibEnzyme (60 мМ Трис-НСl (рН 8,6), 25 мМ КСl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 % Тритон X-100); 0,18 мМ каждого dNTP, по 0,35 мкМ праймеров HL030 и HL031; 1,7 мМ MgCl₂; 0,31 ед. Таq-полимеразы (SibEnzyme); 20...80 нг ДНК. Амплификацию проводили с использованием термоциклера

SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific, США) по следующей программе: начальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин, затем 10 циклов денатурации при 94 °С – 40 с, отжиг при 60 °С – 40 с, элонгация при 72 °С – 40 с, заключительная элонгация при 72 °С в течение 10 мин.

В состав реакционной смеси для 2 этапа ПЦР входили SE-буфер производства SibEnzyme (60 мМ Трис-НСl (рН 8,6), 25 мМ КСl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 % Тритон X-100); 0,18 мМ каждого dNTP, по 0,35 мкМ праймеров HL030 и HL032; 1,7 мМ MgCl₂; 0,31 ед. Таq-полимеразы (SibEnzyme); 1 мкл ПЦР-смеси после первого раунда. Амплификацию проводили по следующему температурному протоколу: начальная денатурация 95 °С – 5 мин., далее 24 цикла денатурации при 94 °С – 20 с, отжиг при 65 °С – 20 с, синтез при 72 °С – 20 с, окончательная элонгация при 72 °С в течение 10 мин.

Рестрикцию осуществляли с использованием *RsaI*, *BstYI* и *HaeIII* (производство SibEnzyme) в конечном объеме 15 мкл отдельно для каждой эндонуклеазы. Реакционная смесь содержала 10 мкл продукта второго раунда вложенной ПЦР, 5 е.а. фермента и 2 мкл ферментного буфера. Реакции с *RsaI* и *HaeIII* инкубировали при 37 °С, а с *BstYI* – при 60 °С около 12 ч с дальнейшей визуализацией в 5 %-ном агарозном геле с использованием E-Gel Imager и ПО Gel Quant Express. Интерпретацию результатов рестрикции проводили по 42 вариантам полиморфизма длин рестрикции в соответствии с методикой, предложенной Gelhaus A. [14] и van Eijk M. J. T. [15].

Частоту встречаемости генотипов по генам *BoLA-DRB3.2* определяли по формуле (1):

$$p = (n/N) \cdot 100 \quad (1)$$

где p – частота генотипов в процентах; n – количество особей, имеющих определенный генотип; N – общее число обследованных животных.

На основании полученных данных проводили анализ частот распространения аллелей, для которого использовали программное обеспечение Microsoft Office Excel 2010.

Результаты и обсуждение. Несмотря на стремительное развитие технологий секвенирования, ПЦР и ее различные модификации по-прежнему остаются актуальными методами исследований в виду своей доступности и простоты. В результате анализ полученных длин рестриционных фрагментов, было отмечено разнообразие полиморфизма гена *BoLA-DRB3.2* (рис. 1). Сравнение результатов, полученных с использованием эндонуклеаз, позволило идентифицировать участки рестрикции с 42 известными аллелями гена *BoLA-DRB3*.

Полученные результаты генотипирования голштинизированного скота по полиморфизму гена *BoLA-DRB3.2* свидетельствуют о наибольшем распространении (с частотой от 8,9 % до 26,5 %) генотипов *23/*24, *24/*24, *16/*16, *24/*28, *9/*38; и меньшем 11,76 (5,89 %) – генотипов *24/*38, *24/*9, *2/*37, *16/*26 (рис. 2). Определение генотипа единичных проб оказалось затруднительным, поскольку разрешающая способность агарозного геля для электрофореза ограничена в отношении коротких длин рестриционных фрагментов (менее 50 п.н.).

