

УДК 619:616–036.22:578. [5:828.2]:636.2: (470+571)

## ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКАЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**М. В. Петропавловский**, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник

**И. М. Донник**, доктор биологических наук, профессор, академик РАН

**Н. А. Безбородова**, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник

Уральский научно-исследовательский ветеринарный институт

E-mail: info@urnivi.ru

**Ключевые слова.** вирус лейкоза крупного рогатого скота, филогенетическая классификация, эпизоотическая ситуация, серологический скрининг, полимеразная цепная реакция, генетический полиморфизм, эпизоотологический мониторинг.

**Реферат.** В рамках исследования, выполненного за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17–76–10051), проведен эпизоотологический мониторинг вируса лейкоза крупного рогатого скота. Установлено, что заболевание имеет широкое распространение как в мире, так и на территории РФ. Лейкоз зарегистрирован на территории 68 субъектов РФ. Согласно официальным данным, ежегодно вновь выявляется в среднем около 200 неблагополучных пунктов. Лейкоз остается одной из актуальных проблем и для животноводства Уральского региона. Особенно сложная эпизоотическая обстановка по лейкозу крупного рогатого скота сохраняется в Челябинской и Курганской областях. Проведенный анализ литературных данных, баз данных NCBI установил, что возбудитель лейкоза имеет 10 генетических групп и несколько подгрупп, выделенные и опубликованные генотипы из РФ сформированы в 4, 7, 8-й группах. С целью дальнейшей филогенетической и иммунобиологической оценки изолятов из РФ были подобраны группы животных голштино-фризской (импортной) и чернопестрой (местной) породы ( $n=50$ ), принадлежащих сельскохозяйственным организациям Тюменской области. Проведено nested-PCR-исследование, в результате которого был получен фрагмент гена env 444 bp в изучаемых образцах. RFLP-исследование этого фрагмента позволило установить, что в 94 % проб присутствовал бельгийский генотип вируса лейкоза, в 4 % проб – австралийский и в 2 % – смешанный генотип. Установлено, что в данном регионе Российской Федерации бельгийский генотип доминирует над австралийским. Все образцы были направлены на NGS-секвенирование.

## EPIZOOTOLOGICAL AND PHYLOGENETIC EVALUATION OF THE BOVINE LEUKEMIA VIRUS IN RUSSIAN FEDERATION

**M.V. Petropavlovskiy**, Candidate of Veterinary Sciences, Senior Researcher

**I.M. Donnik**, Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences

**N.A. Bezborodova**, Candidate of Veterinary Sciences, Senior Researcher

Ural Scientific Research Veterinary Institute

**Key words:** Bovine leukemia virus, cattle, phylogenetic classification, epizootic situation, serological screening, polymerase chain reaction, genetic polymorphism, epizootic monitoring

**Abstract.** The genetic characterization of BLV is an important task in scientific research in many countries of the world. According to the sequenced gene region – env BLV isolates allocated in different geographical locations of the world, up to 10 different genetic groups of the virus were identified and classified. **Acknowledgments:** The research was carried out at the expense of the Russian Science Foundation grant (project No. 17–76–10051). As part of the research, we monitored the epizootic situation of the BLV in Russia. Groups of animals ( $n=50$ ) Holstein-Frisian (imported breed) and Russian Black Pied (local breed) were selected, belonging to agricultural organizations of the Tyumen region. Serological screening methods (ELISA, AGID) were used in cattle to identify infected animals. Immunological evaluation of animals in all test groups is given. A primary A nested-PCR study was performed, which resulted in a fragment of the env 444 bp gene

*in the studied samples. RFLP analysis of this fragment allowed to establish that in 94% of the samples there was a «Belgian type» of the leukemia virus, in 4% of samples – «Australian» and in 2% – a «mixed type». All samples were sent for NGS sequencing. By phylogenetic evaluation of the BLV genome env site in the isolated samples and the immunological evaluation of the infected animals, new data will be obtained that will allow updating information on the genetic groups of the BLV in the territory of the Russian Federation.*

Лейкоз крупного рогатого скота – злокачественное лимфопролиферативное заболевание, этиологическим фактором которого служит вирус лейкоза (ВЛ КРС), относящийся к семейству Retroviridae, роду *Deltaretrovirus*.

