

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ДОНСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ЛИПИЛКИНА ТАТЬЯНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ОСОБЕННОСТИ КОРОНАВИРУСОВ И КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ
НАСЕКОМОЯДНЫХ ЛЕТУЧИХ МЫШЕЙ ЕВРОПЕЙСКОГО ЮГА РОССИИ
И РИСК ПЕРЕНОСА КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Ермаков Алексей Михайлович

Ростов-на-Дону – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Коронавирусы летучих мышей и особенности их микробиоты	15
1.2. Коронавирусы мышей, крыс и птиц	24
1.3. Коронавирусы собак и кошек.....	26
1.4. Коронавирусы крупного рогатого скота	29
1.5. Межвидовой перенос коронавирусов и возможное влияние микробиоты летучих мышей	30
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1 Объекты, материалы и методы.....	36
2.1.1. Отбор биоматериала в Ростовской области, в Республике Адыгея, в Краснодарском и Ставропольском краях у летучих мышей для идентификации коронавирусов и кишечных бактерий	36
2.1.2. Выделение РНК для скрининга коронавирусов у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея.....	42
2.1.3. Проведение кПЦР для детекции коронавирусов у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея.....	43
2.1.4. Проведение масс-спектрометрии для идентификации бактерий, выделенных из фекалий летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея.....	45

2.1.5. Культивирование полученных бактерий для проведения экспериментов с использованием биосенсоров	46
2.1.6. Отбор биоматериала у летучих мышей вида ражая вечерница для анализа бактериоциногенных штаммов бактерий	48
2.1.7. Культивирование бактерий из фекалий летучих мышей вида рыжая вечерница для анализа бактериоциногенных штаммов бактерий	50
2.1.8. Биомолекулярная дифференциация и идентификация изолятов для анализа бактериоциногенных штаммов бактерий	56
2.1.9. Подтверждение белковой природы ингибирующего вещества и стабильности антимикробных пептидов к воздействию температуры, рН и выбранных химикатов у бактериоциногенных штаммов бактерий	57
2.1.10. Мониторинг роста бактериоциногенных штаммов <i>Enterococcus faecium</i> , продукция антимикробных пептидов и изменение рН.....	59
2.1.11. Оценка воздействия супернатанта из бактериоциногенных штаммов <i>Enterococcus faecium</i> на <i>Listeria monocytogenes</i>	60
2.1.12. Оценка свойств бактериоциногенных штаммов <i>Enterococcus faecium</i>	61
2.1.13. Оценка свойств бактериоциногенных штаммов <i>Enterococcus faecium</i> ST01TL и ST76TL	66
2.2 Результаты исследований и их обсуждение.....	68
2.2.1. Результаты биоинформационного анализа панкоронавирусных праймеров и их способность детектировать РНК различных видов коронавирусов.....	68
2.2.2. Концентрация РНК в биоматериале у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея.....	72
2.2.3. Чувствительность и специфичность панкоронавирусных праймеров	73

2.2.4. Скрининг коронавирусов у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея	74
2.2.5. Результаты секвенирования образцов с обнаруженной РНК коронавирусов	75
2.2.6. Оценка риска межвидового переноса коронавирусов	77
2.2.7. Выявленная с помощью RecA-биосенсора <i>Escherichia coli</i> промутагенная и ДНК-защитная активность молочнокислых и бациллярных бактерий, выделенных из фекалий летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея.....	79
2.2.8. Отбор изолятов <i>Enterococcus faecium</i> из фекалий летучих мышей вида рыжая вечерница.....	83
2.2.9. Биомолекулярная дифференциация и идентификация изолятов <i>Enterococcus faecium</i>	83
2.2.10. Антимикробные свойства штаммов <i>Enterococcus faecium</i> ST01TL и ST76TL при воздействии различных температур, рН и химикатов	86
2.2.11. Мониторинг роста штаммов <i>Enterococcus faecium</i> ST01TL и ST76TL и продукция бактериоцина	88
2.2.12. Оценка активности бактериоциногенных штаммов <i>Enterococcus faecium</i> ST01TL и ST76TL	90
2.2.13. Устойчивость к антибактериальным и противомикробным препаратам <i>Enterococcus faecium</i> ST01TL и ST76TL.....	91
2.2.14. Оценка других свойств штаммов <i>Enterococcus faecium</i> ST01TL и ST76TL ..	94
2.2.15. Результаты скрининга на наличие искомым генов в ДНК исследуемых штаммов <i>Enterococcus faecium</i> ST01TL и ST76TL	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	100

ВЫВОДЫ	108
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	110
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	111
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	112
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	114
ПРИЛОЖЕНИЯ	137

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Возбудители коронавирусной инфекции (CoV инфекции) – коронавирусы (CoV) – одни из самых распространенных видов вирусов [42]. Входят в подсемейство Orthocoronavirinae, семейство Coronaviridae, порядок Nidovirales. Представляют собой группу крупных оболочечных одноцепочечных РНК-вирусов. CoV формируют четыре рода: *Альфакоронавирусы*, *Бетакоронавирусы*, *Гаммакоронавирусы* и *Дельтакоронавирусы*. По имеющимся на сегодняшний день данным, все CoV являются причиной зоонозных инфекций, обладают высокой изменчивостью и мутационной активностью. Из-за мутаций и различных рекомбинаций геномов CoV, которые приводят к постоянному появлению новых штаммов с более высокой вирулентностью, они быстро распространяются и преодолевают межвидовой барьер, вызывая как инфекционные болезни диких животных, так и общие для животных и человека [129]. Летучие мыши представляют собой важный, но не до конца охарактеризованный резервуар CoV, имеющий антропозоонозный потенциал. При этом появление зоонозных патогенов летучих мышей непосредственно связано со здоровьем людей, животных и с окружающей средой [94].

CoV инфекции передаются преимущественно респираторным и фекально-оральным путями и широко распространены среди млекопитающих и птиц, вызывая в основном респираторные и кишечные заболевания, в каких-то случаях – неврологические заболевания и гепатиты [106].

Летучие мыши являются одним из самых разнообразных отрядов млекопитающих, который включает более 1400 видов и составляет примерно 20 % мировой популяции млекопитающих [43]. Относительно долгая продолжительность жизни, способность летать, уникальные иммунные реакции и их взаимосвязь с микробиомом отличают летучих мышей от других млекопитающих [63].

В последние годы летучие мыши привлекают особое внимание ученых, потому что являются потенциальным природным резервуаром для многочисленных заболеваний. Вирусы Нипах и Хендра, вирусы, связанные с Эболой, SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 являются одними из наиболее значимых вирусов, которые нанесли огромный ущерб общественному здоровью [144, 160, 177]. Проведенный анализ показал, что упомянутые вирусы происходят от летучих мышей и некоторые виды из их популяции могут быть промежуточным резервуаром инфекций человека и животных [75].

Глобализация и урбанизация являются общественными процессами, которые опосредованно способствуют распространению различных инфекционных агентов среди людей, в том числе через синантропных животных. Большинство возникающих патогенов, полученных от летучих мышей, имеют вирусное происхождение, поэтому вирусное разнообразие летучих мышей изучается тщательнее, чем их бактериальная микробиота; исследования же как раз доказывают, что летучие мыши являются устойчивыми носителями бактерий, обладают резистентностью к антибактериальным препаратам, а это всё вместе значимо для гуманной и ветеринарной медицины [95, 154].

Несмотря на наличие многочисленных исследований CoV у летучих мышей как их промежуточных хозяев, до сих пор существуют неизученные CoV, переносимые летучими мышами в зависимости от их вида и места обитания. Изучение данной научной проблемы актуально в связи с недостаточным исследованием риска зоонозной и антропозоонозной передачи CoV и, с учётом отсутствия сведений по видовому составу CoV в популяциях летучих мышей, обитающих на Европейском Юге России, теми особенностями бактериальной микробиоты кишечника у летучих мышей, которые определяют носительство CoV и их распространение. Поскольку данные о видовом составе CoV у летучих мышей, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и

Ставропольского краёв, в Республике Адыгея, и особенностях их кишечной микробиоты отсутствуют – это не позволяет корректно спрогнозировать эпизоотические и эпидемические вспышки, вызванные CoV. А также, освоить новые методы их анализа и предотвращения в зависимости от видового состава кишечной микробиоты, как фактора носительства различных CoV.

Таким образом, летучие мыши, обитающие на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея, являются носителями различных ранее не изученных CoV и имеют определенные штаммы бактерий в кишечной микробиоте, что предопределяет носительство CoV и риск их межвидовой передачи другим животным.

Степень разработанности темы

Интерес к изучению летучих мышей как переносчиков CoV инфекции связан с тем, что летучие мыши являются промежуточными хозяевами CoV, которые могут приводить к эпидемиям и эпизоотиям. На сегодня есть научные данные о разнообразии переносимыми летучими мышами CoV. Однако недостаточно данных о причинах резистентности летучих мышей к различным CoV.

Бактериальная микробиота кишечника у летучих мышей специфична и зависит от пищевых привычек, сезонности, физиологических сдвигов, связанных со спячкой. Но роль бактериальной микробиоты кишечника у летучих мышей как кофактора их резистентности к CoV до конца не изучена. В частности, анализ бактерий в образцах фекалий летучих мышей может дать представление о штаммах, способных продуцировать метаболиты, включая бактериоцины, которые могут способствовать местному иммунитету. Также, отсутствуют рекомендации для целевых противоэпизоотических мер в отношении CoV у летучих мышей определённых видов.

Таким образом, предположением для проверки является то, что летучие мыши, обитающие на территории Ростовской области, Краснодарского и

Ставропольского краёв, в Республике Адыгея, являются носителями различных ранее не изученных CoV, а также имеют определенные штаммы бактерий в кишечной микробиоте, что предопределяет носительство CoV и риск их межвидовой передачи другим животным. Отсутствие научных данных о видовом составе CoV у летучих мышей, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея, и особенностях их кишечной микробиоты не позволяет корректно спрогнозировать эпизоотические и эпидемические вспышки, вызванные CoV, а также освоить новые методы их анализа и предотвращения в зависимости от видового состава кишечной микробиоты как стимулирующего фактора носительства различных CoV.

Цель исследования – генетическая и эпизоотологическая характеристика CoV и некоторых штаммов бактерий кишечной микробиоты у насекомоядных летучих мышей, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея для определения риска переноса CoV инфекции.

Данная цель достигается выполнением **следующих задач:**

1. Произвести сбор биоматериала (орофарингеальные, ректальные мазки) у летучих мышей, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея.
2. Провести кПЦР (HRM-анализ) для детекции РНК CoV в отобранных образцах биоматериала и метагеномное исследование с применением секвенирования для описания обнаруженных CoV.
3. Установить филогенетическую взаимосвязь и родство обнаруженных CoV с другими патогенными CoV с известной последовательностью генома.
4. Изучить состав и характеристики некоторых штаммов бактерий кишечной микробиоты у летучих мышей, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея.

5. Определить риск переноса CoV инфекции от летучих мышей, обитающих на территориях Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея.

Научная новизна

Впервые на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея было проведено генетическое и эпизоотологическое исследование CoV, переносимых летучими мышами. В ходе исследования получены новые данные о носительстве CoV среди летучих мышей видов рыжая вечерница, средиземноморский нетопырь, поздний кожан, малый подковонос, большой подковонос, водяная ночница, европейская широкоушка, а также впервые установлены филогенетическая взаимосвязь и родство с другими ранее установленными патогенными CoV.

Впервые из образцов фекалий летучих мышей вида рыжая вечерница, обитающих на территории Ростовской области, были выделены бактериоциногенные штаммы *Enterococcus faecium* ST01TL и ST76TL, охарактеризованы их потенциал производства бактериоцинов, свойства в подавлении факторов вирулентности, вследствие чего был определён эпизоотологический риск передачи CoV инфекции от летучих мышей к другим животным и человеку.

Теоретическая и практическая значимость работы

Доказано, что распространённость CoV у насекомоядных летучих мышей Европейского Юга России не зависит от их вида, пола и ареала.

Микробиота кишечника летучих мышей видов рыжая вечерница, средиземноморский нетопырь, поздний кожан, малый подковонос, большой подковонос, водяная ночница, европейская широкоушка может способствовать формированию их устойчивости к патогенным возбудителям CoV. Идентифицированы и охарактеризованы штаммы *E. faecium* ST01TL и ST76TL из

образцов фекалий летучих мышей вида рыжая вечерница, обладающие свойствами формировать биоплёнки для устойчивости летучих мышей к CoV инфекции.

Впервые для эпизоотологической оценки риска передачи CoV от летучих мышей Европейского Юга России использованы методики биоинформационного анализа. Исходя из их геномной структуры в сравнении с другими CoV с установленной ранее последовательностью генома, определено филогенетическое родство CoV летучих мышей Европейского Юга России, даны практические предложения по мерам профилактики передачи CoV.

Результаты диссертации используются в учебной деятельности кафедры «Биология и общая патология» Донского государственного технического университета (акт о внедрении результатов от 01.12.2025) (Приложение А) и научно-практической деятельности лаборатории вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования ФБУН «РостовНИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора (справка о внедрении результатов от 01.12.2025) (Приложение Б).

Методология и методы исследования

Методология данного диссертационного исследования определялась в соответствии с изученными трудами отечественных и зарубежных ученых. В работе использованы аналитические, лабораторные, статистические и эпизоотологические методы исследования. Совокупность используемых методов позволила обеспечить достоверность приведенных в работе результатов и выводов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разница в превалентности CoV в зависимости от вида летучих мышей, пола, происхождения мазка (орофарингеальный, ректальный) и выбранного для исследования ареала не установлена.

2. Обнаруженные CoV у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос на территории Краснодарского края

и Республики Адыгея принадлежат к *Бетакоронавирусам*, что относит их к потенциальным возбудителям CoV инфекций животных и человека.

3. SARS-подобных CoV среди летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос, обитающих на территории Краснодарского края и Республики Адыгея, не обнаружено.

4. Полученные у летучих мышей вида рыжая вечерница конкурентно устойчивые штаммы *E. faecium* ST01TL и ST76TL обладают стабильностью к гидрофильным химическим веществам, что позволяет им формировать биоплёнки на поверхности клеток кишечника, которые могут быть барьером от CoV.

5. Метаболиты бактерий кишечной микробиоты летучих мышей *Lactococcus spp*, *Bacillus spp*, *Lysinibacillus spp*, *Lactobacillus spp*, *Virgibacillus spp*, *Weissella spp*, *Raoultella spp* и штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL способствуют неспецифической устойчивости к CoV, что предопределяет неманифестные формы CoV инфекции у летучих мышей.

6. Введение целевых противозооотических мер в отношении CoV у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан, малый подковонос — на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея нецелесообразно.

Работа выполнена на кафедре «Биология и общая патология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Донской государственной технической университет» и одобрена локальным независимым этическим комитетом (протокол № 2 от 26.02.2021) (Приложение В). Финансирование диссертационной работы осуществлялось за счет грантов: РФФИ № 20-04-60263/21 от 24.09.2021 «Коронавирусы синантропной фауны юга России и риск межвидового переноса коронавирусной инфекции», РНФ № 23-14-00316 от 15.05.2023 «Особенности иммунной системы и кишечной микробиоты синантропных рукокрылых как основа прогнозирования новых инфекций»; а также

стипендии Президента Российской Федерации для обучающихся за рубежом (приказ Минобрнауки России № 836 от 31.08.2023).

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность исследования подтверждена объемом выборки обследованных летучих мышей и результатами молекулярно-генетических и микробиологических исследований. Все исследования были выполнены на сертифицированном оборудовании, результаты обработаны современными статистическими методами.

Результаты диссертационной работы были представлены на: V Южно-Российском международном ветеринарном конгрессе (Ростов-на-Дону, 2019), III Международном симпозиуме «Единое здоровье» (Ростов-на-Дону, 2019), IV Международном симпозиуме «Единое здоровье» (Ростов-на-Дону, 2021), XIV Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса – ИНТЕРАГРОМАШ 2021» (Ростов-на-Дону, 2021), International Conference on Beneficial Microbes (ICOMB-2021) (Ростов-на-Дону, 2021), XV Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса – ИНТЕРАГРО 2022» (Ростов-на-Дону, 2022), Yakult International Symposia on Beneficial Microbes, Windham Sao Paulo Ibirapuera Convention Plaza (Сан Пауло, Бразилия, 2025), 79-я Итоговой научной конференции (Ростов-на-Дону, 2025), 18th International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health – IPC 2025 (Афины, Греция, 2025).

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 11 работ, из них 4 статьи в рецензируемых научных изданиях по перечню ВАК и приравненных к ним, входящих в международные базы Scopus и Web of Science.

Личный вклад соискателя состоит в анализе литературных источников, планировании исследований, формулировании задач, сборе биологического материала, проведении молекулярно-генетических исследований, оформлении

первичной документации, статистической обработки и обобщении полученных результатов, подготовке публикаций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из: введения, обзора литературы, собственных исследований, включающих объекты, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, а также заключения, выводов, практических предложений, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Представлена на 159 страницах машинописного текста и включает 13 рисунков, 16 таблиц, 6 приложений, 196 источников литературы.

Благодарности

Автор благодарит Попова Игоря Витальевича, PhD, научного руководителя, д.б.н., профессора Ермакова Алексея Михайловича, профессора факультета фармацевтических наук Университета Сан-Паулу (Бразилия) Светослава Димитрова Тодорова за помощь на всех этапах проведения исследований и написания диссертационной работы.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Коронавирусы летучих мышей и особенности их микробиоты

Летучие мыши — это единственные млекопитающие, способные летать, что обеспечивает им большое миграционное преимущество перед другими наземными млекопитающими. Это позволяет CoV распространяться горизонтально и вертикально среди летучих мышей или передаваться от них другим видам животных и людям [119]. Летучие мыши являются вторым по численности отрядом среди отрядов млекопитающих, имеют обширное распространение на всех континентах, кроме Антарктиды, долго живут для своих размеров: средняя продолжительность жизни летучей мыши достигает 10 – 12 лет; впрочем, в природе была зарегистрирована продолжительность жизни 41 – 42 года. Высокая плотность и близость друг к другу колоний летучих мышей поддерживают передачу CoV среди насестов и их распространение другим видам животных [156]. При этом летучие мыши могут переносить CoV без каких-либо клинических признаков инфекционного заболевания, вследствие чего такой инфекционный процесс никак не влияет на здоровье и выживаемость популяции [42].

Дело в том, что иммунные противовирусные механизмы защиты отличаются у летучих мышей и у других млекопитающих [179]. Способность летучих мышей к носительству CoV в меньшей степени обусловлена противовирусными механизмами и в большей степени связана с эволюционно сложившейся толерантностью их иммунной системы к различным вирусным агентам. Нельзя исключать и другие особенности, не связанные с иммунной системой летучих мышей, которые могут влиять на состояние резервуара, включая физиологические и поведенческие, например, быстрая скорость метаболизма, и, как следствие (в сравнении с другими млекопитающими), — высокая температура тела из-за способности летучих мышей летать, что привело к их генетическим изменениям [58], которые отразились на

работе иммунной системы и являются эволюционным компромиссом, отражаемым в комменсализме между CoV и летучими мышами [131].

Таким образом, летучие мыши являются основным природным резервуаром *Альфа*коронавирусов (идентифицировано 7 видов из 11 видов) и *Бета*коронавирусов (идентифицировано 4 вида из 9 видов) [67]. Также были обнаружены колонии летучих мышей - носителей штаммов RsSHC014 и Rs3367 (*Бета*коронавирусы), геномы которых совпадали с SARS-CoV на 85 % и 96 % соответственно, и был выделен штамм RaTG13, идентичный геному SARS-CoV-2 на 96,2 % [123]. Эта же исследовательская группа обнаружила штамм HKU5-CoV (*Бета*коронавирусы) у летучих мышей рода *Pipistrellus*, у которого есть фуриновый сайт для разделения S-белка во время связывания с ACE2-рецептором, что является возможной функциональной основой для инфицирования человека [13].

Плазмин и другие протеазы человека могут способствовать расщеплению нового фуринового сайта в S-белке SARS-CoV-2 во внеклеточном пространстве, что увеличивает контагиозность и вирулентность [87]. Ближайший родственник HKU5-CoV (идентифицирован у летучих мышей рода *Pipistrellus*) с похожим фуриновым сайтом — это SARS-CoV-2, который мог эволюционировать у таких летучих мышей, как *Aselliscus stoliczkanus* (трезубец столички), *Rhinolophus affinis* (промежуточный подковонос) и *Rhinolophus sinicus* (китайская рыжая подковообразная). Кроме того, эволюция возможна путем рекомбинации разных CoV в организме толерантных летучих мышей [130]. Такие изменения CoV позволяют им также влиять на иммунную систему летучих мышей и изменять тканевый тропизм и антигенный профиль [97, 118, 170], а филогенетическое дерево *Бета*коронавирусов показывает, что SARS-CoV-2 связан со штаммами CoV летучих мышей вида китайская рыжая подковообразная ZC45 и ZXC21, которые наиболее близки к штамму RaTG13. Однако S-белки ZXC21 и ZC45 [108] не только на 23–24

аминокислотных остатка короче S-белка RaTG13, но и короче в месте связывания с рецептором S-белка (RBM).

После вспышки SARS в 2002 году распространение CoV среди людей было связано с мутациями в рецептор-связывающем домене (RBD) S-белка, которые отличали эпидемический штамм CoV от CoV-предшественников, присутствующих у летучих мышей. Тем не менее зоонозные CoV, подобные SARS, циркулирующие у летучих мышей Юго-Восточной Азии, способны заражать клетки человека путем связывания с ACE2-рецептором без адаптации [14, 124, 167]. Аналогично в исследованиях с псевдотипированными CoV идентифицировали зоонозные штаммы: HKU4-CoV (идентифицирован у летучих мышей рода *Tylonycteris*) и изолятом CoV, связанным с ближневосточным респираторным синдромом – NL140422-CoV как способные связываться с человеческим поверхностным антигеном – человеческая CD26-дипептидилпептидазу 4 (DPP4 или CD26) без мутаций в S-белке [79, 153]. Было продемонстрировано, что S-белки PDF-2180-CoV (MERS-Uganda) и HKU5-CoV способны связываться с клетками человека и эффективно заражать их исключительно в присутствии трипсина [187]. Вместе эти результаты показывают, что некоторые циркулирующие зоонозные штаммы CoV обладают способностью связываться с клетками человека без адаптации и что связывание рецепторов может быть не единственным барьером или механизмом для возникновения инфекции у человека. Лабораторные исследования подтвердили, что, хотя штамм HKU4-CoV тесно связан с MERS-CoV, S-белок HKU4-CoV не способен поддерживать проникновение CoV в клетки человека до тех пор, пока не появятся необходимые мутации гена, кодирующего S-белок. Было обнаружено, что полевые изоляты MERS-CoV содержат мутации, благодаря которым возможна прямая передача инфекции как от летучей мыши человеку, так и через промежуточного хозяина [188].

Большое значение в процессе инфицирования имеет не только сам контакт S-белка с рецепторами человека ACE2 или DPP4, но и протеолитическое расщепление S-белка. Именно протеолитическая активация взаимодействия ACE2-рецептора с S-белком предполагает новый параметр для оценки потенциала возникновения CoV инфекции у людей.

РНК определённых CoV можно обнаружить в гуано летучих мышей [93]. Установлено, что антропогенная деятельность, глобализация и урбанизация повышают риск передачи *Альфакоронавирусов* и *Бетакоронавирусов* синантропными летучими мышами родов *Myotis* или *Scotophilus* человеку [80]. В исследовании М. Pauly и соавт. [22] было оценено генетическое разнообразие и особенности CoV у летучих мышей вида большой подковонос и *Myotis emarginatus* (трехцветная ночница). Сбор фекалий (n = 624) производился продольно в колонии смешанных видов в течение 2015 и 2016 годов. Также были собраны фекалии (n = 254) поперечно из шести колоний летучих мышей вида трехцветная ночница в 2016 году. Общая распространенность CoV составила 4,9 % (43/878), что представляет собой довольно низкую превалентность. Но важным является то, что новые штаммы *Альфакоронавируса 1* были идентифицированы в различных колониях летучих мышей вида трехцветная ночница, а связанные с SARS штаммы *Бетакоронавируса* подрода В были обнаружены в колониях летучих мышей вида большой подковонос. Установленное в исследовании сходство последовательностей генов S-белка *Альфакоронавируса 1* со штаммами *Бетакоронавируса* подрода В может вызывать озабоченность, так как такие штаммы CoV способны к межвидовой передаче [8].

Летучие мыши — единственные млекопитающие, которые в течение всей своей жизни постоянно увеличивают число контактов с другими животными, что играет ключевую роль в обширной межвидовой передаче CoV. Мониторинг CoV среди летучих мышей в Таиланде, Китае и Японии показал, что близкие к SARS-CoV-2 с низкой превалентностью, регулярно циркулирующие в популяции летучих

мышей по всей Юго-Восточной Азии, широко распространены, поэтому достаточно минимальных мутаций для вероятной межвидовой передачи человеку [148]. Причиной регулярной циркуляции как раз и является толерантная иммунная система летучих мышей, что приводит к долгосрочному носительству CoV и их сосуществованию в равновесии [40, 186], а длительное компенсаторное носительство также способствует рекомбинации, мутации и эволюции CoV [39] до нового эндемичного штамма, который может вызвать эмерджентные инфекции у животных и у человека.

В экспериментальном заражении SARS-CoV-2 летучих мышей *Rousettus aegyptiacus* (египетская летучая собака) путём инокуляции у испытуемых не было выявлено ни клинических признаков, ни летальных исходов. Кроме того, наблюдалось оральное и фекальное выделение CoV и привитые летучие мыши заражали других особей при контакте. РНК CoV была обнаружена с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) проб из эпителия дыхательных путей и пищеварительного тракта и связанных с ними лимфатических узлов. Аутопсия и гистопатологические исследования, проведенные на инфицированных летучих мышах, выявили минимальные патологические изменения: некроз эпителия, отек и инфильтрации лейкоцитов в слизистой оболочке верхних дыхательных путей [165], что свидетельствует о наличии неосложнённой респираторной инфекции.

Распространение SARS- и MERS-подобных CoV в значительной степени происходит аэрогенно — в аэрозолях [141, 65, 175]. Состязательное взаимодействие таких факторов, как размер капель, инерция, сила тяжести и испарение, влияет, насколько далеко частицы будут находиться в воздухе [138]. Крупные частицы (> 5 мкм) оседают под действием силы тяжести быстрее, чем испаряются, загрязняя поверхности, и чаще приводят к контактной передаче CoV, а не к аэрогенному пути. Мелкие частицы (≤ 5 мкм) испаряются в воздухе быстрее, чем оседают на

поверхности, и, благодаря воздействию воздушных потоков, могут переноситься на большие расстояния.

Таким образом, существует два основных механизма передачи CoV: аэрогенный и контактный [150]. Поскольку CoV способны оставаться в воздухе до момента их аспирации потенциальным хозяином, необходимо учитывать, что время потери контагиозных свойств CoV в различных условиях окружающей среды и на предметах до конца не изучено, что позволяет рассматривать другие механизмы распространения, помимо аэрогенного. Вместе с тем механизм передачи обусловлен не только эволюционно сложившимися способами инфицирования CoV клеток своих хозяев, о которых было сказано выше, но и такими внешними условиями среды, как климат, природная зона и антропогенные мероприятия (урбанизация и мелиорация). Именно данные условия влияют на физические свойства аэрозолей, содержащих CoV, способствуя или препятствуя в различных ситуациях распространению CoV во внешней среде.

Однако проведение исследований, которые могли бы показать данные о конкретной эпидемиологической цепи передачи CoV от летучих мышей к человеку, свидетельствует о том, что летучие мыши хотя и являются резервуаром различных CoV, но прямая передача человеку либо невозможна, либо возможна через промежуточного хозяина, который на данный момент, скорее всего, не установлен [19, 65, 98]. Это объясняется тем, что довольно трудно смоделировать механизм передачи инфекции от летучей мыши к человеку, если учитывать, что входными воротами инфекции у человека являются верхние дыхательные пути. Ведь в экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано, что S-белок CoV может предопределять у человека инфекцию только дыхательных путей, но не кишечную [15]. Тогда наиболее вероятным механизмом передачи инфекции от летучих мышей к человеку должен быть аэрогенный. В таком случае необходимым условием передачи CoV является существование летучих мышей как постоянной

синантропной фауны, регулярно контактируемой с человеком. На первый взгляд, урбанизация и мелиорация способствуют таким контактам, но есть и ряд препятствующих факторов.

Во-первых, необходимо учесть, что наличие таких условий городской среды, как шум, особенности ландшафта и уменьшение числа зелёных насаждений, негативно отражаются на распространении и плотности колоний летучих мышей разных родов [26, 38, 49, 190]. Это позволяет утверждать, что городская среда не является заведомо благоприятной для распространения CoV среди населения через летучих мышей, в отличие от сельской местности.

Во-вторых, CoV от летучих мышей не более контагиозные [183], чем CoV от любых других животных. В настоящее время нет убедительных доказательств, что CoV от летучих мышей закономерно ухудшают эпидемическую обстановку в популяции людей, но именно эти млекопитающие изучаются в данном аспекте активнее, чем другие. Хотя зоонозный риск является однородным среди таксономических порядков летучих мышей, во многих исследованиях не учитываются межродовые диспропорции в самом количестве особей, что может приводить к ошибочным выводам о реальном эпидемическом или эпизоотологическом потенциале [140].

Было обнаружено, что пациенты с COVID-19 из разных регионов Азии инфицировались штаммами SARS-CoV-2 с различной вирулентностью. На основании филогенетических взаимоотношений этих штаммов SARS-CoV-2, они были разделены по меньшей мере на шесть различных генотипов [91], и сравнительное исследование полных последовательностей генома 95 вариантов SARS-CoV-2, которые присутствовали в GenBank (Национальный центр биотехнологической информации, США) и в хранилище генома NGDC (Национальный центр обработки данных по геномике, Испания), продемонстрировало связь между временем сбора образцов, местоположением

образца и генетическим разнообразием. Обнаруженные 116 мутаций в штаммах SARS-CoV-2 позволяют предположить разную эволюцию штаммов в географически разных местах, и это косвенно подтверждает распространение CoV летучими мышами, влияние внешних условий среды и повышает вероятность заражения людей [73, 125]. Однако SARS-CoV-2 малоэффективно связывается с ACE2-рецептором летучих мышей в исследованиях *in silico* и *in vitro*, что не позволяет предполагать передачу SARS-CoV-2 от летучих мышей к человеку напрямую [48, 166].

В свою очередь следует отметить, что летучие мыши действительно переносят разные штаммы CoV, правда, некоторые из них лишь потенциально опасны для человека. Но летучие мыши пропорционально являются носителями такого же количества зоонозных CoV, как и различные животные. CoV от летучих мышей, по-видимому, имеют вероятность заражать людей не больше, чем CoV от других животных. Было установлено, что из 54 разновидностей вирусов, которые переносятся летучими мышами, менее половины имеют потенциал передачи людям [86]. А отсутствие продромального периода и клинических симптомов в инфекционном процессе, вызванном CoV у летучих мышей, фактически снижает вероятность распространения инфекции. Также нельзя исключать, что антропогенная деятельность, в том числе научно-исследовательская, и употребление мяса летучих мышей, скорее всего, могли повлиять на возникновение пандемии COVID-19 не меньше, чем непосредственная жизнедеятельность летучих мышей в их естественной среде обитания [155].

Многочисленные исследования, посвященные расшифровке механизмов толерантности к вирусам у летучих мышей, редко рассматривали влияние микробных сообществ, которые колонизируют желудочно-кишечный тракт (ЖКТ). У млекопитающих микробиота ЖКТ ассоциирована с особенностями течения инфекции, влияющей на физиологию, иммунитет, питание и поведение хозяина.

Микробиота ЖКТ летучих мышей больше похожа на микробиоту ЖКТ птиц, в которых доминируют протеобактерии, в отличие от микробиоты у других млекопитающих. В качестве адаптации у летучих мышей эволюционно выработан быстрый транзит пищи в ЖКТ, что может снижать стабильность их микробиоты в ЖКТ, ограничивать поглощение питательных веществ и влиять на воздействие патогенов, в том числе вирусных, и развитие механизмов иммунной толерантности [82].

Микробиом ЖКТ летучих мышей не стабилен. Разнообразие микробиомов ЖКТ летучих мышей обусловлено сезоном, временем гибернации [168, 178] и беременностью женских особей [101, 173]. Среда обитания, климат и рацион питания также могут влиять на изменчивость микробиома ЖКТ летучих мышей [114].

У летучих мышей упрощенный ЖКТ, который имеет относительно короткую длину и небольшую площадь поверхности кишечника (за исключением вклада ворсинок и микроворсинок), в отличие от других млекопитающих [127, 176]. Кроме того, у большинства летучих мышей нет аппендикса, органа, в котором содержатся бактерии, влияющие не только на процессы пищеварения, но и на особенности возрастного развития иммунной системы [181]. При исследовании таксономического состава микробиоты ЖКТ у летучих мышей вида большой подковонос было идентифицировано четыре основных бактериальных типа: *Proteobacteria* (74,6 %), за которым последовал *Firmicutes* (15,9 %), *Tenericutes* (4,8 %), некоторые *Bacteroidetes* (1,6 %) и другие (*Fusobacterium*, *Chlamydia* и *Actinobacteria* менее (<1 %) [168]. Данный вид летучих мышей распространен от Северной Африки через всю Евразию — от Франции и Испании через Малую и Переднюю Азию, Россию, Гималаи, Тибет до Китая, Корейского полуострова и Японии.

