

Метавирусное исследование мазков из ротовой полости и фекалий ежей, обитающих на территории Российской Федерации

Лукина-Гронская А.В.^{1*}, Корнеев Е.В.¹, Чудинов И.К.¹, Машкова С.Д.¹,
Сонец И.В.¹, Семашко Т.А.¹, Литвинова Е.М.², Феоктистова Н.Ю.³,
Синькова М.А.⁴, Сперанская А.С.¹

¹ Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины Роспотребнадзора,
Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Москва, Россия

³ Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

⁴ Зоологический музей Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

* lukina.al98@gmail.com

Ключевые слова: ежи; *E. roumanicus*; вирусное разнообразие; метавирус; вирусы позвоночных; коронавирусы; бетакоронавирусы; EriCoV; Betacoronavirus Erinaceus; маммарена-вирусы; MEMV

Мотивация и цель: В ряде зарубежных исследований показано, что в ежах, обитающих на территории Европы, найдены вирусы, которые потенциально опасны для человека и других млекопитающих. Исследований виroma ежей на данный момент не проводилось: большинство работ ограничиваются описанием единичных случаев. Известно, что ежи являются носителями клещевого энцефалита (сем. Flaviviridae) [1], вируса бешенства (сем. Rhabdoviridae) [2], герпесвирусов (сем. Herpesviridae) и парамиксовирусов (сем. Paramyxoviridae, англ. Belerina virus) [3]. В 2014 г. в Германии впервые был обнаружен бетакоронавирус у *Erinaceus europaeus* [4]. Впоследствии бетакоронавирусы ежей были также выявлены во Франции [5], Италии [6], Великобритании [7], Польше [8] и выделены в отдельную кладу EriCoV, филогенетически близкую к MERS-CoV. Другой бетакоронавирус HKU31 был выявлен у *E. amurensis* в Китае [9]. Также известно, что ежи являются носителями вирусов, принадлежащих к семейству Arenaviridae. В 2023 г. вирус Mecsek Mountains virus (англ. MEMV), относящийся к роду Mammarenaviruses, был обнаружен у ежей, обитающих на территории Венгрии [10]. В Европе распространены лишь два вируса из семейства аренавирусов – MEMV и вирус лимфоцитарного хориоменингита (англ. Lymphocytic choriomeningitis, LCMV), последний из которых переносится грызунами. Секвенирование виroma ежей, обитающих на территории Российской Федерации, не проводилось. Основной целью данного исследования являются характеристика вирусного разнообразия у *E. roumanicus*, пойманных на территории России, с использованием методов высокопроизводительного секвенирования, а также характеристика потенциально зоонозных вирусов.

Методы и алгоритмы: В исследование было включено 21 животное вида *Erinaceus roumanicus*, пойманных на территории европейской части России, а

также на территории Сибири (Академгородок, Новосибирск). Большая часть животных была поймана профессиональными зоологами, остальные животные были предоставлены сотрудниками реабилитационного центра Зоологического музея МГУ. У каждого животного были взяты или только ротоглоточные, или ротоглоточные и ректальные мазки. Высокопроизводительное секвенирование тотальной РНК было произведено на платформе BGI DNBSEQ-G400. Полученные данные были дополнительно подтверждены сиквенсом на платформе Oxford Nanopore Technologies. Парные прочтения обрабатывались с использованием fastp v.0.23.4 и более поздних версий Kraken2 версии 2.1.3 с базой данных pluspf (включая прокариоты, эукариоты и вирусы) и параметром -confidence 0.5. Результаты анализа представленности вирусных семейств были использованы для визуализации составных гистограмм, нормализованных по сумме подсчетов прочтений каждого вирусного семейства/рода, присутствующего в образце. Сборка геномов осуществлялась с помощью SPAdes в режиме работы --meta, таксономическая классификация контигов проводилась с помощью kraken2 и базы pluspf. Детализированная таксономическая классификация осуществлялась при помощи базы ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Множественное выравнивание было сделано при помощи программы Mafft (версия 7.505). Филогенетические деревья максимального правдоподобия (ML) были построены с использованием IQ-TREE (версия 2.0.7).