Экономический ущерб от заболевания животных лейкозом обусловлен снижением качественных и количественных показателей продуктивности, преждевременной выбраковкой высокопродуктивных особей, затратами на утилизацию туш и органов с опухолевыми поражениями, нарушением селекционно-племенной работы с потерей генофонда ценных пород.

Цель исследований – провести оценку эпизоотологического и филогеографического распространения вируса лейкоза крупного рогатого скота в мире и на территории Российской Федерации.

Возбудитель широко распространен во всем мире, включая Российскую Федерацию.

По данным ученых из Мичиганского университета (США), 50% всего американского молочного скота инфицировано [1]. Согласно исследованиям Министерства сельского хозяйства США, 83% американских молочных ферм и 39% мясных ферм имеют по крайней мере одно инфицированное ВЛ КРС животное [1–4]. В Канаде заболевание регистрируется в 89% стад при уровне инфицированности животных ВЛ КРС 20–40%.

В то время как североамериканские страны предпочли не принимать в этой связи серьезные меры, многие другие страны решили инициировать программы контроля ВЛ КРС. Вирус лейкоза был полностью ликвидирован в 20 европейских странах и Новой Зеландии по состоянию на 2011 г. Кроме того, ВЛ КРС был искоренен в большинстве регионов Польши, Португалии и Италии. В Западной Австралии заболевание успешно ликвидировано среди молочных стад, однако среди мясного поголовья остается небольшая доля инфицированного крупного рогатого скота. Заболевание широко распространено в стадах крупного рогатого скота стран Южной Америки: Аргентине (до 90%), Бразилии (до 60%), Чили (до 27,9%), Боливии (до 30,7%), Перу (до 42,3%), Венесуэле (33,3%), Парагвае (54,7%); в Азии: в Китае (50% молочных и 2% мясных ферм), в Японии (до 73,3%), Монголии (3,9%), Камбодже (5,3%), Тайване (5,8%), Иране (до 29,8%), Таиланде (58,7%), Филиппинах (9,7%), Корее (54,2%), Мьянме (9,1%); на среднем Востоке – в Турции (48,3%), Израиле (5%) и Саудовской Аравии (20,2%) [1, 2, 5].

Во всех субъектах Российской Федерации с целью выявления инфицированных вирусом лейкоза животных в плановом порядке проводится серологический скрининг, результаты которого подтверждают практически повсеместное распространение ВЛ КРС. Ежегодно в РФ серологически исследуется около 12–14 млн голов крупного рогатого скота, гематологически – 3–4 млн [6].

По официальным данным на 2017 г., в Российской Федерации зарегистрировано 1876 пунктов, неблагополучных по лейкозу крупного рогатого скота, уровень инфицированности животных в которых составляет от 15% (в отдельных регионах значительно выше), а заболеваемость 3–4% (количество животных с гематологической стадией в 2017 г. составило 29 тыс. голов). Такая эпизоотическая ситуация без особых изменений сохраняется в течение многих лет. Это заболевание имеет наибольший удельный вес в структуре инфекционной патологии крупного рогатого скота в РФ (62%). Лейкоз крупного рогатого скота зарегистрирован на территории 68 субъектов Российской Федерации [6].

