



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-303-312>  
УДК 619:578.5:599.4



# Подходы определения генетической последовательности РНК-содержащих вирусов из биологического материала с низкой копийностью на примере вирусов летучих мышей

К. А. Столбунова<sup>1</sup>, М. А. Степанюк<sup>1</sup>, А. Д. Мошкин<sup>1</sup>, И. В. Попов<sup>2</sup>, О. В. Охлопкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Научно-исследовательский институт вирусологии (НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ), ул. Тимакова, 2, г. Новосибирск, 630060, Россия

<sup>2</sup> ФБОУ ВО «Донской государственный технический университет» (ДГТУ), пл. Гагарина, 1, г. Ростов-на-Дону, 344000, Россия

## РЕЗЮМЕ

**Введение.** Летучие мыши, являясь природным резервуаром множества вирусов, традиционно воспринимаются как источник биологической опасности. Активное развитие центров реабилитации рукокрылых входит в противоречие с их репутацией высокопотенциальных резервуаров зоонозных инфекций: концентрация животных в условиях центра без должного контроля способна искусственно усиливать циркуляцию патогенов. Разрешить это противоречие можно путем включения в протоколы работы центров предварительного вирусологического скрининга поступающих особей. Выявление носителей и их своевременная изоляция (карантин) защитят как остальных животных, так и персонал, а накопленные данные позволят создать систему раннего предупреждения о появлении новых генетических вариантов вирусов.

**Цель исследования.** Апробация комбинированного подхода к получению полногеномных последовательностей РНК-содержащих вирусов рукокрылых в условиях низкой копийности и фрагментации РНК-матрицы, включающего последовательное применение и модификацию методов ампликонного секвенирования и случайного прайминга (SMART-9N).

**Материалы и методы.** В качестве материала исследования были взяты образцы фекалий летучих мышей, содержащихся в условиях реабилитационного центра в г. Ростове-на-Дону в 2022–2023 гг. В статье описана последовательность действий от выделения нуклеиновых кислот до обработки и анализа данных. Также представлены три способа обогащения РНК-матрицы на основе реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

**Результаты.** При проведении исследования была разработана праймерная панель для выявления альфа-коронавирусов летучих мышей. В результате метагеномного анализа установлено присутствие вирусной РНК *Bat batrovirus* (семейство *Astroviridae*) и разработаны диагностические праймеры для подтверждения. Получена полная генетическая последовательность вируса *Loanvirus brunaense* (семейство *Hantaviridae*) и 95% нуклеотидной последовательности вируса *Alphacoronavirus* (семейство *Coronaviridae*).

**Заключение.** Данные о генетических последовательностях вирусов играют важную роль в различных аспектах науки, медицины, ветеринарии и здравоохранения в целом. Результаты данного исследования могут быть использованы для разработки экспресс-диагностических тест-систем по обнаружению различных вирусов летучих мышей.

**Ключевые слова:** секвенирование нового поколения, NGS, секвенирование, РНК-вирусы, летучие мыши, пробоподготовка

**Благодарности:** Исследование выполнено при поддержке гранта РФ № 23-64-00005 и государственного задания НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ № 125031903984-1.

**Для цитирования:** Столбунова К. А., Степанюк М. А., Мошкин А. Д., Попов И. В., Охлопкова О. В. Подходы определения генетической последовательности РНК-содержащих вирусов из биологического материала с низкой копийностью на примере вирусов летучих мышей. *Ветеринария сегодня*. 2026; 15 (3): 303–312. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-303-312>

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для корреспонденции:** Столбунова Кристина Александровна, младший научный сотрудник лаборатории геномики и эволюции вирусов НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, ул. Тимакова, 2, г. Новосибирск, 630060, Россия, [kristina.sunwo@yandex.ru](mailto:kristina.sunwo@yandex.ru)

## Approaches to determining the genetic sequence of RNA viruses from low-copy biological material, using bat viruses as a model

Kristina A. Stolbunova<sup>1</sup>, Marina A. Stepanyuk<sup>1</sup>, Alexey D. Moshkin<sup>1</sup>, Igor V. Popov<sup>2</sup>, Olesia V. Ohlopko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Research Institute of Virology, ul. Timakova, 2, Novosibirsk 630060, Russia

<sup>2</sup> Don State Technical University, pl. Gagarina, 1, Rostov-on-Don 344000, Russia

## ABSTRACT

**Introduction.** Bats are recognized as natural reservoirs for a wide range of viruses and are therefore traditionally viewed as a potential biological hazard. This perception, however, conflicts with the growing operation of bat rehabilitation centers, where the concentration of animals – if not accompanied by rigorous

virological monitoring – may inadvertently facilitate pathogen transmission. A viable resolution lies in integrating preliminary virological screening into standard intake protocols. Early identification of viral carriers and their timely quarantine would not only protect both animal cohorts and center personnel but also generate valuable surveillance data to support early warning systems for emerging viral genetic variants.

**Objective.** To validate a combined methodological approach for reconstructing full-genome sequences of bat-derived RNA viruses under conditions of low viral load and fragmented RNA templates. The proposed strategy involves the sequential application and adaptation of amplicon-based sequencing and random priming (SMART-9N) techniques.

**Materials and methods.** Fecal samples were collected from bats housed at a rehabilitation center in Rostov-on-Don between 2022 and 2023. The manuscript details the complete workflow, from nucleic acid extraction through to bioinformatic data processing and analysis. Three RNA template enrichment strategies based on reverse transcription and PCR are also described and compared.

**Results.** A primer panel was developed specifically for the detection of bat alphacoronaviruses. Metagenomic analysis further revealed the presence of viral RNA corresponding to *Bat astrovirus* (family *Astroviridae*), for which confirmatory diagnostic primers were subsequently designed. Notably, the complete genomic sequence of *Loanvirus brunaense* (family *Hantaviridae*) was obtained, along with 95% of the nucleotide sequence of an *Alphacoronavirus* (family *Coronaviridae*).

**Conclusion.** Viral genetic sequence data are indispensable across diverse fields, including fundamental science, clinical medicine, veterinary practice, and public health. The findings of this study provide a practical foundation for the development of rapid diagnostic test kits aimed at detecting bat-associated viruses.

**Keywords:** next generation sequencing, NGS, sequencing, RNA viruses, bats, sample preparation

**Acknowledgments:** The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-64-00005 and the state assignment of the Research Institute of Virology of the FRC FTM No. 125031903984-1.

**For citation:** Stolbunova K. A., Stepanyuk M. A., Moshkin A. D., Popov I. V., Ohlopko O. V. Approaches to determining the genetic sequence of RNA viruses from low-copy biological material, using bat viruses as a model. *Veterinary Science Today*. 2026; 15 (3): 303–312. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-303-312>

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

**For correspondence:** Kristina A. Stolbunova, Junior Researcher, Laboratory of Genomics and Evolution of Viruses, Research Institute of Virology, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, ul. Timakova, 2, Novosibirsk 630060, Russia, [kristina.sunwo@yandex.ru](mailto:kristina.sunwo@yandex.ru)

## ВВЕДЕНИЕ

Рукокрылые (*Chiroptera*) – одна из самых уязвимых и наименее изученных групп млекопитающих в России, находящаяся на стыке интересов экологии, ветеринарии и эпидемиологии. Летучие мыши признаны уникальными резервуарами для огромного разнообразия РНК-содержащих вирусов, многие из которых обладают значительным зоонозным потенциалом [1, 2, 3]. Изучение их генетического разнообразия является ключом к пониманию эволюции вирусов, экологии инфекционных болезней и прогнозированию пандемических угроз [4]. Однако прямая расшифровка вирусных геномов из биологических образцов (слюны, фекалий, тканей) часто сталкивается с критическим препятствием – крайне низкой вирусной нагрузкой. Ограниченное количество вирусных копий, фрагментированная РНК, высокий уровень примесей нуклеиновых кислот хозяина и сложность выделения делают традиционные методы секвенирования малоэффективными [5, 6].