Результаты: Всего было отсеквенировано 34 ротоглоточных и ректальных мазка, полученных от 21 ежа. Образец считался положительным, если более 20 прочтений были классифицированы как принадлежащие к одному семейству вирусов. В результате было идентифицировано 26 семейств вирусов, которые включали вирусы растений, насекомых, грибов и бактериофагов. Было выявлено всего 6 семейств вирусов, ассоциированных с вирусами, переносчиками которых являются позвоночными. В силу того, что лаборатория работает с клиническими образцами SARS-CoV-2, образцы дополнительно проверялись альтернативными биоинформатическими методами. В результате 9 из 10 образцов были оценены как ложноположительные. Еж с идентификатором 22_15(MOS) оказался переносчиком двух разных коронавирусов и двух разных аренавирусов. Оба штамма коронавируса имеют одинаковый размер. Филогенетический анализ полных геномов бетакоронавирусов показал, что оба полученных штамма принадлежат к подроду Merbecovirus и относятся к той же кладе EriCoV, что и бетакоронавирусы, обнаруженные в Европе. Организация генома двух штаммов коронавируса была аналогична организации генома других представителей бетакоронавирусов. Парное выравнивание показывает, что оба генома имеют 98.87 % идентичности и различаются по 342 нуклеотидам. В четырех образцах ежей (22_6(BEL), 22_7(MOS), 22_15(MOS), 23_1(MOW)) были обнаружены прочтения, классифицированные как принадлежащие к семейству Arenaviridae, роду Mammarenavirus. В образце 22_15(MOS) обнаружены два штамма аренавирусов. Длина L-сегмента генома первого штамма составляет 7331 п. о. и имеет 73.55 % идентичности последовательности с L-сегментом маммаренавируса MEMV (номер GenBank OP191655.1). Длина L-сегмента второго штамма составляет 7515 п. о. и имеет 74.3 % идентичности последовательности с L-сегментом маммаренавируса Alxa virus (номер GenBank NC_078105.1).

Выводы: Обитающие на территории России ежи вида *E. roumanicus* являются носителями бетакоронавирусов, которые относятся к той же кладе EriCoV, что и

коронавирусы, обнаруженные ранее на территории европейских стран. Данный вид ежей является носителем аренавирусов, близких к найденным ранее в ежах того же вида вирусов в Венгрии.

Финансирование: Работа выполнена на базе НИИ СБМ Роспотребнадзора в рамках госзадания «Разработка алгоритмов для выявления новых, уникальных последовательностей ДНК или РНК в метагеномах и их фенотипическая характеристика in vitro», номер 12203090069-4.

Metavirome research of oral swabs and feces of hedgehogs from Russian Federation

Lukina-Gronskaya A.V.¹, Korneenko E.V.¹, Chudinov I.K.¹, Mashkova S.D.¹,
Sonets I.V.¹, Semashko T.A.¹, Litvinova E.M.², Feoktistova N.Y.³, Sinkova M.A.⁴,
Speranskaya A.S.¹

¹ Scientific Research Institute for Systems Biology and Medicine, Federal Service on Consumers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Biological Department, Moscow, Russia

³ A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Moscow, Russia

⁴ Zoological Museum of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

* lukina.al98@gmail.com

Key words: hedgehogs; *E. roumanicus*; viral diversity; metavirome; vertebrae-associated viruses; coronavirus; betacoronaviruses; EriCoV; *Betacoronavirus Erinaceus*; mammarenaviruses; MEMV

Motivation and Aim: Some foreign studies have shown that European hedgehogs contain many viruses that are potentially dangerous to humans and other mammals. There is no full research of hedgehogs' virome: most studies of viral findings are limited to single cases description. It is known that hedgehogs are carriers of tick-borne encephalitis (family Flaviviridae) [1], rabies virus (family Rhabdoviridae) [2], herpes viruses (family Herpesviridae) [3] and paramyxoviruses (family Paramyxoviridae, en. Belerina virus) [4]. In 2014, betacoronavirus was first discovered in *Erinaceus europaeus* in Germany [4]. Subsequently, betacoronaviruses were also discovered in France [5], Italy [6], Great Britain [7], Poland [8] and were separated to an isolated clade EriCoV, phylogenetically close to MERS-CoV. Another related betacoronavirus, HKU31, was identified in *E. amurensis* in China [9]. Hedgehogs are also known as carriers of viruses belonging to the Arenaviridae family. In 2023, the Mecsek Mountains virus (MEMV), belonging to the genus Mammarenaviruses, was identified in hedgehogs in Hungary [10]. Only two viruses from this genus are known to be widespread in Europe – MEMV and Lymphocytic choriomeningitis (LCMV), the last one is transmitted by rodents. At the moment, little is known about the virome of hedgehogs. Currently, there is no information on sequencing the viral genomes of hedgehogs living in the Russian Federation. The main goal of this study is to characterize viral diversity in hedgehogs collected in Russia using high-throughput sequencing methods and characterize potentially zoonotic viruses.

Methods and Algorithms: The study included 21 animals of the species *Erinaceus roumanicus*, caught in the European part of Russia, as well as in Siberia

(Akademgorodok, Novosibirsk). Most of the animals were caught by professional zoologists, the rest of the animals were provided by employees of the rehabilitation center of the Zoological Museum of Moscow State University. Only oropharyngeal or oropharyngeal and rectal swabs were collected from each animal. High-throughput total RNA sequencing was performed on the BGI DNBSEQ-G400 platform. The data obtained were further confirmed by sequencing on the Oxford Nanopore Technologies platform. Paired-end reads were processed using fastp v.0.23.4 and later versions of Kraken2 v.2.1.3 with pluspf database (including prokaryotes, eukaryotes and viruses) and -confidence parameter 0.5. Viral abundance results were used to visualize composite histograms normalized by the sum of read counts for each viral family/genus present in the sample. Genome assembly was carried out using SPAdes in the --meta operating mode, taxonomic classification of contigs was carried out using kraken2 and the pluspf database. Detailed taxonomic classification was carried out using the ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) database. The complete genomes including newly discovered coronaviruses were aligned using Mafft v7.505 (2022/Apr/10). The Maximum likelihood (ML) phylogenetic trees were constructed using IQ-TREE (version 2.0.7).