В исследованной выборке большинство аллелей (*2, *9, *26, *37, *38) были нейтральными. Они обычно не связаны ни с устойчивостью, ни с чувствительностью к ВЛ КРС [16]. Были обнаружены аллели *23, *24 и *28, которые ассоциированы с устойчивостью к BLV и аллель *16 – с восприимчивостью к вирусу лейкоза

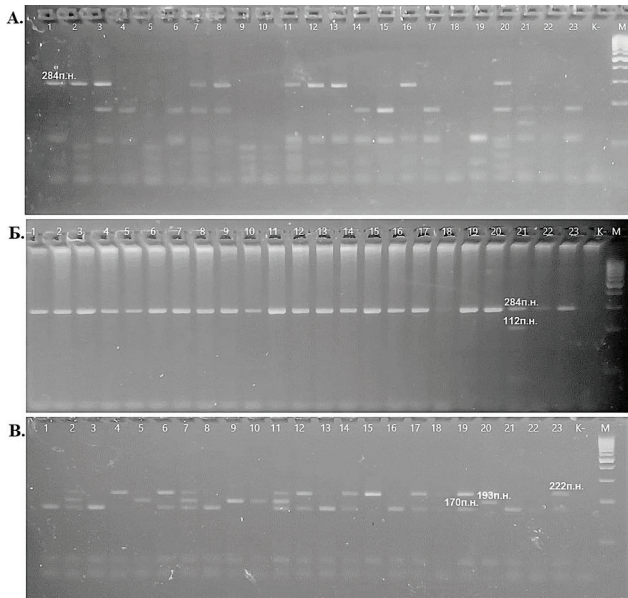


Рис. 1. Электрофорезграмма длин фрагментов гена *BoLA-DRB3.2* после обработки ампликонов: а) эндонуклеазой рестрикции *RSAI*; б) эндонуклеазой рестрикции *BSTYI*; в) эндонуклеазой рестрикции *HAEIII*; 1...23 – номера проб, К – отрицательный контроль, М – размерный стандарт с шагом 100 п.н.

[12, 17], при этом по результатам ряда исследований аллель *24 связан с чувствительностью [18].

Ранее было установлено, что *BoLA-DRB3* как ДНК-маркер играет основную роль в определении разнообразия устойчивости к инфицированию BLV различных особей [17, 19, 20]. Однако достоверная идентификация аллельных вариантов по группам представляет собой отдельную задачу, для решения которой исследователи прибегают к разным методам диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

Чаще всего животных делят на разные экспериментальные группы в зависимости от стадии протекания инфекционного процесса (бессимптомные, с персистирующим лимфоцитозом, с лимфомой и др.), в соответствии с которыми осуществляют идентификацию аллельных вариантов по группам: нейтральные, ассоциированные с резистентностью, ассоциированные с восприимчивостью. В зависимости от методов (серологические, молекулярно-генетические, гистологические), используемых для разделения животных по экспериментальным группам, определяются разные стадии течения инфекционного процесса. Так, японские учёные для диагностики заражения вирусом лейкоза использовали ИФА, идентифицировали субклиническую и клиническую стадии течения заболевания по количе-

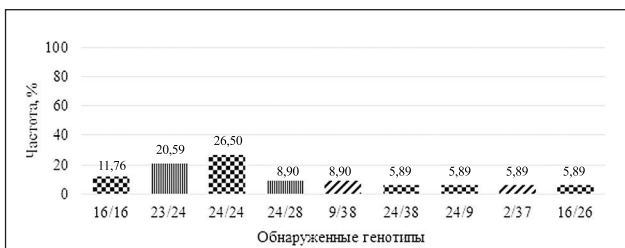


Рис. 2. Частота встречаемости генотипов полиморфизмов гена *BoLA-DRB3.2*: ■■■ – ассоциированы с восприимчивостью, ■■■■ – ассоциированы с устойчивостью, //// – нейтральные.

ству лимфоцитов в мазках крови, выявили лимфомы гематологическими методами, использовали количественную ПЦР с праймерами BLV-CoCoMo-qPCR-2 для определения провирусной нагрузки (PVL) [17, 21].

Проведение комплексных исследований в отношении BLV позволяет более подробно изучить не только особенности протекания инфекционного процесса, но и достоверно ассоциировать аллели и генотипы животных с восприимчивостью или резистентностью к BLV. Обозначенная проблема определения одного аллельного варианта к разным группам устойчивости также встречается при изучении межпородных различий генотипов, детерминирующих протекание инфекционного процесса [22]. Так, в работе Lo. с соавторами [23] исследованы коровы голштинской породы, и аллель DRB3*009:02 была обозначена как ассоциированная с низкой провирусной нагрузкой, а аллель DRB3*012:01 – с высокой.