Нарастающая антропогенная активность, приводящая к интенсификации контактов с популяциями рукокрылых, формирует прямые предпосылки для межвидовой передачи патогенов – как непосредственно человеку, так и опосредованно через промежуточных хозяев (домашних животных и сельскохозяйственный скот) [7, 8, 9]. Тем не менее механизмы и движущие факторы данного процесса остаются недостаточно изученными, что актуализирует необходимость применения междисциплинарных исследовательских подходов [10, 11].

В последние годы в России формируются центры реабилитации рукокрылых, что обусловлено совокупностью социальных, экологических и законодательных факторов. Ключевой причиной является рост

экологической грамотности населения: благодаря просветительской работе ученых и зоозащитников летучие мыши все чаще воспринимаются не как вредители, а как полезные и уязвимые животные, нуждающиеся в защите<sup>1</sup>. Важную роль играет и правовой аспект: многие виды рукокрылых на территории страны занесены в региональные Красные книги, что законодательно обязывает оказывать им помощь<sup>2</sup>. Реабилитационные центры для летучих мышей представляют собой специализированные учреждения, основная цель которых заключается в спасении, лечении и последующем возвращении в естественную среду рукокрылых, оказавшихся в бедственном положении. Их деятельность носит комплексный характер и включает несколько ключевых направлений. Прежде всего, это выхаживание осиротевших детенышей, оставшихся без матери вследствие разрушения убежищ или гибели взрослых особей [12]. Не менее важной задачей является лечение травм, наиболее распространенными из которых являются повреждения крыльев, полученные при столкновении с окнами, нападениях домашних животных или запутывании в садовых сетках. Центры также оказывают помощь истощенным и обезвоженным животным, особенно в критические периоды после спячки или при дефиците кормовой базы, занимаются диагностикой и терапией заболеваний. Важнейшим этапом является реабилитация перед выпуском, когда животные содержатся в специальных подготовительных вольерах для восстановления мышечной массы

<sup>1</sup> Сайт Российского отделения Союза охраны летучих мышей. <https://zmmu.msu.ru/bats/popular/populyar.htm>

<sup>2</sup> О животном мире: федеральный закон от 24.04.1995 № 52-ФЗ. [https://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_6542](https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_6542)

и охотничьих навыков [13, 14]. Роль ветеринарных специалистов в работе таких центров является фундаментальной и критически важной, хотя их участие может иметь разные организационные формы. Крупные и хорошо финансируемые организации могут иметь в штате ветеринара, специализирующегося на экзотических животных или дикой природе. Однако более распространенной моделью является партнерство с курирующим ветеринаром, который осуществляет профессиональный надзор на волонтерской или договорной основе.

Предполагается, что ключевым аспектом в понимании формирования межвидовой передачи патогенов являются уникальные экологические характеристики отряда рукокрылых [15]. В отличие от прочих млекопитающих сопоставимых размерных классов, эти животные отличаются выраженной мобильностью, сложной социальной организацией, исключительной продолжительностью жизни и репродуктивной стратегией, сочетающей низкую плодовитость с высокой выживаемостью [16]. Существенные внутри- и межвидовые вариации в миграционном поведении, степени колонийности и склонности к впадению в состояние оцепенения с высокой вероятностью детерминируют формирование специфических адаптаций к патогенной нагрузке [17].

Значительную долю среди возникающих зоонозов, ассоциированных с рукокрылыми, составляют РНК-содержащие вирусы. Эти вирусы обладают высокой изменчивостью и быстрой способностью к накоплению мутаций, что является следствием низкой точности репликации, обеспечиваемой РНК-зависимой РНК-полимеразой, что позволяет данным возбудителям быстро эволюционировать [18, 19].

Осуществление комплексных исследований по выявлению вирусов у рукокрылых сопряжено со значительными методологическими трудностями. Как отмечено в работах некоторых авторов [20, 21, 22, 23], к ним относятся: 1) необходимость сбора долгосрочных временных рядов данных для выявления циркулирующих вирусов; 2) высокая пространственно-временная вариабельность экологических и популяционных параметров (сезонность, миграции, плотность популяции), которая затрудняет планирование репрезентативного отбора проб; 3) низкая распространенность некоторых вирусов в популяции, что требует применения целевых схем отбора проб, больших объемов выборки и использования специализированных молекулярно-диагностических методик.

В данной статье рассматриваются современные стратегические подходы, позволяющие преодолеть эти барьеры: от целевого обогащения вирусных последовательностей и высокочувствительных протоколов обратной транскрипции с предварительной амплификацией до методов метагеномного секвенирования нового поколения и их оптимизации для работы с деградированной РНК. На примере вирусов летучих мышей была оценена эффективность трех методических подходов по критерию покрытия генома, а также исследована возможность их комбинации для достижения максимальной полноты сборки.

Целью данного исследования является апробация комбинированного подхода к получению полногеномных последовательностей РНК-содержащих вирусов рукокрылых в условиях низкой копияльности и фрагментации РНК-матрицы, включающего последовательное применение и модификацию методов ампликонного секвенирования и случайного прайминга (SMART-9N).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала исследования были взяты образцы фекалий летучих мышей. Отбор проб в популяции летучих мышей Ростовской области (Россия) проводился с ноября 2022 г. по март 2023 г. в Ростовском центре реабилитации летучих мышей (Донской государственный технический университет, г. Ростов-на-Дону). В исследование были включены летучие мыши четырех видов: рыжая вечерница (*Nyctalus noctula*), двухцветный кожан (*Vespertilio murinus*), нетопырь Куля (*Pipistrellus kuhlii*) и поздний кожан (*Eptesicus serotinus*). Все летучие мыши были первоначально отобраны волонтерами Ростовского центра реабилитации летучих мышей по запросам жителей города с ноября 2022 г. по март 2023 г. Собранные колонии и отдельные летучие мыши были доставлены в центр реабилитации для ветеринарного осмотра и ухода. Каждый вид содержался коллективно, по 5–20 особей в клетке, что позволяло социализировать их во время реабилитации и способствовало спячке. Летучих мышей, находящихся в центре, кормили зофобасами и мучными червями. В конце ноября 2022 г. их поместили в контролируемую спячку при постоянной температуре 10 °C, и они оставались в спячке до начала апреля 2023 г. В мае 2023 г. здоровых летучих мышей выпустили в дикую природу, а летучих мышей, нуждающихся в дальнейшей реабилитации, выпустили позже. Образцы фекалий, каждый не менее 0,5 г, собирали из ящиков, в которых содержались зимующие летучие мыши (один раз из каждого ящика). Образцы хранились при минус 80 °C.

Также в данной статье рассмотрены подходы работы с положительными на коронавирус и хантавирус образцами, отобранными у особей рыжей вечерницы данной выборки в результате первичного скрининга, описанного в предыдущих работах авторов [24, 25]. На рисунке 1 изображена общая схема реализуемого исследования.

**Выделение нуклеиновых кислот.** С помощью ватного зонда образцы фекалий массой 20–50 мг помещали в микропробирки объемом 1,5 мл, добавляли 500 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера и растирали содержимое до однородности ватным зондом. После этого образцы тщательно перемешивали с помощью вортекса. Далее центрифугировали образцы при 8000 rcf в течение 4 мин; 100 мкл надосадочной жидкости перемещали в новые пробирки объемом 1,5 мл и использовали для выделения нуклеиновых кислот согласно рекомендациям производителя набора «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

**Диагностические праймеры.** В рамках данного исследования были сконструированы две пары праймеров для вложенной полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления вирусов рода *Bastrovirus* семейства *Astroviridae* (табл. 1). Подбор осуществлялся на основе 60 референсных последовательностей бастровирусов из базы данных GenBank, обнаруженных среди летучих мышей и грызунов.