Лейкоз остается также одной из актуальных проблем и для животноводства Уральского региона. Особенно сложная эпизоотическая обстановка по лейкозу крупного рогатого скота сохраняется в Челябинской и Курганской областях. В Свердловской области, благодаря принятой целевой программе противолейкозных оздоровительных мероприятий, которая активно реализовалась как в общественном, так и в частном секторе в течение длительного времени, популяции крупного рогатого скота области практически оздоровлены от лейкоза. Успехи в ликвидации заболевания были достигнуты главным образом путем тестирования и выбраковки животных или изолирования положительно реагирующего крупного рогатого скота [7]. При диагностике заболевания используются серологические (РИД, ИФА) и молекулярно-генетические (ПЦР) методы [8].

Однако несмотря на достаточно высокую эффективность современных методов диагностики заболевания существует вероятность неполной идентификации инфицированных вирусом лейкоза животных в оздоравливаемых стадах, что существенно влияет на сроки выполнения оздоровительных программ. Ранее отмечено, что это могло быть связано в том числе и с влиянием генетической вариативности отдельных изолятов вируса [9]. Изучение генетического разнообразия ВЛ КРС является важной задачей научно-исследовательских работ во многих странах мира [5, 10, 11].

Как и другие ретровирусы, геном ВЛ КРС содержит структурные и регуляторные гены *gag*, *pol* и *env*. Ген *env* кодирует трансмембранные гликопротеины *gp51* и *gp30* капсида вируса, которые обуславливают инфекционность вируса и играют важное значение в серологической диагностике. В связи с этим филогенетический анализ генотипов ВЛ КРС в основном был основан на *env*-гене.

Согласно проведенному секвенированию участка гена *env*-изолятов BLV, выделенных в разных географических точках мира, установлено и классифицировано до 10 различных генетических групп вируса [9–21].

Выделенные в настоящее время и опубликованные в NCBI Gen Bank изоляты из РФ классифицированы в 4, 7, 8-й генетических группах. Все данные основаны также на частичном или полном секвенировании участка гена *env* – *gp51* и *gp30* из районов Новосибирской, Вологодской (G7), Московской (G4, G8), Тюменской областей (G7 австралийский генотип, G4 бельгийский генотип), Туринского района Свердловской области (австралийский генотип, G7) [4], Челябинской области (G4, бельгийский генотип) и Краснодарского края (G7 австралийский, G4 бельгийский генотипы) [19]. Анализом аминокислотных последовательностей выделенных штаммов установлено, что основные изменения локализовались в С-части CD4+ эпитопа, цинк-связывающей пептидной области, CD8+ Т-клеточном эпитопе и перекрывающемся линейном эпитопе E, а наибольшее количество изменений было отмечено в G4 (бельгийский генотип) [19]. Предполагается, что установленные точечные мутации в геноме возбудителя указывают на приспособительные особенности вируса в процессе эволюции.

Проведенные исследования, посвященные генетической характеристике и классификации изолятов ВЛ КРС из Восточной Европы и России, не являются всеобъемлющими.

В рамках целей и задач исследования были подобраны группы коров 3–4-летнего возраста голштино-фризской (импортной) и черно-пестрой (местной) породы ( $n=50$ ), принадлежащих сельскохозяйственным организациям Тюменской области. Импортный скот был завезен на территорию РФ из Нидерландов в январе–феврале 2014 г. Все завезенные животные были отрицательными по ВЛ КРС, что подтверждено обязательным серологическим контролем при оформлении документов ветеринарной сертификации.

Однако на момент исследования в 2018 г. скот был инфицирован вирусом лейкоза. Предполагаемым источником инфицирования мог являться местный и импортный скот, завезенный ранее (в 2011 г.) из США. Не исключено также, что имели место ложноотрицательные результаты серологического контроля в партии скота из Нидерландов.

Для выявления инфицированных животных были использованы серологические (ИФА, РИД) методы скрининга популяции крупного рогатого скота. Первичное ПЦР-исследование биоматериала проведено с использованием стандартной коммерческой тест-системы.