Изучение и оценка микробиоты ЖКТ летучих мышей необходимы, так как её состав влияет на иммунные реакции в организме хозяина. Таким образом, при различных условиях кишечные бактерии могут либо исключить потенциальных патогенов из хозяина, либо облегчить нахождение патогена в организме хозяина [139]. Следовательно, изменение и эволюция CoV у летучих мышей могут быть связаны с особенностями их микробиоты ЖКТ.

1.2. Коронавирусы мышей, крыс и птиц

Вероятность передачи SARS-подобных CoV от мышей и крыс к человеку является низкой, поскольку у этих млекопитающих ACE2-рецепторы имеют чрезвычайно низкое сродство к S-белкам SARS-CoV и SARS-CoV-2 [152].

В естественной среде CoV у мышей представлены вирусом мышинного гепатита (mouse hepatitis virus – MHV) [128], а у крыс – вирусом инфекционного бронхита (infectious bronchitis virus – IBV), который является общим и для кур. Также показана общая кластеризация CoV птиц с MHV A59 в исследовании R. Durães-Carvalho и соавт. [64].

В исследовании L. Zhang и соавт. [146] было исследовано 177 образцов ректальных мазков синантропных грызунов трех различных видов (*Apodemus chevrieri*, *Apodemus ilex* и *Eothenomys fidelis*) в результате была обнаружена РНК Альфакоронавируса и Бетакоронавируса в 23 образцах (13 %). Мыши и крысы не являются потенциальными прямыми переносчиками CoV к человеку, но трансгенные мышинные модели часто используются в экспериментах, связанных с исследованиями CoV [9, 147, 164], из-за чего сохраняется вероятность возникновения техногенной вспышки. Более того, трансгенные мыши, экспрессирующие DPP4, уже использовались при экспериментальном лабораторном заражении MERS-CoV, однако в естественных условиях мыши не восприимчивы к этому виду CoV [10, 104, 194].

В исследовании Q. Zhuang и соавт. [171] проводился генетический анализ CoV голубей и воробьёв, в том числе у тех, которые используются в фермерской торговле, и пришли к выводу о массовой циркуляции среди исследуемых колоний птиц разных эволюционирующих штаммов CoV, не исключая возможности переноса CoV от голубей к фермерским птицам. В результате были получены данные об увеличении популяции *Альфа*коронавирусов у разных видов птиц, хотя род *Альфа*коронавируса не является для них естественным. В общей сложности 500 образцов, включая трахеальные и клоакальные мазки, взятые у 312 диких птиц, принадлежащих к 42 видам, были проанализированы с помощью ОТ-ПЦР. Согласно полученным данным, 65 проб (13 %) от 22 видов птиц были положительными для *Альфа*коронавируса. Молекулярно-эволюционный анализ показал, что нуклеотидные последовательности из образцов не кластеризовались ни с одной из последовательностей генов *Альфа*коронавируса, хранящихся в базе данных GenBank. Птицы могут быть потенциальными новыми хозяевами, ответственными за распространение *Альфа*коронавирусов. Птицы наряду с летучими мышами тоже летают на большие расстояния и контактируют с большим видовым разнообразием млекопитающих из разных регионов, что способствует распространению CoV. При этом для CoV голубей наиболее характерный фекально-оральный механизм передачи [132].

Исследование *Дельта*коронавирусов, которое включило в себя 192 птицы на Ближнем Востоке выявило рекомбинации, которые обладают потенциалом межвидовой передачи млекопитающим, однако у изучаемых семейств птиц: дрофиных, голубиных, соколиных, бекасовых, утиных, фламинговых, попугаевых и фазановых – *Дельта*коронавирусы были обнаружены лишь у 8 (4,16 %) птиц с наибольшей относительной частотой штамма UAE-NKU30 (перепелиный CoV) у перепелов (50 %) [78].

Таким образом, синантропные птицы имеют потенциал, чтобы стать резервуаром патогенных CoV для животных и человека, и как переносчики обладают всеми необходимыми качествами для поддержания персистенции и существования цепей передачи инфекции среди синантропной фауны.

1.3. Коронавирусы собак и кошек

Коронавирус собак (canine coronavirus – CCoV) является представителем рода *Альфакоронавирусы* [126]. Также у собак идентифицирован респираторный коронавирус собак (canine respiratory coronavirus – CRCoV), который является представителем рода *Бетакоронавирусы* и обладает схожестью с вирусом трансмиссивного гастроэнтерита свиней (transmissible gastroenteritis virus – TGEV) и коронавирусом кошек (feline coronavirus – FCoV), тогда как CRCoV более тесно связан с CoV крупного рогатого скота. Мембранный белок CCoV (M) является наиболее распространенным структурным белком и вызывает выработку антител, в то время как S-белок является основным индуктором вируснейтрализующих антител. На основании анализа генов, кодирующих M- и S-белок, штаммы CCoV были классифицированы на два генотипа: CCoV-I и CCoV-II [161]. Также штаммы CCoV-II были дополнительно классифицированы на два подтипа: CCoV-IIa (классические штаммы) и CCoV-IIb (штаммы, возникшие в результате рекомбинации между CCoV-II и TGEV [69].

Известно, что ACE2-рецепторы человека и собаки различны по 5 аминокислотным остаткам, что является преградой для эффективного прикрепления S-белка SARS-CoV-2 к ACE2-рецептору собаки. Однако в исследовании T.H.C. Sit и соавт. [121] были приведены случаи наличия бессимптомного клинического течения при заражении SARS-CoV-2 (при исследовании 15 собак из семей с подтвержденным COVID-19 положительный результат вирусологического теста был у 2 собак), что подтверждалось ОТ-ПЦР, секвенированием и иммуноферментным

анализом (ИФА). При этом была полностью не подтверждена передача SARS-CoV-2 от одной собаки к другой, а наличие положительных результатов лабораторных исследований (ОТ-ПЦР и ИФА) при отсутствии реальных клинических симптомов у собак может являться ложноположительными результатами или свидетельствовать о бессимптомной инфекции или носительстве.

Инфекционный перитонит кошек (FIP) — заболевание домашних и диких кошек по всему миру. Возбудители FIP относятся к роду *Альфакоронавирусы*. Этиологический агент FCoV встречается в двух серотипах, которые можно различить по их биологическому поведению, но не по морфологии патологических изменений, которые они вызывают [3]. Оба серотипа способны вызывать FIP. Серотип I более распространен в природе и отвечает за 80 % – 90 % естественных клинических случаев [115]. Серотип II встречается сравнительно редко, он возник в результате рекомбинации между FCoV серотипа I и CCoV серотипа II после межвидовой передачи кошкам. Межвидовая передача кишечного CoV собак кошкам, приводящая к генетической рекомбинации серотипа I FECV и серотипа II CCoV, способствовала появлению нового серотипа II FECV [90].

Гипотезы восприимчивости кошек к SARS-CoV-2 для контроля COVID-19 на сегодня не подтверждены. J. Shi и соавт. [172] делали попытку инокуляции кошкам SARS-CoV-2. Результаты исследования показали, что SARS-CoV-2 может реплицироваться у кошек, к тому же подтвердилась экспериментальная аэрогенная передача SARS-CoV-2 от инокулированных кошек здоровым, хотя нет подтверждения такой передачи в естественных условиях. Напротив, есть предположения передачи больными COVID-19 людьми SARS-CoV-2 кошкам и собакам [16, 116, 142].

Исследование в Северной Италии включало в себя 919 домашних кошек и собак, отобранных во время пандемии COVID-19. Было выяснено, что у 3,3 % собак и 5,8 % кошек были титры нейтрализующих антител. В этом исследовании 69

образцов для ИФА были взяты от 47 собак и 22 кошек соответственно, и 12,8 % (6/47) собак, и 4,5% (1/22) кошек были серопозитивными на нейтрализующие SARS-CoV-2 антитела; кроме того, распространенность серотипа, обнаруженная у собак из семейных очагов COVID-19, была значительно выше, чем у собак из семей с отрицательным COVID-19 (1,5 %; 2/133) [170].

Немецкими учёными в Германии было исследовано 920 образцов сыворотки, которые были собраны у домашних кошек в период с апреля по сентябрь 2020 года. Согласно полученным данным, только 0,69 % (6/920) образцов содержали антитела против SARS-CoV-2; две из положительных сывороток содержали нейтрализующие антитела [145], что позволяет предположить: передача от человека к кошке была относительно нечастой. Кроме того, исследование, проведенное в ветеринарном сообществе с участием 20 студентов, двое из которых болели COVID-19, показало, что ни одна из девяти кошек и ни одна из двенадцати собак, живущих в сообществе, не имели положительный результат при ОТ-ПЦР, и ни у одной из кошек или собак не выработались антитела [17], что подтверждает вариабельность передачи SARS-CoV-2 от человека к кошкам и собакам и сведение к минимуму при соблюдении правил гигиены [25], потому что РНК SARS-CoV-2 всё-таки обнаруживается на кошачьей шерсти и в подстилке [72].

Необходимо отметить, что существует вакцинация от FCoV, но Всемирная ветеринарная ассоциация мелких животных (WSAVA) не рекомендует её применение у кошек ввиду недостаточной доказательной базы о пользе вакцинации [20, 195]. Хотя вирусологические и эпидемиологические аспекты инфекции FCoV и SARS-CoV-2 имеют некоторые общие черты, патогенез и клиническая характеристика FIP и COVID-19 отличаются [102], что также противоречит использованию вакцины для предотвращения инфицирования SARS-CoV-2 у кошек.

Важным фактором передачи CoV от бездомных собак и кошек являются вполне вероятные их контакты с домашними питомцами. Именно это может

служить дополнительному благоприятному распространению CoV и создавать различные варианты межвидового переноса с появлением новых штаммов, что представляет постоянную эпизоотическую и эпидемическую угрозу неопределенного на данный момент потенциала, но с формированием стационарных очагов инфекции.

1.4. Коронавирусы крупного рогатого скота

Коронавирус крупного рогатого скота (bovine coronavirus – BCoV) представляет собой одноцепочечный вирус с положительной РНК с липидной оболочкой, принадлежащий к порядку Nidovirales, семейству Coronaviridae, подсемейству Orthocoronavirinae, роду *Betacoronavirus* и подроду Embecovirus. Род *Betacoronavirus* также важен для человека, поскольку он включает CoV, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом, CoV, связанный с ближневосточным респираторным синдромом, и CoV тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2). BCoV широко распространены во всем мире из-за быстрой передачи вируса фекально-оральным и респираторным путями, а также из-за существования животных-носителей в инфицированных стадах. BCoV несет значительные экономические потери из-за высокой смертности телят, в результате чего уменьшаются показатели роста крупного рогатого скота на откормочных площадках и сокращается молочная продуктивность взрослого крупнорогатого скота [162].

Бетакоронавирусы BCoV и SARS-CoV-2, являющиеся представителями одного рода, имеют некоторые общие патогенные характеристики: межвидовая передача и другие факторы, влияющие на тяжесть заболевания крупного рогатого скота, параллельны тяжести SARS-CoV-2 [99]. Таким образом, эти вирусы могут иметь сопоставимые характеристики патогенеза и передачи.

Также были проведены исследования, благодаря которым выяснили, что крупный рогатый скот восприимчив к инфекции SARS-CoV-2. Следовательно,

двойные инфекции у отдельных животных могут привести к рекомбинации между SARS-CoV-2 и BCoV [196]. Дальнейшее изучение BCoV имеет большое значение для продуктивного понимания механизмов заболевания, связанных с инфекцией SARS-CoV-2 и потенциальных факторов-хозяев, вызывающих тяжесть SARS-CoV-2. В итоге двойные инфекции отдельных животных могут привести к рекомбинации между SARS-CoV-2 и BCoV и через промежуточного хозяина серьезно повлиять на биобезопасность человека [89].

1.5. Межвидовой перенос коронавирусов и возможное влияние микробиоты летучих мышей

CoV — семейство вирусов, которое заражает позвоночных, включая летучих мышей и человека. CoV вызывают заболевания, проявляющиеся от локализованных респираторных или кишечных инфекций до системных заболеваний, вызывают заболеваемость и смертность среди домашних, сельскохозяйственных и синантропных животных, включая летучих мышей, собак, кошек, хорьков, лошадей, альпак, свиней, крупный рогатый скот, домашнюю птицу и других (Рисунок 1).

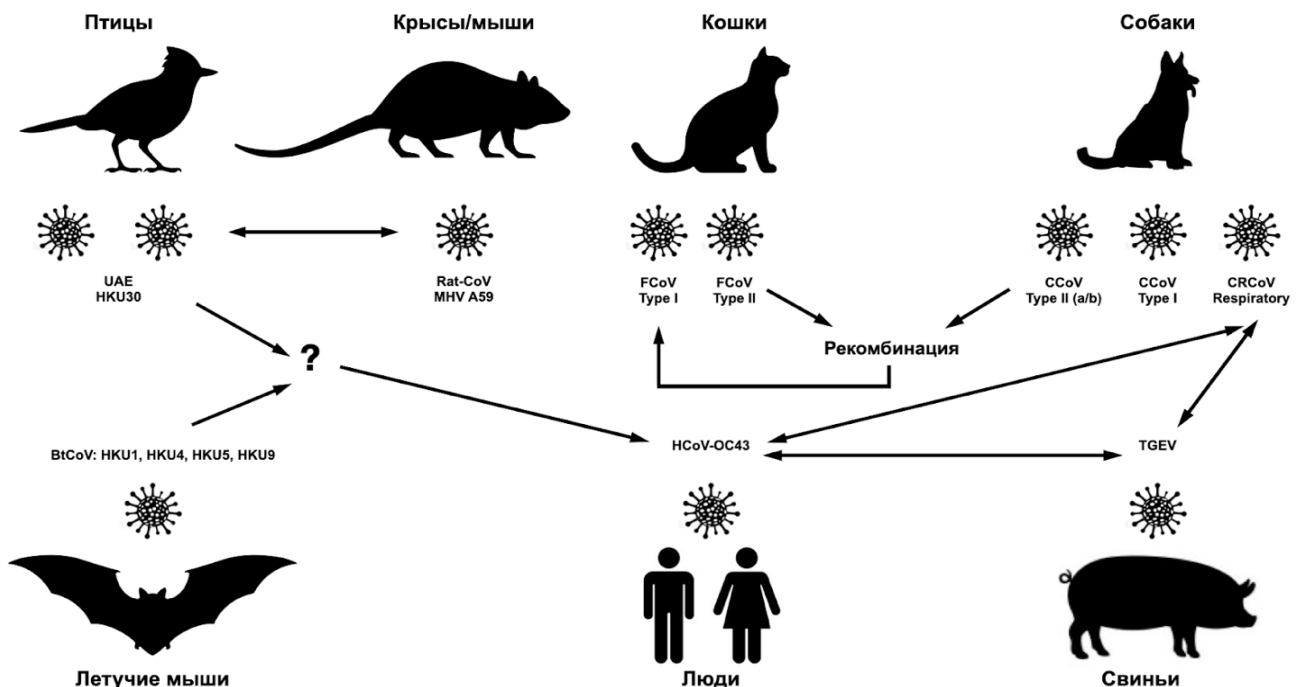


Рисунок 1 – Схема предположительной передачи CoV от животных человеку

Межвидовая передача ССоV кошкам, содействующая генетической рекомбинации между серотипом I FECV и серотипом II ССоV, способствовала появлению серотипа II FECV [71]. Подобным образом рекомбинация между ССоV серотипа II и другими CoV способствовала появлению вариантов ССоV с N-концевыми доменами шиповидного белка, которые в значительной степени гомологичные TGEV [134]. Точечные мутации и генетическая рекомбинация между различными штаммами и видами CoV, а также включение генов из других вирусных таксонов посредством негомологичной рекомбинации демонстрируют генетическую пластичность CoV, что способствует межвидовой передаче CoV [139].

Таким образом, межвидовая передача ССоV благодаря рекомбинациям привела к возникновению нового серотипа FECV. Приведённые выше исследования показали, что рекомбинация между разными типами ССоV и CoV другого происхождения, такими как TGEV, вызывает появление S-белка, схожего с S-белком TGEV. Такая модификация способна повлиять на трансмиссивность и патогенность. При этом негомологичная рекомбинация генного материала от иных микроорганизмов демонстрирует гибкость CoV, позволяющую приобретать новые возможности для адаптации и распространения.

Представленные выше механизмы перераспределения генетического материала подчеркивают необходимость постоянного мониторинга циркулирующих CoV и выявления потенциальных рисков появления новых штаммов, способных вызывать заболевания у людей и животных. Эти процессы помогают объяснить происхождение ряда пандемичных CoV, таких как MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2, возникших в результате аналогичных процессов рекомбинации и мутации.

За последние 20 лет три пандемии CoV у человека (SARS, MERS и COVID-19), которые могли произойти от CoV летучих мышей [41], демонстрируют

антропозоонозный потенциал CoV. Летучие мыши представляют собой важный, но в значительной степени не охарактеризованный источник известных патогенов человека. Появление зоонозных патогенов летучих мышей непосредственно связано со здоровьем людей, животных и с окружающей средой [94].

Однако современные теории вирусных эпидемий и эпизоотий мало объясняют персистентность, сезонность и одномоментную стремительность появления новых штаммов вирусов на обширных территориях. Модели передачи CoV могут быть представлены 3 элементами (Таблица 1) [2, 4, 7]:

1. Окружающая среда, содержащая абиотические и биотические факторы;
2. Антропогенные объекты и агропромышленный комплекс;
3. Переносчики (зараженные) – вступающие в контакт со всеми элементами представленной системы и имеющие собственную микробиоту, которая меняется при воздействии перечисленных выше элементов и участвует в формировании резистентности к возбудителям.

Таблица 1 – Система передачи и устойчивости к CoV у летучих мышей

Передача CoV		
<p>Окружающая среда, содержащая абиотические и биотические факторы:</p> <p>I. Климат. II. Биосфера.</p>	<p>Антропогенные объекты и агропромышленный комплекс:</p> <p>I. Деревни, города, предприятия. II. Фермы, поля сельскохозяйственных культур, транспортные пути. III. Объекты инфраструктуры: электростанции, склады, заводы.</p>	<p>Переносчики (зараженные) – вступающие в контакт со всеми элементами системы и имеющие собственную микробиоту:</p> <p>I. Люди, работающие в сельском хозяйстве, проживающие в населённых пунктах. II. Домашние и</p>

		сельскохозяйственные животные. III. Дикие и синантропные животные.
Устойчивость к CoV		
Физиология: I. Толерантный иммунитет. II. Метаболизм – антиоксидантные и противовоспалительные реакции. III. Высокая репарация ДНК.	Микробиота: I. Метаболиты бактерий. II. Баланс и разнообразие микробиома.	Поведение: I. Особенности колоний. II. Гибернация (спячка). III. Полёт.

Стало быть, изменение вирулентности CoV зависит не только от их собственных свойств, но и от параметров окружающей среды. Есть предположение, что ранние штаммы высоко контагиозных CoV возникают в результате естественного отбора в организме животного-хозяина ещё до межвидовой передачи. Это имеет принципиальное значение для прогнозирования возможных будущих эпизоотий и эпидемий. Показано, что геном хозяина также играет роль в восприимчивости к CoV и в тяжести последующей инфекции [117]. Изучение генома CoV позволяет получить представление об их происхождении, эволюционных закономерностях и потенциальной уязвимости [148]. Объём доступных геномных данных даёт возможность проследить генетическое разнообразие популяций CoV и пути передачи [1].

РНК-вирусы накапливают изменения в своих геномах со скоростью от 0,0005 до 0,005 изменений на сайт в год. В этом случае для определения возникновения вспышки можно использовать анализ накопленных мутаций. Следовательно, эволюцию CoV возможно определить в масштабе 1 месяца. Хотя этого временного интервала обычно недостаточно для выявления отдельных случаев передачи, но

определение последовательности поможет дифференцировать различные виды инфекции [85]. Молекулярно-эпизоотологические методы могут реконструировать временное и пространственное распространение вспышки. Связывая образцы, происходящие из разных географических мест, филогеографические методы могут реконструировать географическое распространение.

Филогеографические методы лучше всего подходят для вирусных патогенов с высокой скоростью эволюции и небольшими геномами. Скорость эволюции бактерий значительно ниже, чем у РНК-вирусов, так как геномы бактерий больше [6, 107].

Наличие филогенетического анализа обычно достаточно, чтобы исключить передачу инфекции при наличии различных последовательностей CoV. Несвязанные, на первый взгляд, случаи могут быть сгруппированы в отдельные вспышки [5], дающие возможность определить пути передачи и вероятные источники в окружающей среде или среди животных [182] Число вирусов, которые фенотипируются, резко возросло до такой степени, что всесторонний и своевременный анализ и аннотирование результатов больше невозможны. С быстрым увеличением объемов данных о последовательности CoV все большее значение приобретают решения о том, как эти данные использовать в реальной практике. Эпизоотологические расследования новых вспышек, как правило, направлены на выявление источников и цепочек передачи, отслеживание распространения. При анализе CoV необходимы более конкретные методы, поскольку данные о случаях заболевания и клинических параметрах различаются в зависимости от патогена. Такие данные, как правило, имеют общую основу (например, время и местоположение взятия биоматериала), но и отличительные признаки (тяжесть инфекционного процесса). Эти данные, по меньшей мере, так же важны, как филодинамические выводы на основе данных о последовательности генома CoV.

В итоге, необходимо дальнейшее изучение физиологии летучих мышей и CoV, которые они переносят, для получения знаний о возникновении возможных последующих эпизоотий и для быстрого ответа на них. Так как распространение CoV у летучих мышей происходит преимущественно фекально-оральным путём, то немаловажным является изучение их микробиоты, так как облигатная микробиота ЖКТ может способствовать местному иммунитету слизистых оболочек (барьерно-защитная функция) с точки зрения продукции неспецифических факторов защиты. Или, наоборот, микробиота ЖКТ летучих мышей может продуцировать промутагенные вещества, метаболиты которых способствуют мутациям у переносимых ими CoV, что имеет эпизоотическое значение ввиду появления ранее неизученных CoV с неустановленными свойствами как возбудителя инфекции.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты, материалы и методы

Объект исследования – CoV летучих мышей следующих видов: рыжая вечерница (*Nyctalus noctula*), средиземноморский нетопырь (*Pipistrellus kuhlii*), поздний кожан (*Eptesicus serotinus*), малый подковонос (*Rhinolophus hipposideros*), большой подковонос (*Rhinolophus ferrumequinum*), водяная ночница (*Myotis daubentonii*), европейская широкоушка (*Barbastella barbastellus*) – обитающие на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея.

Предмет исследования – РНК CoV, выделенная из орофарингеальных и ректальных мазков; бактерии из ректальных мазков и фекалий летучих мышей видов рыжая вечерница, средиземноморский нетопырь, поздний кожан, малый подковонос, большой подковонос, водяная ночница, европейская широкоушка.

2.1.1. Отбор биоматериала в Ростовской области, в Республике Адыгея, в Краснодарском и Ставропольском краях у летучих мышей для идентификации коронавирусов и кишечных бактерий

Всего в Ростовской области, в Республике Адыгея, в Краснодарском и Ставропольском краях с марта по июнь 2021 г. было собрано 300 проб (орофарингеальных (n=150) и ректальных (n=150) мазков) от 150 летучих мышей.

Включенные в исследование виды летучих мышей представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Данные о видах летучих мышей, включенных в исследование, и число отобранных проб

Вид летучих мышей	Число проб, абс.	%
Малый подковонос (<i>Rhinolophus hipposideros</i>)	53	35
Рыжая вечерница (<i>Nyctalus noctula</i>)	43	28
Поздний кожан (<i>Eptesicus serotinus</i>)	24	16
Средиземноморский нетопырь (<i>Pipistrellus kuhlii</i>)	22	15
Европейская широкоушка (<i>Barbastella barbastellus</i>)	6	4
Большой подковонос (<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>)	1	1
Водяная ночница (<i>Myotis daubentonii</i>)	1	1
Всего	150	100

Данные о поле летучих мышей, включенных в исследование, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Пол летучих мышей в исследовании

Пол	Вид летучих мышей	Число особей	%
Самец	Всего	53	35,3
	Рыжая вечерница (<i>Nyctalus noctula</i>)	18	12
	Средиземноморский нетопырь (<i>Pipistrellus kuhlii</i>)	10	6,6
	Поздний кожан (<i>Eptesicus serotinus</i>)	7	4,7

Продолжение таблицы 3

Пол	Вид летучих мышей	Число особей	%
	Малый подковонос (<i>Rhinolophus hipposideros</i>)	14	9,3
	Большой подковонос (<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>)	2	1,3
	Водяная ночница (<i>Myotis daubentonii</i>)	1	0,7
	Европейская широкоушка (<i>Barbastella barbastellus</i>)	1	0,7
Самка	Всего	97	64,7
	Рыжая вечерница (<i>Nyctalus noctula</i>)	25	16,7
	Средиземноморский нетопырь (<i>Pipistrellus kuhlii</i>)	12	8
	Поздний кожан (<i>Eptesicus serotinus</i>)	17	11,3
	Малый подковонос (<i>Rhinolophus hipposideros</i>)	39	26
	Большой подковонос (<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>)	4	2,7
	Водяная ночница (<i>Myotis daubentonii</i>)	0	0
	Европейская широкоушка (<i>Barbastella barbastellus</i>)	0	0

Данные о регионе нахождения летучих мышей представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Данные о регионе нахождения летучих мышей

Регион	Вид летучих мышей	Число особей	%
Ростовская область	Всего	24	15,5
	Рыжая вечерница (<i>Nyctalus noctula</i>)	12	8
	Средиземноморский нетопырь (<i>Pipistrellus kuhlii</i>)	7	4,2
	Поздний кожан (<i>Eptesicus serotinus</i>)	5	3,3
	Малый подковонос (<i>Rhinolophus hipposideros</i>)	0	0
	Большой подковонос (<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>)	0	0
	Водяная ночница (<i>Myotis daubentonii</i>)	0	0
	Европейская широкоушка (<i>Barbastella barbastellus</i>)	0	0

Продолжение таблицы 4





Регион	Вид летучих мышей	Число особей	%
Республика Адыгея	Всего	72	48,2
	Рыжая вечерница (<i>Nyctalus noctula</i>)	7	4,7
	Средиземноморский нетопырь (<i>Pipistrellus kuhlii</i>)	4	2,7
	Поздний кожан (<i>Eptesicus serotinus</i>)	0	0
	Малый подковонос (<i>Rhinolophus hipposideros</i>)	53	35,4
	Большой подковонос (<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>)	6	4
	Водяная ночница (<i>Myotis daubentonii</i>)	1	0,7
	Европейская широкоушка (<i>Barbastella barbastellus</i>)	1	0,7
Краснодарский край	Всего	44	29,3
	Рыжая вечерница (<i>Nyctalus noctula</i>)	21	14
	Средиземноморский нетопырь (<i>Pipistrellus kuhlii</i>)	8	5,3
	Поздний кожан (<i>Eptesicus serotinus</i>)	15	10
	Малый подковонос (<i>Rhinolophus hipposideros</i>)	0	0
	Большой подковонос (<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>)	0	0
	Водяная ночница (<i>Myotis daubentonii</i>)	0	0
	Европейская широкоушка (<i>Barbastella barbastellus</i>)	0	0
Ставропольский край	Всего	10	7
	Средиземноморский нетопырь (<i>Pipistrellus kuhlii</i>)	3	2
	Поздний кожан (<i>Eptesicus serotinus</i>)	4	3
	Малый подковонос (<i>Rhinolophus hipposideros</i>)	0	0
	Большой подковонос (<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>)	0	0
	Водяная ночница (<i>Myotis daubentonii</i>)	0	0
	Европейская широкоушка (<i>Barbastella barbastellus</i>)	0	0

Отбор орофарингеальных и ректальных мазков был произведён у животных с соблюдением принципов биоэтики использования диких животных в научных исследованиях и совершался стерильными зондами-тампонами с диаметром

собирающей части 2,5 мм (ООО «Биомедицинские инновации», Россия) из ротоглотки и прямой кишки летучих мышей. Затем зонд помещался в стерильную микропробирку объемом 2 мл (Eppendorf, Германия), наполненный транспортной средой для вирусодержащих образцов TVM (ООО «Биомедицинские инновации», Россия).

Во время процедуры взятия мазков у животных отсутствовали признаки болевого синдрома. После процедуры животных выпустили в пределах ареала, в котором были выловлены для исключения негативного влияния исследовательских действий на окружающую среду. Вышеописанный алгоритм отбора мазков обоснован включением в исследование следующих видов летучих мышей: европейская широкоушка, большой подковонос и малый подковонос, которые включены в Красные книги Российской Федерации, Краснодарского края и Республики Адыгея.

На основе данных геопозиции обнаружения летучих мышей, включенных в исследование, создана база данных (Таблица – Ареал летучих мышей в исследовании, в приложении Г) и карта (Рисунок 2, Таблица 5).

-  Рыжая вечерница
-  Поздний кожан
-  Нетопырь Куля
-  Малый подковонос
-  Обнаружена COV RNA

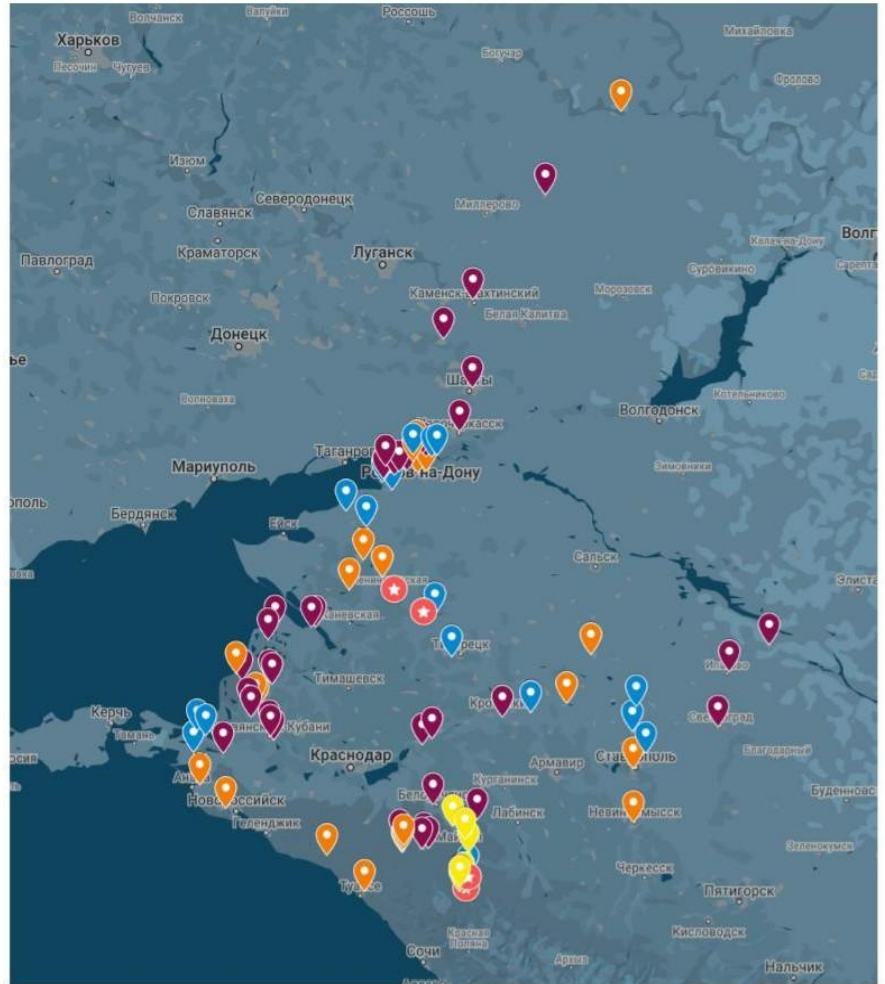


Рисунок 2 – Геоинформационная система по определению РНК CoV
на примере изученных летучих мышей

Все отобранные образцы орофарингеальных и ректальных мазков были отправлены на процедуру выделения РНК без промежуточного хранения образцов в холодильном оборудовании.