**Подготовка кДНК по методике SMART-9N.** Для синтеза кДНК использовали набор «Обратная транскриптаза RNAscribe RT» (ООО «Биолабмикс», Россия) и 2 праймера с одинаковыми свободными участками для следующего этапа обогащения. Один праймер на 3'-конце содержит 9N последовательность [AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACNNNNNNNN]. Второй праймер имеет три рибонуклеотидных гуанина [GCTAATCATTGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATrGrGrG] на 3'-конце [26]. К 10 мкл выделенной РНК добавляли по 1 мкл каждого

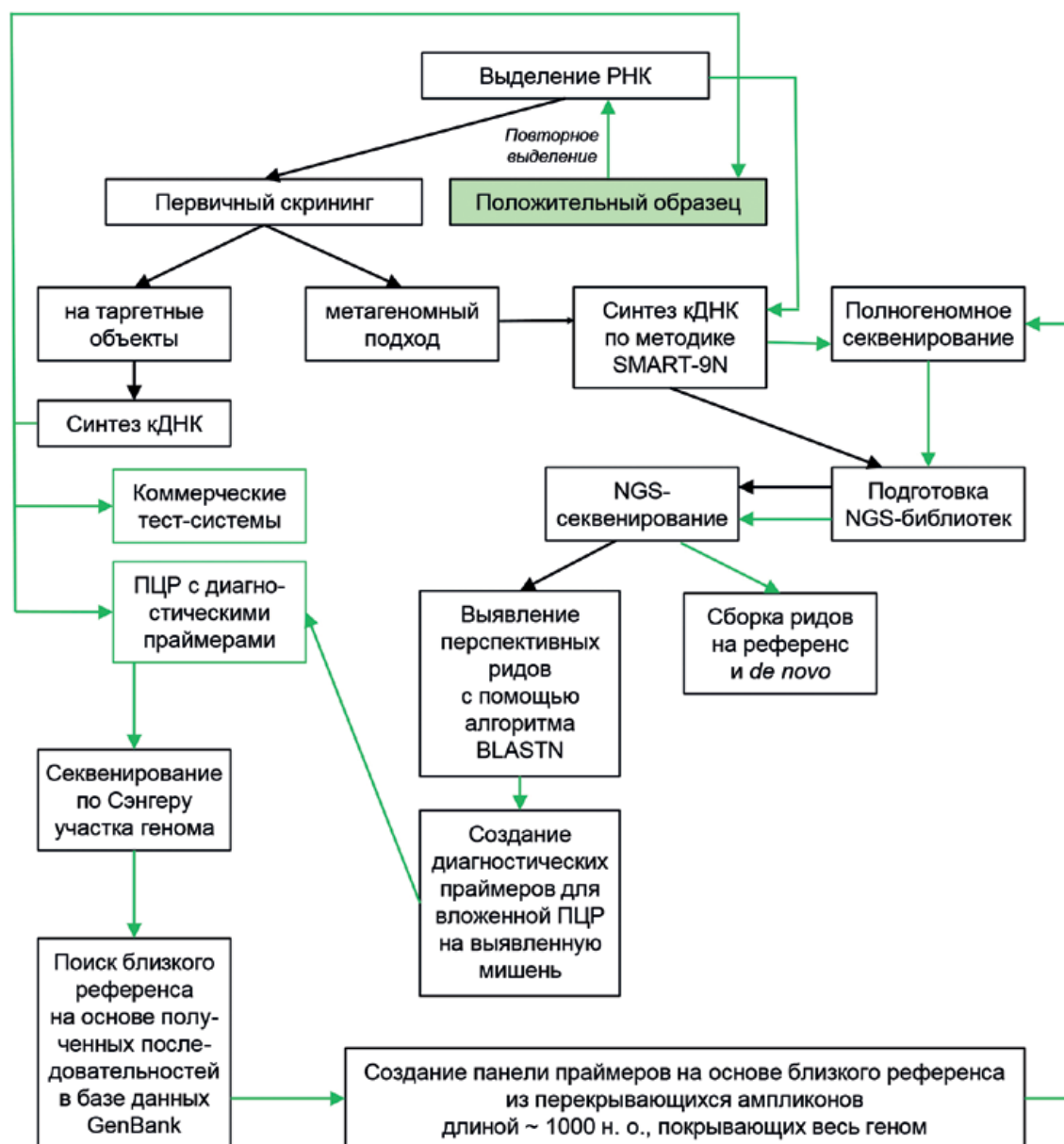


Рис. 1. Общая схема применения подходов по выявлению нуклеотидных последовательностей РНК-содержащих вирусов с низкой копиюностью (черными стрелками показаны пути скрининга по выявлению положительных образцов; зеленые стрелки отражают движение работы с положительными образцами)

*Fig. 1. Overview of the methodological approaches for detecting nucleotide sequences of low-copy RNA viruses (black arrows indicate screening pathways for positive sample identification; green arrows trace the handling and processing workflow for positive samples)*

**Таблица 1**  
**Диагностические праймеры для выявления вирусов вида *Bastrovirus* рукокрылых**

**Table 1**  
**Diagnostic primers for the detection of bat batroviruses**

| Название        | Последовательность 5'–3' | Температура отжига | Длина участка |
|-----------------|--------------------------|--------------------|---------------|
| Bastro F1       | CACGAGAAGRAYCCCGACCT     | 58 °C              | 896 bp        |
| Bastro R1       | CCCACGCACCGTTTCAGRTC     | 57 °C              |               |
| Bastro F2 (st2) | TCAAGGCAGGGCARGGCAT      | 57 °C              | 408 bp        |
| Bastro R2 (st2) | AACAGGGTGTGGCCTCGCC      | 57 °C              |               |

Таблица 2

Панель праймеров, покрывающая весь геном альфа-коронавируса на основе референса OP919651.1

Table 2

Primer panel covering the complete genome of *Alphacoronavirus* based on reference sequence OP919651.1