Нами был установлен таргетный для классификации участок гена и проведен подбор методик для исследований генома изолятов вируса лейкоза. Для амплификации короткого участка гена *env* (444 bp – *gp51* область) использована nested-ПЦР-реакция. Для проведения реакции подобраны комплементарные ДНК-мишени праймеры и компоненты ПЦР-смеси. Опытным путем установлены концентрации растворов и температурные режимы реакции амплификации, сформирован протокол исследований. В качестве контроля нами использовалась инфицированная перевиваемая клеточная культура FLK-BLV-почка эмбриона овцы. Для проведения генотипирования участка *env* (444bp- *gp51* области) применялась реакция полиморфизма (RFLP), в качестве рестриктаз использованы *Bam*HI, *Bcl*II, *Pvu*II.

Проведено nested-ПЦР-исследование, в результате которого был получен фрагмент гена *env* 444 bp в изучаемых образцах ( $n=50$ ). Исследование фрагмента гена 444 bp методом энзимного полиморфизма (RFLP) позволило установить, что в 94 % проб присутствовал бельгийский генотип вируса лейкоза, в 4 % проб – австралийский и в 2 % – смешанный генотип. Установлено, что в данном регионе Российской Федерации бельгийский генотип доминирует над австралийским. При сравнительном анализе результа-

тов исследований отмечено, что 6% исследованных проб с использованием стандартной коммерческой тест-системы ПЦР являлись ложноотрицательными. Данные образцы относились к бельгийскому генотипу по энзимному генотипированию. Это могло быть связано как с локальной вариабельностью участка гена в местах посадки праймеров, так и с низкой концентрацией вируса в лимфоцитах вследствие различных факторов. При этом при серологическом скрининге (РИД, ИФА) отмечено 100%-е совпадение с методом nested-ПЦР. Все образцы были направлены на секвенирование, дальнейшие выводы будут сделаны по результатам реакции. Будет произведена филогенетическая и иммунобиологическая оценка генома возбудителя. Полученные данные позволят получить новые данные, позволяющие обновить сведения о генетических группах вируса лейкоза крупного рогатого скота на территории РФ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-76-10051).