Таблица 5 – Ареалы видов изученных летучих мышей, обнаруженных на территории Европейского Юга России (на территории Республики Адыгея, Краснодарского края, Ставропольского края и Ростовской области)

Вид	Ареал
Рыжая вечерница (<i>Nyctalus noctula</i>)	Европа, Юго-Западная Сибирь, Ближний Восток, редко – Средняя и Юго-Восточная Азия
Средиземноморский нетопырь (<i>Pipistrellus kuhlii</i>)	Северная Африка, Средняя Азия, Ближний Восток, Кавказ, Юг Центральной Европы, европейская часть России по Югу и отдельные находки в центральных областях
Поздний кожан (<i>Eptesicus serotinus</i>)	Европа, Северная Африка, Кавказ, Ближний Восток, Средняя, Юго-Восточная, Восточная Азия
Малый подковонос (<i>Rhinolophus hipposideros</i>)	Европа, Северная Африка, редко – Ближний Восток, Кавказ
Большой подковонос (<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>)	Европа, Северная Африка, Кавказ, Ближний Восток, Средняя и Восточная Азия
Водяная ночница (<i>Myotis daubentonii</i>)	Европа (в основном западная, в восточной части реже), редко – Кавказ, Юго-Западная Сибирь, Восточная Азия
Европейская широкоушка (<i>Barbastella barbastellus</i>)	Европа (в основном западная, в восточной части реже), редко – Юг Восточной Европы, Северная Африка, Кавказ

2.1.2. Выделение РНК для скрининга коронавирусов у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея

Экстракция РНК из мазков была произведена с помощью набора QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Полученную РНК разделили на алиquotы для исследования качества и концентрации с помощью

флуориметра, используя набор Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo-Fisher Scientific, США), отрицательных контролей обратной транскрипции с последующим секвенированием и ДНКазной обработки, обратной транскрипции, приготовления. Обратная транскрипция проводилась с помощью набора MMLV RT («Евроген», Россия) по протоколу производителя для жидких вирусосодержащих образцов с использованием случайных декануклеотидных праймеров. В последнем случае аликвоты хранятся при -80 °С в низкотемпературном морозильнике MDF-193 (Sanyo, Япония) до последующих манипуляций.

ДНКазная обработка проводилась с помощью ДНКазы I (Thermo-Fisher Scientific, США) по протоколу производителя. Для обеспечения термических условий использовался амплификатор QuantStudio 5 (Thermo-Fisher Scientific, США).

2.1.3. Проведение кПЦР для детекции коронавирусов у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея

Образцы РНК, выделенные из образцов биоматериала от летучих мышей, были проанализированы на наличие РНК SARS-CoV-2 и SARS-подобных вирусов при помощи коммерческих наборов («ДНК-Технология», Россия) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе серии ДТ-96.

кПЦР проводилось с помощью набора MMLV RT kit («Евроген», Россия) по протоколу производителя для жидкостных вирусосодержащих образцов с использованием декануклеотидного праймера. Для обеспечения термических условий использовался амплификатор QuantStudio 5 (Thermo-Fisher Scientific, США).

В качестве праймеров для скринингового исследования применялись вырожденные праймеры из L. Vijgen и соавт. (2008) [12], имеющие последовательности:

F: 5'-ACWCARHTVAAAYYTNAARTAYGC-3'

R: 5'-TCRCAYTTDGGRTARTCCCA-3'

Синтез олигонуклеотидов, в том числе вырожденных праймеров, осуществлялся по техническому заданию компанией «Евроген» (Россия). Реакции ПЦР проводили с использованием ПЦР-смеси горячего старта qPCRmix-HS и красителя SYBR Green («Евроген», Россия) на амплификаторе QuantStudio 5 (Thermo-Fisher Scientific, США).

Оптимизация параметров реакции проводилась по следующим критериям: серийное разбавление матрицы (анализ эффективности реакции), температура отжига, время отжига, температура элонгации, время элонгации. Оптимальную температуру отжига подбирали методом градиентной ПЦР с использованием возможностей блока Veriflex термоциклера QuantStudio 5 (Thermo-Fisher Scientific, США). Анализ кривой плавления (HRM-анализ) проводился в случаях всех постановок ПЦР. Реакции полного отрицательного контроля ПЦР проводились совместно с основными реакциями.

Программа ПЦР была следующей: 1 цикл по 5 минут при 95 °С, 54 цикла по 15 секунд при 94 °С, 30 секунд при 44 °С, 30 секунд при 60 °С, 1 цикл HRM-анализа, начиная шагом 0,15 °С при 60 °С и до 95 °С.

Полные отрицательные контрольные ПЦР-реакции проводили с использованием воды, обработанная диэтилпиروкарбонатом (DEPC) в качестве матрицы с основными реакциями. В качестве матрицы оптимизации реакции/праймеров использовали синтезированную последовательность, соответствующую 251 целевому нуклеотиду записей EF584908.1 (коронавирус азиатской леопардовой кошки), DQ249235.1 (Batcoronavirus HKU2) и AF304460.1

(CoV человека 229E) и положительный контроль в последующих реакциях. Последовательность была синтезирована компанией «Евроген» (Россия) и разбавлена до концентрации 1 нг/мкл, чтобы служить матрицей. Значения отсечения были определены автоматически с помощью программного обеспечения QuantStudio (Thermo-Fisher Scientific, США). Анализ данных ПЦР проводился в среде Design and Analysis (Thermo-Fisher Scientific, США). Скрининг кПЦР проводился трехкратно в независимых повторах.

Исследование *in silico* возможности использования праймеров для детекции CoV проводилось с помощью биоинформационных инструментов NCBI Blast, SequenceSearcher и следующих записей в базе NCBI Nucleotide: EF584908.1, DQ249235.1, AF391541.1, JX860640.1, KC461235.1, AF304460.1, AY567487.2, AY391777.1, KC008600.1, X51939.1, JQ065043.2, NC_003436.1, AY864806.1, NC_016992.1, NC_010800.1, DQ811789.2, NC_016991.1, NC_045512.2, NC_004718.3, NC_038294.1.

Анализ термодинамических характеристик праймеров осуществлялся с помощью OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>) и IDT OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Синтез олигонуклеотидов, в том числе вырожденных праймеров, проводился по техническому заданию компанией «Евроген» (Россия).

2.1.4. Проведение масс-спектрометрии для идентификации бактерий, выделенных из фекалий летучих мышевидных видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея

Для масс-спектрометрического биотипирования (идентификации) были использованы чистые суточные бактериальные культуры, пробоподготовка для масс-спектрометра – методом прямого нанесения.

Для идентификации видов бактерий методом MALDI-TOF MS использовался настольный масс-спектрометр Microflex с базой данных MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Германия). Согласно протоколу была проведена пробоподготовка чистых культур штаммов и анализ. Идентификация бактерий осуществлялась согласно критериям в инструкции: 2,300 – 3,000 высокая вероятность идентификации вида; 2,000 – 2,299 надежная идентификация рода, вероятная идентификация вида; 1,700 – 1,999 вероятная идентификация рода; 0.00 – 1,699 ненадежная идентификация.

Профили микроорганизмов получены с использованием Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Германия) с программным обеспечением FlexControl (Bruker Daltonics, Германия). Визуализация проведена с помощью программного обеспечения flexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Германия).

Протокол масс-спектрометрии

Суточные чистые культуры бактерий в виде одиночных колоний были нанесены тонким слоем непосредственно на точку мишени, начиная от середины.

Точки мишени с нанесенным биоматериалом покрывали 1 мкл раствора матрицы НССА (α -циано-4-гидроксикоричная кислота) до полного высыхания при комнатной температуре.

После высыхания мишень с культурами помещалась в масс-спектрометр, и осуществлялась работа в программах «MALDI Biotyper Realtime Classification» и «FlexControl» (Bruker Daltonics, Германия).

После идентификации отобранных изолятов при помощи масс-спектрометрии определились их мутагенные и антиоксидантные свойства.

2.1.5. Культивирование полученных бактерий для проведения экспериментов с использованием биосенсоров

Культивирование лактобактерий. В пробирку с жидкой средой LB (10 мл) петлей добавляли культуру лактобактерий (культивирование проходило в течение

двух суток при температуре 37 °С). Супернатант получен с помощью центрифугирования культур (Minispin-plus; Eppendorf, Германия) в течение 7 минут на скорости 13 000 оборотов в секунду.

Культивирование бацилл. Штаммы *Bacillus* росли в течение суток в жидкой среде LB при температуре 37 °С. Супернатант получен с помощью центрифугирования культур (Minispin-plus; Eppendorf, Германия) в течение 7 минут при скорости 13 000 оборотов в секунду.

Описание исследований на биосенсорах

Биосенсоры на основе *E.coli* MG1655 с промоторами pKatG-luxPkatG и pRecA-luxPsoxS определяют наличие в среде окислителей, которые образуются в клетке и наличие факторов, вызывающих повреждение ДНК относительно гидроперекиси и супероксид-анион-радикала. Биосенсор с плазмидами pRecA, pColD фиксирует наличие в клетке факторов, вызывающих повреждение ДНК.

В качестве индуктора повреждений ДНК использовали 1,4-диоксид 2,3-хиноксалиндиметанол (диоксидин) («Биосинтез», Россия) в концентрации $2,25 \times 10^5$ М, для индукции окислительных повреждений применяли перекись водорода (Ferrain, Франция) в концентрации 10^3 М.

Культивирование бактерий в жидкой питательной среде при постоянной температуре 37°C до ранней или средней логарифмической фазы. К ночной культуре вносили свежую питательную среду регулируя плотность до показателей 0,01–0,1 единица Мак-Фарланда (концентрация 3×10^7 – 3×10^6 клеток/мл). Измерения плотности проводились с помощью денситометра DEN-1В (Biosan, Латвия). После суспензию инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C до ранней логарифмической фазы. Аликвоты данной культуры по 90 мкл вносили в стерильные ячейки (находящиеся в стрипах планшета), к ним добавляли по 10 мкл тестируемого препарата (кроме контрольных ячеек). В контрольные ячейки вносили

10 мкл деионизированной воды, 10 мкл соответствующего индуктора или стерильную дистиллированную воду.

Затем планшет с пробами помещали в люминометр при температуре 30°C. Интенсивность биолюминесценции оценивалась каждые 10-15 мин.

Для оценки люминесценции применялся микропланшетный люминометр ЛМ-01Т (Immunotech, Чехия), мультимодальный ридер FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Германия). Эксперименты были проведены минимум двукратно независимо друг от друга для чистоты.

Фактор индукции SOS ответа/окислительного стресса/повреждения ДНК (Is) рассчитывался согласно формулам, представленным в формате кода статистической обработки, созданного при помощи языка статистического программирования R v4.1.0 (R Foundation for Statistical Computing, Австрия).

2.1.6. Отбор биоматериала у летучих мышей вида рыжая вечерница для анализа бактериоциногенных штаммов бактерий

Для изучения особенностей бактерий кишечной микробиоты использовался биоматериал (фекалии), полученный от летучих мышей вида рыжая вечерница, обитающих в Ростовской области. Летучие мыши на момент отбора образцов находились в Центре реабилитации летучих мышей ДГТУ. Все образцы были отобраны в периоде их гибернации, биоматериал отбирался из контейнеров, в которых проживало одновременно несколько летучих мышей (4-9 особей). Было собрано 7 пробирок с биоматериалом различной массы (Таблица 6).

Стерильно отобранные образцы фекалий были транспортированы в лабораторию университета Сан-Пауло (факультет Фармацевтических наук, SP, Бразилия). Для выделения бактериоциногенных штаммов образцы фекалий гомогенизировали в стерильном физиологическом растворе 1:9 (0,85 % NaCl, м/о) путем перемешивания в течение 2 минут и 10-кратно серийно разводили тем же

разбавителем, затем высевали на бульон MRS (Oxoid, Великобритания), дополненный 2 % бактериологическим агаром (м/о) (Oxoid, Великобритания).

Таблица 6 – Данные о биоматериале для изучения микробиоты

№ пробирки	Масса биоматериала, г	Объем воды, мл
1	0,09	0,81
2	0,02	0,18
3	0,04	0,36
4	0,04	0,36
5	0,04	0,36
6	0,05	0,45
7	0,10	0,90

С целью создания аэробных условий на чашки Петри был нанесен второй слой 2 % агара, с последующей инкубацией при 37 °С в течение 24 ч в аэробных условиях. На следующие сутки оценивали наличие роста бактерий и КОЕ/г. С целью предварительного отбора колоний с потенциальной продукцией антимикробных метаболитов был нанесен новый слой агара с сердечно-мозговым экстрактом (Vecton, Dickinson and Company Sparks, Франция), дополненный 2 % агаром и исследуемыми микроорганизмами в конечной концентрации 10⁶ КОЕ/мл, потом чашки инкубировали 24 ч при 37 °С. В качестве исследуемых микроорганизмов использовали *Listeria monocytogenes* (*L. Monocytogenes*) 422, 603 и 620 (коллекция ProVacLab факультета фармацевтических наук, Университет Сан-Паулу, SP, Бразилия). Через 24 ч в чашках Петри наблюдались колонии, представляющие ингибирующие зоны. Колонии были отобраны и перенесены в 5 мл бульона MRS (их инкубировали при 37 °С). Полученные изоляты были протестированы на продукцию антимикробных метаболитов в соответствии с рекомендациями [32]. После культивирования в бульоне MRS при 37 °С в течение 24 ч был получен бесклеточный супернатант с помощью центрифугирования (5 000 × g, 10 мин, 20 °С). При необходимости рН был скорректирован до 5,5-6,5 с 1М NaOH, чтобы

исключить возможное антимикробное воздействие слабых органических кислот, полученных в лаборатории, и их влияние в дальнейших испытаниях на антимикробные свойства. Образцы дополнительно обрабатывались в течение 10 мин при 80 °С для инактивации потенциально продуцируемых протеаз или H₂O₂. Был подготовлен агар с сердечно-мозговым экстрактом с добавлением 2 % агара с конечной концентрацией 10⁶ КОЕ/мл *L. monocytogenes* 422, 603 и 620, потом на поверхность чашек наносили 10 мкл предварительно приготовленного супернатанта. Пластины инкубировали в течение 24 ч при 37 °С и наблюдали за ингибирующими зонами; положительным результатом считались зоны, диаметр которых был более 2 мм. Микробные культуры, представляющие четкие ингибирующие зоны, были отобраны для дальнейших исследований как потенциально бактериоциногенные. Все культуры были исследованы на предмет морфологии отформатированных колоний, растущих на агаре MRS, микроскопического наблюдения за формой клеток и окрашивания по Граму. Кроме того, был проведен тест на каталазу и дополнительные стандартные микробиологические, биохимические и физиологические тесты, рекомендованные «Руководством Берджи по бактериологической систематике» [43]. Микробные изоляты, имеющие отрицательный тест на каталазу и грамположительное окрашивание, рассматриваются как потенциально идентифицированные молочнокислые бактерии, которые были отобраны для следующих этапов.

2.1.7. Культивирование бактерий из фекалий летучих мышей вида рыжая вечерница для анализа бактериоциногенных штаммов бактерий

К каждому образцу фекалий добавляли дистиллированную воду в соотношении 1:10, размешивали до полного растворения и получения гомогенной и однородной субстанции, затем разводили стерильным NaCl в соотношении 1:6 после инкубации при температуре 24 °С в течение 24 часов. Потом сеяли на чашки

Петри (49 разведений): каждое разведение сеяли четырехкратно (196 чашек Петри) с последующей инкубацией при температуре 37 °С в течение 24 часов. После инкубирования провели оценку наличия выросших культур (Таблица 7) на 196 чашках Петри и получили следующие результаты: культуры выросли в 72 чашках, 72 чашки Петри были пусты, на 52 чашках Петри невозможно было подсчитать число колоний (>300). Все культуры в 72 чашках Петри были круглой формы, однородной расцветки (белые), имели ровные края и четкий контур.

Таблица 7 – Число выросших культур на посевах

Степень разведения стерильным раствором NaCl	Посев 1	Посев 2	Посев 3	Посев 4
1-4-	216	270	262	222
1-5-	179	201	166	190
1-6-	42	81	34	56
1-7-	11	38	41	3
2-3-	137	99	104	94
2-4-	47	17	7	13
2-5-	2	-	3	3
3-0-	1	2	3	22
4-3-	154	66	89	103
4-4-	54	27	25	19
4-5-	1	1	2	3
5-4-	239	220	279	143
5-5-	108	108	94	102
5-6-	60	93	88	89
5-7-	14	27	19	11
6-3-	33	49	32	24
7-2-	261	204	209	174
7-3-	69	78	74	43

В 72 чашки Петри с зоной роста добавили слой агара с сердечно-мозговым экстрактом и инкубировали при температуре 37 °С 24 часа. Оценивая результат,

пришли к выводу: зоны роста присутствовали в 32 чашках Петри (края зон роста четкие). Из каждой чашки Петри с зонами роста были взяты мазки и посеяны в 5 мл MRS (86 пробирок). В 18 чашках Петри края зон роста были размыты. Из данных чашек были взяты мазки (38 пробирок); все пробирки (124) были отправлены в инкубатор при 37 °С на 24 часа (Таблица 8).

Таблица 8 – Идентификация мазков с чашек Петри

№ пробирки	№ чашки Петри	№ серовара <i>L. monocytogenes</i> *	№ пробирки	№ чашки Петри	№ серовара <i>L. monocytogenes</i> *
1	4 (5)	211	63	2 (3)	620
2	4 (5)	211	64	2 (3)	620
3	2 (4)	422	65	2 (3)	620
4	2 (4)	422	66	2 (3)	620
5	2 (4)	422	67	2 (3)	620
6	2 (4)	211	68	2 (3)	620
7	2 (4)	211	69	2 (3)	620
8	2 (4)	211	70	4 (4)	211
9	2 (4)	211	71	4 (4)	211
10	4 (4)	422	72	4 (4)	211
11	3 (0)	211	73	1 (6)	602
12	1 (6)	101	74	1 (6)	602
13	1 (6)	101	75	1 (6)	602
14	1 (6)	101	76	4 (3)	101
15	1 (6)	101	77	4 (3)	101

Продолжение таблицы 8

№ пробирки	№ чашки Петри	№ серовара <i>L. monocytogenes</i> *	№ пробирки	№ чашки Петри	№ серовара <i>L. monocytogenes</i> *
16	2 (4)	101	78	4 (3)	101
17	2 (4)	101	79	4 (3)	101
18	2 (4)	620	80	1 (7)	422
19	2 (4)	620	81	1 (7)	422
20	2 (4)	620	82	1 (7)	422
21	2 (4)	620	83	4 (3)	101
22	2 (4)	620	84	4 (3)	101
23	5 (5)	620	85	4 (3)	101
24	5 (5)	620	86	4 (3)	101
25	3 (0)	620	87	5 (5)	422
26	3 (0)	620	88	5 (5)	422
27	4 (4)	101	89	1 (5)	620
28	4 (4)	101	90	1 (5)	620
29	5 (7)	101	91	7 (3)	620
30	4 (3)	422	92	7 (3)	620
31	4 (3)	422	93	7 (2)	422
32	4 (3)	422	94	7 (2)	422
33	1 (6)	211	95	1 (5)	422
34	6 (3)	620	96	1 (5)	422
35	6 (3)	620	97	1 (4)	422

Продолжение таблицы 8

№ пробирки	№ чашки Петри	№ серовара <i>L. monocytogenes</i> *	№ пробирки	№ чашки Петри	№ серовара <i>L. monocytogenes</i> *
36	1 (7)	620	98	1 (4)	422
37	1 (7)	620	99	1 (4)	422
38	2 (5)	422	100	7 (2)	101
39	3 (0)	422	101	7 (2)	101
40	6 (3)	422	102	2 (3)	422
41	6 (3)	422	103	2 (3)	422
42	4 (3)	620	104	1 (4)	620
43	4 (3)	620	105	1 (4)	620
44	4 (3)	620	106	7 (2)	620
45	4 (3)	620	107	7 (2)	620
46	4 (3)	620	108	1 (4)	101
47	1 (7)	211	109	1 (4)	101
48	1 (7)	211	110	5 (4)	422
49	1 (7)	211	111	5 (4)	422
50	1 (7)	211	112	5 (4)	422
51	5 (4)	620	113	1 (5)	101
52	5 (6)	422	114	1 (5)	101
53	5 (6)	422	115	2 (3)	101
54	5 (6)	422	116	2 (3)	101
55	1 (6)	422	117	1 (5)	211

Продолжение таблицы 8

№ пробирки	№ чашки Петри	№ серовара <i>L. monocytogenes</i> *	№ пробирки	№ чашки Петри	№ серовара <i>L. monocytogenes</i> *
56	1 (6)	422	118	1 (5)	211
57	1 (6)	422	119	2 (3)	211
58	1 (6)	422	120	2 (3)	211
59	3 (0)	101	121	4 (3)	211
60	3 (0)	101	122	4 (3)	211
61	3 (0)	101	123	1 (4)	211
62	3 (0)	101	124	1 (4)	211

Было выделено 6 бактериоциногенных культур: №№ 1, 10, 76, 77, 85, 122. Культуры посеяли в чашки Петри с агаром с сердечно-мозговым экстрактом и *L. monocytogenes* №№ 101, 211, 302, 422, 603, 620, инкубировали при 37 °С 24 часа. Оценка зон роста представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Оценка зон роста *L. monocytogenes* №№ 101, 211, 302, 422, 603, 620

№ культуры	№ <i>L. monocytogenes</i>					
	101	211	302	422	603	620
1	-	-	-	+	-	-
10	-	-	-	-	+	+
76	-	-	-	-	-	+
77	-	-	-	-	-	+
85	-	-	-	-	+	+
122	-	+	-	-	-	-

«-» – отсутствие зон роста в чашках Петри

«+» – наличие зон роста в чашках Петри

Для теста с каталазой свежеприготовленные 6 бактериоциногенные культуры (№№ 1, 10, 76, 77, 85 и 122) стерильной петлей опускали поочередно в перекись водорода. Реакция отсутствовала у каждого образца.

2.1.8. Биомолекулярная дифференциация и идентификация изолятов для анализа бактериоциногенных штаммов бактерий

Предварительно отобранные бактериальные культуры выращивали при 37 °С в течение 24 ч в 20 мл MRS, затем выделяли общую ДНК с помощью набора ZR Fungal/Bacterial Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit, DNA (Zymo Research, США) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию и чистоту полученной геномной ДНК оценивали с помощью NanoPhotometer (Implen, Германия).

Отобранные бактериальные изоляты, предварительно оцененные как предполагаемые продуценты антимикробных метаболитов, дифференцировали с помощью ДНК-фингерпринтинга методом ОТ-ПЦР в соответствии с рекомендациями [33, 103]. Концентрация ДНК каждого изолята была доведена до 50 нг/мкл. Реакции ОТ-ПЦР были выполнены с использованием праймера (5'-(GTG)5-3') на 96-луночном термоциклере Veriti (Thermo-Fisher Scientific, США). Полученные ампликоны были визуализированы в 1,0 % агарозном геле, дополненном гелем-красителем SYBR®Safe DNA (Thermo-Fisher Scientific, США) в буфере 0,5×TAE для гель-электрофореза, потом визуализированы на оборудовании Molecular Imager ® GelDoc™ XR (Bio-Rad, США).

На основании предварительных биохимических, физиологических и морфологических наблюдений согласно Руководству Берджи [44] изоляты были предварительно идентифицированы как молочнокислые бактерии. Дальнейшая таксономическая идентификация штаммов, представляющих интерес, была

основана на секвенировании амплифицированного гена 16S рРНК, где была проведена ОТ-ПЦР, как описано у J.M.S. Lima и соавт. [34]. Праймеры:

F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'

были использованы для амплификации почти всего гена 16S рРНК для последующей идентификации на видовом уровне [66]. Реакции ОТ-ПЦР были выполнены на термоциклере Applied Biosystems Veriti™ (Thermo-Fisher Scientific, США), и полученные продукты ОТ-ПЦР были разделены с помощью геле-электрофореза на 1 % агароза, окрашенная гелем SYBR® Safe DNA Gel Stain (Thermo-Fisher Scientific, США), и визуализировали с помощью Molecular Imager® GelDoc™ XR (Bio-Rad, США). Полученные ампликоны затем были секвенированы в Центре исследований генома человека, Институте биомедицинских наук, Университете Сан-Паулу, Сан-Паулу, SP, Бразилия) с помощью секвенирования ДНК по Сэнгеру (набор для циклического секвенирования BigDye Terminator v3.1) и идентифицированы с помощью Sequencing Analysis 7.0 (Base Caller KB™, Applied Biosystems, США). На следующем этапе полученные результаты были проанализированы с помощью инструмента поиска Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, Национальный центр биотехнологической информации, Бетесда, Мэриленд, США) для идентификации.

2.1.9. Подтверждение белковой природы ингибирующего вещества и стабильности антимикробных пептидов к воздействию температуры, рН и выбранных химикатов у бактериоциногенных штаммов бактерий

На основании предварительных тестов ингибирования и идентификаций для следующих тестов были выбраны шесть микробных культур, названных ST01TL, ST10TL, ST76TL, ST77TL, ST85TL как *E. faecium*. Однако после проведения ПЦР для последующих экспериментов были отобраны культуры ST01TL и ST76TL.

Выбранные культуры выращивали в 20 мл MRS в течение 24 ч при 37 °С, а супернатант получали центрифугированием (10,000×g, 10 мин, 20 °С). рН супернатанта был доведен до диапазона 5,5 – 6,5 с помощью 1М NaOH и подвергнут термической обработке в течение 10 мин при 80 °С [31].

Для подтверждения белковой природы ингибирующего метаболита к 1,0 мл супернатанта добавили протеазу К (Promega, США) в концентрации 0,1 мг/мл и 1,0 мг/мл и образцы инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Для остановки ферментативных реакций образцы были подвергнуты термической обработке в течение 5 минут при 99-100 °С на AccuBlock Digital Dry Baths (Labnet International, США). Супернатант без добавления ферментов служил в качестве контроля. Остаточную антимикробную активность во всех экспериментальных установках оценивали в отношении штаммов *L. monocytogenes* 422, 603 и 620, как описано ранее. Для оценки влияния рН на стабильность полученных антимикробных пептидов аликвоты из ранее полученного супернатанта доводили до различных уровней рН (2,0, 4,0, 6,0, 8,0 и 12,0) с помощью 1 М NaOH или 1 М HCl. Затем инкубировали в течение 2 ч при 37 °С. рН был скорректирован обратно до диапазона 5,5-6,5 и протестирован на остаточную антимикробную активность с *L. monocytogenes* 422, 603 и 620. В эксперименте оценки влияния различных температур на стабильность полученных антимикробных белков аликвоты из супернатанта подвергли воздействию температур (8, 30, 37, 40, 60, 80, 100 и 122 °С) в течение 2 ч и потом протестировали на остаточную антимикробную активность с *L. monocytogenes* 422, 603 и 620 [31].

Для оценки влияния химических веществ, используемых в пищевой промышленности и в научной практике, были выбраны NaCl, Полисорбат-20, Полисорбат-80, додецилсульфат натрия и обезжиренное молоко. Все вещества были добавлены в количестве 1 %, вес/объем. Для стабильности антимикробных метаболитов, продуцируемых исследуемыми штаммами, были использованы

подготовленные супернатанты, как описано ранее [31]. Перед тестированием на остаточную антимикробную активность рН при необходимости корректировали до диапазона 5,5-6,5, активность определяли в отношении *L. monocytogenes* 422, 603 и 620. Все эксперименты были проведены в двух независимых случаях как минимум двукратно.

2.1.10. Мониторинг роста бактериоциногенных штаммов *Enterococcus faecium*, продукция антимикробных пептидов и изменение рН

Динамика роста бактерий, а также продукция антимикробных пептидов и изменения рН оценивались путем культивирования выбранных штаммов в бульоне MRS в течение 24 ч при 37 °С в аэробных условиях. Для каждого эксперимента в 100 мл бульона MRS добавляли инокулируемые ночные культуры 5 % (об./об.) изучаемых штаммов. Рост бактерий оценивали согласно изменениям оптической плотности (OD) при 600 нм на спектрофотометре Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, США), изменения рН оценивали с помощью рН-метра (Láctea Aparelhos Científicos e Eletrônicos LTDA, Бразилия) ежечасно. Также для каждой установки оценивалась продукция антимикробных пептидов (бактериоцинов) (активность выражалась в Ед/мл), определяемая каждые три часа.

Для определения конкретных уровней активности экспрессируемых бактериоцинов получали супернатант, как описано ранее, и готовили серию 2-кратных разведений со стерильным 25 мМ калий-фосфатным буфером рН равна 6,5. На следующем этапе аликвоты по 10 мкл из каждого ранее приготовленного разведения наносили на чашки Петри с агаром с сердечно-мозговым экстрактом, дополненный 1 % агаром, с включенными *L. monocytogenes* 422, 603 и 720 в конечной концентрации 10^5 КОЕ/мл, приготовленными как описано ранее. Чашки Петри инкубировали при 37 °С в течение 24 ч и результаты оценивали, как описано ранее: наличие 2 мм зон ингибиции показало положительный результат. Затем

рассчитали удельный уровень активности бактериоцина (выраженный в Ед/мл) с учетом типа серийного разведения (2-кратное), объема в мл (0,01 мл), примененного в тесте, и максимального разведения, все еще представляющего зону ингибирования [52].

2.1.11. Оценка воздействия супернатанта из бактериоциногенных штаммов

Enterococcus faecium* на *Listeria monocytogenes

В ходе эксперимента *L. monocytogenes* 422, 603 и 620 были добавлены к 200 мл 2 % агара с сердечно-мозговым экстрактом и инкубировали при 37 °С. Рост бактериоцинов оценивали в соответствии с изменениями в регистре OD при длине волны 600 нм. Предварительно приготовленный супернатант исследуемых бактериоциногенных штаммов, как описано ранее, пропускали через фильтр 0,22 мкм (Kasvi, Испания) и добавляли к экспоненциально растущей культуре *L. monocytogenes* 422, 603 620 (через 3 ч после инокуляции). Изменения в росте бактерий регистрировали в течение следующих 12 ч на спектрофотометре Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, США). Ед/мл примененных бактериоцинов оценивали, как описано ранее. *L. monocytogenes* ATCC 422, 603 и 620 без добавления бактериоцинов служили контролем роста [31]. Эксперимент проводили в двух независимых случаях.

Для оценки спектра активности были использованы штаммы из коллекции ProVacLab факультета фармацевтических наук Университета Сан-Паулу с включением патогенных микроорганизмов пищевого происхождения, а также продуценты бактериоцина, закваски и пробиотические культуры. Все штаммы культивировались в питательных средах (MRS или агар с сердечно-мозговым экстрактом) при 37 °С в течение 24 часов (чашки Петри для оценки бактериоциногенной активности были подготовлены, как описано ранее).

2.1.12. Оценка свойств бактериоциногенных штаммов *Enterococcus faecium*

Выбранные штаммы с подтвержденным антимикробным потенциалом рассматривались для оценки их основных свойств безопасности, включая гидролиз желатина, протеолитическую и гемолитическую активность, тесты на деградацию муцина и чувствительность к антибактериальным препаратам в соответствии с рекомендациями Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов (EFSA) [111].

Продукция желатиназы исследуемых штаммов оценивалась в соответствии с рекомендациями от dos Santos [101]. Выбранные культуры выращивали в бульоне MRS с 5 % желатином (Oxoid, Великобритания) при 37 °C в течение 24 ч, потом пробирки охлаждали в течение 2 ч при 4 °C и оценивали агрегатное состояние (жидкое или твёрдое). Если после охлаждения в пробирке сохраняется жидкая форма, это считается положительным результатом продукции желатиназы. В качестве положительного контроля использовали *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. В качестве отрицательного контроля использовали необработанную среду (MRS, с 5 % желатина). Эксперимент проводился двукратно независимо друг от друга для чистоты эксперимента.

Для оценки выработки протеолитических ферментов экспериментальные культуры сеяли на агар MRS с добавлением 10 % сухого обезжиренного молока (Molico[®], Nestlé, Бразилия) или 10 % казеина (Difco Laboratories, США). Эксперименты проводили двукратно независимо друг от друга. Чашки инкубировали при 37 °C в течение 72 ч. Согласно исследованиям M. Domingos-Lopes и соавт. [105], наличие прозрачной зоны вокруг колоний говорило о протеолитической активности.

Для гемолитической активности исследуемые культуры сеяли штрихами в чашки Петри с кровяным агаром (триптиказо-соевый агар с 5 % овечьей крови) и инкубировали при 37 °C в течение 48 ч. Образование прозрачных зон вокруг

растущих колоний считалось β -гемолитическим; в качестве α -гемолиза считалось образование зеленых зон вокруг растущих колоний; для γ -гемолиза отсутствие ореолов вокруг колоний считалось отсутствием гемолитической активности. *L. monocytogenes* ATCC 7644 использовался в качестве контроля для α -гемолиза [56]. Эксперимент проводился в двух независимых случаях.

Для оценки способности продуцировать муцин исследуемыми штаммами применялись рекомендации А. Monteagudo-Mera и соавт. [120]. Эксперименты проводились в двух независимых случаях. Среда MRS была приготовлена в соответствии с инструкцией производителя с исключением глюкозы как источника углерода. Модифицированная среда MRS без глюкозы была дополнена 1,5 % агара с добавлением 0,3 % свиной желудочный муцин, тип III (Sigma-Aldrich, США) или 1 % глюкозы в качестве контроля. На следующем этапе аликвоты по десять микролитров каждой выбранной культуры наносили в двух экземплярах на поверхность предварительно подготовленных чашек Петри и инкубировали в аэробных условиях при 37 °C в течение 72 ч. На следующем этапе сформированные колонии окрашивали 0,1 % черным крахмалом в 3,5 М уксусной кислоте в течение 30 мин. Чашки Петри промывали 1,2 М уксусной кислотой и наблюдали за зоной лизиса муцина вокруг колоний [120].