| Пул праймеров 1 (нечетные) |                              | Пул праймеров 2 (четные) |                            |
|----------------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Название                   | Последовательность 5'–3'     | Название                 | Последовательность 5'–3'   |
| BtCoV_1F                   | TATCTATCTACGGATAGTGCGTCTCA   | BtCoV_2F                 | GTGGCTGGTGAACCTAAATGCAAT   |
| BtCoV_1R                   | GTGTGGAACCACAATTACACTTAATGAG | BtCoV_2R                 | GAGTGRACCAAGAACAATACTTACG  |
| BtCoV_3F                   | GCCACTTGTGATTCTGTACGTGTT     | BtCoV_4F                 | CAGGTGGCTTCTAGCCAGTT       |
| BtCoV_3R                   | CTTTGACACCATAATAGCAAGAGCC    | BtCoV_4R                 | GACGCCACCCAGCAATTATTCTG    |
| BtCoV_5F                   | CCTGTTGATGAGTCCAATCTGCTG     | BtCoV_6F                 | GAGAATCTTGCTCATGGTGGTGG    |
| BtCoV_5R                   | GTTTGCCATTACGTGGTCCAACAA     | BtCoV_6R                 | GGGTTCTGCTTTGTATACCTTGC    |
| BtCoV_7F                   | GTACAGGCTGAATTGGTTTCTTATCTG  | BtCoV_8F                 | GGYGAGCCTAGTGACTCTGAG      |
| BtCoV_7R                   | CAATGACGACTGGTGTGCTACTA      | BtCoV_8R                 | GTGCTGCCAAACAACCTTAGTATG   |
| BtCoV_9F                   | CCTGTTGGCGATCCATTATGCG       | BtCoV_10F                | CTCACTCAGATTAAGAAGCTGTG    |
| BtCoV_9R                   | GTAGTACACTTGTAGAGGTCTTAC     | BtCoV_10R                | GTACACGCGGCAAGTAAAGATGC    |
| BtCoV_11F                  | GTAATCTGATGARGCTCGCAC        | BtCoV_12F                | GCCCTCTTGAGTTGTGCTT        |
| BtCoV_11R                  | GGAGATAGAATTGACCAACGCTC      | BtCoV_12R                | CTTGAACCTAAGCCACCAATTGCATC |
| BtCoV_13F                  | CTCTGTTGTACGTTGGTAGTG        | BtCoV_14F                | CTATCTCTATGTTGATGCCCTTG    |
| BtCoV_13R                  | CATCAAGTAGCACAACACACACC      | BtCoV_14R                | CTGGGATRACTGATAAAGGTACAG   |
| BtCoV_15F                  | GCTGCAGCCCAATGTACAAGAG       | BtCoV_16F                | GCATGGCTGAACCAATGGTGC      |
| BtCoV_15R                  | GGATCTTGTGTACCTATAGGCACC     | BtCoV_16R                | GCAATTTGTGAGTCCCAATACAGG   |
| BtCoV_17F                  | GTGTTGGGTGTCGTGACTC          | BtCoV_18F                | CTACGAGGGAGGTTGTATCACAG    |
| BtCoV_17R                  | GTCATAGTGGYAGGATGTACGC       | BtCoV_18R                | GTTGAGAACAGAATTCATGTGGGC   |
| BtCoV_19F                  | CTGTGATGATGGTGTGTTTGC        | BtCoV_20F                | GGCTCACTGATGTGAAGAC        |
| BtCoV_19R                  | GTATAGTAGACATGCATAGGATGAC    | BtCoV_20R                | CTGGCTTAATAGCACATGCGC      |
| BtCoV_21F                  | CAGAGGGTCAGCTTTAGACATATTG    | BtCoV_22F                | GTAATCTGCGATTTTGCATGCG     |
| BtCoV_21R                  | CAGCCTTCTGGCCTAACAACG        | BtCoV_22R                | GGACCTACCTAGTGTCAAACC      |
| BtCoV_23F                  | CCTACCAAGACTAACGTTAAGTGC     | BtCoV_24F                | GATGGCGATGTGACACATTT       |
| BtCoV_23R                  | CTTCATGRGTAGAACTGGTACAC      | BtCoV_24R                | GTCGCTGACATGATTCACG        |
| BtCoV_25F                  | CCTCATCATGCGTGTGTRCAC        | BtCoV_26F                | GTCAACACGACGAAATGAGAGTGG   |
| BtCoV_25R                  | CACACCAACATGGAAGCCRTAC       | BtCoV_26R                | CATCATAAGAGGAGGAGGATCAC    |
| BtCoV_27F                  | CCAGTCCACTACTGGTGGTTG        | BtCoV_28F                | GCAAGTGTCCCTTCACACCAC      |
| BtCoV_27R                  | CACCYGTAACAACATCACCCTAG      | BtCoV_28R                | GTCTTCATCCACAGTCCGAG       |
| BtCoV_29F                  | GCTCACTGTTTCTGAAGAGGCC       | BtCoV_30F                | GGTGATCAGATCTTCTCCATAGTG   |
| BtCoV_29R                  | CTAAACATGACAAGGCCAGGTTC      | BtCoV_30R                | GTGCAGCTACAGAGCAATTAG      |
| BtCoV_31F                  | CYAACTGTCTAATGATGCTGTAG      | BtCoV_32F                | GCCAATTGGAGCTATGATGGGG     |
| BtCoV_31R                  | CAARATGACATCCACGAGAARTTC     | BtCoV_32R                | CTGTGCCGAGGTAGTAGA AATGC   |
| BtCoV_33F                  | CTTCATATGATGCTGACWCAG        | BtCoV_34F                | CTCCAACACCCGCTGCAATGC      |
| BtCoV_33R                  | GTTGAGGAGCTGGGATTTCG         | BtCoV_34R                | GTGATATAGTAATATCTTCTGCACTG |

праймера в концентрации 10 и 30 рмоль/мкл соответственно. Полученную смесь поместили в амплификатор с температурным режимом 25 °C – 2 мин, 70 °C – 3 мин. Во время инкубации подготовили второй микс с использованием набора для обратной транскрипции: к 4 мкл «5× ОТ-буфер-mix» добавили 1 мкл «RNAscribe RT ревертазы» и 3 мкл воды для ПЦР. После окончания инкубации матрицы и праймеров к полученной смеси добавили приготовленный микс из буфера, фермента и воды, перемешали и снова поместили в амплификатор с температурным режимом 25 °C – 10 мин, 42 °C – 3 ч, 85 °C – 5 мин. По завершении программы синтез кДНК закончен и полученный продукт можно использовать для последующего ПЦР-обогащения.

Для наработки продукта на матрице кДНК применяли метод ПЦР-амплификации с использованием готовой ПЦР-смеси «БиоМастер LR HS-ПЦР (2×)» (ООО «Биолабмикс», Россия). Для приготовления ПЦР-микса использовали 15 мкл «БиоМастер LR HS-ПЦР (2×)» из набора, 4 мкл воды для ПЦР и 1 мкл праймера [AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT] в концентрации 30 рмоль/мкл и 10 мкл матрицы (кДНК, полученной по методике SMART-9N) [26]. Протокол амплификации состоял из следующих стадий: 1) предварительный нагрев – 95 °C, 5 мин; 2) 50 циклов амплификации, включающих этапы: денатурации – 94 °C, 15 с; отжига – 62 °C, 45 с; элонгации – 68 °C, 4 мин и 30 с; 3) заключительная элонгация – 68 °C, 15 мин. Синтез праймеров осуществляла компания

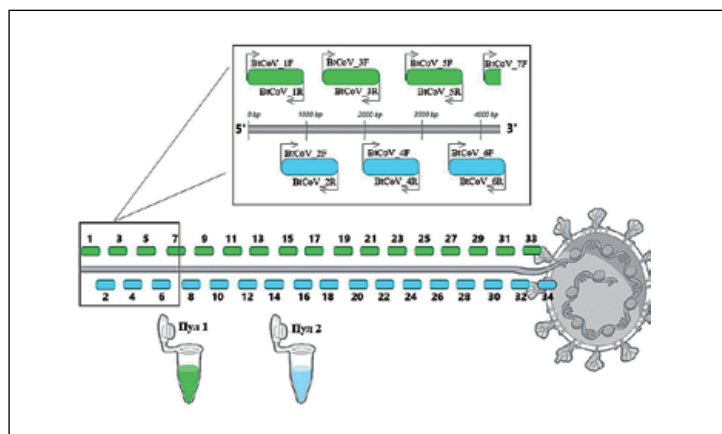


Рис. 2. Схема праймерной панели для покрытия генома коронавируса (голубым цветом отмечены четные участки, зеленым – нечетные)

Fig. 2. Schematic layout of the primer panel for coronavirus genome coverage (even-numbered amplicons are shown in blue; odd-numbered amplicons are shown in green)

ООО «Синтол» (Россия). Используемый амплификатор T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США).

Праймерная панель, рассчитанная на основе близкого референса альфа-коронавируса летучих мышей. Как уже было сказано выше, ранее авторам удалось обнаружить с помощью диагностических праймеров фрагмент альфа-коронавируса у рыжей вечерницы [24]. Чтобы добиться большего охвата генома коронавируса с помощью метода секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS), была разработана панель олигонуклеотидов на основе максимально близкого референса *Alphacoronavirus* [GenBank OP919651.1] (табл. 2, рис. 2). Синтезированные праймеры охватывают фрагменты генома коронавируса в пределах 1000 пар оснований с перекрытием четных и нечетных участков. Каждый праймер разводили до концентрации 100 мкМ. Формировали 2 пула праймеров по 1 мкл каждого в соответствии с таблицей 1. Сформированные пулы разводили до рабочей концентрации 10 мкМ. Для амплификации целевых фрагментов полноразмерного генома была проведена одноступенчатая ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием набора «БиоМастер ОТ-ПЦР-Премиум (2x)» (ООО «Биолабмикс», Россия). ПЦР-смесь готовили согласно инструкции производителя без учета праймеров и делили поровну на две части. В первую смесь добавляли 2,5 мкл пула нечетных праймеров, во вторую смесь – 2,5 мкл пула четных праймеров в концентрации 10 мкМ. Синтез праймеров осуществляла компания ООО «Биолабмикс» (Россия).

