

37. OTDK BIOLÓGIA SZEKCIÓ

ÚJ VÍRUSOK METAGENOMIKAI KIMUTATÁSA VIETNAMEI DENEVÉREKBŐL

Készítette: Maloschik Emma Ilona

Biológia BSc szakos hallgató III.

Állatorvostudományi Egyetem, Pécsi Tudományegyetem

Témavezető: Dr. Görföl Tamás, tudományos munkatárs

Pécsi Tudományegyetem, Virologiai Nemzeti Laboratórium

Belső konzulens: Dr. Szabó Krisztián, tudományos munkatárs

Állatorvostudományi Egyetem, Zoológiai Tanszék

Budapest

2025

TARTALOMJEGYZÉK

Új vírusok metagenomikai kimutatása vietnami denevérekből.....	1
1. Rövidítések jegyzéke.....	3
2. Bevezetés.....	4
3. Célkitűzés.....	8
4. Anyag és módszer.....	9
4.1. Mintavételi helyszínek.....	9
4.2. Mintagyűjtés.....	10
4.3. Metagenomikai szekvenálás.....	10
4.4. Taxonómiai besorolás.....	11
4.5. Teljes genom összeállítás.....	11
4.6. Filogenetikai és rekombinációs elemzés.....	11
4.7. Térkép készítése.....	12
5. Eredmények.....	13
5.1. Mintavétel.....	13
5.2. Metagenomikai diverzitás.....	14
5.3. Új koronavírusok és hepevírusok.....	18
5.4. Filogenetika.....	18
6. Diskusszió.....	24
7. Köszönetnyilvánítás.....	28
8. Irodalomjegyzék.....	29

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

DNS	dezoxiribonukleinsav
CoV	koronavírus
SARS-CoV	súlyos akut légzőszervi szindróma-koronavírus
PEDV	sertések járványos hasmenésének vírusa
ICTV	Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság
HEV	hepatitis E vírus
RNS	ribonukleinsav
PCR	polimeráz láncreakció
bp	bázispár
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
RdRp	RNS-függő RNS-polimeráz
GTR+I+G	Generalised Time Reservible + invariable sites + Gamma distribution

2. BEVEZETÉS

A denevérek igen fontos és meghatározó szerepet töltenek be az ökoszisztémákban [1]: az ízeltlábú állományok szabályozásán keresztül a táplálékláncok kiemelt szereplői, a trópusi területeken ezenkívül a magok terjesztésével és a virágos növények egy részének beporzásával jelentős mezőgazdasági hasznót is hajtanak az emberek számára, illetve hozzájárulnak az ökológiai stabilitás fenntartásához.

Ökológiai szolgáltatásaikon túl a denevérek népes rendjét (Chiroptera) a többi emlősétől eltérő számos biológiai tulajdonságuk teszi a tudományos kutatás számára kiemelten fontossá és érdekessé. Ugyan egyre több kutatás irányul ezekre a sok szempontból különleges élőlényekre [2], még mindig meglehetősen hiányosak az ismereteink. Rejtett életmódjuk megnehezíti mintázásukat, továbbá veszélyeztetett státuszuk megköti a kutatók kezét, mert törekedniük kell a populációik zavarásának elkerülésére [3].

A repülés képessége alapjaiban meghatározza életmódjukat, és hatással van biológiájuk számos aspektusára, a táplálkozástól kezdve a stresszre adott válaszokon át egészen az immunrendszerükig. A repülés és a vírustolerancia között kapcsolatot feltételeznek, mivel a denevérek repülés közbeni magas testhőmérséklete és energiaigénye káros molekuláris stresszreakciókat idézne elő, és interferonválaszt váltana ki. Ennek a választútvonalnak a tompítása – a repülés okozta megerőltetés autoimmun válasz kiváltásának elkerülésére – hozzájárulhat a hosszabb élettartamhoz és elősegítheti a vírusokkal való békésebb együttélést [4, 5]. A denevérekben az inflammoszómák represszálttsága megakadályozza a szervezetük számára káros, túlzottan heves immunreakciókat (citokin viharokat), amelyek más emlősökben gyakran előfordulnak hasonló fertőzések esetén. Emellett a denevérek erőteljes interferon szignálokkal rendelkeznek, amelyek segítenek a vírusok gyors felismerésében és elpusztításában, miközben fenntartják a kontrollált gyulladásos választ. Továbbá, a DNS-sérülések javításának hatékonysága is kiemelkedő, ami szintén hozzájárul az immunrendszerük stabilitásához és a vírusokkal való hosszú távú együttélés képességéhez [6].