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. OIE World animal health information database-version: 1.4. Paris France: World organisation for animal Health. – 2009.
2. OIE World Organization for Animal Health. Enzootic Bovine Leukosis. World Anim Heal Inf Database, Dis information, List Ctries by Sanit Situat. Available [Электрон. ресурс]. – 2017. – Режим доступа: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statuslist](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statuslist).
3. LaDronka R. Impact of bovine leukemia virus on herd level production indicators on U.S. dairy farms// 97th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases. – Chicago, IL, 2016.
4. Molecular characterization of bovine leukemia virus from Moldovan dairy cattle/ A. Pluta, M. Rola-Luszczak, P. Kubis' [et al.] // Arch. Virol. – 2018. – P. 1563–1576.
5. Polat M., Takeshima S., Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus// Virology Journal. – 2017. – Vol. 14. – P. 209. – DOI: 10.1186/s12985-017-0876-4.
6. Эпизоотическая ситуация по социально значимым и особо опасным болезням животных в Российской Федерации за 2016 год [Электрон. ресурс] / В.Н. Шевкопляс, В.Н. Боровой, Ю.И. Барсуков, С.А. Коломыцев. – Режим доступа: <https://www.tsenovik.ru/business/articles/mvet/epizooticheskaya-situatsiya-po-sotsialno-znachimym-i-osobo-opasnym-boleznyam-zhivotnykh-v-rossiyskoy-1/>.
7. Гулюкин М.И., Донник И.М., Татарчук А.Т. Методологическая система оздоровительных мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота. – Екатеринбург: Урал. изд-во, 2007. – 224 с.
8. Методы лабораторной диагностики лейкоза: учеб. пособие/ И.М. Донник, И.А. Шкуратова, А.С. Кривоногова, М.В. Петропавловский [и др.]. – Екатеринбург: Урал. гос. агр. ун-т, 2015. – 48 с.
9. Features of the regional structure of the blv provirus/ N.V. Bateneva, P.N. Smirnov, S.H. Vyshegurov [et al.] // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2016. – T. 7, N 4. – P. 2025–2032.
10. Батенёва Н.В. Особенности течения лейкозного процесса у носителей 4-го и 7-го генотипов BLV // Инновации и продовольственная безопасность. – 2015. – № 4 (10). – С. 5–8.
11. Molecular analysis of a 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp51 env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile/ R. Felmer, G. Mun'oz, J. Zu'niga, M. Recabal // Vet. Microbiol. – 2005. – Vol. 108 (1–2) – P. 39–47.
12. Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle/ E. Lee, E. J. Kim, J. Ratthanophart [et al.] // Infect Genet Evol. – 2016. – Vol. 41. – P. 245–254.
13. Sequencing and phylogenetic analysis of the gp51 gene from Korean bovine leukemia virus isolates/ E. Lee, E. J. Kim, H. K. Joung [et al.] // Virol. J. – 2015. – Vol. 12. – P. 64. – DOI: 10.1186/s12985-015-0286-4.
14. Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle /M. Polat, A. Ohno, S.N. Takeshima [et al.] // Arch. Virol. – 2016. – Vol. 120. – P. 285–296. – DOI: 10.1007/s00705-014-2280-3.
15. Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle/ M. Polat, A. Ohno, S.N. Takeshima, J. Kim, M. Kikuya, Y. Matsumoto, C.N. Mingala, M. Onuma, Y. Aida // Arch. Virol. – 2015. – Vol. – 160. – P. 285–296.
16. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis/ M. Polat, S.N. Takeshima, K. Hosomichi, [et al.] // Retrovirology. – 2016. Vol. –13 P. 4.
17. The molecular epidemiological study of bovine leukemia virus infection in Myanmar cattle/ M. Polat, H. H. Moe, T. Shimogiri [et al.] // Arch. Virol. – 2016. – Vol. 1. – P. 293.
18. The molecular characterization of bovine leukemia virus 1574 A. Pluta et al. isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny/ M. Rola-Luszczak, A. Pluta, M. Olech [et al.] // PLoS One. – 2018. – DOI: 10.1371/journal.pone.0058705.



19. *Molecular epidemiology and characterization of bovine leukemia virus in domestic yaks (Bos grunniens) on the Qinghai-Tibet Plateau, China/* M. Wang [et al.] // *Arch. Virol.* – 2018. – Vol. 163 (3). – P. – 659–670.
20. *First molecular characterization of bovine leukemia virus infections in the Caribbean/* Y. Yang, P. J. Kelly, J. Bai, R. Zhang, C. Wang // *PLoS One.* – 2016.