Модификация методики SMART-9N. Для модификации методики SMART-9N изменения внедрили только в конструкцию праймера, в составе которого присутствует последовательность 9N. Авторами была заменена последовательность 9N на последовательность известной части генома коронавируса на краю уже известного (отсеквенированного) участка на 5'-конце (табл. 3). Таким образом, при синтезе кДНК праймер должен селективно присоединяться к геному коронавируса и в процессе синтеза в сторону 5'-конца синтезировать матрицу кДНК неизвестного участка. Технически процесс синтеза и амплификации аналогичен описанному в пункте «Подготовка кДНК по методике SMART-9N» раздела «Материалы и методы» данной статьи. Синтез кДНК с каждым праймером из таблицы 3 и ПЦР-амплификация проводились в отдельных пробирках, после чего объединялись и готовились для NGS-секвенирования. Синтез праймеров осуществляла компания ООО «Биолабмикс» (Россия).

Подготовка NGS-библиотек. Для ферментативной фрагментации и лигирования адаптера применяли наборы FTP Display и LIB Display (ООО «БиоЛинк», Россия). Очистку кДНК проводили с помощью магнитных частиц с использованием VANTS DNA Clean Beads (Vazyme, Китай). Концентрацию конечного библиотечного пула измеряли с помощью флуорометра Qubit (Thermo Fisher Scientific, США) с набором для анализа Equalbit 1x dsDNA HS Assay Kit (Vazyme, Китай). Контроль готовых библиотек осуществляли путем проведения количественной ПЦР с использованием набора реактивов NEBNext Library Quant Kit for Illumina (New England Biolabs, США) и амплификатора CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, США). Геномные библиотеки были секвенированы на платформе Illumina MiSeq с использованием набора реагентов MiSeq v3 в течение 600 циклов и на платформе FASTASeq (GeneMind, Китай) с использованием набора реактивов FASTASeq 300 Sequencing Kit V2.0.

Биоинформатический анализ. Полученные данные секвенатора на первом этапе были подвергнуты таксономической классификации с использованием инструмента Kraken2 и стандартной референсной базы Viral. Параллельно для реконструкции геномных последовательностей была выполнена сборка *de novo* с использованием ассемблера MEGANIT с параметрами по умолчанию. Аннотация полученных контигов проводилась путем поиска гомологичных последовательностей с использованием алгоритма BLASTn и базы данных NT. Идентифицированные в результате этого анализа референсные геномы были отобраны для следующего этапа. Для формирования полногеномной консенсусной

Таблица 3  
Праймеры для модификации методики SMART-9N

Table 3  
Primers for SMART-9N protocol modification

| Название         | Последовательность 5'–3'           | Позиции праймера<br>Реф. OP919651.1 |
|------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| CovBat_12570(9N) | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTTGGTTACA | 12570–12578                         |
| CovBat_19269(9N) | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCAGACATC | 19269–19277                         |
| CovBat_22561(9N) | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGGTGTGAAG | 22561–22569                         |
| CovBat_25024(9N) | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATCATTAGA | 25024–25032                         |
| CovBat_27460(9N) | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACACAGCAATG | 27460–27468                         |
| CovBat_28088(9N) | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGTCAAACAT | 28088–28096                         |

последовательности данные, полученные в результате секвенирования, были картированы на выбранный референсный геном с использованием программы для выравнивания BWA-MEM, включенной в программный пакет UGENE.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Выявление нуклеотидной последовательности с помощью диагностических праймеров.** Для проведения первичного скрининга образцов не всегда есть возможность применения коммерческих тест-систем, поскольку вирусы одного и того же рода и вида могут циркулировать у различных животных и при этом иметь генетические различия, индивидуальные для определенного круга носителей. Диагностические праймеры подбираются на консервативные участки вирусного генома среди анализируемого круга носителей. Например, в предыдущей работе [24] авторы использовали диагностические праймеры для выявления вирусов семейства *Coronaviridae* у рукокрылых методом вложенной ПЦР. Это наиболее эффективный способ выявления нуклеотидной последовательности из биоматериала с поврежденной матрицей или низкой копийностью анализируемых объектов. К тому же данный подход позволяет проводить скрининг более селективно, если на первом шаге ПЦР вполне возможно, что праймеры могут комплементарно связываться с матрицей других представителей (хозяин, бактерии, насекомые и др.), то на втором шаге увеличивается вероятность обнаружения искомого объекта и возрастает число копий ампликонов, которых становится достаточно для последующего анализа.

При попытке получения полногеномной последовательности коронавиральной РНК рукокрылых с применением методики SMART-9N для синтеза кДНК в данном исследовании этот подход оказался не вполне успешным, а сработал больше как метагеномный скрининг. В результате уже метагеномного анализа один из образцов, который был положительным на коронавирус рукокрылых (GenBank PQ439335), содержал в себе порядка сотни ридов нуклеотидных последовательностей, относящихся к вирусу семейства *Astroviridae*, к неклассифицируемым бастровирусам рукокрылых (*Bat bastrovirus*). Бастровирусы обнаружены у летучих мышей, грызунов, птиц, комаров, свиней и людей. Они были впервые выявлены в образцах кала человека на территории Нидерландов в 2016 г. Генетический анализ показал, что они имеют частичное сходство как с астровирусами, так и с вирусами гепатита Е. На сегодняшний день их потенциальная роль в развитии болезней у человека не установлена [27].

Для подтверждения присутствия в образце РНК бастровируса были сконструированы диагностические праймеры на основе известных генетических последовательностей бастровирусов рукокрылых, выделенных на территории Евразии (табл. 1). Результат вложенной ПЦР оказался положительным. Продукты первого и второго шага были объединены и подготовлены для NGS-секвенирования, в результате которого было получено 711 н. о. *Bat bastrovirus* (GenBank PX666685). В 2023 г. на территории России в Московской области Г. В. Роевым и соавт. у рыжей вечерницы также был обнаружен бастровирус [28], что может свидетельствовать о видоспецифичности вируса к носителю. Авторы оценили степень зоонозного риска обнаруженного вируса с помощью машинного обучения и выявили для одного из образцов высокий зоонозный потенциал. Важно отметить, что полученная нами последовательность бастровиру-

са охватывает лишь фрагмент ORF1. Для полноценной филогенетической классификации этого вируса требуется получение более длинных нуклеотидных последовательностей, что упирается в те же проблемы низкой копийности и фрагментации, которые являются предметом нашего исследования. Несмотря на это, при сравнении обнаруженного нами участка гена PX666685 с московскими изолятами (OR552430 и OR552431) идентичность нуклеотидных оснований составила 97,19 и 97,33% соответственно. Данные о высоком зоонозном потенциале референсного изолята указывают на необходимость дальнейшего изучения выявленного бастровируса как потенциально способного к межвидовой передаче.

Комбинация методологических подходов позволила зафиксировать случай коинфекции (одновременного носительства двух и более вирусов) у рыжей вечерницы (*Alphacoronavirus* и *Bat bastrovirus*). Согласно систематическому обзору B. D. Jones et al., анализ 117 исследований выявил 61 публикацию, в которой описаны случаи вирусной коинфекции у 662 особей летучих мышей, что подтверждает распространенность этого явления, хотя оно чаще фиксируется как побочная находка, а не как цель специализированных работ [29], что и было установлено в нашем исследовании.