Results: A total of 34 oropharyngeal and rectal swabs obtained from 21 hedgehogs were sequenced. A sample was considered positive if more than 20 reads were classified as belonging to the same virus family. As a result, 26 families of viruses were identified, which included viruses of plants, insects, oomycetes, fungi and bacteriophages. 6 families of viruses associated with viruses transmitted by vertebrates were identified. Due to the fact that the laboratory works with clinical samples of SARS-CoV-2, the samples were additionally tested using alternative bioinformatics methods. As a result, 9 out of 10 samples were considered false positive. The hedgehog with identification number 22_15 (MOS) turned out to be a carrier of two different coronaviruses and two different arenaviruses. Both coronaviruses have the same size. Phylogenetic analysis of complete betacoronavirus genomes showed that both strains belong to the subgenus Merbecovirus and belong to the same EriCoV clade as betacoronaviruses found in Europe. The genome organization of the two coronavirus strains was similar to other betacoronaviruses. Pairwise alignment shows that both genomes have 98.87 % identity and differ by 342 nucleotides. In four hedgehog samples (22_6(BEL), 22_7(MOS), 22_15(MOS), 23_1(MOW)) reads were classified as belonging to the family Arenaviridae, genus Mammarenavirus. Two strains of arenaviruses were detected in sample 22_15(MOS). The length of the L-segment of the genome of the first strain is 7331 b.p. and has 73.55 % sequence identity with the L segment of Mecsek Mountains mammarenavirus (GenBank number OP191655.1). The length of the L-segment of the second strain is 7515 b.p. and has 74.3 % sequence identity with the L-segment of the Alxa virus mammarenavirus (GenBank number NC_078105.1).

Conclusion: The results of this study prove that *Erinaceus roumanicus* Russia are carriers of betacoronaviruses, which are included in the same EriCoV clade as coronaviruses previously discovered in European countries. This species of hedgehog is a carrier of arenaviruses close to viruses previously found in hedgehogs of the same type in Hungary.

Funding: This study was financially supported by the Research Institute of SBM of Rospotrebnadzor within the framework of the state task “Algorithm development for identifying new, unique DNA or RNA sequences in metagenomes and their phenotypic characteristics in vitro”, number 12203090069-4.

Список литературы/References

1. Schönbächler K., Hatt J., Silaghi C. et al Confirmation of Tick-borne encephalitis virus in an European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2019;161(1):23-31. doi 10.17236/sat00191
2. Faragó Z. Rabid hedgehog in inner-city area of Budapest. *Orv Hetil.* 1997;138(36):2231-2232. doi 10.1556/650.1997.09.07
3. Hydeskov H.B., Dastjerdi A., Hopkins K.P. et al. Detection and characterisation of multiple herpesviruses in free-living Western European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*). *Sci Rep.* 2018;8:13942
4. Vanmechelen B., Vergote V., Merino M., Verbeken E., Maescorresponding P. Common occurrence of Belerina virus, a novel paramyxovirus found in Belgian hedgehogs. *Sci Rep.* 2020;10(1):19341. doi 10.1038/s41598-020-76419-1
5. Monchatre-Leroy E., Boué F., Boucher J.M. et al. Identification of alpha and beta coronavirus in wildlife species in France: bats, rodents, rabbits, and hedgehogs. *Viruses.* 2017;9(12):364. doi 10.3390/v9120364
6. Delogu M., Cotti C., Lelli D. et al. Eco-virological preliminary study of potentially emerging pathogens in hedgehogs (*Erinaceus Europaeus*) recovered at a wildlife treatment and rehabilitation center in northern Italy. *Animals (Basel).* 2020;10(3):407. doi 10.3390/ani10030407
7. Saldanha I.F., Lawson B., Goharriz H. et al. Extension of the known distribution of a novel clade C betacoronavirus in a wildlife host. *Epidemiol Infect.* 2019;147:e169. doi 10.1017/S0950268819000207
8. Pomorska-Mól M., Ruskowski J.J., Gogulski M., Domanska-Blicharz K. First detection of Hedgehog coronavirus 1 in Poland. *Sci Rep.* 2022;12(1):2386. doi 10.1038/s41598-022-06432-z
9. Lau S.K.P., Luk H.K.H., Wong A.C.P. et al. Identification of a novel betacoronavirus (merbecovirus) in amur hedgehogs from China. *Viruses.* 2019;11(11):980. doi 10.3390/v11110980
10. Reuter G., Boros Á., Takáts K., Mátics R., Pankovics P. A novel mammarenavirus (family Arenaviridae) in hedgehogs (*Erinaceus roumanicus*) in Europe. *Arch Virol.* 2023;168(7):174. doi 10.1007/s00705-023-05804-8