Тест на чувствительность к антибактериальным и противомикробным препаратам проводили методом диско-диффузии в соответствии с руководством EFSA [110]. Антибактериальные и противомикробные препараты, выбранные для теста: стрептомицин (10 мкг/диск), цефепим (30 мкг/диск), цефуроксим (30 мкг/диск), неомицин (10 мкг/диск), метронидазол (50 мкг/диск), тобрамицин (10 мкг/диск), амикацин (30 мкг/диск), оксациллин 1 (мкг/диск), имипенем (10 мкг/диск), ванкомицин (30 мкг/диск), ампициллин (10 мкг/диск), гентамицин (10 мкг/диск), кларитромицин (15 мкг/диск), тилозин (60 мкг/диск), налидикс (30 мкг/диск), клиндамицин (2 мкг/диск), тетрациклин (30 мкг/диск), хлорамфеникол

(30 мкг/диск), стрептомицин (10 мкг/диск), левофлоксацин (5 мкг/диск), эритромицин (10 мкг/диск), канамицин (30 мкг/диск), офлоксацин (5 мкг/диск), ципрофлоксацин (5 мкг/диск), моксифлоксацин (5 мкг/диск), амоксициллин и клавулановая кислота (30 мкг/диск), флорфеникол (30 мкг/диск), энрофлоксацин (30 мкг/диск), линезолид (30 мкг/диск), нитрофурантоин (300 мкг/диск), триметоприм (5 мкг/диск), пефлоксацин (5 мкг/диск), цефтиофур (30 мкг/диск), ко-тримоксазол (25 мкг/диск), ампициллин и сульбактам (20 мкг/диск), цефтриаксон (30 мкг/диск), азитромицин (15 мкг/диск) (Cefar Diagnóstica Ltda, Бразилия). Налидиксовую кислоту использовали в качестве отрицательного контроля (антибактериальный препарат, обладающий активностью к грамотрицательным бактериям). Эксперимент проводили в двух независимых случаях. Штаммы культивировали в бульоне MRS при 37 °С в течение 24 ч и инокулировали на чашки Петри с MRS (с добавлением 2 % агара) в конечной концентрации 10^5 КОЕ/мл. Выбранные диски с антибактериальными и противомикробными препаратами помещали на поверхность чашек Петри и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Полученные результаты устойчивости/чувствительности к используемым антибактериальным и противомикробным препаратам измеряли по диаметру зон ингибиции (мм) [110].

Скрининг генов вирулентности

Был проведен скрининг на наличие различных генов, связанных с оценкой безопасности (определяли вирулентность, устойчивость к антибактериальным и противомикробным препаратам, гены, отвечающие за выработку биогенных аминов), для чего была использована ДНК, выделенная из исследуемых штаммов методом ПЦР с праймерами, указанными в таблице 10. Все реакции ПЦР были проведены на термоциклере Veriti 96 (Applied Biosystems, США), и каждый скрининг был сделан в соответствии со ссылками, указанными в таблице 10. Полученные ампликоны были разделены на электрофорезе в агарозном геле (1-2 %,

вес/объем, с учетом размера целевых ампликонов), окрашивали и визуализировали, как описано ранее.

Таблица 10 – Праймеры, применяемые для оценки безопасности полезных свойств, связанных с изучаемыми штаммами *E. faecium* ST01TL и ST76TL

Ген	Праймеры	Источник	ST01TL	ST76TL
<i>vanA</i>	5'-GTAGGCTGCGATATTCAAAGC-3' 5'-CGATTCAATTGCGTAGTCCAA-3'	J.I.I. Fugaban и соавт. [55]	-	-
<i>vanB</i>	5' -GTAGGCTGCGATATTCAAAGC-3' 5'- GCCGACAATCAAATCATCCTC-3'	J.I.I. Fugaban и соавт. [55]	-	-
<i>vanC</i>	5'-ATCCAAGCTATTGACCCGCT-3' 5'-TGTGGCAGGATCGTTTTTCAT-3'	J.I.I. Fugaban и соавт. [55]	-	-
<i>vanD</i>	5'- TGTGGGATGCGATATTCAA-3' 5'- TGCAGCCAAGTATCCGGTAA-3'	J.I.I. Fugaban и соавт. [55]	-	-
<i>vanE</i>	5'- TGTGGTATCGGAGCTGCAG-3' 5'- GTCGATTCTCGCTAATCC-3'	J.I.I. Fugaban и соавт. [55]	-	-
<i>vanG</i>	5'- GAAGATGGTACTTTGCAGGGCA-3' 5'-AGCCGCTTCTTGTATCCGTTTT-3'	J.I.I. Fugaban и соавт. [55]	-	-
<i>gelE</i>	5'-TATGACAATGCTTTTTGGGAT-3' 5'-AGATGCACCCGAAATAATATA-3'	V. Vankerckho ven и соавт. [76]	+	+
<i>ace</i>	5'-GAATTGAGCAAAAGTTCAATCG-3' 5'-GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC-3'	A.M. Martín- Platero и соавт. [51]	+	+
<i>hdc</i>	5'-AGATGGTATTGTTTCTTATG-3' 5'-AGACCATACACCATAACCTT-3'	B. de Las Rivas и соавт. [68]	-	-
<i>tdc</i>	5'-GAYATNATNGGNATNGGNYTNGAYCARG-3' 5'-CCRTARTCNGGNATAGCRAARTCNGTRTG-3'	B. de Las Rivas и соавт. [68]	-	-

Продолжение таблицы 10

Ген	Праймеры	Источник	ST01TL	ST76TL
<i>odc</i>	5'-GTNTTYAAYGCNGAYAARCANTAYTTYGT-3' 5'-ATNGARTTNAGTTTCRCAYTTYTCNGG-3'	B. de Las Rivas и соавт. [68]	-	-
<i>IS16</i>	5'-CATGTTCCACGAACCAGAG-3' 5'-TCAAAAAGTGGGCTTGGC-3'	G. Werner и соавт. [122]	-	-
<i>asa</i>	5'-GCACGCTATTACGAACTATGA-3' 5'-TAAGAAAGAACATCACCACGA-3'	V. Vankerckhov en и соавт. [76]	+	-
<i>esp</i>	5'-AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG-3' 5'-AATTGATTCTTTAGCATCTGG-3'	V. Vankerckhov en и соавт. [76]	-	-
<i>cylA</i>	5'-ACTCGGGGATTGATAGGC-3' 5'-GCTGCTAAAGCTGCGCTT-3'	V. Vankerckhov en и соавт. [76]	-	-
<i>hyl</i>	5'-ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG-3' 5'-GACTGACGTCCAAGTTTCCAA-3'	B. de Las Rivas и соавт. [68]	-	-
<i>map</i>	5'-TGGATTCTGCTTGAGGTAAG-3' 5'-GACTAGTAATAACGCGACCG-3'	S.J.D. Valledor и соавт. [52]		
<i>map</i>	5'-TGGATTCTGCTTGAGGTAAG-3' 5'-GACTAGTAATAACGCGACCG-3'	S.J.D. Valledor и соавт. [52]	-	-
<i>mub</i>	5'-GTAGTTACTCAGTGACGATCAATG-3' 5'-TAATTGTAAAGGTATAATCGGAGG-3'	S.J.D. Valledor и соавт. [52]	-	-
<i>eftu</i>	5'-TTCTGGTCGTATCGATCGTG-3' 5'-CCACGTAATAACGCACCAAC-3'	V. Vankerckhov en и соавт. [76]	-	-
<i>gad</i>	5-CCTCGAGAAGCCGATCGCTTAGTTCG-3' 5'-TCATATTGACCGGTATAAGTGATGCC-3'	S.J.D. Valledor и соавт. [52]	+	+
<i>prg</i>	5'-GCCGTCGACTCGAGGAGAATGATACATGAAT-3' 5'-CCTGCGGCCGCGTCCTTCTTTTCGTCTTCAA-3'	S.J.D. Valledor и соавт. [52]	-	-
<i>efl249</i>	5'-GCCGTCGACAAACGAGGGATTTATTATG-3' 5'-CTGGCGGCCGCGTTTAATACAATTAGGAAGCAG A-3'	S.J.D. Valledor и соавт. [52]	-	-

Продолжение таблицы 10

Ген	Праймеры	Источник	ST01TL	ST76TL
<i>ef2380</i>	5'-GCGGTCGACGACATCTATGAAAACAAT-3' 5'-TCCGCGCCGCCTTAAACTTTCTCCTT-3'	S.J.D. Valledor и соавт. [52]	-	-
<i>ef2662</i>	5'- GGCGTCGACCACTTAAACTGATAGAGAGGAAT- 3' 5'-CGCGCCGCAATTAATTATTAAGTAGTTTCC-3'	S.J.D. Valledor и соавт. [52]	-	-
<i>nisin</i>	5'-ATGAGTACAAAAGATTTCAACTT-3' 5'-TTATTTGCTTACGTGAACGC-3'	J.I.I. Fugaban и соавт. [35]	-	-
<i>pediocin PA1</i>	5'-CAAGATCGTTAACCAGTTT-3' 5'-CCGTTGTTCCCATAGTCTAA-3'	J.I.I. Fugaban и соавт. [35]	-	-
<i>enterocin P</i>	5'-ATGAGAAAAAAATTATTTAGTTT-3' 5'-TTAATGTCCCATACCTGCCAAACC-3'	J.I.I. Fugaban и соавт. [35]	-	+
<i>pabC</i>	5'-CGGACAAGCATAATGAATACTCGGAAT-3' 5'-GGATTGATAACCGCTTCTATTGCCGA-3'	К.М.О. Dos Santos и соавт. [100]	-	-
<i>pabB</i>	5'-CCTCAATTCATACAACCCTCTCACA-3' 5'-CAGACAAATCTTCACTCACGCCATAA-3'	К.М.О. Dos Santos и соавт. [100]	-	-
<i>pabK Q</i>	5'-CACTAGTGTCTATTGACTCAAATATTTT-3' 5'-CGTTTTTATGGCTATCACGGGGCT-3'	К.М.О. Dos Santos и соавт. [100]	-	-
<i>pabP E</i>	5'-GAGATAGTCTTAACGACATCACGATT-3' 5'-GCAGTCTATCAATTATTGGAAGCTTT-3'	К.М.О. Dos Santos и соавт. [100]	-	-

2.1.13. Оценка свойств бактериоциногенных штаммов *Enterococcus faecium* ST01TL и ST76TL

Гидрофобность

Уровень гидрофобности исследуемых культур оценивался с помощью подхода, ранее описанного R. Dolye и соавт. [83]. Исследуемые молочнокислые бактерии культивировали при 37 °С в течение 24 ч, после получали клетки с помощью центрифугирования (4000 × g, 10 мин, 4 °С). Полученные клетки промывали и взбалтывали в 25 мМ калий-фосфатном буфере с рН 6,5. Полученную суспензию клеток доводили до OD 560 нм около 1,0, смешивали в пропорции 5:1 с

н-гексадеканом и встряхивали в течение 2 мин. Данные образцы инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и регистрировали OD при 560 нм водной фазы. Уровень гидрофобности, выраженный в %, рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ гидрофобности} = \frac{(\text{OD}_{560} \text{ (показание 1)} - \text{OD}_{560} \text{ (показание 2)})}{\text{OD}_{560} \text{ (показание 1)}} \times 100$$

Ферментативный профиль (ApiZym)

Для оценки ферментов, продуцируемых исследуемыми штаммами, применялся коммерческий набор ApiZym (Biomereix, Франция) в соответствии с инструкцией производителя. Выбранные штаммы выращивали в бульоне MRS при 37 °С в течение 24 ч, потом с помощью центрифугирования (6000 × g при 20 °С) получали клетки, к которым добавляли стерильный физиологический раствор в соответствии с McFarland 5. Полученные клеточные суспензии помещали в предоставленные субстраты для ферментативных реакций и культивировали при 37 °С в течение 4 ч. Два реагента, предоставленные набором ApiZym (Biomereix, Франция), были добавлены, и колориметрические реакции зарегистрированы как доказательство ферментативной активности в соответствии с рекомендациями производителя.

Скрининг на наличие генов бактериоцинов в ДНК изучаемых штаммов *E. faecium*

ДНК, выделенная из исследуемых штаммов, как было описано ранее, использовалась для оценки на наличие известных генов бактериоцинов. Эксперименты проводились с праймерами, разработанными для нацеливания на: низин, педиоцин РА-1, энтероцин А, энтероцин В, энтероцин Р и энтероцин 50. Реакции ПЦР проводились на термоциклере Veriti 96 (Applied Biosystems, США), полученные ампликоны разделяли на электрофореze в агарозном геле (1-2 %, вес/объем) с учетом размера целевых ампликонов, окрашивали и визуализировали, как описано ранее.

2.2 Результаты исследований и их обсуждение

2.2.1. Результаты биоинформационного анализа панкоронавирусных праймеров и их способность детектировать РНК различных видов коронавирусов

Для биоинформатического сопоставления полученных статистических данных показателей про-мутагенной активности и наличия у летучих мышей CoV необходимо проведение полногеномного секвенирования выделенных РНК для детекции CoV, нуклеотидная последовательность которых не соответствует последовательности используемых праймеров.

Была проверена способность описанных в литературе панкоронавирусных праймеров детектировать РНК различных видов CoV. В результате исследования было установлено, что вырожденные праймеры, описанные в статье L. Vijgen и соавт., способны детектировать не только 5 видов CoV из различных таксономических групп, но и с варьирующей вероятностью еще около 300 других CoV.

С помощью биоинформационного анализа была показана полная гомология последовательностей праймеров и целевых участков геномов для 17 CoV из различных таксономических групп (Таблица 11).

Таблица 11 – Таксономические группы CoV

№	Подсемейство	Род, подрод	Вид
1	Не классифицируемые коронавирусы	<i>Guangxi coronaviridae</i>	Коронавирус азиатского леопардового кота Guangxi/F230/2006

Продолжение таблицы 11

№	Подсемейство	Род, подрод	Вид
2	Ортокороновирусы	<i>Alphacoronavirus;</i> <i>Rhinacovirus</i>	Коронавирус подковоносой летучей мышы HKU2
3	Ортокороновирусы	<i>Betacoronavirus;</i> <i>Embecovirus</i>	Штамм респираторного коронавируса собак K37
4	Ортокороновирусы	<i>Alphacoronavirus;</i> <i>Tegacovirus</i>	Штамм вируса инфекционного перитонита кошек FCoVWSU791146 P1
5	Ортокороновирусы	<i>Alphacoronavirus;</i> <i>Duvinacovirus</i>	Коронавирус человека 229E
6	Ортокороновирусы	<i>Alphacoronavirus;</i> <i>Setracovirus</i>	Коронавирус человека NL63
7	Ортокороновирусы	<i>Betacoronavirus;</i> <i>Embecovirus</i>	Коронавирус человека OC43
8	Ортокороновирусы	<i>Gammacoronavirus;</i> <i>Igacovirus</i>	Вирус инфекционного бронхита
9	Ортокороновирусы	<i>Betacoronavirus;</i> <i>Embecovirus</i>	Вирус мышиноного гепатита A59
10	Ортокороновирусы	<i>Deltacoronavirus;</i> <i>Buldecovirus</i>	Коронавирус свиней HKU15, штамм HKU15- 155

Продолжение таблицы 11

№	Подсемейство	Род, подрод	Вид
11	Ортокороновирусы	<i>Alphacoronavirus;</i> <i>Pedacovirus</i>	Вирус эпидемической диареи свиней
12	Ортокороновирусы	<i>Betacoronavirus;</i> <i>Embecovirus</i>	Штамм коронавируса крупного рогатого скота BCoV-ENT
13	Ортокороновирусы	<i>Betacoronavirus;</i> <i>Sarbecovirus</i>	SARS BJ202
14	Ортокороновирусы	<i>Deltacoronavirus;</i> <i>Buldecovirus</i>	Коронавирус воробья HKU17
15	Ортокороновирусы	<i>Gammacoronavirus;</i> <i>Igacovirus</i>	Коронавирус индейки
16	Ортокороновирусы	<i>Alphacoronavirus;</i> <i>Tegacovirus</i>	Вирус трансмиссивного гастроэнтерита (TGEV)
17	Ортокороновирусы	<i>Deltacoronavirus;</i> <i>Buldecovirus</i>	Коронавирус белоглазок HKU16

Таким образом, праймеры подходили для скринингового исследования на наличие CoV РНК в исследуемых образцах.

После проведения серии биоинформационных исследований праймеры были синтезированы и испытаны в тестовом эксперименте с синтетическим конструктором, соответствующим целевому участку детекции в геноме указанных CoV на примере CoV Guangxi/F230/2006. Результаты одной из оптимизационных постановок приведены на рисунке 3.

Автором был проведен систематический литературный анализ в базах данных Scopus, Web of Science и Pubmed с использованием следующего запроса: "Bat*" AND "coronavir*" AND "Nyctalus noctula" OR "Pipistrellus kuhlii" OR "Eptesicus

serotinus" OR "Rhinolophus hipposideros" OR "Rhinolophus ferrumequinum" OR "Myotis daubentonii" OR "Barbastella barbastellus".

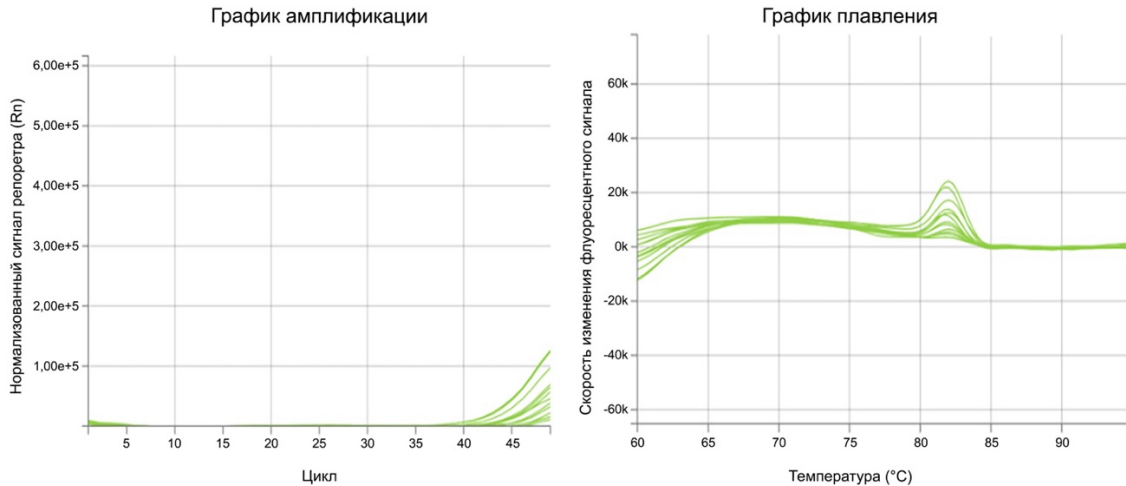


Рисунок 3 – Результаты амплификации синтетического конструкта-гомолога целевого участка Guangxi/F230/2006 и проверки специфичности реакции с помощью анализа кривой плавления ампликонов

По результатам систематического литературного анализа выявлено, что наибольшее количество эпизоотологических исследований по определению РНК CoV проведено в Италии: 6 публикаций в период с 2012 по 2019 год. Через некоторое время обширные исследования проведены в Китае (2 публикации в период с 2005 по 2017 год) и в Германии (2 публикации в период с 2008 по 2016 год). в соответствии с регионом скрининга: Люксембург (2017), Франция (2015), Великобритания (2012), Словения (2010), Нидерланды (2010), Корея (2020) и Дания (2018).

Частота обнаружения РНК CoV у летучих мышей в вышеописанных исследованиях при помощи метода первичного скрининга равна 3,17 % (случаев потенциального обнаружения из 300 образцов; 95 % доверительный интервал 1,28 % — 6,42 %). При этом SARS-подобных CoV у летучих мышей не обнаружено, что в

совокупности с данными кПЦР при помощи панкоронавирусных праймеров свидетельствует о благоприятной эпизоотической ситуации CoV инфекций летучих мышей. Однако для полноценного определения рисков межвидового переноса потенциально выявленных CoV летучих мышей требуется детальный биоинформатический анализ данных полногеномного секвенирования выделенных РНК.

2.2.2. Концентрация РНК в биоматериале у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея

Средняя концентрация РНК в жидких образцах орофарингеального зонда составляла 2,67 нг/мкл (2,58 – 2,77 нг/мкл), а в жидких ректальных образцах – 2,71 нг/мкл (2,59 – 2,82 нг/мкл). Существенных различий в концентрации РНК в ротоглотке/глотке и ректальных мазках нет ($p = 0,997$) (Рисунок 4).

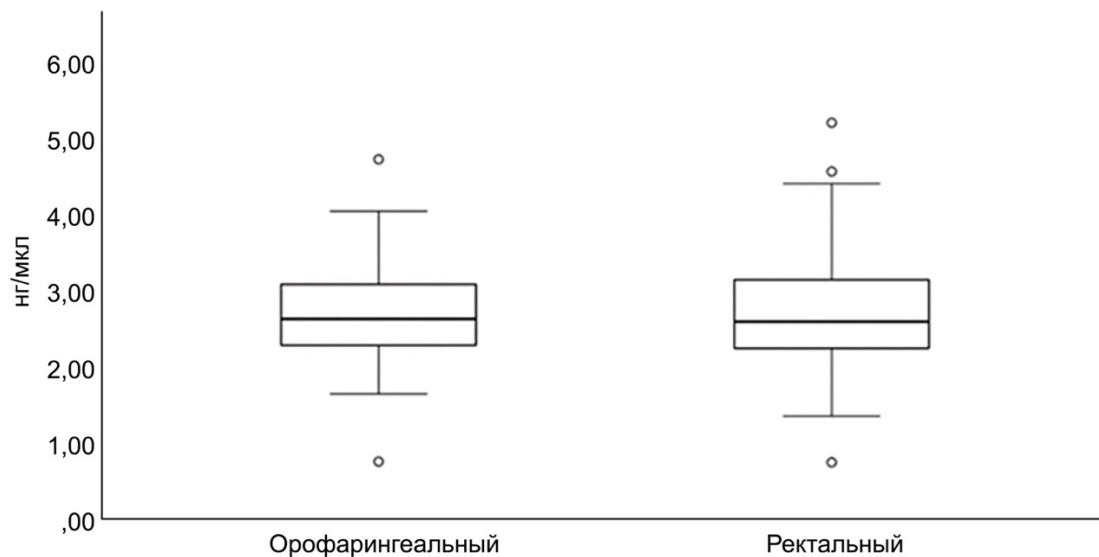


Рисунок 4 – Концентрация РНК (нг/мкл) в орофарингеальных и ректальных мазках летучих мышей

2.2.3. Чувствительность и специфичность панкоронавирусных праймеров

In silico были проведены анализы способности панкоронавирусных праймеров обнаруживать РНК различных типов CoV (Рисунок 5).

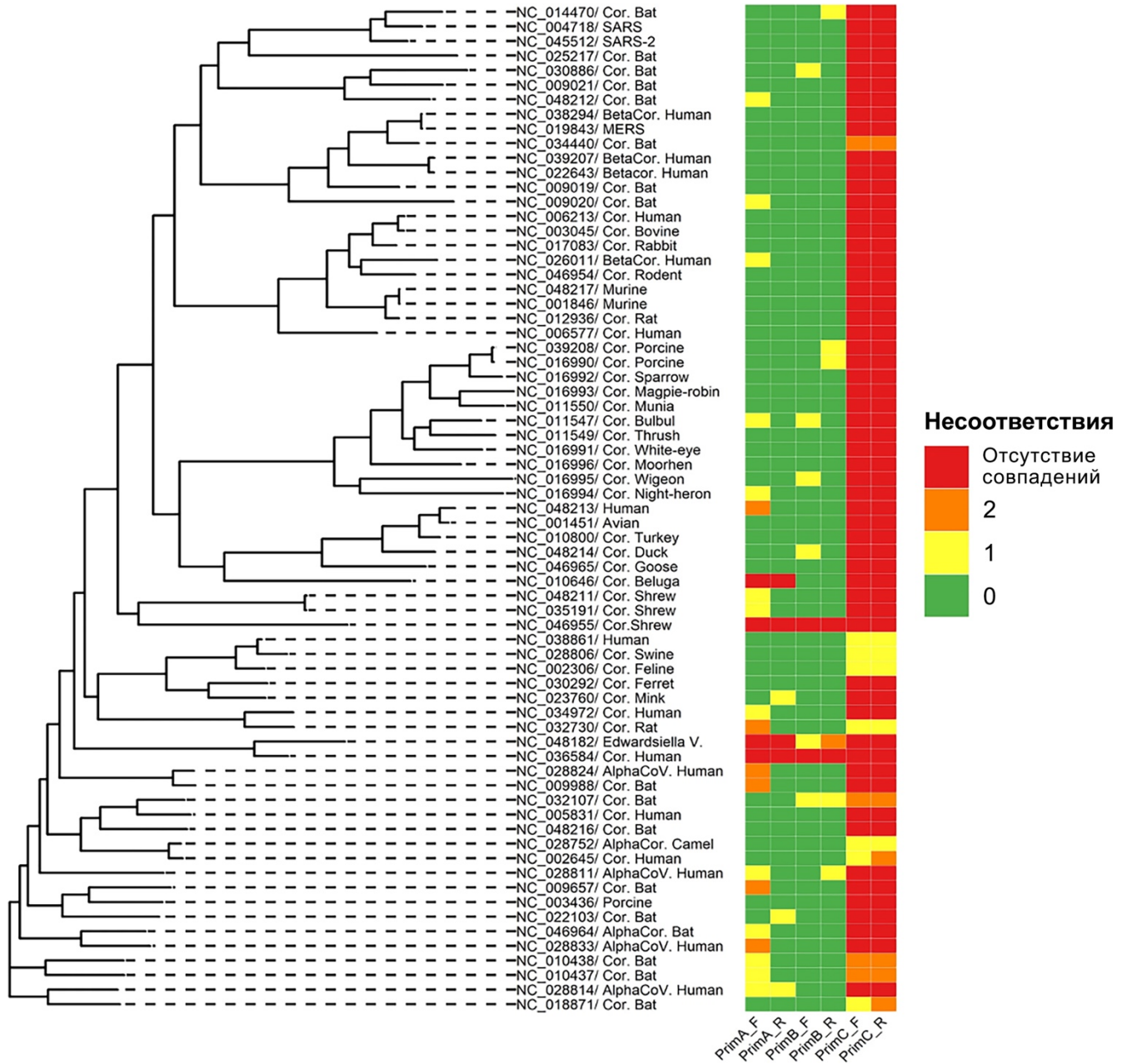


Рисунок 5 – Филогенетическое древо построено с использованием 68 полных эталонных геномов видов CoV и одного эталонного генома вируса рEt-SU. Прямоугольная тепловая карта представляет количество несовпадений для прямого (F) и обратного (R) праймеров во время тестирования методом ПЦР *in silico*

В результате было установлено, что использованные вырожденные праймеры из исследования L. Vijgen и соавт. позволяют обнаружить по меньшей мере 65 видов CoV из доступных эталонных геномов, принадлежащих к семейству Coronaviridae. В отношении других CoV совпадений обнаружено не было. Большинство несовпадений наблюдалось в прямом праймере: 1 несовпадение с 24,18 % опубликованных геномов CoV и 2 несовпадения с 6,59 % геномов CoV. В геномах трех CoV было более двух несоответствий: CoV SW1 белухи, неопознанного человеческого изолята CoV FT1407-6/2014 и Shrew-CoV/Tibet2014.

Пары праймеров от D. Lelli и соавт. [74] показали аналогичную чувствительность. Однако они также обнаружили эталонный геном pEt-SU бактерии *Edwardsiella*, и на основании этого не представляется возможным предположить высокую специфичность для этой пары праймеров. Праймеры из исследования S. Watanabe и соавт. [38] в основном имели более двух несовпадений в использованных эталонных геномах CoV, что превышает количество разрешенных несовпадений.

2.2.4. Скрининг коронавирусов у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея

Положительные сигналы при обнаружении РНК CoV были обнаружены в пяти образцах от пяти образцов разных видов летучих мышей: двух образцов средиземноморских нетопырей, двух образцов поздних кожанов и одного образца малой подковообразной летучей мыши. РНК CoV была обнаружена в четырех образцах мазков из ротоглотки и в одном образце мазка из прямой кишки.

Подробную базу данных о летучих мышах и обнаружении CoV в таблице – Наличие РНК CoV у исследуемых летучих мышей в приложении Д.

Средняя доля обнаруженных CoV в изученной популяции летучих мышей составляет 3,33 % (96 % ДИ 1,1–7,6). Значимого влияния вида летучих мышей ($\chi^2 = 6,23$, $df = 6$; $p = 0,39$), происхождения мазка ($\chi^2 = 1,83$, $df = 1$; $p = 0,18$), пола ($\chi^2 = 1,38$, $df = 1$; $p = 0,24$) и место сбора проб ($\chi^2 = 2,9$, $df = 3$; $p = 0,4$) при обнаружении РНК CoV не было установлено, вероятно, из-за небольшого количества положительных образцов. Никаких значимых предикторов обнаружения РНК CoV не наблюдается (результаты простой логистической регрессии приведены в таблице – Доля обнаруженной РНК CoV у исследуемых летучих мышей в приложении Е).

В результате SARS-подобные CoV не обнаружены.

2.2.5. Результаты секвенирования образцов с обнаруженной РНК коронавирусов

При подготовке библиотеки с помощью набора NEB-Next ARTIC SARS-CoV-2 (New England Biolabs, США) не была обнаружена амплифицированная кДНК гРНК SARS-подобных CoV, подходящих для NGS. Результаты электрофореза ампликонов кДНК представлены на рисунке 6.

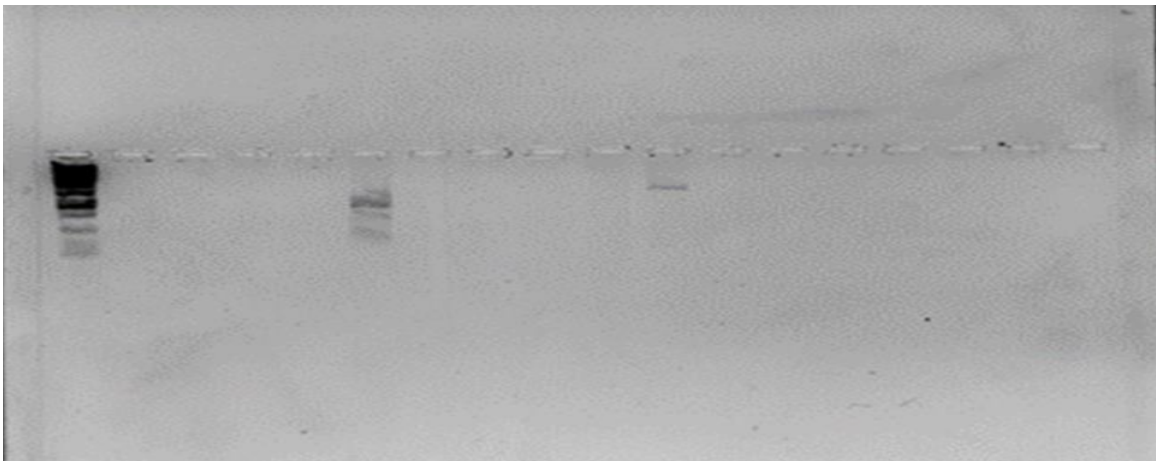


Рисунок 6 – Результаты гель-электрофореза амплифицированной кДНК РНК SARS-подобных CoV, приготовленного с помощью набора NEBNext ARTIC SARS-CoV-2 Library Prep Kit

Хотя секвенирование целевых фрагментов генома SARS-подобных CoV не увенчалось успехом из-за отсутствия ампликонов, были получены метагеномные данные из образцов, в которых была обнаружена РНК CoV.

Согласно таксономической идентификации необработанных чтений (FASTQ) с помощью Kraken2, было 30 чтений геномов Coronaviridae в данных, полученных в ходе MiSeq, и 54 чтения в данных генома Coronaviridae, полученных в ходе NovaSeq. Результаты таксономической идентификации отображены в рисунке 7.