**Полногеномная сборка после пробоподготовки кДНК по методике SMART-9N.** Технология SMART – это механизм переключения на 5'-конце матрицы РНК. Метод базируется на способности определенных обратных транскриптаз переключать матрицы и включать адаптерные последовательности во время синтеза первой цепи кДНК [26]. Этот подход основан на случайном прайминге для синтеза кДНК и не является селективным. Зато данный метод вполне приемлем для метагеномного/полногеномного секвенирования или первичного скрининга.

Как уже было описано выше, в данном исследовании эта методика не подошла для выявления полногеномной последовательности коронавируса рукокрылых. Это могло произойти, вероятнее всего, из-за длины (32 000 н. о.) и структуры (линейный) его генома, а также количества и состояния матрицы в образце. Но этот подход хорошо сработал на примере сегментированного генома хантавируса рукокрылых (*Loanvirus brunaense*), у которого удалось собрать после NGS-секвенирования 3 полноразмерных кодирующих гена: S-сегмент длиной 1323 н. о. (GenBank PP898197.1), кодирующий белок нуклеокапсид; М-сегмент длиной 3427 н. о. (GenBank PP910333.1), кодирующий гликопротеины; L-сегмент длиной 6561 н. о. (GenBank PP910334.1), кодирующий РНК-зависимую РНК-полимеразу. Полученные нами результаты согласуются с данными I. M. Claro et al., которые впервые систематически охарактеризовали эффективность метода SMART-9N для метагеномного секвенирования РНК-вирусов. Авторы продемонстрировали, что данный подход обладает рядом важных преимуществ по сравнению с традиционными ампликонными методами [26]. В контексте нашего исследования эти данные имеют прямое значение. Успешная сборка трех полноразмерных сегментов хантавируса *Loanvirus brunaense* с использованием протокола SMART-9N подтверждает, что метод эффективен для сегментированных РНК-вирусов, в отличие от коронавируса с длинным не-сегментированным геномом, где тот же протокол оказался недостаточно эффективным. Геном хантавируса, каждый сегмент которого не превышает 6500 н. о., был

собиран полностью. Это наблюдение также согласуется с данными I. M. Claro et al., которые отмечали, что эффективность SMART-9N зависит от длины и структуры целевого генома. Таким образом, метод SMART-9N представляет собой ценный инструмент для метагеномного секвенирования РНК-вирусов, особенно в случаях, когда неизвестен точный вид, вирус имеет сегментированную структуру генома и требуется получение длинных ридов для *de novo* сборки. В то же время для длинных несегментированных геномов, таких как коронавирусы, может потребоваться дополнительная оптимизация протокола или комбинация с другими подходами, что будет рассмотрено далее в статье.

**Праймерная панель, рассчитанная на основе близкого референса, на примере альфа-коронавируса летучих мышей.** В результате ПЦР-амплификации с праймерной панелью было получено 2 пула ПЦР-продуктов, которые объединили и подготовили к NGS. При биоинформатической сборке данных секвенирования удалось покрыть более 30% генома альфа-коронавируса. Десять пар праймеров успешно отождествились на матрицу, и примерно 10 000 н. о. удалось прочитать, используя данный подход. Здесь большое значение имеет качество и целостность РНК-цепи. Каждая пара праймеров рассчитана примерно на 1000 букв. Такая длина наиболее оптимальна для того, чтобы в дальнейшем использовать ферментативную фрагментацию, в результате которой возможно получить средний фрагмент оптимальной длины, ориентированный на возможности чтения секвенатора и наборов реактивов для работы с ним. Если ампликоны будут меньшей длины, соответственно, при фрагментации могут получиться слишком короткие участки, которые либо удалятся при очистке на магнитных частицах, либо возникнут трудности при сборке коротких ридов. Сравнение с альтернативными подходами показывает, что праймерная панель, хотя и является экономически доступным методом, имеет фундаментальные ограничения. Во-первых, ампликонные методы критически зависят от точной комплементарности праймеров матрице, и даже единичные нуклеотидные замены в сайтах посадки могут приводить к выпадению ампликонов. Во-вторых, для РНК-вирусов с высокой частотой мутаций праймеры необходимо часто обновлять, чтобы они соответствовали циркулирующим вариантам [30]. В качестве альтернативы можно использовать более дорогостоящий метод гибридационного захвата (target capture sequencing), который содержит зонды, толерантные к нуклеотидным несоответствиям. Takemae N. et al. продемонстрировали, что при концентрации вирусной РНК < 26 копий/мкл target capture sequencing обеспечивает > 70% покрытия полноразмерных геномов, что представляет собой примерно 180-кратное увеличение числа ридов по сравнению с метагеномным секвенированием [30]. Таким образом, наш результат с низким покрытием (лишь 30% генома) при использовании праймерной панели является весьма распространенной проблемой и иллюстрирует ограничение ампликонных подходов в условиях фрагментированной РНК и возможных мутаций в праймерных участках.

**Модификация методики SMART-9N для большего покрытия генома.** В поисках новых вариантов для получения более полной нуклеотидной последовательности альфа-коронавируса летучих мышей была подготовлена кДНК по модифицированной методике протокола

SMART-9N. Условия ПЦР-амплификации оставались неизменными. Все ПЦР-продукты одного образца объединили и аналогичным образом подготовили NGS-библиотеку. После секвенирования при сборке ридов на референс покрытие генома составило уже около 80%, это примерно 25 000 н. о.

Оригинальный протокол SMART-9N, разработанный I. M. Claro et al., основан на использовании случайного 9N-праймера, что обеспечивает неселективную амплификацию всей РНК, присутствующей в образце. Однако, как отмечают сами авторы, метод имеет ограничения при работе с длинными несегментированными геномами: даже для SARS-CoV-2 максимальная длина единичного рида составила 18 500 п. о., что покрывает лишь 60% генома [26]. Данные ограничения обусловлены двумя факторами – это конкуренция с клеточной РНК и невозможность направленной достройки участков в сторону 5'-конца. Предложенная нами модификация устраняет оба этих ограничения. Замена случайного 9N-праймера на специфичный праймер, комплементарный уже известному участку генома коронавируса (на краю отсеквенированного участка), обеспечивает селективную амплификацию и направленный синтез кДНК в сторону 5'-конца генома, что позволяет достраивать неизвестные участки. В результате чего удалось увеличить покрытие генома с 30% (при использовании только праймерной панели) до 80%.

**Объединение подходов SMART-9N и праймерной панели для альфа-коронавируса.** После обработки результатов сборки альфа-коронавируса при индивидуальном секвенировании каждого из трех подходов была подготовлена новая NGS-библиотека, в которой в равных долях смешали продукты обогащения матрицы после протокола SMART-9N, модифицированного SMART-9N и праймерной панели в одну пробирку. В результате секвенирования одновременно трех подходов покрытие генома составило уже 95%, что соответствует примерно 26 500 нуклеотидам. Полученное нами покрытие генома после объединения трех подходов сопоставимо с результатами A. Cerro-Monje et al., которые достигли порога > 90% генома после объединения ридов из трех повторов [31]. Однако, в отличие от их подхода, основанного исключительно на повторных реакциях секвенирования одного типа, нами использована комбинация различных методов пробоподготовки (SMART-9N, модифицированный SMART-9N и праймерная панель), что позволило достичь 95% покрытия без многократного секвенирования одного и того же материала. Стоит отметить, что L. Marcolungo et al. [32] также подчеркивают важность комбинирования данных из нескольких источников (технических трехкратных повторов синтеза кДНК и ампликонов) для достижения полной реконструкции генома. Эта логика перекликается с нашим подходом, описанным выше. Эти две работы основаны на одном принципе: разные эксперименты дают разные наборы ампликонов, и их объединение позволяет закрыть пробелы в геноме, что подтверждает необходимость применения различных комбинаций в подобных условиях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования были апробированы три подхода к получению полногеномных последовательностей РНК-содержащих вирусов из образцов с низкой копийностью и фрагментированной РНК-матрицей (образцы от рукокрылых, поступающих в центр реабилитации).