Результаты исследований свидетельствуют, что у гетерозиготных по полиморфизмам в *BoLA-DRB3* особый риск развития лимфомы значительно ниже, чем у гомозигот. Считается, что это обусловлено распознаванием более разнообразного репертуара антигенов. Кроме того, один из возможных механизмов более выраженной устойчивости гетерозигот – функциональное доминирование аллелей устойчивости над аллелями восприимчивости [21].

Выводы. В результате исследований выполнена первичная оценка аллельного полиморфизма экзона 2 гена *BoLA-DRB3* на основе ПЦР-ПДФ при генотипировании крупного рогатого скота по ценному генетическому маркеру. В исследованной популяции генотипом, ассоциированным с восприимчивостью к вирусу лейкоза, обладали 56 % особей, с устойчивостью – 29 %, нейтральным генотипом – 15 %. Исходя из полученных результатов в современных условиях целесообразно проводить генетический скрининг популяций крупного рогатого скота по полиморфизму *BoLA-DRB3*, особенно в эпизоотологически неблагополучных регионах по заболеваемости лейкозом.

Литература.

1. Характеристика быков-производителей с комплексными генотипами генов *BLG* и *INOS* по молочной продуктивности женских предков / Х. Х. Гильманов, С. В. Тюлькин, И. В. Ржанова и др. // Ученые записки казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2020. Т. 241. № 1. С. 71-75. doi: 10.31588/2413-4201-1883-241-1-71-76.
2. Метаболические заболевания крупного рогатого скота / В. А. Мищенко, А. В. Мищенко, Р. В. Яшин и др. // Ветеринария сегодня. 2021. Т. 10. № 3. С. 184-189. doi: 10.29326/2304-196X-2021-3-38-184-189.
3. Review: Genetic selection of high-yielding dairy cattle toward sustainable farming systems in a rapidly changing world / L. F. Brito, N. Bedere, F. Douhard, et al. // Animal. 2021. Vol. 15. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S175173112100135X?via%3Dihub> (дата обращения: 10.02.2022). doi: 10.1016/j.animal.2021.100292.
4. Detection and immunobiological characterization of bovine leukemia virus in Russian Federation territory in dependence on geographical variations / M. V. Petropavlovskiy, I. M. Donnik, N. A. Bezborodova, et al. // Journal of Integrated OMICS. 2019. Vol. 9. No. 1. URL: <https://www.jiomics.com/index.php/jiomics/article/view/157> (дата обращения: 10.02.2022) doi: 10.5584/jiomics.v9i1.255.