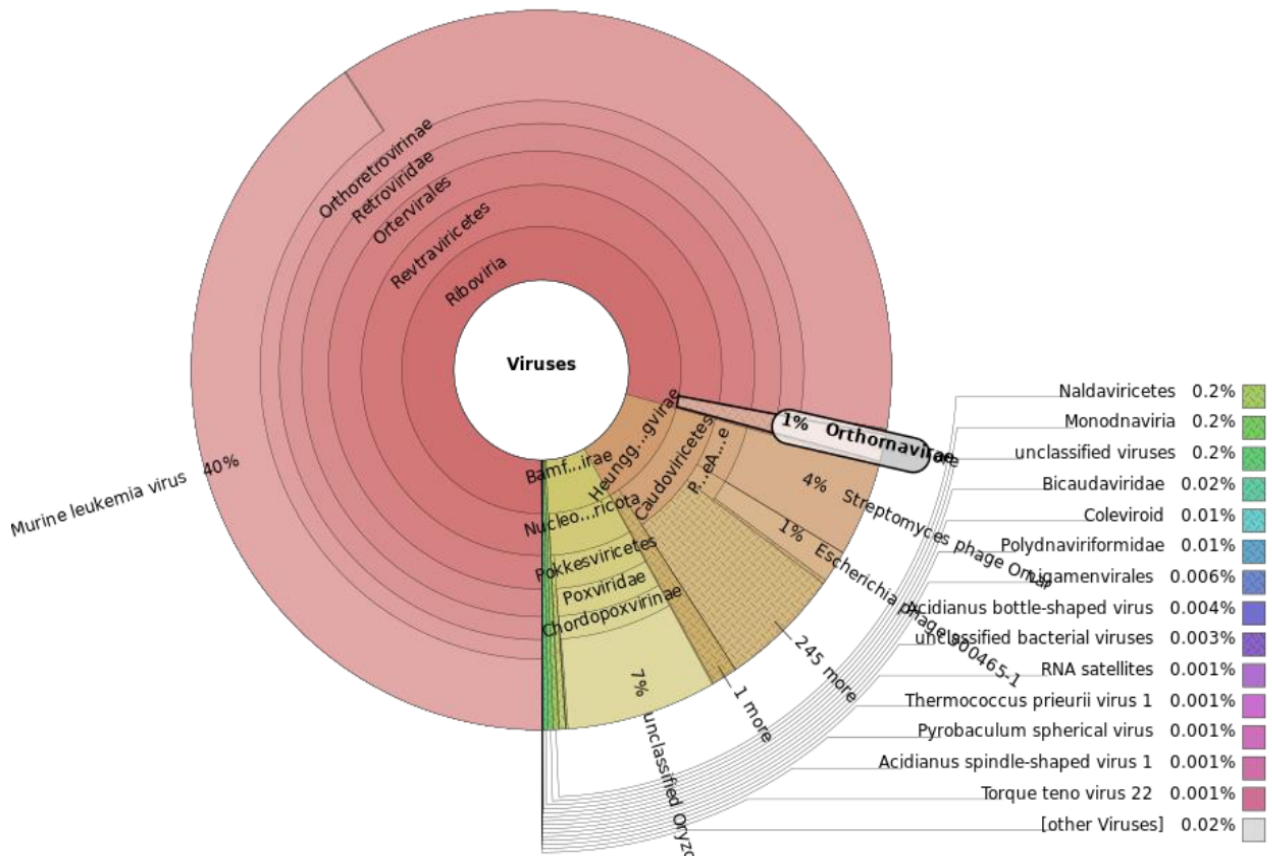


Рисунок 7 – Таксономическая идентификация вирусных прочтений с помощью Nova Sequn

Некоторые собранные контиги имели 89–100 % идентичность с CoV, связанными с SARS, и записями HCoV-OC43 из базы данных вирусов NCBI с охватом 3–16 %. Длина этих контигов составляет от 458 до 1236 п.н. Генная

аннотация с помощью Viral Annotation DefineR (VADR) в базе данных GenBank не увенчалась успехом, однако часть контигов была сопоставлена с эталонным геномом SARS-CoV-2, использованным для этого инструмента. Собранные контиги и результаты поиска сходных вирусных нуклеотидных последовательностей с помощью Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) находятся в базе данных вирусов NCBI (записи PHK(+)).

2.2.6. Оценка риска межвидового переноса коронавирусов

Ранние исследования показывают, что вспышки SARS, MERS и COVID-19, вероятно, произошли в результате межвидового переноса CoV от летучих мышей через животных, контактирующих с человеком.

На основании вышеперечисленных результатов установлено, что в Краснодарском крае и в Республике Адыгея обитают летучие мыши, которые являются носителями штаммов CoV. Эти животные могут дополнять синантропную фауну.

Для оценки риска передачи CoV от летучих мышей проведён анализ (Таблица 12), в рамках которого представлены виды летучих мышей, а также биотические, абиотические и антропогенные факторы для переноса CoV.

В Краснодарском крае и в Республике Адыгея риск передачи CoV от летучих мышей человеку крайне низкий по нескольким причинам:

- 1) Незначительное видовое разнообразие рукокрылых на Европейском Юге России.
- 2) Низкая плотность колоний летучих мышей по сравнению с тропическими регионами.
- 3) Отсутствие пищевых традиций употребления летучих мышей.

4) Специфика поведения летучих мышей: отсутствие склонности к агрессивному поведению по отношению к человеку, за исключением случаев бешенства.

5) Отсутствие SARS-подобных штаммов.

6) Большинство видов летучих мышей обитает вдали от населенных пунктов, что минимизирует контакт с людьми.

Важно отметить, что в России не зафиксировано случаев передачи CoV от летучих мышей человеку.

Таблица 12 – Анализ факторов переноса CoV в Краснодарском крае и в Республике Адыгея

Летучие мыши	Число образцов биоматериала с РНК CoV	Пол	Происхождение	Продолжительность гибернации	Климат	Доля пашни и мелиорации
Средиземно морской нетопырь	2	Самцы	орофарингеальный	≈ 7 месяцев с возможными короткими периодами пробуждения	умеренно - континентальный, горный	≈ 60 %
Поздний кожан	2	Самец, самка	орофарингеальный			
Малый подковонос	1	Самка	ректальный			

2.2.7. Выявленная с помощью RecA-биосенсора *Escherichia coli* промутагенная и ДНК-защитная активность молочнокислых и бациллярных бактерий, выделенных из фекалий летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея

В исследовании для определения мутагенных и про- или антиоксидантных свойств штаммов, выделенных из микробиоты кишечника летучих мышей, использовали lux-биосенсоры – бактерии *E. coli* MG1655, в которые была введена плазида, содержащая интересующий промотор генов *RecA* и *katG*, под контроль которого поместили оперон luxCDABE от бактерии *Photobacterium luminescens*. Мутагенная активность идентифицировалась с помощью измерений экспрессии *RecA*, возрастающей при появлении двухнитевых разрывов в ДНК клетки, которые являются причиной активизации системы SOS-ответа. Экспрессия *katG* возрастает в присутствии гидроксильных радикалов.

Как можно видеть из рисунка 8, супернатанты многих исследованных бактерий показывают усиление индукции RecA при внесении их одновременно с индуктором повреждения ДНК. При этом сами по себе супернатанты не вызывали достоверного изменения экспрессии *RecA*.

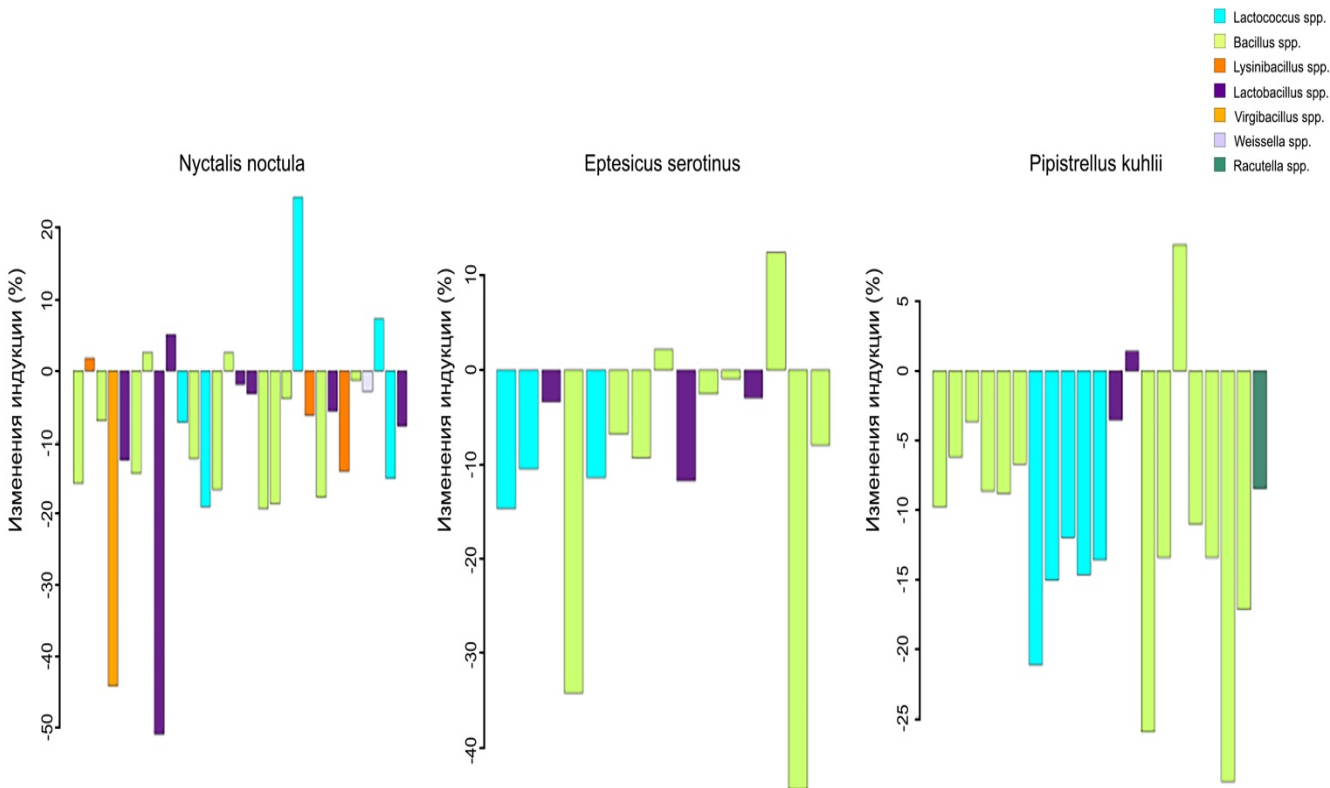


Рисунок 8 – Промутагенная и ДНК-защитная активность *Lactococcus* spp, *Bacillus* spp, *Lysinibacillus* spp, *Lactobacillus* spp, *Virgibacillus* spp, *Weissella* spp, *Raoultella* spp, определенная с помощью ResA-биосенсора *E. coli*. Активность определена относительно диоксидина. Легенда столбчатого графика представляет группы штаммов, идентифицированных с помощью масс-спектрометрии

Так как lux-биосенсоры показывают не двухцепочечные разрывы в ДНК клетки биосенсора, а только реакцию на них клетки, к росту экспрессии ResA в присутствии метаболитов могут привести два события. Метаболиты бактерий и использованный в качестве индуктора диоксидин могут действовать синергетически. То есть при совместном действии метаболитов и диоксидина количество двухнитевых разрывов в клетке возрастает по сравнению с действием только диоксидина, поэтому усиливается и ответ клетки на повреждения.

С другой стороны, метаболиты могут усиливать непосредственно ответ клетки, то есть вмешиваться в SOS-ответ на ранних этапах при том же уровне повреждений ДНК.

В норме экспрессия белка RecA находится на низком уровне, промотор RecA, как и другие промоторы белков SOS-ответа, репрессирован белком LexA. При появлении двухнитевых разрывов белок RecA соединяется с повреждённой ДНК и образует активированный белок RecA, под воздействием которого белок LexA автокаталитически расщепляется, что влечет быстрое возрастание экспрессии RecA и других генов, вовлеченных в SOS-ответ.

Таким образом, можно предположить, что метаболиты кишечных бактерий летучих мышей способны увеличивать сродство RecA к одноцепочечной ДНК либо взаимодействовать с LexA, ускоряя его автокатализ.

У эукариот известна система гомологичной репарации двухцепочечных разрывов, важную роль в регуляции которой играет белок RAD51. При этом белок RAD51 гомологичен и во многом похож на RecA. Таким образом, вероятно, что действие метаболитов кишечной микробиоты может увеличить не только SOS-ответ бактерий, но и процессы, протекающие в эукариотических клетках хозяина. С одной стороны, система гомологичной репарации работает только в делящихся клетках в S- и G2-стадиях клеточного цикла, то есть не относится к основным системам репарации клетки. С другой – из-за полёта в клетках летучих мышей вырабатывается повышенное содержание прооксидантов, что приводит и к увеличению повреждения ДНК. У летучих мышей известно много генетически закрепленных приспособлений, направленных на защиту различных систем от прооксидантов, включая улучшенные системы репарации ДНК. Возможно, что кишечная микробиота также вносит вклад в усиление систем репарации ДНК летучих мышей.

RAD51 тоже играет заметную роль в патогенезе вирусов, включая одноцепочечные РНК-вирусы с положительной полярностью цепи: CoV, ретровирусов. Возможно, устойчивость летучих вышей к вирусам зависит в том числе и от регуляции RAD51, в которой может принимать участие бактериальная микробиота кишечника.

Как видно на рисунке 9, значительное число бактерий, выделенных из исследованных мышей, имело высокую степень антиоксидантной активности. В связи с полётом летучие мыши имеют высокую нагрузку свободных радикалов в клетках. Можно предположить, что бактериальная микробиота кишечника летучих мышей способна за счет выработки вторичных антиоксидантных метаболитов в некоторой степени нивелировать влияние свободных радикалов на организм.

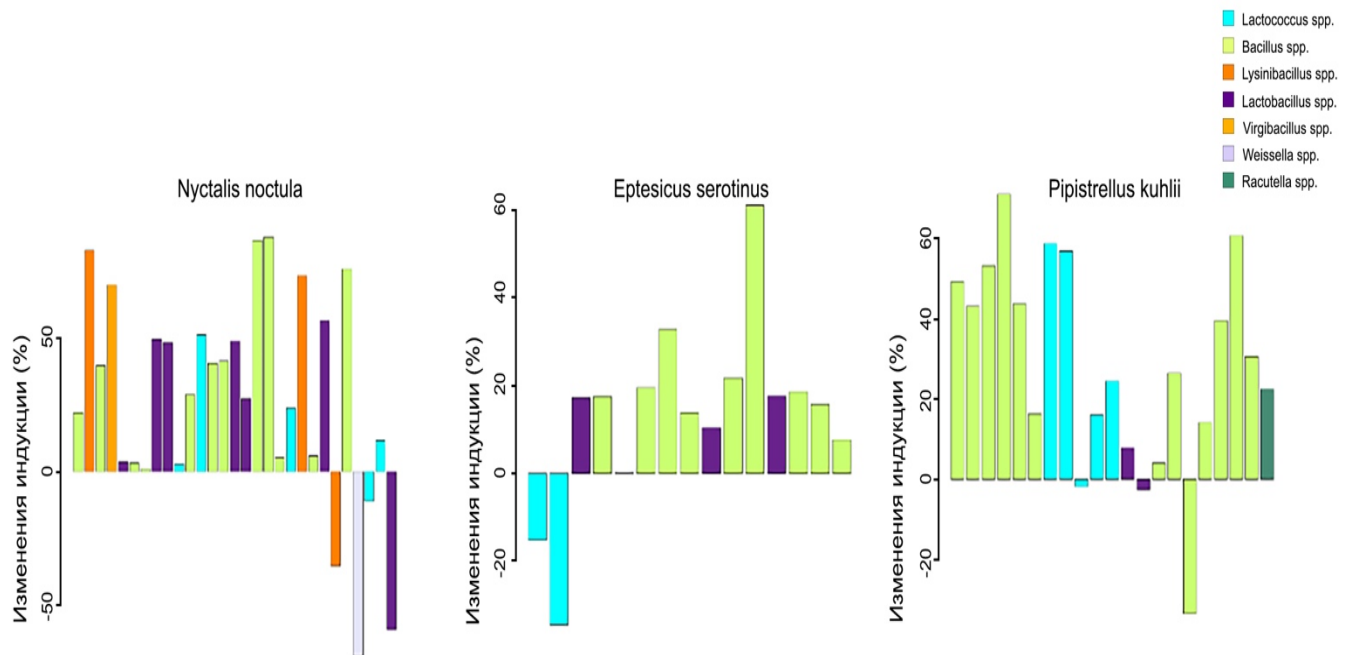


Рисунок 9 – Про- и антиоксидантная активность *Lactococcus* spp, *Bacillus* spp, *Lysinibacillus* spp, *Lactobacillus* spp, *Virgibacillus* spp, *Weissella* spp, *Raoultella* spp, определенная с помощью Кат-биосенсора *E. coli*. Активность определена относительно перекиси водорода. Легенда столбчатого графика представляет группы штаммов, идентифицированных с помощью масс-спектрометрии

2.2.8. Отбор изолятов *Enterococcus faecium* из фекалий летучих мышей вида рыжая вечерница

В процессе выделения штаммов из образцов фекалий летучих мышей использовали трехслойный подход для предварительного отбора бактериальных культур с антимикробными свойствами. Также регистрировали общее количество бактерий в образцах. Бактериальная нагрузка во всех образцах варьировалась от $2,5 \times 10^7$ КОЕ/мл до $6,9 \times 10^7$ КОЕ/мл. Ожидалось, что все протестированные образцы будут иметь схожие значения бактериальной нагрузки, поскольку образцы фекалий были взяты у одного вида летучих мышей, проживающих в одном ареале и схожих условиях, находящиеся в стадии гибернации в Ростовском центре реабилитации летучих мышей. В предыдущих исследованиях было описано, что бактериальная микробиота кишечника летучих мышей вида рыжая вечерница в основном состоит из различных представителей бактерий: родов *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bacteroides*, *Citrobacter* и *Bacteroides* или лактобацилл, как было определено с помощью высокопроизводительного секвенирования 16S рРНК V3-V4 [112]. Понимание состава микробиоты кишечника летучих мышей вида рыжая вечерница необходимо, поскольку они играют важную роль в экосистемах и могут быть резервуарами для различных микроорганизмов, тех, которые способны повлиять на здоровье человека, или штаммы с полезными свойствами для человека [163].

Из более 26 изолятов с ингибирующими свойствами, обнаруженными в предварительном скрининге, только 6 изолятов *E. faecium* были выбраны для последующих исследований, согласно предварительному тесту на бактериоцины с *L. monocytogenes* 422, 603, и 620.

2.2.9. Биомолекулярная дифференциация и идентификация изолятов *Enterococcus faecium*

Точная идентификация является важным этапом в отборе штаммов бактерий с определёнными функциональными свойствами, однако во время выделения бактериальных культур часто сопровождается риском повторного отбора одного и того же штамма, особенно если скрининг проводится на образцах, полученных от одного источника или сходных экологических ниш [57]. В части изучения микробиоты исследовали образцы фекалий у летучих мышей, находящихся в одинаковых условиях обитания. Данные факторы не исключают возможность того, что шесть полученных изолятов могут представлять собой несколько экземпляров одного и того же штамма. На основе биомолекулярного подхода, выполненного с использованием общей ДНК, полученной из 6 выбранных изолятов, представляющих потенциал для производства бактериоцинов и с помощью Rep-ПЦР, были обнаружены две группы (Рисунок 10).

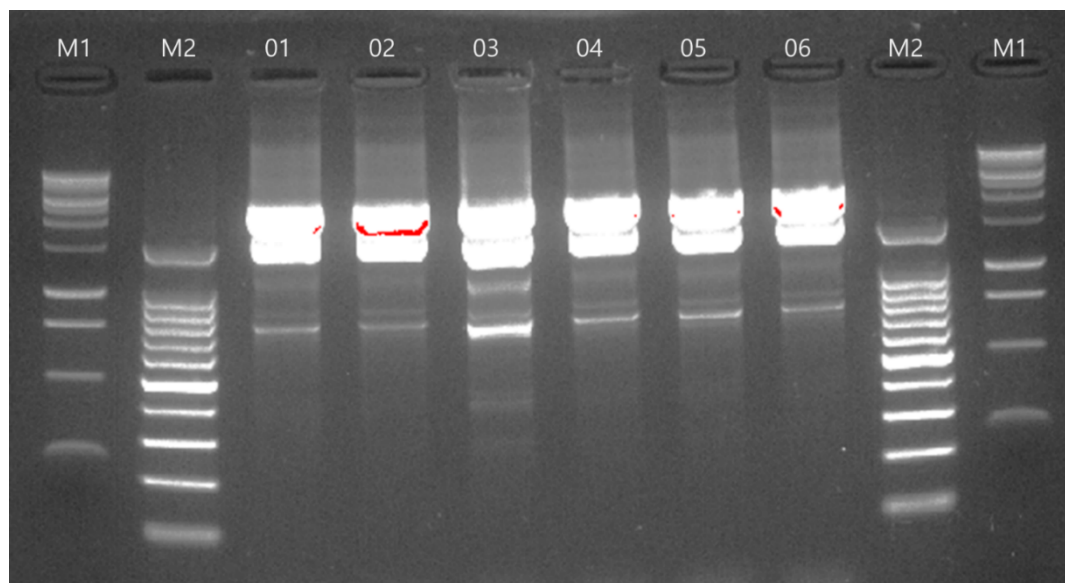


Рисунок 10 – Фрагменты ДНК, полученные после Rep-ПЦР геномной ДНК. Линии 01-06: изоляты из образцов фекалий летучих мышей, предварительно идентифицированные как *Enterococcus* spp. Линии M1 и M2, молекулярные лестницы длиной 1 т.п.н. и 100 п.н. (ферменты). Изоляты 01 и 03, названные ST01TL и ST76TL, были отобраны для дальнейших исследований

В первой группе (кластер 1) 5 изолятов (ST01TL, ST10TL, ST77TL, ST85TL и ST122TL) показали одинаковый профиль отпечатков пальцев и могут рассматриваться как копия одного и того же штамма, выделенного многократно, а во второй группе (кластер 2) только один изолят (изолят ST76TL) демонстрировал другой профиль Rep-ПЦР. Несмотря на то, что пять изолятов в кластере 1 были получены от разных летучих мышей, все летучие мыши содержались в одном ареале. Это наблюдение предполагает потенциальный обмен бактериями и вирусами между совместно содержащимися животными из-за общей среды обитания и тесного контакта друг с другом.

Летучие мыши, обитающие в одном ареале, часто проявляют социальное поведение, такое, как уход за собой и совместное размещение, что способствует горизонтальной передаче бактерий и вирусов между друг другом. Из-за данного поведения возможна более однородная бактериальная микробиота кишечника среди конспецификов. Такие факторы, как общая диета, социальная структура, одна среда обитания, играют важную роль в формировании состава микробиоты летучих мышей [23, 59, 113, 169].

Секвенирование гена 16s рРНК в дополнение к биохимическим, физиологическим и морфологическим тестам позволило идентифицировать все 6 предварительно отобранных изолятов как сгруппированных в два кластера *E. faecium*. Также 5 из 6 изолятов представляют один и тот же профиль Rep-ПЦР, только 1 из них (ST01TL) был выбран для дальнейших исследований в дополнение к уникальному представителю кластера 2 (ST76TL).

E. faecium является общим резидентом для кишечника не только летучих мышей, но и других животных, охватывая в том числе и людей [24, 109]. Считается, что бактерии вида *E. faecium* являются членом основной микробиоты млекопитающих, способствующих здоровью кишечника, поддерживают гомеостаз кишечника и могут участвовать в усвоении питательных веществ и

иммуномодуляции [84]. Понимание поведения *E. faecium* имеет важное значение для оценки его экологической роли и потенциального зоонозного риска. Также некоторые штаммы *E. faecium* известны как носители генов устойчивости к ванкомицину и метициллину, что подчеркивает важность мониторинга их распространения в ареалах дикой природы [137, 192].

2.2.10. Антимикробные свойства штаммов *Enterococcus faecium* ST01TL и ST76TL при воздействии различных температур, pH и химикатов

Антимикробные свойства, полученные из супернатанта от штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL, были оценены после воздействия протеиназы К при различных температурах, диапазонах pH и под воздействием различных химических веществ (Таблица 13).

Таблица 13 – Влияние химических веществ, температуры и pH на стабильность бактериоцинов, продуцируемых штаммами *E. faecium* ST01TL и ST76TL

Химические вещества/условия	ST01TL			ST76TL		
	<i>L. monocytogenes</i>					
	422	603	620	422	603	620
Химические вещества: NaCl, додецилсульфат натрия, Полисорбат-20, Полисорбат-80 и молоко (1%)	+	+	+	+	+	+
Температура: 8, 30, 37, 40, 60, 80 °C в течение 60 минут	+	+	+	+	+	+
Температура 100°C в течение 60 минут	-	-	+	-	-	+
Температура 121°C в течение 15 минут	-	-	+	-	-	+
pH: 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 и 10.0 в течение 60 минут	+	+	+	+	+	+
Контроль	+	+	+	+	+	+

Полная потеря антимикробной активности наблюдалась после воздействия протеинкиназы К на супернатант обоих штаммов, что указывает на белковую природу веществ, продуцируемых штаммами *E. faecium* ST01TL и ST76TL. Регулирование рН супернатанта до 5,5 – 6,5 исключает возможность ингибирования штаммов *L. monocytogenes* за счет продуцирования слабыми органическими кислотами. Ни H_2O_2 , ни некоторые протеолитические ферменты не могут быть указаны как ингибирующие метаболиты, поскольку тестируемые супернатанты из штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL в течение 10 мин находились при температуре 80 °С.

Полученные данные соответствуют ранее опубликованным исследованиям [54], в которых применялись подобные тесты. Подтверждение белковой природы антимикробных веществ, таких как бактериоцины, включает в себя ферментативную обработку, которая разрушает белки. Например, обработка вещества протеолитическими ферментами, такими как протеинкиназа К, альфа-химиотрипсин и трипсин, может подтвердить его белковую природу, если после обработки антимикробная активность будет утеряна [29]. Данный метод широко применяется в качестве простого экспериментального подхода для различия антимикробных веществ на основе белков от других типов ингибирующих веществ.

Бактериоцины обычно представляют собой небольшие полипептиды (менее 10 кДа [185]), стабильные к факторам окружающей среды. Большинство бактериоцинов обладают термостабильностью, устойчивы к различным уровням рН и к воздействию различных химических веществ, что является ключевым фактором в их потенциальном использовании в пищевой промышленности, в медицине и в других отраслях с различными факторами окружающей среды [37, 174].

Понимание того, как условия окружающей среды влияют на активность бактериоцина, необходимо для прогнозирования их дальнейшего применения. Например, стабильность изученных бактериоцинов, продуцируемых штаммами *E.*

faecium ST01TL и ST76TL в кислой среде, делает их пригодными для использования в пищевой промышленности с целью подавления роста патогенных бактерий (в кислых продуктах). Однако отсутствие стабильности при более высоких значениях pH ограничивает его использование в нейтральных или щелочных продуктах [21].

2.2.11. Мониторинг роста штаммов *Enterococcus faecium* ST01TL и ST76TL и продукция бактериоцина

Изменения в росте бактерий сопровождались изменениями мутности культуры *E. faecium* ST01TL и ST76TL в MRS при 37 °C. Оба штамма имели похожие паттерны роста, где максимальный показатель оптической плотности (OD) 600 нм увеличился примерно до 3,84 (OD был рассчитан на основе примененных уровней разбавлений и зарегистрированных значений для исследуемых образцов), соответственно, зарегистрированных через 21 ч и 27 ч для *E. faecium* ST01TL и ST76TL из процесса ферментации. В период ферментации pH снизился с 6,31 до 3,94 для *E. faecium* ST01TL и с 6,37 до 4,08 для *E. faecium* ST76TL. Более того, активность бактериоцина, протестированная с *L. monocytogenes* 620, поднялась до 12800 Ед/мл от *E. faecium* ST01TL через 21 ч и 25600 Ед/мл для *E. faecium* ST76TL через 24 ч. Подобные результаты были получены при проведении тестов с *L. monocytogenes* 422 и 603 (в обоих случаях снижение активности бактериоцина было зафиксировано в конце периода ферментации (24 ч) (Рисунок 11)).

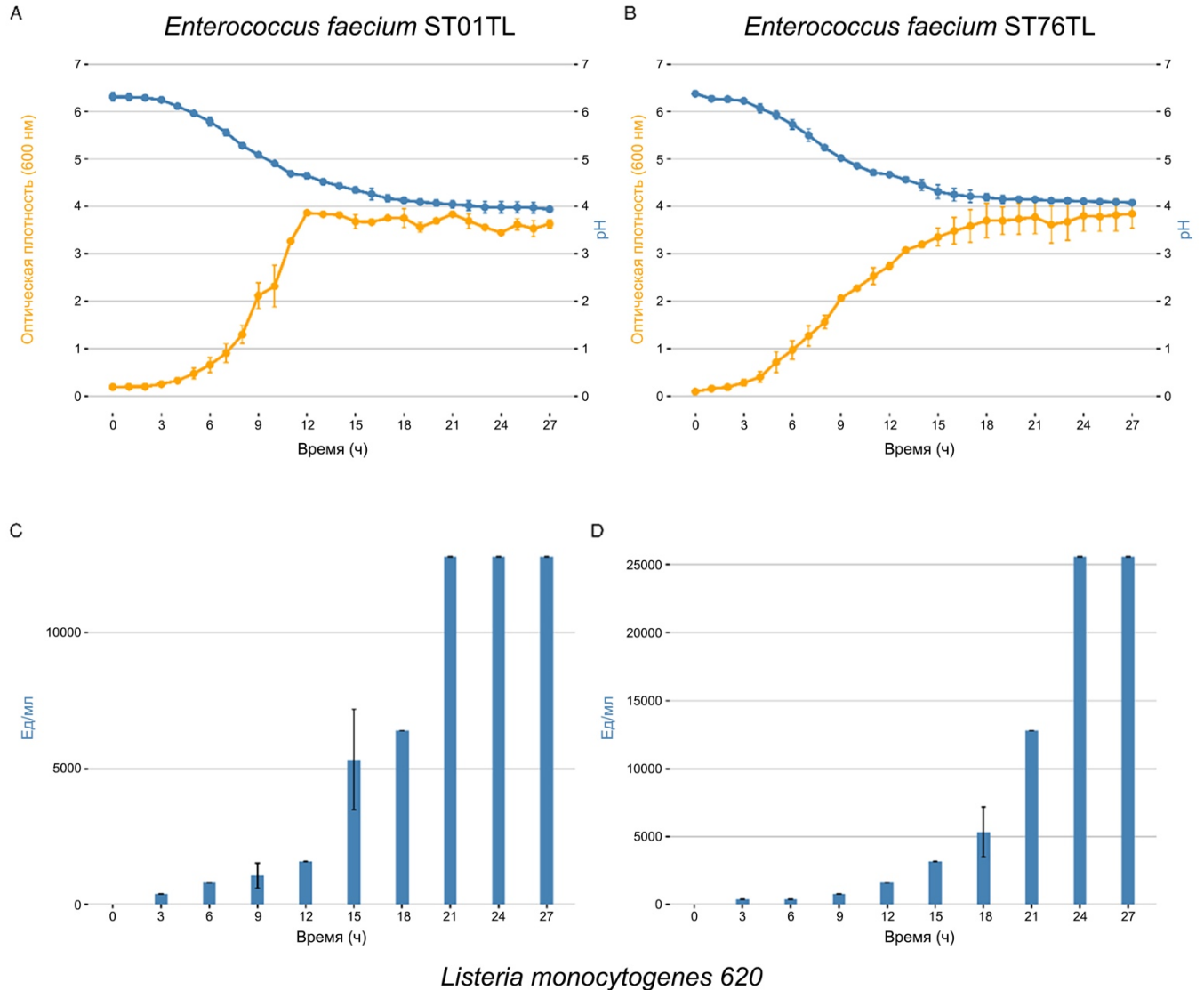


Рисунок 11 – Бактериальный рост *E. faecium* ST01TL и ST76TL в MRS, подкисление и продукция бактериоцинов исследуемыми штаммами с зарегистрированной активностью по сравнению с *L. monocytogenes* 620. Максимальное количество бактериоцинов, продуцируемых *E. faecium* ST01TL и ST76TL, было зарегистрировано в стационарной фазе (12800 Ед/мл и 25600 Ед/мл) при культивировании в MRS при 37 °С

Полученные результаты о динамике роста и продукции бактериоцина с различными штаммами *Enterococcus* spp. совпадают с результатами, описанными

ранее, однако в исследованиях, заявленных раньше, отмечалось, что бактериоцины, продуцируемые *Enterococcus*, были стабильны в период ферментации 24-48 ч [34, 53, 55].

2.2.12. Оценка активности бактериоциногенных штаммов *Enterococcus faecium* ST01TL и ST76TL

Ингибирование роста штаммов *L. monocytogenes* 422, 603 620 наблюдалось после добавления супернатанта и бактериоциногенных штаммов ST01TL и ST76TL. В экспериментальной группе при добавлении 12800 у.е./мл в раннюю логарифмическую фазу (через 3 часа после инокуляции) *L. monocytogenes* 422, 603 и 620 приводило к ингибции роста в течение следующих 9 ч. Рост *L. monocytogenes* 422, 603 и 620 без добавления бактериоцина служил контролем (Рисунок 12).