## Основные результаты:

1. С помощью методики SMART-9N в результате мета-геномного анализа была обнаружена РНК *Bat batrovirus* рукокрылых (семейство *Astroviridae*). Сконструированы диагностические праймеры для вложенной ПЦР. Выявленный участок гена длиной 711 н. о. запонирован в базу данных GenBank – PX666685.

2. Протокол SMART-9N в немодифицированном виде показал высокую эффективность для сегментированного генома хантавируса (собраны три полноразмерных кодирующих сегмента) и запонированы в базу данных GenBank: PP898197.1, PP910333.1, PP910334.1.

3. Созданная праймерная панель на основе близкого референсного генома альфа-коронавируса позволила покрыть лишь 30% целевого генома. Это подтверждает известное ограничение ампликонных методов: их эффективность критически зависит от комплементарности праймеров матрице и целостности РНК.

4. Модификация SMART-9N (замена случайного 9N-праймера на специфичный, комплементарный известному участку генома коронавируса) позволила увеличить покрытие до 80% за счет селективной амплификации вирусной РНК и направленного синтеза кДНК в сторону 5'-конца.

5. Комбинация трех подходов (SMART-9N + модифицированный SMART-9N + праймерная панель) в одной библиотеке для секвенирования обеспечила покрытие 95% генома альфа-коронавируса, что на 15% выше лучшего индивидуального результата.

В условиях низкой копийности и фрагментации РНК-матрицы ни один из апробированных методов по отдельности не обеспечивает полного покрытия генома альфа-коронавируса. Предложенная стратегия комбинации трех подходов позволяет компенсировать «слепые зоны» каждого метода и может быть рекомендована для секвенирования архивных и деградированных образцов, где переотбор материала невозможен.

Обнаружение в образцах от рукокрылых РНК бастровируса с 97%-й идентичностью зоонозному изоляту, а также коронавируса и хантавируса подтверждает необходимость вирусологического мониторинга в центрах реабилитации рукокрылых. Предложенный протокол может быть использован для скрининга и полногеномного секвенирования вирусов в подобных учреждениях при ограниченных ресурсах. Дальнейшие исследования будут направлены на доопределение оставшихся 5% генома и разработку специализированной праймерной панели для бастровируса.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Nieto-Rabiela F., Wiratsudakul A., Suzán G., Rico-Chávez O. Viral networks and detection of potential zoonotic viruses in bats and rodents: a worldwide analysis. *Zoonoses and Public Health*. 2019; 66 (6): 655–666. <https://doi.org/10.1111/zph.12618>
2. Alvarez-Munoz S., Upegui-Porras N., Gomez A. P., Ramirez-Nieto G. Key factors that enable the pandemic potential of RNA viruses and inter-species transmission: a systematic review. *Viruses*. 2021; 13 (4):537. <https://doi.org/10.3390/v13040537>
3. Letko M., Seifert S. N., Olival K. J., Plowright R. K., Munster V. J. Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nature Reviews Microbiology*. 2020; 18 (8): 461–471. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0394-z>
4. Yan X., Liu Y., Hu T., Huang Z., Li C., Guo L., et al. A compendium of 8,176 bat RNA viral metagenomes reveals ecological drivers and circulation dynamics. *Nature Microbiology*. 2025; 10 (2): 554–568. <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01884-7>
5. Greninger A. L. The challenge of diagnostic metagenomics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2018; 18 (7): 605–615. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1487292>

6. Bergner L. M., Orton R. J., da Silva Filipe A., Shaw A. E., Becker D. J., Tello C., et al. Using noninvasive metagenomics to characterize viral communities from wildlife. *Molecular Ecology Resources*. 2019; 19 (1): 128–143. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12946>
7. Eby P., Peel A. J., Hoegh A., Madden W., Giles J. R., Hudson P. J., Plowright R. K. Pathogen spillover driven by rapid changes in bat ecology. *Nature*. 2023; 613 (7943): 340–344. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05506-2>
8. Wang J., Pan Y. F., Yang L. F., Yang W. H., Lv K., Luo C. M., et al. Individual bat virome analysis reveals co-infection and spillover among bats and virus zoonotic potential. *Nature Communications*. 2023; 14 (1):4079. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39835-1>
9. Tsai V., Lai Y.-C., Contreras G. P., Yeh T.-Y. Impact of anthropogenic activities on the ecosystem and emergence of bat-borne zoonotic diseases. *Virology*. 2026; 617:110811. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2026.110811>
10. Hayman D. T. S., Bowen R. A., Cryan P. M., McCracken G. F., O'Shea T. J., Peel A. J., et al. Ecology of zoonotic infectious diseases in bats: current knowledge and future directions. *Zoonoses and Public Health*. 2013; 60 (1): 2–21. <https://doi.org/10.1111/zph.12000>
11. Hassani A., Khan G. Human-animal interaction and the emergence of SARS-CoV-2. *JMIR Public Health and Surveillance*. 2020; 6 (4):e22117. <https://doi.org/10.2196/22117>
12. Berthiusen A., Richardson O. C., Altringham J. D. Bat Conservation: Global evidence for the effects of interventions. Conservation Evidence Series Synopses. Cambridge: University of Cambridge; 2021; 266–269. <https://www.conservationevidence.com/synopsis/pdf/32>
13. Kelly A., Goodwin S., Grogan A., Mathews F. Post-release survival of hand-reared pipistrelle bats (*Pipistrellus* spp.). *Animal Welfare*. 2008; 17 (4): 375–382. <https://doi.org/10.1017/S0962728600027871>
14. Serangeli M. T., Cistrone L., Ancillotto L., Tomassini A., Russo D. The post-release fate of hand-reared orphaned bats: survival and habitat selection. *Animal Welfare*. 2012; 21 (1): 9–18. <https://doi.org/10.7120/096272812799129510>
15. Apoorva, Singh S. K. A tale of endurance: bats, viruses and immune dynamics. *Future Microbiology*. 2024; 19 (9): 841–856. <https://doi.org/10.2217/fmb-2023-0233>
16. Calisher C. H., Childs J. E., Field H. E., Holmes K. V., Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006; 19 (3): 531–545. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>
17. Harazim M., Perrot J., Varet H., Bourhy H., Lannoy J., Píkula J., et al. Transcriptomic responses of bat cells to European bat lyssavirus 1 infection under conditions simulating euthermia and hibernation. *BMC Immunology*. 2023; 24 (1):7. <https://doi.org/10.1186/s12865-023-00542-7>
18. Williams E. P., Spruill-Harrell B. M., Taylor M. K., Lee J., Nywening A. V., Yang Z., et al. Common themes in zoonotic spillover and disease emergence: lessons learned from bat- and rodent-borne RNA viruses. *Viruses*. 2021; 13 (8):1509. <https://doi.org/10.3390/v13081509>
19. Aguilar Rangel M., Dolan P. T., Taguwa S., Xiao Y., Andino R., Frydman J. High-resolution mapping reveals the mechanism and contribution of genome insertions and deletions to RNA virus evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2023; 120 (31):e2304667120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2304667120>
20. Becker D. J., Crowley D. E., Washburne A. D., Plowright R. K. Temporal and spatial limitations in global surveillance for bat filoviruses and henipaviruses. *Biology Letters*. 2019; 15 (12):20190423. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0423>
21. Sarabeev V., Shvydka S., Lisitsyna O., Oros M., Miterpáková M., Ždimalová M. The sample size matters: evaluating minimum and reasonable values in prevalence studies. *International Journal for Parasitology*. 2025; 55 (13): 683–693. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2025.05.003>
22. Martínez-Puchol S., Tarradas-Aleman M., Mejías-Molina C., Itarte M., Rusiñol M., Baliellas J., et al. Target enrichment metaviromics enables comprehensive surveillance of coronaviruses in environmental and animal samples. *Heliyon*. 2024; 10 (11):e31556. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31556>
23. Greninger A. L. A decade of RNA virus metagenomics is (not) enough. *Virus Research*. 2018; 244: 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.10.014>
24. Ohlopokova O. V., Popov Ig. V., Popov Il. V., Stolbunova K. A., Stepanyuk M. A., Moshkin A. D., et al. Detection and phylogenetic analysis of alphacoronaviruses in bat populations of Rostov and Novosibirsk Regions of Russia, 2021–2023. *Microbiology Research*. 2025; 16 (1):3. <https://doi.org/10.3390/microbiolres16010003>
25. Ohlopokova O. V., Stolbunova K. A., Popov Il. V., Popov Ig. V., Kabwe E., Davidyuk Y. N., et al. Detection of Brno loanvirus (*Loanvirus brunense*) in common noctule bats (*Nyctalus noctula*) in Southern Russia. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2025; 56 (1): 675–682. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01587-5>
26. Claro I. M., Ramundo M. S., Coletti T. M., da Silva C. A. M., Valença I. N., Candido D. S., et al. Rapid viral metagenomics using SMART-9N amplification and nanopore sequencing. *Wellcome Open Research*. 2023; 6:241. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.17170.2>
27. Oude Munnink B. B., Cotten M., Canuti M., Deijls M., Jebbink M. F., van Hemert F. J., et al. A novel astrovirus-like RNA virus detected in human stool. *Virus Evolution*. 2016; 2 (1):vew005. <https://doi.org/10.1093/ve/vew005>
28. Роев Г. В., Борисова Н. И., Чистякова Н. В., Выходцева А. В., Акимкин В. Г., Хафизов К. Ф. Бастровирусы (*Astroviridae*): генетическое разнообразие и потенциальное влияние на здоровье человека