5. Early events following bovine leukaemia virus infection in calves with different alleles of the major histocompatibility complex DRB3 gene / A. Forletti, C. M. Lützelshwab, R. Cepeda, et al. // *Veterinary Research*. 2020. Vol. 51. No. 1. URL: <https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-019-0732-1> (дата обращения: 10.02.2022). doi: 10.1186/s13567-019-0732-1.
6. Frie M. C., Coussens P. M. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2015. Vol. 163. No. 3. P. 103-114. doi: 10.1016/j.vetimm.2014.11.014.
7. Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds / P. C. Bartlett, B. Norby, T. M. Byrem et al. // *Journal of Dairy Science*. 2013. Vol. 96 No. 3. P. 1591-1597. doi: 10.3168/jds.2012-5930.
8. Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows / O. Nekouei, J. Vanleeuwen, H. Stryhn, et al. // *Preventive Veterinary Medicine*. 2016. Vol. 133. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27720022/> (дата обращения: 10.02.2022). doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.09.011.
9. Emanuelson U., Scherling K., Pettersson H. Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds // *Preventive Veterinary Medicine*. 1992. Vol. 12. No. 1. P. 121-131. doi: 10.1016/0167-5877(92)90075-Q.
10. Bovine leukemia virus discovered in human blood / G. C. Buehring, A. Delaney, H. Shen, et al. // *BMC Infectious Diseases*. 2019. Vol. 19. No. 1. URL: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-019-3891-9> (дата обращения: 10.02.2022). doi: 10.1186/s12879-019-3891-9.
11. No evidence of bovine leukemia virus proviral DNA and antibodies in human specimens from Japan / M. P. Yamanaka, S. Saito, Y. Hara, et al. // *Retrovirology*. 2022. Vol. 19. No. 1. URL: <https://retrovirology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12977-022-00592-6> (дата обращения: 10.02.2022). doi: 10.1186/s12977-022-00592-6.
12. Relationship between allelic heterozygosity in BoLA-DRB3 and proviral loads in bovine leukemia virus-infected cattle / H. E. Daous, S. Mitoma, E. Elhanafy, et al. // *Animals*. 2021. Vol. 11. No. 3. URL: <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/3/647> (дата обращения: 10.02.2022). doi: 10.3390/ani11030647.
13. Morales J., Lopez-Herrera A., Zuluaga J. Association of BoLA DRB3 gene polymorphisms with BoHV-1 infection and zootechnical traits // *Open Veterinary Journal*. 2020. Vol. 10. No. 3. P. 331-339. doi: 10.4314/ovj.v10i3.12.
14. Sequence and PCR-RFLP analysis of 14 novel BoLA-DRB3 alleles / A. Gelhaus, L. Schnittger, D. Mehlitz, et al. // *Animal Genetics*. 1995. Vol. 26. No. 3. P. 147-153. doi: 10.1111/j.1365-2052.1995.tb03154.x.
15. van Eijk M. J. T., Stewart-Haynes J. A., Lewin H. A. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP // *Animal Genetics*. 1992. Vol. 23. No. 6. P. 483-496. doi: 10.1111/j.1365-2052.1992.tb00168.x.
16. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus / A. Xu, M. J. van Eijk, C. Park, et al. // *The Journal of Immunology*. 1993. Vol. 151. No. 12. P. 6977-6985. doi: 10.4049/jimmunol.151.12.6977.
17. Takeshima S. N., Ohno A., Aida Y. Bovine leukemia virus proviral load is more strongly associated with bovine major histocompatibility complex class II DRB3 polymorphism than with DQA1 polymorphism in Holstein cow in Japan // *Retrovirology*. 2019. Vol. 16. No. 1. URL: <https://retrovirology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12977-019-0476-z> (дата обращения: 10.02.2022). doi: 10.1186/s12977-019-0476-z.
18. Связь генотипов BoLA-DRB3 с племенной ценностью по показателям молочной продуктивности в российской популяции молочного скота / А. А. Сермягин, Н. В. Ковалюк, А. Н. Ермилов и др. // *Сельскохозяйственная биология*. 2016. Т. 51. № 6. С. 775-781. doi: 10.15389/agrobiol.2016.6.775rus.
19. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene / M. A. Juliarena, M. Poli, L. Sala, et al. // *Animal Genetics*. 2008. Vol. 39. No. 4. P. 432-438. doi: 10.1111/j.1365-2052.2008.01750.x.
20. Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle / T. Miyasaka, S. N. Takeshima, M. Jimba, et al. // *Tissue Antigens*. 2013. Vol. 81. No. 2. P. 72-82. doi: 10.1111/tan.12041.
21. Bovine major histocompatibility complex (BoLA) heterozygote advantage against the outcome of bovine leukemia virus infection / C. W. Lo, S. N. Takeshima, S. Wada, et al. // *HLA*. 2021. Vol. 98. No. 2. P. 132-139. doi: 10.1111/tan.14285.
22. Приоритизация генов, ассоциированных с патогенозом лейкоза у крупного рогатого скота / Н. С. Юдин, Н. Л. Подколодный, Т. А. Агаркова и др. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018. Т. 22 № 8. С. 1063-1069. doi: 10.18699/VJ18.451.
23. BoLA-DRB3 polymorphism is associated with differential susceptibility to bovine leukemia virus-induced lymphoma and proviral load / C. W. Lo, L. Borjigin, S. Saito, et al. // *Viruses*. 2020. Vol. 12. No. 3. URL: <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/3/352> (дата обращения: 10.02.2022). doi: 10.3390/v12030352.

Поступила в редакцию 27.02.2023
 После доработки 25.04.2023
 Принята к публикации 15.07.2023