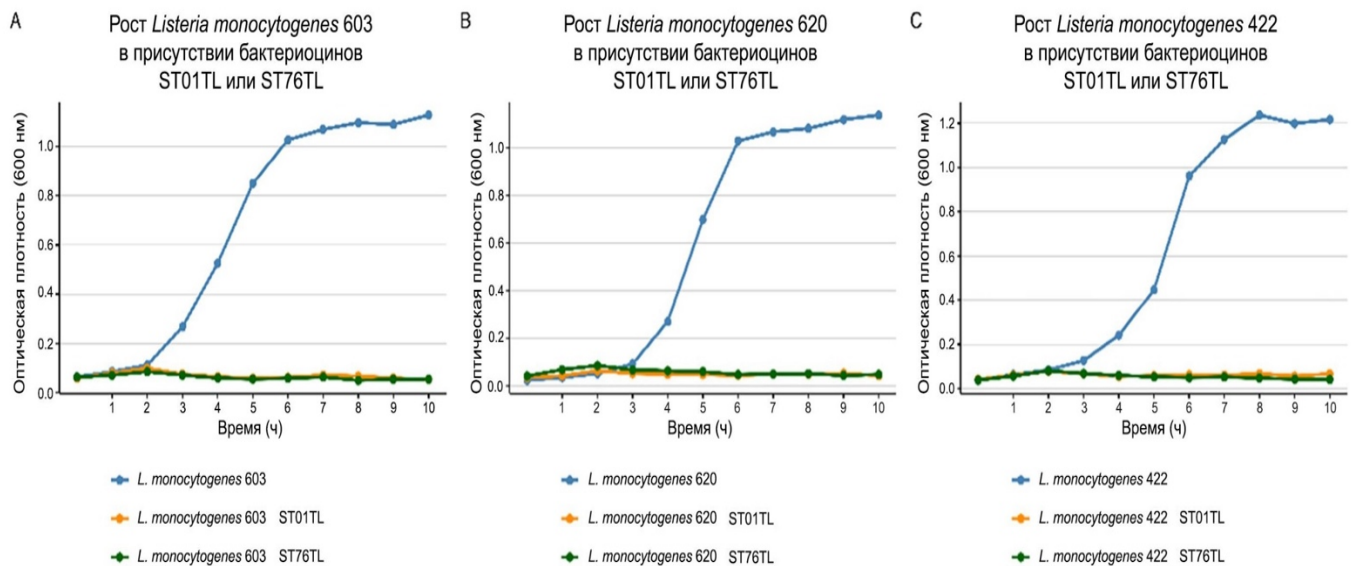


Рисунок 12 – Эффект продукции бактериоцинов из *E. faecium* ST01TL и ST76TL с *L. monocytogenes* 422, 603 и 620, культивируемых в агаре с сердечно-мозговым экстрактом при 37 °С. Контролем служил рост микроорганизмов без добавления бактериоцинов

Также, образцы полученные через 10 ч из экспериментальной и контрольной групп, не выявили присутствия и жизнеспособности *L. monocytogenes* (log 8,23 КОЕ/мл) (культивирование в течение 48 ч при 37 °С в чашках Петри (питательная среда Palcam). Полученные данные совпадают с аналогичными наблюдениями при оценке различных энтероцинов [52, 55].

Бактериоцины, продуцируемые *E. faecium* ST01TL и ST76TL, показали высокую ингибирующую активность по отношению к *L. monocytogenes*. Однако бактериоцины, продуцируемые *E. faecium* ST01TL и ST76TL, имели узкий спектр активности по отношению к грамотрицательным тестируемым организмам. В целом, бактериоцины представляют собой антимикробные пептиды, которые проявляют узкий спектр активности: в первую очередь действия нацелены на организмы, тесно связанные с продуцирующим штаммом [36, 30]. Данная характеристика сопоставима с полученными данными в сравнении с грамотрицательными бактериальными штаммами. Полученные результаты подтверждают штаммоспецифический и узкий спектр действия бактериоцинов, продуцируемых *E. faecium* ST01TL и ST76TL, что подтверждает их целевую активность в отношении *L. monocytogenes* и ограниченную эффективность против неродственных или резистентных штаммов микроорганизмов.

2.2.13. Устойчивость к антибактериальным и противомикробным препаратам *Enterococcus faecium* ST01TL и ST76TL

Оба штамма: *E. faecium* ST01TL и ST76TL – показали отрицательные результаты по продукции желатиназы, протеолитической активности, гемолитической активности (классифицируемой как γ -гемолиз).

Однако, согласно результатам восприимчивости к антибактериальным и противомикробным препаратам, штамм *E. faecium* ST01TL был чувствителен к большинству антибактериальных и противомикробных препаратов, используемых в

исследовании, но был устойчив к клиндамицину, стрептомицину и ванкомицину (рекомендованные EFSA антибактериальные препараты для рода *Enterococcus*), а также к цефепиму, цефтиофуру, цефуроксиму, ко-тримоксазолу, метронидазолу, налидиксовой кислоте, неомицину, оксациллину, тобрамицину, триметоприму, имипенему и пefлоксацину. Подобные результаты были получены и для штамма *E. faecium* ST76TL, который показал устойчивость к клиндамицину, гентамицину, канамицину и стрептомицину, а также к цефепиму, цефтиофуру, цефуроксиму, ко-тримоксазолу, метронидазолу, налидиксовой кислоте, неомицину, оксациллину, тобрамицину, триметоприму, амикацину, ампициллину/сульбактаму и цефтриаксону.

Полученные результаты об устойчивости исследуемых штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL к нескольким антибактериальным препаратам позволяют предположить их полирезистентность.

Устойчивость штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL к антибактериальным и противомикробным препаратам (Таблица 14) может являться проблемой, поскольку летучие мыши, имеющие такие устойчивые штаммы в составе своей микробиоты, могут выступать в качестве вектора для распространения генов устойчивости к данным антибактериальным и противомикробным препаратам среди других микроорганизмов в окружающей среде.

Когда штаммы используют в качестве пробиотиков, подобная устойчивость может быть выгодной, так как позволяет их применять во время антибиотикотерапии без ущерба для жизнеспособности пробиотиков [27, 88].

Таблица 14 – Устойчивость к антибактериальным и противомикробным препаратам штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL с помощью метода диско-диффузии (жирным шрифтом выделены антибактериальные препараты, рекомендованные Европейским агентством по безопасности продуктов питания). Высокая чувствительность – 25 мм и более. Низкая чувствительность – менее 10 мм.

Антибактериальные и противомикробные препараты мг/диск	ST01TL	ST76TL
Ампициллин, 10	21	30
Хлорамфеникол, 30	26	25
Клиндамицин, 2	0	0
Эритромицин, 15	26	26
Гентамицин, 10	18	0
Канамицин, 30	20	0
Стрептомицин, 10	0	0
Тетрациклин, 30	30	30
Ванкомицин, 30	0	20
Амикацин, 30	7	0
Амоксициллин + клавулановая кислота, 30	30	25
Ампициллин + сульбактам, 20	28	0
Азитромицин, 15	20	14
Цефтриаксон, 30	20	0
Ципрофлоксацин, 5	20	20
Кларитромицин, 15	23	24
Энрофлоксацин, 5	20	18
Флорфеникол, 30	26	25
Имипенем, 10	0	24
Левифлоксацин, 5	20	20
Линезолид, 30	26	26
Моксифлоксацин, 5	25	24
Нитрофурантоин, 300	26	24
Офлоксацин, 5	18	15
Пефлоксацин, 5	0	10
Тилозин, 60	21	21
Цефепим, 30; Цефтиофур, 30; Цефуроксим, 3; Ко-тримоксазол, 25; Метронидазол, 50; Налидиксовая кислота, 30; Неомицин, 10; Оксациллин, 1; Тобрамицин, 10; Триметоприм, 5	0	0

2.2.14. Оценка других свойств штаммов *Enterococcus faecium* ST01TL и ST76TL

Гидрофобность

Гидрофобность относится к неспецифическим взаимодействиям между микробными клетками и клетками-хозяевами. Данные первоначальные взаимодействия обычно слабые, часто обратимые и служат предшественниками более стабильных процессов адгезии. Последующая адгезия опосредуется специфическими механизмами, включающими белки клеточной поверхности и липотейхоевые кислоты. Данное начальное гидрофобное взаимодействие имеет решающее значение, поскольку оно закладывает основу для установления более прочных и специфических связей, которые облегчают микробную колонизацию и инфицирование [50, 157, 159].

Бактериальные клетки, имеющие высокую гидрофобность, образуют прочные взаимодействия с клетками слизистой оболочки. Значения гидрофобности *E. faecium* ST01TL и ST76TL были 34,55 % и 41,51 % (Рисунок 13). Данные значения выше, чем у *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (55 %), известного коммерческого пробиотического штамма. Также есть предположение, что гидрофобность может способствовать адгезии, но не является предпосылкой к прочной адгезии [47]. Более того, гидрофобные взаимодействия могут способствовать образованию биопленок, что повышает устойчивость ЖКТ и улучшает защитную среду для пробиотиков от неблагоприятного воздействия биологических агентов [92].

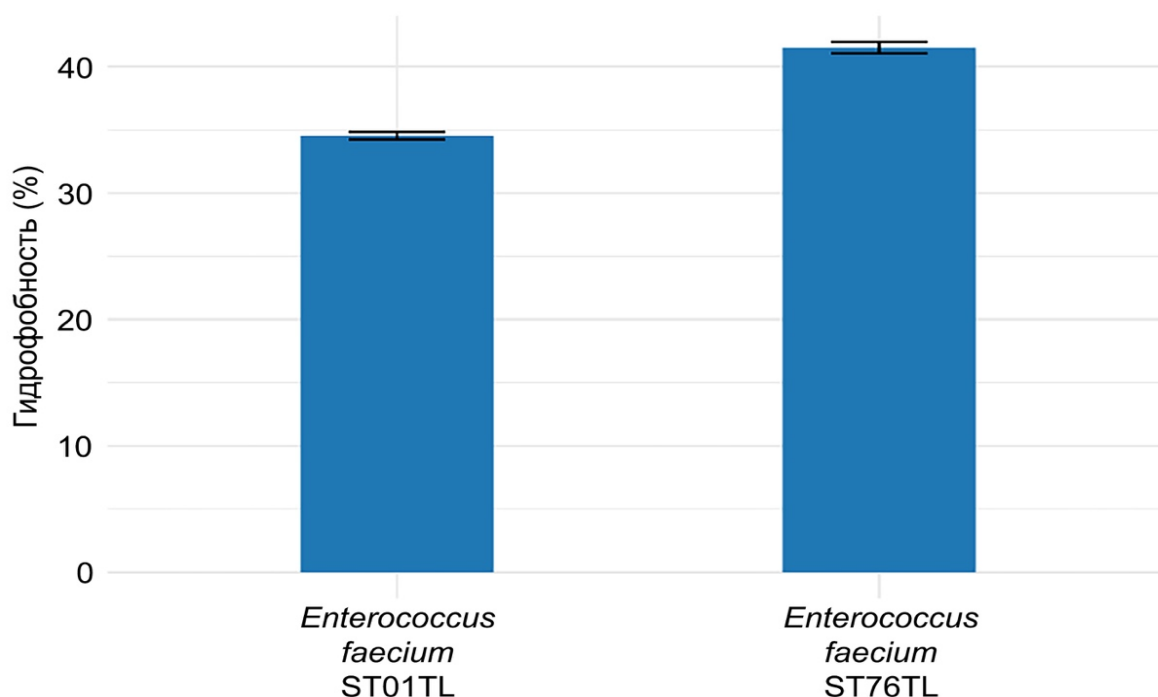


Рисунок 13 – Гидрофобность штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL

Продукция ферментов штаммами *E. faecium* ST01TL и ST76TL

Синтез ферментов необходим для различных биохимических процессов, протекающих в клетке. Штаммы *E. faecium* ST01TL и ST76TL с использованием набора APIZym (Biomereux, Франция) продуцировали эстеразу липазу (С 8), липазу (С 14), валин ариламидазу, цистин ариламидазу, трипсин, нафтол-AS-ВІ-фосфогидролазу и альфа-галактозидазу с некоторыми специфическими вариациями (Таблица 15).

Эстераза липаза (С 8) и липаза (С 14) обладают активностью утилизировать различные липидные субстраты. Если эстераза липаза (С 8) связана с гидролизом сложноэфирных связей в липидах и расщепляет триглицериды на диглицериды, моноглицериды, свободные жирные кислоты и глицерин, то липаза (С 14) связана с гидролизом длинноцепочечных триглицеридов на свободные жирные кислоты и глицерин. Важность липазы (С 14) связана с метаболизмом липидов как источника энергии и углерода [151, 61].

Таблица 15 – Анализ производства ферментов штаммами *E. faecium* ST01TL и ST76TL с помощью набора APIZym (Biomereux, Франция) согласно индикаторной шкале производителя, где 0 — отсутствие ферментативной активности; 1 — слабая активность; 2 — наивысшая активность

Фермент	ST01TL	ST76TL
Щелочная фосфатаза	0	0
Эстераза (С 4)	0	0
Эстераза (С 8)	2	2
Липаза (С 14)	1	1
Лейцинаминопептидаза	0	0
Валин ариламидаза	1	1
Цистин ариламидаза	0	1
Трипсин	0	1
α - химотрипсин	0	0
Кислая фосфатаза	0	0
Фосфогидролаза нафтола AS-BI	2	1
α -галактозидаза	1	1
β - галактозидаза	0	0
β - глюкуронидазы	0	0
α -глюкозидаза	0	0
β - глюкозидаза	0	0
N-ацетил- β - глюкозаминидаза	0	0
α - маннозидаза	0	0
α - фукозидаза	0	0

Полученные продукты метаболизма обеих ферментативных реакций необходимы для синтеза энергии и основных клеточных процессов *E. faecium* [45] и могут способствовать усвоению жирных кислот, которые играют жизненно важную роль для синтеза мембран и других клеточных процессов [151]. Активность эстеразы липазы (С 8) способствует возможности бактериям образовывать биопленки, которые важны для выживания клетки и персистенции в различных средах, включая ЖКТ [45]. Также эстераза липаза (С 8) повышает способность бактерий взаимодействовать с мембранами клеток хозяина и разрушать их. Также липаза (С 14) играет важную роль в адаптации и выживании энтерококков в

липидных средах, таких как ЖКТ. Липаза (С 14), содержащаяся в пищевых продуктах, увеличивает их способность колонизировать и выживать в средах за счет большого содержания липидов [45]. Кроме того, существует предположение, что липолитическая активность липазы (С 14) связана с выработкой биоактивных соединений, которые могут подавлять рост конкурирующих микроорганизмов, способствуя доминированию *E. faecium* [151].

Метаболизм белков связан со сложными метаболическими реакциями, в которых различные ферменты участвуют в регуляции микробных метаболических сетей. Один из них, валин-ариламидаза, связан с гидролизом пептидных связей в белках и нацелен на аминокислоту валин, расщепляя белки на более мелкие пептиды и аминокислоты. Кроме того, валин-ариламидаза облегчает ассимиляцию этих компонентов в метаболических путях, поддерживая рост и выживание [46]. Также существует предположение, что активность валин-ариламидазы связана с общей протеолитической активностью *E. faecium*, увеличивающей его адаптивность в различных средах, включая ЖКТ [193]. Цистин ариламидаза отвечает за гидролиз цистина в цистеин, что имеет решающее значение для метаболизма серы бактериальной клетки и общего синтеза белка. Трипсин отвечает за расщепление белков на более мелкие пептиды и аминокислоты, необходимые для роста и выживания бактерий и способствующие их жизнедеятельности в различных средах [191, 189].

Нафтол-AS-VI-фосфогидролаза участвует в гидролизе фосфатных эфиров и помогает в расщеплении нафтол-AS-VI-фосфата на нафтанол-AS-VI и неорганический фосфат для производства энергии и синтеза нуклеотидов [28, 149], что может рассматриваться как один из основных ферментов для функционирования микробных клеток.

Альфа-галактозидаза участвует в гидролизе альфа-галактозидных связей в галактоолигосахаридах и полисахаридах и способствует расщеплению сложных

углеводов, таких как раффиноза и стахиоза, на простые сахара, которые легче перевариваются в ЖКТ [11, 119].

Данная специфическая ферментативная активность может оказывать благоприятное воздействие при применении микробных культур в биотехнологической промышленности для утилизации определенных субстратов или при применении в качестве пробиотических продуктов [32].

2.2.15. Результаты скрининга на наличие искомым генов в ДНК исследуемых штаммов *Enterococcus faecium* ST01TL и ST76TL

Таблица 16 – ПЦР-скрининг генов с искомыми свойствами у штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL

Ген	Праймер	Источник	ST01TL	ST76TL
<i>gelE</i>	5'-TATGACAATGCTTTTTGGGAT-3' 5'-AGATGCACCCGAAATAATATA-3'	V. Vankerckhove и соавт. (2004) [73]	+	+
<i>ace</i>	5'-GAATTGAGCAAAAAGTTCAATCG-3' 5'-GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC-3'	A.M. Martín- Platero и соавт. [52]	+	+
<i>asa</i>	5'-GCACGCTATTACGAACTATGA-3' 5'-TAAGAAAGAACATCACCACGA-3'	V. Vankerckhove и соавт. (2004) [73]	+	-
<i>gad</i>	5'-CCTCGAGAAGCCGATCGCTTAGTTCG-3' 5'-TCATATTGACCGGTATAAGTGATGCC-3'	S.J.D. Valledor и соавт. [53]	+	+
<i>entero cin P</i>	5'-ATGAGAAAAAATTATTTAGTTT-3' 5'-TTAATGTCCCATACCTGCCAAACC-3'	J.I.I. Fugaban и соавт. [56]	-	+

Согласно данным проведенного ПЦР-скрининга на наличие генов с искомыми свойствами (Таблица 16), было выяснено, что штаммы *E. faecium* ST01TL и ST76TL содержат ген *gad*, влияющий на продукцию γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), а ген *enterocin P*, ассоциированный с продукцией бактериоцинов, был выделен только в ДНК *E. faecium* ST76TL. Обнаруженные гены у штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL говорят о том, что их можно использовать в качестве кандидатов для пробиотических препаратов. Полученные результаты совпадают с результатами, опубликованными в других исследованиях [34, 53, 55].

Скрининг на наличие генов вирулентности показал, что штаммы *E. faecium* ST01TL и ST76TL можно считать безопасными, поскольку не было обнаружено генов, связанных с патогенностью или устойчивостью к ванкомицину. Однако гены *gelE* (кодирующего секретируемую Zn-металлопротеазу у *E. faecalis* и других энтерококков, связанных с дегидратацией фибрина и способствующих процессам инфицирования хозяина) [158], *ase* (кодирующего белки, связанные со свойствами адгезии у *E. faecalis* и других энтерококков) [18] были выявлены у обоих штаммов, в отличие от гена *asa* (кодирующий субстрат агрегации) [180], обнаруженного только у штамма *E. faecium* ST76TL.

Биомолекулярные тесты являются одним из важнейших компонентов оценки комплексной безопасности, поскольку некоторые гены вирулентности могут оставаться невыраженными в лабораторных условиях, но могут активироваться под воздействием факторов окружающей среды или хозяина. В связи с этим необходимо тщательно оценивать генетический потенциал патогенности [96, 77].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Расширение ветеринарно-санитарного надзора для периодического изучения распространения и геномной характеристики CoV среди летучих мышей необходимо для предупреждения будущих вспышек инфекций животных и человека.

По сравнению с CoV от других животных, CoV летучих мышей имеют некоторые уникальные особенности. Физиология и жизнедеятельность летучих мышей способствуют возникновению мутаций в переносимых ими CoV, которые, в свою очередь, имеют сами по себе высокую частоту мутаций.

С помощью кПЦР (HRM-анализа) с панкоронавирусными праймерами был произведен скрининг распространенности CoV у летучих мышей из нескольких точек Европейского Юга России (на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея).

Чтобы изучить эффективность панкоронавирусных праймеров, был проведен анализ *in silico*. Было установлено, что используемые в исследовании праймеры могут обнаруживать по меньшей мере 65 видов CoV, включая SARS-подобные CoV. Согласно полученным данным, было выяснено, что вырожденные праймеры показали лучшую чувствительность и могут охватывать больше возможных комбинаций нуклеотидов целевого гена полимеразы и естественным образом обнаруживать больше CoV. Именно поэтому для эпизоотологического исследования CoV в популяции летучих мышей Европейского Юга России были использованы вырожденные пары праймеров.

Доля обнаруженных CoV в изученной популяции из 150 летучих мышей составила 3,33 % (95 % ДИ 1,1–7,6). CoV были обнаружены в 5 образцах из 300 мазков (4 орофарингеальных мазка и 1 ректальный мазок). В имеющихся предыдущих исследованиях превалентность CoV у летучих мышей была схожей.

Вероятно, из-за малого числа обнаруженных CoV у летучих мышей не установлено влияние вида летучих мышей, происхождения мазка (орофарингеальное, ректальное), пола или места сбора образцов на обнаружение РНК CoV. Кроме того, не выявлено существенных различий в концентрации РНК в мазках из ротоглотки и прямой кишки, что дополнительно свидетельствует о том, что происхождение мазка не влияло на вероятность обнаружения РНК CoV. Но следует отметить, что полученная концентрация РНК, вероятно, была низкой для NGS и эффективной сборки геномов CoV, их точной аннотации и последующего филогенетического анализа.

На основании полученных результатов выдвинуто предположение, что допустимо два способа для значимого обнаружения РНК CoV в популяции летучих мышей Европейского Юга России.

Во-первых, увеличить размер выборки, чтобы увеличить размер эффекта в соответствии с основными принципами биостатистики.

Во-вторых, уменьшить или оставить прежним места сбора проб при том же или большем размере выборки, поскольку в исследованиях с меньшими местами сбора проб уровень обнаружения CoV у летучих мышей относительно выше. В диссертационном исследовании была охвачена достаточно обширная территория, поскольку была цель собрать образцы из разных регионов. Например, четыре места сбора, где были обнаружены CoV летучих мышей, могут быть включены в последующие исследования с включением большего числа летучих мышей из этих мест. Уровень обнаружения CoV в популяциях летучих мышей зависит от характеристик колоний, включенных в исследование, в частности, от размера колонии, статуса размножения/гибернации животных, количества видов в колонии и местоположения колонии. Выборку для будущих исследований популяций летучих мышей необходимо проводить с учетом не только результатов настоящего исследования, но и особенностей колоний летучих мышей.

Выполнено три попытки NGS. Первые две включали секвенирование метагеномных библиотек методом дробовика, состоящих из 2 фрагментов кДНК размером (2×150 п.н.), с помощью NovaSeq (Illumina, США), генерирующего 800 миллионов парных прочтений на образец.

Таксономический анализ необработанных чтений в результате первого запуска привел к идентификации нескольких чтений, похожих на записи CoV, связанных с атипичной пневмонией. Было выдвинуто предположение, что амплификация геномных фрагментов CoV, связанных с атипичной пневмонией, с помощью пулов праймеров из этого набора может улучшить результат получения хотя бы частичного генома обнаруженных CoV, но амплификация во время подготовки библиотеки не увенчалась успехом.

Затем использовались более длинные 2 фрагмента кДНК (2×300 п.н.) для третьей попытки подготовки комплексной метагеномной библиотеки и секвенирования ее с генерацией 40 миллионов парных чтений на образец. В полученных необработанных чтениях было больше идентифицированных прочтений, похожих на записи «Coronaviridae». Однако к сборке полезных контигов это не привело. По данным поиска BLAST в базе данных NCBI Viruses есть записи о связанных с SARS CoV и HCoV-OC43 контигов, которые на 89–100 % идентичны части собранных контигов. Но собранные контиги также похожи на другие, даже невирусные записи по своей длине, что не позволяет правильно выполнить поиск BLAST.

В соответствии с таксономической идентификацией необработанных и собранных метагеномных данных были идентифицированы *Бетакоронавирусы*, которые не связаны с SARS, поскольку в противном случае части SARS-подобных CoV будут амплифицированы во время подготовки библиотеки, нацеленной на их конкретные регионы.

В исследовании А. Babiker и соавт. [136] проведен скрининг SARS-CoV-2 и других респираторных вирусов в образцах людей с аналогичным дизайном исследования, включающий скрининг ОТ-ПЦР после метагеномного NGS положительных образцов с платформой MiSeq и аналогичной глубиной секвенирования (42 миллиона чтений на образец). Во всех случаях с помощью метагеномного NGS были обнаружены те же вирусы, что и с помощью ОТ-ПЦР. Минимальное количество считываний SARS-CoV-2 из данных NGS на один образец, обнаруженный с помощью инструмента для анализа метагеномных данных KraenUniq, составило 27, что позволило собрать как минимум 6 участков генома из образца с наименее обнаруженными прочтениями SARS-CoV-2.

В диссертационном исследовании были обнаружены считывания различных видов CoV, что позволило предположить: количество чтений на образец из данных NovaSeq и MiSeq было относительно низким для правильной сборки геномов CoV.

В исследовании J. M. Crook и соавт. [135] также проводили поиск CoV у летучих мышей, однако использовали только метагеномное NGS из 2 фрагментов кДНК размером (2×150 п.н.) с MiSeq и более длинные фрагменты кДНК с Oxford nanopore GridION (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Самый крупный одиночный контиг, идентифицированный как часть генома CoV и собранный на основе данных MiSeq, составлял ~ 7 кб, тогда как в данном исследовании самый большой контиг составлял $\sim 1,2$ кб. Согласно полученным данным, можно предположить, что концентрация РНК способна влиять на результаты метагеномного NGS. Однако мы не можем сравнивать концентрацию РНК, полученную в диссертационном исследовании и в исследовании J. M. Crook и соавт., поскольку авторы не предоставили соответствующих данных.

Одним из возможных способов изучения филогенетики CoV является амплификация длинных фрагментов кДНК с помощью ПЦР после капиллярного секвенирования, как описано в исследованиях D. Lelli и соавт. [74] и S. Watanabe и

соавт. [38]. Следует отметить, что этот подход также не является лучшим вариантом, поскольку некоторые CoV не могут быть обнаружены с помощью ПЦР. Например, С. Kohl и соавт. [184] сообщили, что в своем исследовании метагеномный NGS идентифицировал CoV летучих мышей, которые не были обнаружены с помощью ПЦР.

Другие исследования включают образцы тканей, мочи, фекалий и даже экзопаразитов для скрининга CoV. В диссертационном исследовании не собирали и не использовали биопсию тканей или мочу у летучих мышей, чтобы не держать животных в неволе для отбора проб и не нарушать их естественную среду обитания. Образцы фекалий также не собирались, поскольку в некоторых случаях невозможно предсказать происхождение вида летучих мышей, которым принадлежали образцы, что приводит к некоторой неопределенности во время биостатистического анализа. Однако будущие исследования должны включать не только отбор мазков, но также тканей, мочи и фекалий для увеличения концентрации РНК. Кроме того, будущие исследования должны включать не только образцы различного происхождения, но и некоторые другие подходы, такие как капиллярное секвенирование амплифицированных генов CoV, поскольку метагеномное NGS следует использовать в качестве основного дополнительного метода для характеристики ранее неизвестных геномов CoV, что невозможно сделать с помощью ПЦР.

Подводя итог проделанной работе, можно сказать, что диссертационное исследование предоставляет первые данные об обнаружении CoV на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея. Полученные данные соответствуют аналогичным исследованиям, проведенным в других регионах и странах.

Метагеномное NGS-исследование не предоставило достаточных данных для подробной характеристики CoV, но в необработанных данных метагеномного NGS всех образцов с положительным результатом кПЦР были обнаружены считывания

Бетакоронавируса с помощью инструмента таксономической идентификации, что подтверждает результаты скрининга кПЦР.

Метаболиты кишечных *бактерий* *Lactococcus spp*, *Bacillus spp*, *Lysinibacillus spp*, *Lactobacillus spp*, *Virgibacillus spp*, *Weissella spp*, *Raoultella spp*, выделенные из ректальных мазков исследованных летучих мышей, имели антиоксидантную и промутагенную активность. Могут влиять на белки RecA и LexA через несколько механизмов:

1. Увеличение сродства RecA к одноцепочечной ДНК:
 - RecA играет ключевую роль в репарации ДНК и ответе на стресс. Он связывается с одноцепочечной ДНК, активируя рекомбинацию и репарацию;
 - Метаболиты бактерий могут изменять структуру или доступность одноцепочечной ДНК, что способствует более эффективному связыванию RecA. Например, короткоцепочечные жирные кислоты, такие как бутират, могут влиять на экспрессию генов и стабильность ДНК.
2. Взаимодействие с LexA:
 - LexA — это репрессорный белок, который регулирует экспрессию генов SOS-ответа. Его автокаталитический протеолиз активируется в условиях стресса;
 - Метаболиты бактерий могут ускорять этот процесс, изменяя конформацию LexA или влияя на его взаимодействие с ДНК. Например, некоторые метаболиты могут действовать как сигнальные молекулы, активируя протеолитические пути.
3. Возможные метаболиты:
 - Короткоцепочечные жирные кислоты (уксусная, пропионовая, масляная): они могут влиять на экспрессию генов, связанных с репарацией ДНК;
 - Антиоксиданты и другие вторичные метаболиты: они могут снижать окислительный стресс, что уменьшает повреждение ДНК и потребность в репарации.

4. Экологическая роль:

– Летучие мыши живут в условиях высокого стресса (например, ограниченное питание, инфекционные агенты). Их кишечная микробиота может адаптироваться, вырабатывая метаболиты, которые поддерживают стабильность генома и устойчивость к окислительному стрессу.

Можно предположить, что метаболиты бактерий *Lactococcus spp*, *Bacillus spp*, *Lysinibacillus spp*, *Lactobacillus spp*, *Virgibacillus spp*, *Weissella spp*, *Raoultella spp* в кишечнике летучих мышей участвуют в формировании их устойчивости к CoV, так как активируют антиоксидантные реакции и способствуют SOS-ответу в клетках летучих мышей. Также установлено, что метаболиты бактерий *Lactococcus spp*, *Bacillus spp*, *Lysinibacillus spp*, *Lactobacillus spp*, *Virgibacillus spp*, *Weissella spp*, *Raoultella spp* могут способствовать мутациям CoV.

Обнаруженные свойства отобранных штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL из фекалий летучих мышей вида рыжая вечерница могут благоприятно влиять на местный иммунитет кишечника летучих мышей ввиду образования биопленок и бактериоцинов, что, вероятно, повышает устойчивость клеток к CoV. При этом штаммы *E. faecium* ST01TL и ST76TL являются довольно устойчивыми к физическим и химическим факторам.

Таким образом, можно утверждать, что метаболиты кишечной микробиоты летучих мышей способствует формированию, с одной стороны, местного иммунитета кишечника летучих мышей, а с другой – промутагенных условий для появления эмерджентных CoV и их дальнейшего выделения в окружающую среду. Более того, летучие мыши, обитающие в одном ареале, имеют способность к горизонтальной передаче бактерий. Из-за этого возможно формирование однородной бактериальной микробиоты кишечника среди колонии летучих мышей, что потенцирует их общую устойчивость к CoV.

Риск переноса CoV инфекции от летучих мышей другим животным на территории Ростовской области, и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея определён по нескольким факторам:

- Незначительное видовое разнообразие летучих мышей;
- Низкая плотность колоний летучих мышей;
- Большинство летучих мышей обитает вдали от населенных пунктов, что минимизирует контакт с людьми, сельскохозяйственными животными и синантропами;
- Сезонность;
- Носительство CoV рода *Бетакоронавирус* у меньшинства летучих мышей, но с вероятностью появления новых штаммов;
- Ретроспективно по данным Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) в Ростовской области, Краснодарском и Ставропольском краях, а также в Республике Адыгея не зафиксировано вспышек CoV инфекции среди животных.

Сочетание этих факторов создает такие эпизоотологические условия, при которых риск передачи CoV от летучих мышей другим животным или человеку остается стохастическим, так как возможны различные по вирулентности и устойчивости во внешней среде свойства новых штаммов CoV рода *Бетакоронавирус*. При этом мониторинг CoV у летучих мышей на больших территориях является трудозатратным и экономически нецелесообразным из-за сложности сбора биоматериала, влияния сезонности, проведения молекулярно-генетических исследований, потенциального нарушения колоний летучих мышей.

ВЫВОДЫ

1. Не выявлено различий в концентрации РНК CoV в мазках из ротоглотки и прямой кишки. Не установлено влияния вида летучих мышей, происхождения мазка, пола или места сбора образцов на обнаружение РНК CoV.

2. Установлена превалентность CoV в 3,3 % у исследуемых летучих мышей на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея в период сбора биоматериала. CoV обнаружены у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь (2 самца), поздний кожан (самец и самка), малый подковонос (самка), обитающих в Краснодарском крае и в Республике Адыгея при проведении кПЦР (HRM-анализа) с использованием панкоронавирусного праймера.

3. Метагеномным исследованием с применением секвенирования обнаружены участки *Бетакоронавируса* с помощью таксономической идентификации у CoV среди летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан, малый подковонос, обитающих в Краснодарском крае и в Республике Адыгея. Таким образом, обнаруженные CoV могут являться потенциальными возбудителями CoV инфекций животных и человека.

4. Не обнаружено SARS-подобных CoV среди летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан, малый подковонос, обитающих в Краснодарском крае и в Республике Адыгея.

5. Установлено, что метаболиты кишечных бактерий *Lactococcus spp*, *Bacillus spp*, *Lysinibacillus spp*, *Lactobacillus spp*, *Virgibacillus spp*, *Weissella spp*, *Raoultella spp* у исследуемых летучих мышей участвуют в формировании их устойчивости к CoV, так как активируют антиоксидантные и ДНК-репаративные реакции в клетках летучих мышей, но также способствуют и мутациям CoV.