и животных. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68 (6): 505–512. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-192>

Roev G. V., Borisova N. I., Chistyakova N. V., Vyhodtseva A. V., Akimkin V. G., Khafizov K. F. *Bastroviruses (Astroviridae): genetic diversity and potential impact on human and animal health. Problems of Virology*. 2023; 68 (6): 505–512. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-192>

29. Jones B. D., Kaufman E. J., Peel A. J. Viral co-infection in bats: a systematic review. *Viruses*. 2023; 15 (9):1860. <https://doi.org/10.3390/v15091860>

30. Takemae N., Kuba Y., Oba K., Kageyama T. Direct genome sequencing of respiratory viruses from low viral load clinical specimens using the target capture sequencing technology. *Microbiology Spectrum*. 2024; 12 (11):e0098624. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00986-24>

31. Cerro-Monje A., Buenestado-Serrano S., Palomino-Cabrera R., Molero-Salinas A., Herranz M., Alonso R., et al. A solution to achieve sequencing from SARS-CoV-2 specimens with low viral loads:

concatenation of reads from independent reactions. *Virology Journal*. 2024; 21 (1):121. <https://doi.org/10.1186/s12985-024-02347-5>

32. Marcolungo L., Beltrami C., Degli Esposti C., Lopatriello G., Piubelli C., Mori A., et al. ACoRE: accurate SARS-CoV-2 genome reconstruction for the characterization of intra-host and inter-host viral diversity in clinical samples and for the evaluation of re-infections. *Genomics*. 2021; 113 (4): 1628–1638. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.04.008>

Поступила в редакцию / Received 03.03.2026

Поступила после рецензирования / Revised 19.05.2026

Принята к публикации / Accepted 15.06.2026

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Столбунова Кристина Александровна**, младший научный сотрудник лаборатории геномики и эволюции вирусов НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3376-945x>, [kristina.sunwo@yandex.ru](mailto:kristina.sunwo@yandex.ru)

**Kristina A. Stolbunova**, Junior Researcher, Laboratory of Genomics and Evolution of Viruses, Research Institute of Virology, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3376-945x>, [kristina.sunwo@yandex.ru](mailto:kristina.sunwo@yandex.ru)

**Степанюк Марина Алексеевна**, младший научный сотрудник лаборатории геномики и эволюции вирусов НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, Россия; <https://orcid.org/0009-0002-2658-7746>, [stepanunya1996@gmail.com](mailto:stepanunya1996@gmail.com)

**Marina A. Stepanyuk**, Junior Researcher, Laboratory of Genomics and Evolution of Viruses, Research Institute of Virology, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia; <https://orcid.org/0009-0002-2658-7746>, [stepanunya1996@gmail.com](mailto:stepanunya1996@gmail.com)

**Мошкин Алексей Дмитриевич**, младший научный сотрудник лаборатории геномики и эволюции вирусов НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1182-8247>, [alex.moshkin727@gmail.com](mailto:alex.moshkin727@gmail.com)

**Alexey D. Moshkin**, Junior Researcher, Laboratory of Genomics and Evolution of Viruses, Research Institute of Virology, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1182-8247>, [alex.moshkin727@gmail.com](mailto:alex.moshkin727@gmail.com)

**Попов Игорь Витальевич**, PhD, научный сотрудник Института живых систем ФГБОУ ВО ДГТУ, г. Ростов-на-Дону, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-9223-8731>, [ipopov@donstu.ru](mailto:ipopov@donstu.ru)

**Igor V. Popov**, PhD, Researcher, Institute of Living Systems, Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-9223-8731>, [ipopov@donstu.ru](mailto:ipopov@donstu.ru)

**Охлопкова Олеся Викторовна**, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории геномики и эволюции вирусов НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-8214-7828>, [ohlopkova.lesia@yandex.ru](mailto:ohlopkova.lesia@yandex.ru)

**Olesia V. Ohlopkova**, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Genomics and Evolution of Viruses, Research Institute of Virology, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-8214-7828>, [ohlopkova.lesia@yandex.ru](mailto:ohlopkova.lesia@yandex.ru)

**Вклад авторов:** Столбунова К. А. – разработка концепции, формулировка и развитие ключевых целей и задач, проведение исследований, сбор, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка и редактирование текста, участие в научном дизайне, подготовка, создание рисунков и таблиц в части визуализации и отображения данных; Степанюк М. А. – проведение исследований, сбор данных, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка и редактирование текста, участие в научном дизайне; Мошкин А. Д. – проведение исследований, сбор, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка и редактирование текста, участие в научном дизайне; Попов И. В. – проведение исследований, сбор, анализ и интерпретация полученных данных, предоставление материалов, лабораторных образцов от животных; Охлопкова О. В. – разработка концепции, формулировка и развитие ключевых целей и задач, утверждение окончательного варианта, принятие ответственности за все аспекты работы, целостность всех частей статьи и окончательный вариант.

**Contribution of the authors:** Stolbunova K. A. – conceptualization; formulation and development of key goals and objectives; investigation; data curation, analysis, and interpretation; writing – original draft preparation and editing; participation in study design; preparation of figures and tables, including data visualization and presentation; Stepanyuk M. A. – investigation; data collection, analysis, and interpretation; writing – original draft preparation and editing; participation in study design; Moshkin A. D. – investigation; data collection, analysis, and interpretation; writing – original draft preparation and editing; participation in study; Popov I. V. – investigation; data collection, analysis, and interpretation; provision of materials and laboratory animal samples; Ohlopkova O. V. – conceptualization; formulation and development of key goals and objectives; final manuscript approval; accountability for all aspects of the work, including the integrity of all parts of the article and the final version.