## REFERENCES

1. OIE World animal health information database-version: 1.4. Paris France: World organisation for animal Health: - 2009.
2. OIE World Organization for Animal Health. Enzootic Bovine Leukosis. World Anim Heal Inf Database, Dis information, List Ctries by Sanit Situat. Available. [Elektronnyy resurs]. – 2017. Rezhim dostupa: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statuslist](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statuslist).
3. LaDronka R. Impact of bovine leukemia virus on herd level production indicators on U.S. dairy farms// 97th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases. - Chicago, IL, 2016.
4. Molecular characterization of bovine leukemia virus from Moldovan dairy cattle/ A. Pluta, M. Rola-Łuszczak, P. Kubis', S. Balov, R. Moskalik, B. Choudhury, J. Kuzmak// *Arch. Virol.* – 2018. – P. 1563–1576.
5. Polat M., Takeshima S., Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus// *Virology Journal.* – 2017. – Vol. 14 P. 209. – DOI: 10.1186/s12985-017-0876-4.
6. Epizooticheskaya situatsiya po sotsialno znachimym i osobo opasnym boleznyam zhivotnykh v Rossiyskoy Federatsii za 2016 god [Elektronnyy resurs]/ V.N. Shevkoplyas, V.N. Borovoy, Yu.I. Barsukov, S.A. Kolomyitsev – Rezhim dostupa: <https://www.tsenovik.ru/bizness/articles/mvet/epizooticheskaya-situatsiya-po-sotsialno-znachimym-i-osobo-opasnym-boleznyam-zhivotnykh-v-rossiyskoy-1/>.
7. Gulyukin M. I., Donnik I. M., Tatarchuk A. T. Metodologicheskaya sistema ozdorovitelnykh meropriyatiy pri leykoze krupnogo rogatogo skota. Ekaterinburg: Ural. izd-vo, 2007. – 224 s.
8. Metody laboratornoy diagnostiki leykoza: ucheb. Posobie/ I.M. Donnik, I.A. Shkuratova, A.S. Krivonogova, M.V. Petropavlovskiy i dr. - g. Ekaterinburg: Ural. gos. agr. un-t, 2015. - 48 s.
9. Features of the regional structure of the blv provirus/ N.V. Bateneva, P.N. Smirnov, S.H. Vyshegurov, M.S. Fomenko, M.I. Voevoda // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* - 2016. - T. 7, N 4. - C. 2025-2032.
10. BatenYova N.V. Osobennosti techeniya leykoznogo protsessa u nositeley 4-go i 7-go genotipov BLV // *Innovatsii i prodovolstvennaya bezopasnost.* - 2015. - N 4 (10). - S. 5-8.
11. Molecular analysis of a 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp51 env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile/ R. Felmer, G. Munõz, J. Zuñiga, M. Recabal // *Vet Microbiol.* – 2005. – Vol. – P. 108(1–2):39–47.
12. Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle/ E. Lee, E.J. Kim, J. Ratthanophart, R. Vitoonpong, B.H. Kim, I.S. Cho, J.Y. Song, K.K. Lee, Y.K. Shin // *Infect Genet Evol.* 2016. – Vol. 41. – P. 245-254.
13. Sequencing and phylogenetic analysis of the gp51 gene from Korean bovine leukemia virus isolates/ E. Lee, E.J. Kim, H.K. Joung, B.H. Kim, J.Y. Song, I.S. Cho, K.K. Lee, Y.K. Shin// *Virol. J.* 2015. – Vol. 12. – P. 64.- DOI: 10.1186/s12985-015-0286-4.
14. Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle /M. Polat, A. Ohno, S.N. Takeshima, J. Kim, M. Kikuya, Y. Matsumoto, C.N. Mingala, M. Onuma, Y. Aida // *Arch Virol.* – 2016. – Vol. – P. 285–296. – DOI: 10.1007/s00705-014-2280-3.
15. Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle/ M. Polat, A. Ohno, S.N. Takeshima, J. Kim, M. Kikuya, Y. Matsumoto, C.N. Mingala, M. Onuma, Y. Aida // *Arch Virol.* – 2015. 160 P. 285–296.
16. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis/ . Polat, S.N. Takeshima, K. Hosomichi, J. Kim, T. Miyasaka, K. Yamada, M. Arainga, T. Murakami, Y. Matsumoto, V. de la Barra Diaz. [et al.] // *Retrovirology.* – 2016. Vol. –13 P. 4.
17. The molecular epidemiological study of bovine leukemia virus infection in Myanmar cattle/ M. Polat, H.H. Moe, T. Shimogiri, K.K. Moe, S.N. Takeshima, Y. Aida // *Arch Virol.* - 2016. – Vol. (1). – P. 293.
18. The molecular characterization of bovine leukemia virus 1574 A. Pluta et al. isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny/ M. Rola-Łuszczak, A. Pluta, M. Olech, I. Donnik, M. Petropavlovskiy, A. Gerilovych, I. Vinogradova, B. Choudhury, J. Kuz'mak// *PLoS One.* – 2018. – Vol. - e58705. DOI: 10.1371/journal.pone.0058705.