6. Выявлено, что штаммы *E. faecium* ST01TL и ST76TL способны за счёт синтеза бактериоцинов и образования биоплёнок нивелировать патогенные факторы CoV, что, вероятно, ассоциировано с неманифестными формами CoV инфекции у летучих мышей.

7. Расширен инструментарий ветеринарно-санитарного мониторинга CoV у летучих мышей. Полученные данные о распространённости CoV у исследуемых летучих мышей на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея не позволяют разработать целевые противоэпизоотические меры, ввиду обнаруженной промутагенной активности микробиот-зависимых метаболитов, а также способностью бактериоциногенными штаммами *E. faecium* ST01TL и ST76TL формировать местный иммунитет кишечника у летучих мышей как фактора их устойчивости к CoV, что создаёт условия для переноса CoV инфекции в окружающей среде.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для получения более высокой концентрации РНК CoV и достоверных данных об особенностях CoV инфекции необходимо исследовать не только орофарингеальные и ректальные мазки летучих мышей, но и отбирать образцы тканей, мочи, фекалий.
2. С целью характеристики ранее неизвестных геномов CoV у летучих мышей следует использовать вырожденные пары праймеров и в качестве основного метода – метагеномный NGS-анализ, а также капиллярное секвенирование амплифицированных генов CoV.
3. Проведение целевых противоэпизоотических мер в отношении CoV у летучих мышей на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея нецелесообразно ввиду неопределяемого риска их межвидовой передачи и потенциального нарушения колоний летучих мышей.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В рамках диссертационной работы были изучены особенности бактериальной микробиоты летучих мышей и её возможное влияние на носительство CoV потенциально патогенных для животных и человека.

Для последующего изучения CoV у летучих мышей в качестве биоматериала необходимо отбирать, помимо ректальных, орофаренгеальных мазков и образцов кала, дополнительно: кровь, мочу, образцы тканей в скученных поселениях летучих мышей, поскольку в подобных случаях вероятность выделения CoV будет выше. Это позволит получить наиболее точные данные о тропизме CoV и особенностях инфекционного процесса у летучих мышей.

Возможно изучение бактериоциногенных штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL в качестве пробиотиков в аспекте формирования ими местного иммунитета у летучих мышей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – пищеварительный тракт

ИФА – иммуноферментный анализ

кДНК – комплементарная ДНК

кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой

РНК – рибонуклеиновая кислота

ВCoV – коронавирусная инфекция летучих мышей

ССoV – коронавирусная инфекция собак

CoV – коронавирус, семейство коронавирусов

CoV инфекция – коронавирусная инфекция

COVID-19 – коронавирусная инфекция 2019 года

CRCoV – коронавирусная инфекция собак с респираторным синдромом

E. coli – кишечная палочка

E. faecium – фекальные энтерококки

FCoV – коронавирусная инфекция кошек

FECV – коронавирусная инфекция кошек, протекающая в виде кишечной инфекции

HKU4-CoV, HKU5-CoV – коронавирусы летучих мышей

HRM-анализ – анализ кривых плавления

IBV – вирус инфекционного бронхита

katG – ген, кодирующий фермент каталазу-пероксидазу

L. monocytogenes – возбудитель листериоза

MERS – ближневосточный респираторный синдром

MHV – вирус мышиноного гепатита

MRS – агар (среда для культивирования лактобацилл)

NGS – секвенирование нового поколения

PBS – фосфатно-солевой буфер

RAD51 — белок, кодируемый геном RAD51

RecA, LexA – регуляторы SOS-ответа бактериальной клетки

SARS-CoV – тяжелый острый респираторный синдром, вызванный коронавирусом

SARS-CoV-2 – тяжелый острый респираторный синдром, вызванный коронавирусом

2

SOS-ответ – репаративный механизм при повреждении ДНК

TGEV – коронавирусная инфекция свиней

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Геномика и эволюция вирусных патогенов, вызывающих наиболее распространенные респираторные заболевания / О. В. Охлопкова, К. А. Столбунова, М. А. Степанюк [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2023. – № 4. – С. 6 – 9.
2. Костарев, С. Н. Моделирование зоонозной передачи коронавирусов / С. Н. Костарев, Т. Г. Середа // Зоотехнический вестник Пермского института ФСИН России. – 2024. – Т. 4, № 5. – С. 40 – 46.
3. Коронавирусная инфекция кошек: геномика и эпизоотология / Е. В. Ткачева, М. Ю. Вакуленко, И. В. Попов [и др.] // Ветеринарная патология. – 2023. – Т. 22, № 3. – С. 25 – 31.
4. Синантропные и домашние животные как резервуар коронавирусов / Т.А. Липилкина, С.Н. Головин, Попов И.В. [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2022. – № 5.
5. A cluster of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among patients arriving in Europe from the Horn of Africa: a molecular epidemiological study / T.M. Walker, M. Merker, A.M. Knoblauch [et al.] // *The Lancet. Infectious diseases*. – 2018. – Vol. 18, N 4 – P. 431 – 440.
6. A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic / M.T. Holden, L.Y. Hsu, K. Kurt [et al.] // *Genome Research*. – 2013. – Vol. 23, N 4. – P. 653 – 664.
7. A mathematical model for simulating the phasebased transmissibility of a novel coronavirus / T.M. Chen, J. Rui, Q.P. Wang [et al.] // *Infectious Diseases of Poverty*. – 2020. – Vol. 9, N 1. – P. 2 – 7.
8. A metaanalysis of bat phylogenetics and positive selection based on genomes and transcriptomes from 18 species / J.A. Hawkins, M.E. Kaczmarek, M.A. Muller [et al.] // *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. – 2019. – Vol. 116, N 23. – P. 11351 – 11360.

9. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. / K.H. Dinno, S.R. Leist, A. Schäfer [et al.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 586, N 7830. – P. 560 – 566.
10. A Mouse-Adapted SARS-CoV-2 Induces Acute Lung Injury and Mortality in Standard Laboratory Mice. / S.R. Leist, K.H. Dinno, A. Schäfer [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 183, N 4. – P. 1070 – 1085.
11. A novel α -galactosidase from the thermophilic probiotic *Bacillus coagulans* with remarkable protease-resistance and high hydrolytic activity / R. Zhao, R. Zhao, Y. Tu [et al.] // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13, N 5. – P. 2 – 12.
12. A pancoronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses / L. Vijgen, E. Moës, E. Keyaerts [et al.] // *Methods in Molecular Biology*. – 2008. – Vol. N 454. – P. 3 – 12.
13. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin / P. Zhou, X.L. Yang, X.G. Wang [et al.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 579. – P. 270 – 273.
14. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence / V.D. Menachery, B.L. Yount, K. Debbink [et al.] // *Nature Medicine*. – 2015. – Vol. 21. – P. 1508 – 1510.
15. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. / M.D Vineet., B.L. Yount, K. Debbink [et al.] // *Nature medicine*. – 2015. – Vol. 21, N 12. – P. 1511 – 1513.
16. A serological survey of SARS-CoV-2 in cat in Wuhan / Q. Zhang, H. Zhang, J. Gao [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2020. – Vol. 9, N 1. – P. 2013 – 2019.
17. Absence of SARS-CoV-2 infection in cats and dogs in close contact with a cluster of COVID-19 patients in a veterinary campus / S. Temmam, A. Barbarino, D. Maso [et al.] // *One Health*. – 2020. – Vol. 10. – P. 100164.

18. ace, Which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by Ers and is involved in virulence / F. Lebreton, E. Riboulet-Bisson, P. Serror [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2009. – Vol. 77, N 7. – P. 2832 – 2839.
19. ACE2 receptor usage reveals variation in susceptibility to SARS-CoV and SARS-CoV-2 infection among bat species / H. Yan, H. Jiao, Q. Liu [et al.] // *Nature Ecology & Evolution*. – 2021. – Vol. 5. – P. 600 – 608.
20. Addie, D.D. Feline infectious peritonitis: answers to frequently asked questions concerning FIP and coronavirus / D.D. Addie // *Veterinary Nursing Journal*. – 2019. – Vol. 34, N 8. – P. 201 – 206.
21. *Advances in Applied Biotechnology: Proceedings of the 2nd International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2014)* / Z. Tan, J. Luo, F. Liu [et al.] // – Springer. – 2015. – Vol. 2. – P. 305 – 312.
22. Alphacoronaviruses and Paramyxoviruses Cocirculate with Type 1 and Severe Acute Respiratory System (SARS)-Related Betacoronaviruses in Synanthropic Bats of Luxembourg / M. Pauly, J.B. Pir, C. Loesch [et al.] // *Applied and environmental microbiology*. – 2017. – Vol. 83, N 18. – P. 1326 – 1317.
23. Alpízar, P. Agricultural fast food: bats feeding in banana monocultures are heavier but have less diverse gut microbiota / P. Alpízar, A. Risely, M. Tschapka, S. Sommer // *Frontiers in Ecology and Evolution*. – 2021. – Vol. 9. – P. 746783.
24. Analysis of the occurrence and molecular characteristics of drug-resistant strains of *Enterococcus faecalis* isolated from the gastrointestinal tract of insectivorous bat species in Poland: A possible essential impact on the spread of drug resistance? / A. Nowakiewicz, P. Zięba, S. Gnat [et al.] // *Environmental Pollution*. – 2021. – Vol. 269. – P. 116099.
25. Anthropogenic Infection of Cats during the 2020 COVID-19 Pandemic. / M.J. Hosie, R. Hofmann-Lehmann, K. Hartmann [et al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, N 2. – P. 185.

26. Anthropogenic noise alters bat activity levels and echolocation calls / J.P. Bunkley, C.J.W. McClure, N.J. Kleist [et al.] // *Global Ecology and Conservation*. – 2015. – Vol. 3. – P. 62 – 71.
27. Antibiotic resistance in probiotic bacteria / M. Gueimonde, B. Sánchez, C. de los Reyes-Gavilán [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2013. – Vol. 4, N 202.
28. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture / E. Muñoz-Atienza, B. Gómez-Sala, C. Araújo [et al.] // *BMC Microbiology*. – 2013. – Vol. 13, N 15. – P. 1 – 22.
29. Antimicrobial peptides (bacteriocins) produced by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus* strains with activity against clinical and food-borne pathogens / G.H. Choi, J.I.I. Fugaban, C.M. Dioso [et al.] // *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. – 2025. – Vol. 17, N 3. – P. 1171 – 1192.
30. Arbulu, S. Revisiting the multifaceted roles of bacteriocins: the multifaceted roles of bacteriocins / S. Arbulu, M. Kjos // *Microbial Ecology*. – 2024, - Vol. 87, N 41.
31. Assessment of Bacteriocin-Antibiotic Synergy for the inhibition and Disruption of Biofilms of *Listeria monocytogenes* and Vancomycin-Resistant *Enterococcus* / J.I.I. Fugaban, J.E. Vazquez Bucheli, S.D. Todorov [et al.] // *Microbiology Research*. – 2022. – Vol. 13, N 3. – P. 480 – 499.
32. Assessment of the safety and anti-inflammatory effects of three *Bacillus* strains in the respiratory tract / H.-S. Kim, K. Arellano, H. Park [et al.] // *Environmental Microbiology*. – 2021. – Vol. 23, N 6. – P. 3077 – 3098.
33. *Bacillus* Strains isolated from Korean Fermented Food Products with Antimicrobial Activity Against Staphylococci, an Alternative for Control of Antibiotic-Resistant Pathogens / J. Ye, J.I.I. Fugaban, C.M. Dioso [et al.] // *Foodborne Pathogens and Disease* – 2023. – Vol. 20, N 7. – P. 279 – 293.

34. Bacteriocinogenic anti-listerial properties and safety assessment of *Enterococcus faecium* and *Lactococcus garvieae* strains isolated from Brazilian artisanal cheesemaking environment / J.M.S. Lima, K.O. Carneiro, S.D. Todorov [et al.] // *Journal of Applied Microbiology*. – 2024. – Vol. 135, N 7. – P. 159.
35. Bacteriocinogenic *Bacillus* spp. isolated from Korean fermented cabbage (Kimchi) – beneficial or hazardous? / J.I.I. Fugaban, J.E. Vazquez Bucheli, W.H. Holzapfel [et al.] // *Fermentation*. – 2021. – Vol. 7, N 2. – P. 1– 6.
36. Bacteriocins: properties and potential use as antimicrobials / A. Darbandi, A. Asadi, M. Mahdizade Ari [et al.] // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. – 2022. – Vol. 36, N 1. – P. 24093.
37. Bagde, P. Improving the stability of bacteriocin extracted from *Enterococcus faecium* by immobilization onto cellulose nanocrystals / P. Bagde, N. Vigneshwaran // *Carbohydrate polymers*. – 2019. – Vol. 209. – P. 172 – 180.
38. Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines / S. Watanabe, J.S. Masangkay, N. Nagata [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 16, N 8. – P. 1217 – 1223.
39. Bat coronaviruses in China / Y. Fan, K. Zhao, Z.L. Shi [et al.] // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11, N 3. – P. 2 – 10.
40. Bat flight and zoonotic viruses / T.J. O’Shea, P.M. Cryan, A.A. Cunningham [et al.] // *Emerging infectious diseases*. – 2014. – Vol. 20, N 5. – P. 741 – 745.
41. Bat-borne virus diversity, spillover and emergence / M. Letko, S.N. Seifert, K.J. Olival [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. – 2020. – Vol. 18, N 8. – P. 461 – 471.
42. Bat-borne viruses in Africa: a critical review / W. Markotter, J. Coertse, L. de Vries [et al.] // *Journal of zoology*. – 2020. – Vol. 311, N 2. – P. 77 – 98.
43. Bats (Mammalia, Chiroptera) and bat flies (Diptera, Streblidae) from the Cazumba-Iracema and Chico Mendes Reserve, Western Brazilian Amazon / S.A. Pena,

A.B. Alencastre-Santos, J.B. da Silva [et al.] // *Parasitology research*. – 2023. – Vol. 122, N 2. – P. 451 – 459.

44. *Bergey's manual of systematic bacteriology* / P. De Vos, G.M. Garrity, D. Jones [et al.] // *The firmicutes*. – 2009. – Vol. 3. – P. 594 – 607.

45. Bhagwat, A. In vitro assessment of metabolic profile of Enterococcus strains of human origin / A. Bhagwat, U.S. Annapure // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. – 2019. – Vol. 17, N 1.

46. Blumenberg, M. The Genus Enterococcus and Its Associated Virulent Factors / M. Blumenberg, M. Shaaban, A. Elgami // *Microorganisms*. – 2019. – P. 109 – 130.

47. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria / S. Todorov, M. Botes, C. Guigas [et al.] // *Journal of Applied Microbiology*. – 2008. – Vol. 104, N 2. – P. 465 – 477.

48. Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates / J. Damas, G.M. Hughes, K.C. Keough [et al.] // *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. – 2020. – Vol. 117, N 36. – P. 22311 – 22322.

49. Bunkley, J.P. Noise Reduces Foraging Efficiency in Pallid Bats (*Antrozous pallidus*) / J.P. Bunkley, J.R. Barber // *Ethology*. – 2015. – Vol. 121, N 11. – P. 1116–1121.

50. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells / D. Granato, F. Perotti, I. Masserey [et al.] // *Applied and Environmental microbiology*. – 1999. – Vol. 65, N 3. – P. 1071 – 1077.

51. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats milk cheeses/ A.M. Martín-Platero, E. Valdivia, M. Maqueda [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2009. – Vol. 132, N 1. – P. 24 – 32.

52. Characterization and safety evaluation of two beneficial, enterocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from kimchi, a Korean fermented cabbage / S.J.D. Valledor, C.M. Dioso, J.E.V. Bucheli [et al.] // *Food Microbiology*. – 2022. – Vol. 102. – P. 2 – 4.
53. Characterization and safety evaluation of two beneficial, enterocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from kimchi, a Korean fermented cabbage / S.J.D. Valledor, C.M. Dioso, J.E.V. Bucheli [et al.] // *Food Microbiology*. – 2022. – Vol. 102. – P. 4 – 7.
54. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81 / I. Ivanova, V. Miteva, Ts. Stefanova [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 1998. – Vol. 42, N 3. – P. 147 – 58.
55. Characterization of partially purified bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains isolated from soybean paste active against *Listeria* spp. and vancomycin-resistant enterococci / J.I.I. Fugaban, J.E. Vazquez Bucheli, W.H. Holzapfel [et al.] // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9, N 5. – P. 1085.
56. Characterization of probiotic strains: an application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni* / C. Santini, L. Baffoni, F. Gaggia, [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2010. – Vol. 141, N 1. – P. 98 – 108.
57. Co-existence of physiologically similar sulfate-reducing bacteria in a full-scale sulfidogenic bioreactor fed with a single organic electron donor / S.A. Dar, A.J. Stams, J.G. Kuenen [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2007. – Vol. 75, N 6. – P. 1463 – 1472.
58. Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity / G. Zhang, C. Cowled, Z. Shi [et al.] // *Science*. – 2013. – Vol. 339, N 6118. – P. 456 – 460.

59. Comparative analysis of the gut microbiota of bat species with different feeding habits / D.A. Mena Canata, M.S. Benfato, F.D. Pereira [et al.] // *Biology*. – 2024. – Vol. 13, N 6. – P. 363.
60. Composition of the Common Noctule (*Nyctalus noctula*) Gut Microbiota Determined by Bacteriological Analysis and High-Throughput 16S rRNA Gene Sequencing / I. Popov, I. Donnik, T. Lipilkina [et al.] // *Microbiology*. – 2024. – Vol. 93, № 6. – P. 916-920.
61. Concomitant production of lipase, protease and enterocin by *Enterococcus faecium* NCIM5363 and *Enterococcus durans* NCIM5427 isolated from fish processing waste / V. Ramakrishnan, B. Balakrishnan, A.K. Rai [et al.] // *International Aquatic Research*. – 2012. – Vol. 4, N 14. – P. 1 – 14.
62. Consideration of the Aerosol Transmission for COVID-19 and Public Health. / E.L. Anderson, P. Turnham, R.J. Griffin [et al.] // *Risk Analysis*. – 2020. – Vol. 40, N 5. – P. 902–907.
63. Coronavirus Infections of Animals: Future Risks to Humans / I.M. Donnik, M.L. Chikindas, AM. Ermakov [et al.] // *Biology bulletin of the Russian Academy of Sciences*. – 2021. – Vol. 48, N 1. – P. 26–37.
64. Coronaviruses Detected in Brazilian Wild Birds Reveal Close Evolutionary Relationships with Beta- and Deltacoronaviruses Isolated From Mammals / R. Durães-Carvalho, L.C. Caserta, A.C. Barnabé [et al.] // *Journal of molecular evolution*. – 2015. – Vol. 81, N 1–2. – P. 21–23.
65. COVID-19 and threats to bats / M.B. Fenton, S. Mubareka, S.M. Tsang [et al.] // *Facets*. – 2020. – Vol. 5, N 1. – P. 349–352.
66. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes” / J.A. Frank, C.I. Reich, S. Sharma [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2008. – Vol. 74, №8. – P. 2461 – 2470.

67. Cui, J. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses / J. Cui, F. Li, Z.L. Shi // *Nature reviews. Microbiology*. – 2019. – Vol. 17, N 3. – P. 181–192.
68. de las Rivas, B. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines / B. de las Rivas, A. Marcobal, R. Muñoz // *FEMS Microbiology Letters*. – 2005. – Vol. 244, N 2. – P. 367–372.
69. Decaro, N. Canine Coronavirus: Not Only an Enteric Pathogen / N. Decaro, C. Buonavoglia // *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. – 2011. – Vol. 41, N 6. – P. 1121 – 1132.
70. Decaro, N. Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): a lesson from animal coronaviruses / N. Decaro, A. Lorusso // *Veterinary microbiology*. – 2020. – Vol. 244.
71. Decaro, N. Recombinant canine coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus of Swine are circulating in dogs / N. Decaro, V. Mari, M. Campolo // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83, N 3.– P. 1532–1537.
72. Detection and Genome Sequencing of SARS-CoV-2 in a Domestic Cat with Respiratory Signs in Switzerland / J. Klaus, M.L. Meli, B. Willi [et al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, N 3. – P. 496.
73. Detection of alpha- and betacoronaviruses in rodents from Yunnan, China / X.Y. Ge, W.H. Yang, J.H. Zhou [et al.] // *Virology Journal*. – 2017. – Vol. 14, N 98. – P. 2 – 10.
74. Detection of coronaviruses in bats of various species in Italy. / D. Lelli, A. Papetti, C. Sabelli [et al.] // *Viruses*. – 2013. – Vol. 5, №11. – P. 2679 – 2689.
75. Detection of coronaviruses in insectivorous bats of Fore-Caucasus, 2021. / I.V. Popov, O.V. Ohlopkova, I.M. Donnik, [et al.] // *Scientific reports*. – 2023. – Vol. 13, N 1. – P. 2306.
76. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium* / V. Vankerckhoven, T. Van Autgaerden, C.

Vael [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2004. – Vol. 42, №10. – P. 4473 – 4479.

77. Diard, M. Evolution of bacterial virulence / M. Diard, W.D. Hardt // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2017. – Vol. 41, N 5. – P. 679 – 697.

78. Discovery and Sequence Analysis of Four Deltacoronaviruses from Birds in the Middle East Reveal Interspecies Jumping with Recombination as a Potential Mechanism for Avian-to-Avian and Avian-to-Mammalian Transmission / S. Lau, E. Wong, C.C. Tsang [et al.] // *Journal of virology*. – 2018. – Vol. 92, N 15. – P. 265–318.

79. Discovery of novel bat coronaviruses in South China that use the same receptor as Middle East respiratory syndrome coronavirus / C.-M. Luo, N. Wang, X.-L. Yang [et al.] // *Journal of virol*. – 2018. – Vol. 92, №13 – P.116 – 118.

80. Distribution of bat-borne viruses and environment patterns. *Infection* / A. Afelt, A. Lacroix, U. Zawadzka-Pawlewska [et al.] // *Infection, genetics and evolutionary genetics in infectious diseases*. – 2018. – Vol. 58. – P. 181–191.

81. Dixon, M.D. Relationship between land cover and insectivorous bat activity in an urban landscape / M.D. Dixon // *Urban Ecosystems*. – 2012. – Vol. 15. – P. 683–695.

82. Do gastrointestinal microbiomes play a role in bats' unique viral hosting capacity? / D.N. Jones, N.A.F. Ravelomanantsoa, C.J. Yeoman [et al.] // *Trends in Microbiology*. – 2022. – Vol. 30, N 7. – P. 632 – 642.

83. Dolye, R. Measurement of microbial adhesion to hydrophobic substrates / R. Dolye, M. Rosenberg, // *Methods in Enzymology*. – 1995. – Vol. 253. – P. 542 – 550.

84. Dubin, K. Enterococci and their interactions with the intestinal microbiome / K. Dubin, E.G. Pamer, // *Microbiology Spectrum*. 2014. – Vol. 5, №6. – P. 1 – 9.

85. Duffy, S. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants / S. Duffy, L.A. Shackelton, E.C. Holmes. // *Nature Reviews Genetics*. – 2008. – Vol. 9, N 4. – P. 267–276.

86. Dutheil, F. Bats, Pathogens, and Species Richness / F. Dutheil, M. Clinchamps, J.-B. Bouillon-Minois // Pathogens. – 2021. – Vol. 10, N 2. – P. 98.
87. Elevated Plasmin(ogen) as a Common Risk Factor for COVID-19 Susceptibility. / H.L. Ji, R. Zhao, S. Matalon [et al.] // Physiological reviews. – 2020. – Vol. 100, N 3. – P. 1065 – 1075.
88. Elshaghabee, F.M. Mitigation of antibiotic resistance using probiotics, prebiotics and synbiotics. A review / F.M. Elshaghabee, N. Rokana // Environmental Chemistry Letters. – 2022. – Vol. 20. – P. 1295 – 1308.
89. Emergence of Pathogenic Coronaviruses in Cats by Homologous Recombination between Feline and Canine Coronaviruses / Y. Terada, N. Matsui, K. Noguchi [et al.] // PLoS ONE – 2014. – Vol. 9, N 9. – P. 3 – 5.
90. Emergence of Pathogenic Coronaviruses in Cats by Homologous Recombination between Feline and Canine Coronaviruses / Y. Terada, N. Matsui, K. Noguchi [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, N 9. – P. 1 – 2.
91. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spot include a novel RNA-dependent RNA polymerase variant / M. Pachetti, B. Marini, F. Benedetti [et al.] // Journal of Translational Medicine. 2020. – Vol. 18, N 179. – P. 2 – 8.
92. Evaluation cell surface hydrophobicity of four potential probiotics Lactic acid bacteria's isolated from local dairy products / F.J. Shalsh, N.A. Alrazzaq, D. Resan [et al.] // Pharmacy and Applied Health Sciences. – 2023. – Vol. 2. – P. 29 – 35.
93. Evaluation of a real-time RT-PCR panel for detection of SARS-CoV-2 in bat guano / Anis E., Turner G., Ellis C.J. [et al.] // Journal of veterinary diagnostic investigation. – 2021. – Vol. 33, N 2. – P. 331 – 335.
94. Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia / S. Wacharapluesadee, C.W. Tan, P. Maneerorn [et al.] // Nature Communications. – 2021. – Vol. 12, №1. – P. 972.

95. Evidence of Antimicrobial Resistance in Bats and Its Planetary Health Impact for Surveillance of Zoonotic Spillover Events: A Scoping Review / P. Devnath, N. Karah, J.P. Graham [et al.] // International journal of environmental research and public health. – 2022. – Vol. 20, N 1. – P. 2 – 15.
96. Evidence of exposure to SARS-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy / E.I. Patterson, G. Elia, A. Grassi [et al.] // Nature Communications. – 2020. – Vol. 11, N 1. – P. 6231.
97. Evolutionary arms race between virus and host drives genetic diversity in bat severe acute respiratory syndrome-related coronavirus spike genes / H. Guo, B.-J. Hu, X.-L. Yang [et al.] // Journal of virology. – 2020. – Vol. 94. – P. 2 – 13.
98. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic / M.F. Boni, P. Lemey, X. Jiang [et al.] // Nature Microbiology. – 2020. – Vol. 5, N 11. – P. 1408–1417.
99. Experimental Infection of Cattle with SARS-CoV-2 / L. Ulrich, K. Wernike, D. Hoffmann [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2020. – Vol. 26, №12.– P. 2979–2981.
100. Exploring beneficial/virulence properties of two dairy-related strains of *Streptococcus infantarius* subsp. *Infantarius* / K.M.O. dos Santos, C.R. de Matos, H.O. Salles [et al.] // Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2020. – Vol. 12, N 4. – P. 1524 – 1531.
101. Fecal microbiota of different reproductive stages of the central population of the lesser-long nosed bat, *Leptonycteris yerbabuenae* / O. Gaona, E.S. Gómez-Acata, D. Cerqueda-García [et al.] // PLoS One. – 2019. – Vol.14, N 7. – P. 0219982.
102. Feline infectious peritonitis (FIP) and coronavirus disease 19 (COVID-19): Are they similar? / S.Paltrinieri, A. Giordano, A. Stranieri [et al.] // Transboundary and emerging diseases. – 2020. – Vol. 68, N 4. – P. 1786 – 1799.

103. Functional properties of *Lactobacillus mucosae* strains isolated from Brazilian goat milk / G.M.D. de Moraes, L.R. de Abreu, A.S. do Egito [et al.] // *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. – 2017. – Vol. 9, N 3. – P. 235 – 245.
104. Generation of a transgenic mouse model of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection and disease. / A.S. Agrawal, T. Garron, X. Tao [et al.] // *Journal of virology*. – 2015. – Vol. 89, N 7. – P. 3659–70.
105. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese / M. Domingos-Lopes, C. Stanton, P. Ross [et al.] // *Food Microbiology*. – 2017. – Vol. 63. – P. 178 – 190.
106. Genetic identification of bat species for pathogen surveillance across France / Y. Arnaout Z. Djelouadji, E. Robardet [et al.] // *PLoS One*. – 2022. – Vol. 17, N 1. – P. 0261344.
107. Genome-scale rates of evolutionary change in bacteria / S. Duchene, K.E. Holt, F.X. Weill [et al.] // *Microbial Genomics*. – 2016. – Vol.2, N 11. – P. 000094.
108. Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats / D. Hu, C. Zhu, L. Ai [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2018. – Vol. 7, N 154.
109. Global diversity of enterococci and description of 18 previously unknown species / J.A. Schwartzman, F. Lebreton, R. Salamzade [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2024. – Vol. 121, N 10. – P. 2310852121.
110. Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli / W.P. Charteris, P.M. Kelly, L. Morelli [et al.] // *Journal of Food Protection*. – 2001. – Vol. 64, N 12. – P. 2007 – 2014.
111. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance / G. Aquilina, G. Bories, A. Chesson [et al.] // *EFSA*. – 2012. – Vol. 10, N 6. – P. 2740.

112. Gut microbiota composition of insectivorous synanthropic and fructivorous zoo bats: a direct metagenomic comparison / I.V. Popov, I.V. Popov, A.A. Krikunova [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, N 24. – P. 17301.

113. Habitat fragmentation is associated with dietary shifts and microbiota variability in common vampire bats / M.R. Ingala, D.J. Becker, J. Bak Holm [et al.] // *Ecology and Evolution*. – 2019. – Vol. 9, N 11. – P. 6518 – 6521.

114. Habitat fragmentation is associated with dietary shifts and microbiota variability in common vampire bats / M.R. Ingala, D.J. Becker, J. Holm Bak [et al.] // *Ecology and Evolution*. – 2019. – Vol. 9, N 11. – P. 6508-6515.

115. Hazuchova, K. Usefulness of acute phase proteins in differentiating between feline infectious peritonitis and other diseases in cats with body cavity effusions. / K. Hazuchova, S. Held, R. Neiger // *Journal of Feline Medicine Surgery*. – 2017. – Vol. 19, N 8. – P. 809–816.

116. High prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in pets from COVID-19+ households / M. Fritz, B. Rosolen, E. Krafft [et al.] // *One Health*. – 2021. – Vol, N 11. – P. 100192.

117. Holmes, E.C. The evolutionary genetics of emerging viruses / E. C. Holmes // *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. – 2009. – Vol. 40, N 1. – P. 353-372.

118. Homologous recombination within the spike glycoprotein of the newly identified coronavirus may boost cross-species transmission from snake to human / W. Ji, W. Wang, X. Zhao [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2020. – Vol.92, N 4. – P. 433–440.

119. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals / K.J Olival, P.R. Hosseini, C. Zambrana-Torrel [et al.] // *Nature*. – 2017. – Vol. 546, N 7660. – P. 646–650.

120. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin / A. Monteagudo-Mera, L. Rodríguez-Aparicio, J. Rúa [et al.] // *Journal of Functional Foods*. – 2012. – Vol. 4, N 2. – P. 531 – 541.
121. Infection of dogs with SARS-CoV-2 / T.H.C. Sit, C.J. Brackman, S.M. Ip [et al.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 586, N 7831. – P. 776–778.
122. IS element IS16 as a molecular screening tool to identify hospital-associated strains of *Enterococcus faecium* / G. Werner, C. Fleige, U. Geringer [et al.] // *BMC Infection Disease*. – 2011. – Vol. 11, N 80.
123. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor / X.Y. Ge, J.L. Li, X.L. Yang [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 503. – P. 535–537.
124. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor / X.-Y. Ge, J.-L. Li, X.-L. Yang [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 503. – P. 538.
125. Khailany, R.A. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2 / R.A. Khailany, M. Safdar, M. Ozaslan // *Gene Reports*. – 2020. – Vol. 19, N 100682.
126. King A.M.Q. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses.* / King A.M.Q., Lefkowitz E, Adams M.J. [et al.] / Elsevier/Academic Press. – 2012. – P. 806 – 828.
127. Klite, P.D. Intestinal bacterial flora and transit time of three neotropical bat species / P.D. Klite // *Journal of Bacteriology*. – 1965. – Vol. 90, N 2. – P. 375–379.
128. Kuo, L. Functional analysis of the murine coronavirus genomic RNA packaging signal / L. Kuo, P.S. Masters // *Journal of Virology*. – 2013. – Vol. 87, N 9. – P. 5182 – 5192.
129. Lai, M.C. *The Molecular Biology of Coronaviruses* / M.C. Lai, D. Cavanagh // *Advances in Virus Research* – 1997. – Vol. 48. – P. 3–76.

130. Li, C. Genetic evolution analysis of 2019 novel coronavirus and coronavirus from other species / C. Li, Y. Yang, L. Ren // *Infection, genetics and evolution*. – 2020. – Vol. 82. – P. 2 – 3.
131. Long, G.H. How can immunopathology shape the evolution of parasite virulence? / G.H. Long, M. Boots // *Trends in parasitology*. – 2011. – Vol. 27. – P. 300–305.
132. Łukaszuk, E. Occurrence and Role of Selected RNA-Viruses as Potential Causative Agents of Watery Droppings in Pigeons / E. Łukaszuk, T. Stenzel // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9, N 12. – P. 1025.
133. Mammalian Lipopolysaccharide Receptors Incorporated into the Retroviral Envelope Augment Virus Transmission / J. Wilks, E. Lien, A.N. Jacobson [et al.] // *Cell Host & Microbe*. – 2015. – Vol. 18, N 4. – P.456-462.
134. Masters, P.S. The Molecular Biology of Coronaviruses / P.S. Masters // *Advances in Virus Research* – 2006. – Vol. 65. – P. 193–292.
135. Metagenomic identification of a new sarbecovirus from horseshoe bats in Europe / J. M. Crook, Murphy I., Carter D.P. [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, N 14723.
136. Metagenomic sequencing to detect respiratory viruses in persons under investigation for COVID-19 / A. Babiker, H.L. Bradley, V.D. Stittleburg [et al.] // *Journal in Clinical Microbiology*. – Vol. 59, N 1. – P. 1 – 5.
137. Microbial distribution and antibiotic susceptibility of bloodstream infections in different intensive care units / N. Duan, L. Sun, C. Huang [et al.] // *Frontiers in microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 792282.
138. Mittal, R. The flow physics of COVID-19 / R. Mittal, R. Ni, J. Seo // *Journal of Fluid Mechanics*. – 2020. – Vol. 894.
139. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes / D. Forni, R. Cagliani, M. Clerici [et al.] // *Trends in Microbiology*. – 2017. – Vol. 25, №1. – P. 35–48.

140. Mollentze, N. Viral zoonotic risk is homogenous among taxonomic orders of mammalian and avian reservoir hosts / N. Mollentze, D.G. Streicker // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2020. – Vol. 117, N 17. – P. 9423–9430.

141. Morawska, L. Airborne transmission of SARS-CoV-2: The world should face the reality. / L. Morawska, C. Junji // *Environment international*. – 2020. – Vol. 139. – P. 2 – 4.

142. Natural SARS-CoV-2 infections, including virus isolation, among serially tested cats and dogs in households with confirmed human COVID-19 cases in Texas, USA / S.A. Hamer, A. Pauvolid-Corrêa, I.B. Zecca [et al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, N 5.

143. Neher, R.A. Real-Time Analysis and Visualization of Pathogen Sequence Data. / R.A. Neher, Bedford T. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2018. – Vol. 56, N 11. – P. 00480–00518.

144. Nipah Virus Transmission from Bats to Humans Associated with Drinking Traditional Liquor Made from Date Palm Sap, Bangladesh, 2011-2014 / M.S. Islam, H.M. Sazzad, S.M. Satter [et al.] // *Emerging infectious diseases*. – 2016. – Vol. 22, N 4. – P. 664–670.

145. Occurrence of Antibodies against SARS-CoV-2 in the Domestic Cat Population of Germany / A. Michelitsch, D. Hoffmann, K. Wernike [et al.] // *Vaccines*. – 2020. – Vol. 8, N 4. – P. 772.

146. Origin and Evolution of the 2019 Novel Coronavirus / L. Zhang, F.-M. Shen, F. Chen [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 71, N 15. – P. 882–883.

147. Pathogenesis of SARS-CoV-2 in Transgenic Mice Expressing Human Angiotensin-Converting Enzyme 2. / R.D. Jiang, M.Q. Liu, Y. Chen [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 182, N 1. – P. 50–58.

148. Phylogenetic and phylogeographic mapping of the avian coronavirus spike protein-encoding gene in wild and synanthropic birds / Durães- R. Carvalho, L.C. Caserta, A.C. Barnabé [et al.] // *Virus Research*. – 2015. – Vol. 201. – P. 101–112.
149. Postbiotic production: harnessing the power of microbial metabolites for health applications / N. Prajapati, J. Patel, S. Singh [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2023. – Vol. 14, N 1306192.
150. Prather, A.K. Reducing transmission of SARS-CoV-2 / A.K. Prather, C.C. Wang, T.R. Schooley // *Science*. – 2020. – Vol. 368, N 6498. – P. 1422–1424.
151. Ramakrishnan, V. Combined effect of enterocin and lipase from *Enterococcus faecium* NCIM5363 against food borne pathogens: mode of action studies / V. Ramakrishnan, B. Narayan, P.M. Halami // *Current Microbiology*. – 2012. – Vol. 65, N 2. – P. 162 – 169.
152. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus / Y. Wan, J. Shang, R. Graham [et al.] // *Journal of Virology*. – 2020. – Vol. 94, N 7. – P. 00127–00120.
153. Receptor usage and cell entry of bat coronavirus HKU4 provide insight into bat-to-human transmission of MERS coronavirus / Y. Yang, L. Du, C. Liu [et al.] // *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. – 2014. – Vol. 111, N 34. – P. 12516–21.
154. Remarkable fungal biodiversity on northern Belgium bats and hibernacula / P. Becker, C. van den Eynde, F. Baert [et al.] // *Mycologia*. – 2023. – Vol. 115, N 4. – P. 484–498.
155. Risk factors for bat contact and consumption behaviors in Thailand; a quantitative study / K. Suwannarong, S. Chanabun, P. Kanthawee [et al.] // *BMC Public Health*. – 2020. – Vol. 20, N 841.
156. Roes, F.L. On the evolution of virulent zoonotic viruses in bats. / F.L. Roes // *Biological theor.* – 2020. – Vol. 15, N 4. – P. 223–225.

157. Rojas, M. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin / M. Rojas, F. Ascencio, P.L. Conway // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. – Vol. 68, N 5. – P. 2330 – 2336.
158. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins / C.M. Waters, M.H. Antiporta, B.E. Murray, G.M. Dunny [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2003. – Vol. 185, N 12. – P. 3613 – 3623.
159. Roos, S. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components / S. Roos, H. Jonsson // *Microbiology*. – 2002. – Vol. 148. – P. 433 – 442.
160. Routes of Hendra Virus Excretion in Naturally-Infected Flying-Foxes: Implications for Viral Transmission and Spillover Risk / D. Edson, H. Field, L. McMichael [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, N 10. – P. 0140670.
161. S. Le Poder, Feline and canine coronaviruses: Common genetic and pathobiological features / S. Le Poder // *Advances in Virology*. – 2011, N 1. – P.609465.
162. Saif, L.J. Bovine respiratory coronavirus / L.J. Saif, // *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. – 2010. – Vol. 26, N 2. – P. 349 – 364.
163. Saif, L.J. Comparative Pathogenesis of Bovine and Porcine Respiratory Coronaviruses in the Animal Host Species and SARS-CoV-2 in Humans. / L.J. Saif, K. Jung // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2020. – Vol. 58, N 8. – P. 01355 – 13620.
164. SARS-CoV-2 D614G variant exhibits efficient replication ex vivo and transmission in vivo. / Y.J. Hou, S. Chiba, P. Halfmann [et al.] // *Science*. – 2020. – Vol. 370, N 6523. – P. 1464–1468.
165. SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study / K. Schlottau, M. Rissmann, A. Graaf [et al.] // *The Lancet Microbe*. – 2020. – Vol. 1, N 5. – P. 218–220.

166. SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study / K. Schlottau, M. Rissmann, A. Graaf [et al.] // *The Lancet Microbe*. – 2020. – Vol. 1, N 5. – P. 221–225.
167. SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence / V.D. Menachery, BL.-Jr. Yount, A.C. Sims [et al.] // *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. – 2016. – Vol. 113, N 11. – P. 3048–3053.
168. Seasonal Changes in Gut Microbiota Diversity and Composition in the Greater Horseshoe Bat / G. Xiao, S. Liu, Y. Xiao [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 2247.
169. Seasonal dietary shifts alter the gut microbiota of avivorous bats: implication for adaptation to energy harvest and nutritional utilization / L. Gong, B. Liu, H. Wu [et al.] // *mSphere*. – 2021. – Vol. 6, N 4. – P. e0046721.
170. Stearns, S.C. *Evolution in Health and Disease* / S.C. Stearns, J.C. Koella // Oxford University Press. – 2010. – P. 128 – 129.
171. Surveillance and taxonomic analysis of the coronavirus dominant in pigeons in China / Q. Zhuang, S. Liu, X. Zhang, [et al.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2020. – Vol. 65, N 6. – P. 1981–1990.
172. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. / J. Shi, Z. Wen, G. Zhong [et al.] // *Science*. – 2020. – Vol. 368, N 6494. – P. 1016–1020.
173. Synchronized shift of oral, faecal and urinary microbiotas in bats and natural infection dynamics during seasonal reproduction. / M. Dietrich, T. Kearney, E.C.J. Seamark [et al.] // *Royal Society Open Science*. – 2018. – Vol. 5, N 5. – P. 180041.
174. The circular bacteriocin enterocin NKR-5-3B has an improved stability profile over nisin / C.K. Wang, Y.-H. Huang, F. Shabbir [et al.] // *Peptides*. – 2023. – Vol. 167. – P. 171049.

175. The coronavirus pandemic and aerosols: Does COVID-19 transmit via expiratory particles? / S. Asadi, N. Bouvier, S.A. Wexler [et al.] // *Aerosol Science and Technology*. – 2020. – Vol. 54, N 6. – P. 635–638.

176. The digestive adaptation of flying vertebrates: high intestinal paracellular absorption compensates for smaller guts / E. Caviedes-Vidal, T.J. McWhorter, S.R. Lavin [et al.] // *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. – 2007. – Vol. 104, N 48. – P. 19132-19137.

177. The discovery of Bombali virus adds further support for bats as hosts of ebolaviruses / T. Goldstein, S.J. Anthony, A. Gbakima [et al.] // *Nature microbiology*. – 2018. – Vol. 3, N 10. – P. 1084.

178. The dynamics of mediterranean horseshoe bat (*Rhinolophus euryale*, Chiroptera) gut microflora during hibernation. / L. Maliničová, L. Hrehová, E. Maxinová [et al.] // *Acta Chiropterologica*. – 2017. – Vol. 19, N 1. – P. 211–218.

179. The Egyptian rousette genome reveals unexpected features of bat antiviral immunity / S.S. Pavlovich, S.P. Lovett, G. Koroleva [et al.] // *Cell*. – 2018. – Vol. 173, N 5. – P. 1–13.

180. The emergence of antimicrobial resistance and virulence characteristics in *Enterococcus* species isolated from bovine milk / B.R. Paschoalini, K.V.M. Nuñez, J.T. Maffei [et al.] // *Antibiotics*. – 2023. – Vol. 12, N 8. – P. 1243.

181. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract / C.J. Yeoman, N. Chia, P. Jeraldo [et al.] // *Animal Health Research Reviews*. – 2012. – Vol.13, N 1. – P. 89 – 99.

182. The public health impact of a publically available, environmental database of microbial genomes / E.L. Stevens, R. Timme, E.W. Brown [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – Vol. 8.

183. The *Rhinolophus affinis* bat ACE2 and multiple animal orthologs are functional receptors for bat coronavirus RaTG13 and SARS-CoV-2 / P. Li, R. Guo, Y. Liu [et al.] // *Science Bulletin*. – 2021. – Vol. 66, N 12. – P. 1215–1227.

184. The virome of German bats: Comparing virus discovery approaches / C. Kohl, A. Brinkmann, A. Radonić [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, №1. – P. 7430.
185. Todorov, S.D. Bacteriocins of Gram-positive bacteria having activity spectra extending beyond closely-related species / S.D. Todorov, B. de Melo Franco, J. Tagg, // *Beneficial Microbes*. – 2019. – Vol. 10, N 3. – P. 315 – 328.
186. Tools to study pathogen-host interactions in bats / A. Banerjee, V. Misra, T. Schountz [et al.] // *Virus Research*. – 2018. – Vol. 248. – P. 5–12.
187. Trypsin Treatment Unlocks Barrier for Zoonotic Bat Coronavirus Infection / D. Vineet Menachery, H. Kenneth [et al.] // *Journal of Virology*. – 2020. – Vol. 94, N 5. – P. 01774–19.
188. Two mutations were critical for bat-to-human transmission of Middle East respiratory syndrome coronavirus / Y. Yang, C. Liu, L. Du [et al.] // *Journal of Virology*. – 2015. – Vol. 89, N 17. – P. 9119–9123.
189. Tyrosine decarboxylase activity of enterococci grown in media with different nutritional potential: tyramine and 2-phenylethylamine accumulation and tyrDC gene expression / E. Bargossi, G. Tabanelli, C. Montanari [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – Vol. 6, N 259.
190. Urban bat occupancy is highly influenced by noise and the location of water: Considerations for nature-based urban planning / E.W. Lehrer, T. Gallo, M. Fidino [et al.] // *Landscape and Urban Planning*. – 2021. – Vol. 210.
191. Van Tyne, D. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin / D. Van Tyne, M.J. Martin, M.S. Gilmore // *Toxins*. – 2013. – Vol. 5, N 5. – P. 895 – 911.
192. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: A current perspective on resilience, adaptation, and the urgent need for novel strategies / A.C. Almeida-Santos, C.

Novais, L. Peixe [et al.] // Journal of Global Antimicrobial Resistance. – 2025. – Vol. 41. – P. 233 – 252.

193. Virulence Determinants of *Enterococcus faecium* / S. Reissier, M. Penven, C. Michaux [et al.] // Infections diseases: Enterococcus – Unveiling the Emergence of a Potent Pathogen. – 2024.

194. Wild-type and innate immune-deficient mice are not susceptible to the Middle East respiratory syndrome coronavirus. / C.M. Coleman, K.L. Matthews, L. Goicochea [et al.] // Journal of general virology. – 2014. – Vol. 95, N 2. – P. 408–412.

195. WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats / M.J. Day, M.C. Horzinek, R.D. Schultz [et al.] // The Journal of Small Animal Practice. – 2016. – Vol. 57, N 1. – P. 1–45.

196. Zhu, Q. Advances in Bovine Coronavirus Epidemiology / Q. Zhu, B. Li, D. Sun // Viruses. – 2022. – Vol. 14, N 5. – P. 2 – 11.

ПРИЛОЖЕНИЯ

УТВЕРЖДАЮ
И.о. проректора по учебной работе и
международной деятельности
Донского государственного
технического университета
К.т.н., доцент А.В. Шилов



« 11 » 2025

АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Результаты научных исследований Липилкиной Татьяны Александровны по диссертационной работе на тему: «Особенности коронавируса и кишечной микробиоты насекомоядных летучих мышей Европейского Юга России и риск переноса коронавирусной инфекции» приняты к внедрению в учебный процесс кафедры «Биология и общая патология».

Используются в лекциях и лабораторных занятиях при подготовке по программам: 36.05.01 «Ветеринария» и 36.04.01 «Санитарная экспертиза и клинико-лабораторная диагностика в ветеринарии», а также приняты к внедрению в разработку рабочих программ учебных дисциплин. Будут учтены при выполнении научно-квалификационных работ аспирантами и соискателями кафедры.

Заведующий кафедрой
«Биология и общая патология»
д.в.н., доцент

С.Н. Тресницкий

УТВЕРЖДАЮ
И.о. директора
ФБУН «РостовНИИ
микробиологии и паразитологии»
Роспотребнадзора
к.м.н., А.Г. Суладзе



« 17 октября » 2025

СПРАВКА О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Результаты и методики научных исследований Липилкиной Татьяны Александровны по диссертационной работе на тему: «Особенности коронавируса и кишечной микробиоты насекомых летучих мышей Европейского Юга России и риск переноса коронавирусной инфекции» внедрены в деятельность Лаборатории вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования. Используются при проведении научно-аналитической работы в области вирусной этиологии кишечных инфекций и дисбактериозов кишечника.

Руководитель лаборатории
вирусологии, микробиологии и
молекулярно-биологических методов
исследования, д.м.н.

 А.В. Алешукина

Подпись заверяю
И.гальских ОК
ФБУН РостовНИИМП   Т.С. Распоркина



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
 ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
 «ДОНСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
 (ДГТУ)

«26» февраля 2021 г.

№ 2

г. Ростов-на-Дону

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ЛНЭК ДГТУ одобряет проведение исследования под руководством декана факультета «Биоинженерия и ветеринарная медицина» ДГТУ, д.б.н., профессора А.М. Ермакова, «Определение наличия коронавирусов у летучих мышей Европейского Юга России», включающего использование летучих мышей следующих видов: рыжая вечерница (*Nyctalus noctula*), средиземноморский нетопырь (*Pipistrellus kuhlii*), поздний кожан (*Eptesicus serotinus*), малый подковонос (*Rhinolophus hipposideros*), большой подковонос (*Rhinolophus ferrumequinum*), водяная ночница (*Myotis daubentonii*), европейская широкоушка (*Barbastella barbastellus*), всего 150 особей.

В задачи входит сбор биоматериала (орофарингеальные, ректальные мазки) у летучих мышей, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, Республики Адыгея; проведение скрининга при помощи HRM-анализа РНК CoV в отобранном биоматериале; выполнение метагеномного исследования с применением секвенирования нового поколения по идентификации и описанию обнаруженных CoV; установление филогенетических связей и родства обнаруженных CoV с другими CoV с известной последовательностью генома.

Протоколы прижизненных манипуляций предоставлены. Эвтаназия и аутопсия не предусмотрены.

Председатель ЛНЭК ДГТУ, к.б.н., доцент

Секретарь ЛНЭК ДГТУ



А.П. Евсюков

А.А. Крикунова

Таблица – Ареал летучих мышей в исследовании

№ метки	Широта	Долгота	Описание	Подпись
1,2	44,120762	40,116244	Рыжая вечерница, самка, 1РВ, 2РВ	Рыжая вечерница
3	44,152282	40,1156	Рыжая вечерница, самка, 3РВ	Рыжая вечерница
4	44,152114	40,117472	Рыжая вечерница, самка, 4РВ	Рыжая вечерница
5	44,179312	40,156161	Рыжая вечерница, самка, 5РВ	Рыжая вечерница
6	44,179411	40,155905	Рыжая вечерница, самец, 6РВ	Рыжая вечерница
7,8	44,153708	40,181467	Средиземноморс кий нетопырь, самец, 7НК, 8НК, обнаружена РНК коронавируса (мазок из ротоглотки) Малый подковонос	Средиземном орский нетопырь/ Малый подковонос
9	44,236781	40,205274	Средиземноморс кий нетопырь, самка, 9НК	Средиземном орский нетопырь

Продолжение таблицы – Ареал летучих мышей в исследовании

№ метки	Широта	Долгота	Описание	Подпись
10	44,237029	40,205507	Средиземноморский нетопырь, самка, 10 НК	Средиземноморский нетопырь
11	44,651164	40,297984	Рыжая вечерница, самка, 11РВ	Рыжая вечерница
12	44,760585	39,836242	Рыжая вечерница, самка, 12РВ	Рыжая вечерница
13	45,195801	39,723133	Рыжая вечерница, самец, 13РВ	Рыжая вечерница
14	45,239665	39,826215	Рыжая вечерница, самец, 14РВ	Рыжая вечерница
15	45,395951	40,561355	Рыжая вечерница, самка, 15РВ	Рыжая вечерница
16	45,43028	40,859338	Средиземноморский нетопырь, самка, 16НК	Средиземноморский нетопырь
17	45,430242	40,859188	Средиземноморский нетопырь, самка, 17РВ	Средиземноморский нетопырь
18	45,829011	40,030909	Средиземноморский нетопырь, самка, 18НК	Средиземноморский нетопырь
19	46,136663	39,855128	Средиземноморский нетопырь, самец, 19НК	Средиземноморский нетопырь
20	46,16154	39,738327	Средиземноморский нетопырь, самец, 20НК, обнаружена РНК коронавируса (мазок из ротоглотки)	Средиземноморский нетопырь

Продолжение таблицы – Ареал летучих мышей в исследовании

№ метки	Широта	Долгота	Описание	Подпись
14	45,239665	39,826215	Рыжая вечерница, самец, 14РВ	Рыжая вечерница
15	45,395951	40,561355	Рыжая вечерница, самка, 15РВ	Рыжая вечерница
16	45,43028	40,859338	Средиземноморский нетопырь, самка, 16НК	Средиземноморский нетопырь
17	45,430242	40,859188	Средиземноморский нетопырь, самка, 17РВ	Средиземноморский нетопырь
18	45,829011	40,030909	Средиземноморский нетопырь, самка, 18НК	Средиземноморский нетопырь
19	46,136663	39,855128	Средиземноморский нетопырь, самец, 19НК	Средиземноморский нетопырь
20	46,16154	39,738327	Средиземноморский нетопырь, самец, 20НК, обнаружена РНК коронавируса (мазок из ротоглотки)	Средиземноморский нетопырь
21	46,319543	39,430173	Поздний кожан, самец, 21ПК, обнаружена РНК коронавируса (мазок из ротоглотки)	Поздний кожан
22	46,400915	39,305783	Поздний кожан, самка, 22ПК	Поздний кожан
23	46,520928	39,107987	Поздний кожан, самка, 23ПК	Поздний кожан
24	46,308148	38,960829	Поздний кожан, самец, 24ПК	Поздний кожан

Продолжение таблицы – Ареал летучих мышей в исследовании

№ метки	Широта	Долгота	Описание	Подпись
25	46,043868	38,608373	Рыжая вечерница, самка, 25РВ	Рыжая вечерница
26	46,039943	38,563982	Рыжая вечерница, самка, 26РВ	Рыжая вечерница
27	46,043935	38,184627	Рыжая вечерница, самка, 27РВ	Рыжая вечерница
28	45,952142	38,110898	Рыжая вечерница, самка, 28РВ	Рыжая вечерница
29	45,657015	38,121692	Рыжая вечерница, самка, 29РВ	Рыжая вечерница
30	45,633321	38,152108	Рыжая вечерница, самец, 30РВ	Рыжая вечерница
31	45,663397	37,838708	Рыжая вечерница, самец, 31РВ	Рыжая вечерница
32	45,711573	37,777103	Поздний кожан, самка, 32ПК	Поздний кожан
33	45,471229	38,008953	Поздний кожан, самка, 33ПК	Поздний кожан
34	45,49069	37,981653	Поздний кожан, самка, 34ПК	Поздний кожан
35	45,457034	37,901423	Рыжая вечерница, самец, 35РВ	Рыжая вечерница
36	45,396243	37,934184	Рыжая вечерница, самец, 36РВ	Рыжая вечерница
37	45,292573	38,12241	Рыжая вечерница, самец, 37РВ	Рыжая вечерница

Продолжение таблицы – Ареал летучих мышей в исследовании

№ метки	Широта	Долгота	Описание	Подпись
38	45,230634	38,170937	Рыжая вечерница, самец, 38РВ	Рыжая вечерница
39	45,258274	38,13712	Рыжая вечерница, самка, 39РВ	Рыжая вечерница
40	45,133623	37,641158	Рыжая вечерница, самка, 40РВ	Рыжая вечерница
41	45,140661	37,330188	Средиземноморский нетопырь, самка, 41НК	Средиземноморский нетопырь
42	45,297782	37,369182	Средиземноморский нетопырь, самка, 42НК	Средиземноморский нетопырь
43	45,26042	37,459529	Средиземноморский нетопырь, самец, 43НК	Средиземноморский нетопырь
44	44,904863	37,396819	Поздний кожан, самец, 44ПК	Поздний кожан
45	44,732583	37,670463	Поздний кожан, самец, 45ПК	Поздний кожан
46	44,389145	38,727898	Поздний кожан, самка, 46ПК	Поздний кожан
47	44,122908	39,118503	Поздний кожан, самка, 47ПК	Поздний кожан

Таблица – Наличие РНК CoV у исследуемых летучих мышей

№	Вид	Пол	Регион	РНК CoV обнаружена в орофаринге альном мазке	РНК CoV обнаружена в ректальном мазке
1	Рыжая вечерница	Самка	Республика Адыгея		
2	Рыжая вечерница	Самка			
3	Рыжая вечерница	Самка			
4	Рыжая вечерница	Самка			
5	Рыжая вечерница	Самка			
6	Рыжая вечерница	Самец			
7	Нетопырь Куля	Самец		Да	
8	Нетопырь Куля	Самец			
9	Нетопырь Куля	Самка			
10	Нетопырь Куля	Самка			
11	Рыжая вечерница	Самка			

Продолжение таблицы – Наличие РНК CoV у исследуемых летучих мышей

№	Вид	Пол	Регион	РНК CoV обнаружена в орофарингеальном мазке	РНК CoV обнаружена в ректальном мазке
12	Рыжая вечерница	Самка	Краснодарский край		
13	Рыжая вечерница	Самец			
14	Рыжая вечерница	Самец			
15	Рыжая вечерница	Самка			
16	Нетопырь Куля	Самка			
17	Нетопырь Куля	Самка			
18	Нетопырь Куля	Самка			
19	Нетопырь Куля	Самец			
20	Нетопырь Куля	Самец			Да
21	Поздний кожан	Самец			Да
22	Поздний кожан	Самка			
23	Поздний кожан	Самка			
24	Поздний кожан	Самец			
25	Рыжая вечерница	Самка			

Продолжение таблицы – Наличие РНК CoV у исследуемых летучих мышей

№	Вид	Пол	Регион	РНК CoV обнаружена в орофаринге альном мазке	РНК CoV обнаружена в ректальном мазке
26	Рыжая вечерница	Самка			
27	Рыжая вечерница	Самка			
28	Рыжая вечерница	Самка			
29	Рыжая вечерница	Самка			
30	Рыжая вечерница	Самец			
31	Рыжая вечерница	Самец			
32	Поздний кожан	Самка			
33	Поздний кожан	Самка			
34	Поздний кожан	Самка			
35	Рыжая вечерница	Самец			
36	Рыжая вечерница	Самец			
37	Рыжая вечерница	Самец			
38	Рыжая вечерница	Самец			
39	Рыжая вечерница	Самка			

Продолжение таблицы – Наличие РНК CoV у исследуемых летучих мышей

№	Вид	Пол	Регион	РНК CoV обнаружена в орофарингеальном мазке	РНК CoV обнаружена в ректальном мазке
40	Рыжая вечерница	Самка			
41	Нетопырь Куля	Самка			
42	Нетопырь Куля	Самка			
43	Нетопырь Куля	Самец			
44	Поздний кожан	Самец			
45	Поздний кожан	Самка			
46	Поздний кожан	Самка			
47	Поздний кожан	Самка			
48	Поздний кожан	Самец			
49	Рыжая вечерница	Самка			
50	Рыжая вечерница	Самка			
51	Рыжая вечерница	Самка			
52	Рыжая вечерница	Самец			
53	Поздний кожан	Самка			

Продолжение таблицы – Наличие РНК CoV у исследуемых летучих мышей

№	Вид	Пол	Регион	РНК CoV обнаружена в орофарингеальном мазке	РНК CoV обнаружена в ректальном мазке
54	Поздний кожан	Самка		Да	
55	Поздний кожан	Самка			
56	Нетопырь Куля	Самка	Ростовская область		
57	Нетопырь Куля	Самец			
58	Нетопырь Куля	Самка			
59	Нетопырь Куля	Самец			
60	Рыжая вечерница	Самец			
61	Рыжая вечерница	Самка			
62	Поздний кожан	Самец			
63	Поздний кожан	Самка			
64	Рыжая вечерница	Самец			
65	Рыжая вечерница	Самец			
66	Рыжая вечерница	Самец			
67	Рыжая вечерница	Самка			

Продолжение таблицы – Наличие РНК CoV у исследуемых летучих мышей

№	Вид	Пол	Регион	РНК CoV обнаружена в орофарингеальном мазке	РНК CoV обнаружена в ректальном мазке	
68	Рыжая вечерница	Самка				
69	Поздний кожан	Самка				
70	Поздний кожан	Самец				
71	Нетопырь Куля	Самец				
72	Нетопырь Куля	Самец				
73	Нетопырь Куля	Самка				
74	Рыжая вечерница	Самка				
75	Рыжая вечерница	Самка				
76	Рыжая вечерница	Самка				
77	Рыжая вечерница	Самец				
78	Рыжая вечерница	Самец				
79	Поздний кожан	Самец				
80	Поздний кожан	Самка		Ставропольский край		
81	Поздний кожан	Самка				

Продолжение таблицы – Наличие РНК CoV у исследуемых летучих мышей

№	Вид	Пол	Регион	РНК CoV обнаружена в орофарингеальном мазке	РНК CoV обнаружена в ректальном мазке
82	Нетопырь Куля	Самка			
83	Нетопырь Куля	Самка			
84	Нетопырь Куля	Самец			
85	Рыжая вечерница	Самец			
86	Рыжая вечерница	Самец			
87	Рыжая вечерница	Самка			
88	Поздний кожан	Самка			
89	Поздний кожан	Самка			
90	Малый подковонос	Самка		Республика Адыгея	
91	Малый подковонос	Самка			
92	Малый подковонос	Самка			
93	Малый подковонос	Самка			
94	Малый подковонос	Самка			
95	Малый подковонос	Самка			

Продолжение таблицы – Наличие РНК CoV у исследуемых летучих мышей

№	Вид	Пол	Регион	РНК CoV обнаружена в орофаринге альном мазке	РНК CoV обнаружена в ректальном мазке
96	Малый подковонос	Самка			
97	Малый подковонос	Самка			
98	Малый подковонос	Самка			
99	Малый подковонос	Самка			
100	Малый подковонос	Самка			
101	Малый подковонос	Самец			
102	Малый подковонос	Самец			
103	Малый подковонос	Самец			
104	Малый подковонос	Самец			
105	Малый подковонос	Самец			
106	Малый подковонос	Самец			
107	Малый подковонос	Самец			
108	Малый подковонос	Самец			
109	Малый подковонос	Самец			

Продолжение таблицы – Наличие РНК CoV у исследуемых летучих мышей

№	Вид	Пол	Регион	РНК CoV обнаружена в орофарингеальном мазке	РНК CoV обнаружена в ректальном мазке
110	Малый подковонос	Самец			
111	Малый подковонос	Самка			
112	Малый подковонос	Самка			
113	Малый подковонос	Самка			
114	Малый подковонос	Самка			
115	Малый подковонос	Самка			
116	Малый подковонос	Самка			
117	Малый подковонос	Самка			
118	Малый подковонос	Самка			
119	Малый подковонос	Самка			
120	Малый подковонос	Самка			
121	Малый подковонос	Самка			
122	Малый подковонос	Самка			
123	Водяная ночница	Самец			

Продолжение таблицы – Наличие РНК CoV у исследуемых летучих мышей

№	Вид	Пол	Регион	РНК CoV обнаружена в орофарингеальном мазке	РНК CoV обнаружена в ректальном мазке
124	Европейская широкоушка	Самец			
125	Большой подковонос	Самка			
126	Большой подковонос	Самка			
127	Большой подковонос	Самка			
128	Большой подковонос	Самка			
129	Большой подковонос	Самец			
130	Большой подковонос	Самец			
131	Малый подковонос	Самка			
132	Малый подковонос	Самка			
133	Малый подковонос	Самка			Да
134	Малый подковонос	Самка			
135	Малый подковонос	Самка			
136	Малый подковонос	Самка			

Продолжение таблицы – Наличие РНК CoV у исследуемых летучих мышей

№	Вид	Пол	Регион	РНК CoV обнаружена в орофаринге альном мазке	РНК CoV обнаружена в ректальном мазке
137	Малый подковонос	Самка			
138	Малый подковонос	Самка			
139	Малый подковонос	Самка			
140	Малый подковонос	Самка			
141	Малый подковонос	Самец			
142	Малый подковонос	Самец			
143	Малый подковонос	Самец			
144	Малый подковонос	Самец			
145	Малый подковонос	Самка			
146	Малый подковонос	Самка			
147	Малый подковонос	Самка			
148	Малый подковонос	Самка			
149	Малый подковонос	Самка			
150	Малый подковонос	Самка			

Таблица – Доля обнаруженной РНК CoV у исследуемых летучих мышей

Признак	Доля обнаруженной РНК CoV (95 % ДИ)	Нескорректированное отношение шансов	р-значение
Все	3,33 % (1,1–7,6)		
Рыжая вечерница	0	1	
Нетопырь Куля	9,1 % (1,1–29)	18,9	0,99
Поздний кожан	8,3 % (1–27)	18,8	0,99
Малый подковонос	3,8 % (0,5–13)	17,3	0,99
Большой подковонос	0	0	1
Водяная ночница	0	0	1
Европейская широкоушка	0	0	1
Константа (базовое значение)		– 21,2	

Продолжение таблицы Е – Доля обнаруженной РНК CoV у исследуемых летучих мышей

Признак	Доля обнаруженной РНК CoV (95% ДИ)	Нескорректированное отношение шансов	р-значение
Мазок			
Ректальный		1	
Орофарингеальный	2,7 % (0,7–6,7)	1,4	0,21
Константа (базовое значение)	0,7 % (0–3,7)	– 5	
Пол		5	
Самец	3,1 % (0,6–8,8)	1	
Самка	3,8 % (0,5–13)	1	0,26
Константа (базовое значение)		– 3,9	
Регион		5	

Продолжение таблицы – Доля обнаруженной РНК CoV у исследуемых летучих мышей

Признак	Доля обнаруженной РНК CoV (95% ДИ)	Нескорректированное отношение шансов	р-значение
Ростовская область	0	1	
Республика Адыгея	4,2 % (0,9–11,7)	18,6	0,99
Краснодарский край	4,5 % (0,6–15,5)	17,6	0,99
Ставропольский край	0	0	1
Константа (базовое значение)		– 21,2	