A denevéreknek rezervoár szerepük van [5], ugyanis a vírusfertőzések kordában tartásában különösen hatékony immunrendszerük lehetővé teszi számukra, hogy hosszú ideig hordozzanak különböző vírusokat anélkül, hogy komoly tüneteket mutatnának. Ez a tulajdonságuk, illetve hosszú élettartamuk, társas viselkedésük és nagy távolságokat elérő migrációjuk hozzájárul ahhoz, hogy számos zoonotikus, azaz állatról emberre terjedő vírus,

mint például a koronavírusok, a Marburg vírus és a veszettség vírusok legfőbb gazdaszervezetei a denevérek.

A vírusos zoonózis járványok előrejelzése napjainkra egyre fontosabb közegészségügyi kérdéssé vált. A vírusok alapos megismerése, különösen azoké, amelyek olyan állatfajokban fordulnak elő, amelyek rezervoárként szolgálnak, kulcsfontosságú lépés ezen probléma kezelésében. A denevérek különösen sokféle vírust hordoznak, amelyek közül több is jelentős figyelmet érdemel, mivel komoly egészségügyi kockázatot jelent az emberek számára. Ezen vírusok egy része súlyos járványokat képes előidézni az emberi populációban. Mindazonáltal jelenleg még mindig kevés ismerettel rendelkezünk a denevérek által hordozott globális víruspopulációk összetételéről és sokféleségéről, ami megnehezíti a járványok előrejelzését [7].

Trópusi területeken jelentős a zoonózisos fertőző betegségek kockázata, mivel az élőhelyek pusztítása miatt egyre több az ember-állat kontaktusok száma [8].

A denevérekkel való érintkezés egyik formája a denevérek elfogyasztása, ami elsősorban Ázsiában és Afrikában fordul elő, bár nem minden területen kiemelkedő jelentőségű. Egy átfogó irodalmi áttekintés során 119 forrásban találtak utalásokat a denevérfogyasztásra. Délkelet-Ázsiában, különösen Indonéziában és Laoszban, jelentős denevérpopulációkat veszélyeztet a vadászat. A vietnámi Kho Muong faluban a helyiek becslése szerint évente kb. 1000 kg denevért gyűjtöttek be a közeli denevérbarlangból és Thanh Hoa tartományban szintén jelentős vadászati tevékenység zajlik [9].

A délkelet-ázsiai régió – amely Vietnámot is magában foglalja – különösen fontos a zoonózisok szempontjából, hiszen számos állatfaj él itt, amelyek potenciális rezervoárjai lehetnek új vírusoknak.

A helyzetet súlyosbítja, hogy Délkelet-Ázsiában a denevérguanó gyűjtése elterjedt gyakorlat, ugyanis ezt természetes trágyaként használják [10]. A guanót hagyományosan barlangokban gyűjtik, ahol nagy denevérrkolóniák élnek [11]. A gyűjtők ki vannak téve a fejük felett átrepülő denevérek ürülékének, és rendszeresen mezítláb járnak a denevérürülék halmokon. Egy-egy barlangból évente akár 70 tonna guanót is bányászhatnak [11]. Vietnámban és Kambodzsában a denevérguanót mesterséges denevérszállások alól is gyűjtik, amelyek beton alapon elhelyezkedő oszlopos épületek, tetejükön kókuszpálma levelekkel, hogy vonzzák a lombkoronában élő denevéreket [12]. Ezeket a mesterséges pihenőhelyeket guanófarmoknak nevezik, és gyakran emberi lakóhelyek közelében

találhatók, ahol háziállatokat nevelnek és növényeket termesztnek. Korábbi vizsgálatokban eddig nem találtak olyan denevérvírusokat, amelyek egyértelműen megfertőzték volna a denevérek élőhelyeihez közel lakó embereket, habár korlátozott számú emberi mintavétel történt. Ugyanakkor néhány szerológiai vizsgálat arra utal, hogy bizonyos vírusokkal történt korábbi érintkezés lehetséges, így a további kutatások elengedhetetlenek a teljesebb kép megértéséhez [13].

A koronavírusok (CoV-ok) nagy méretű (kb. 22-36 ezer bázisból álló), egyszálú, pozitív RNS-vírusok, amelyek a *Coronaviridae* családba és a *Nidovirales* rendbe tartoznak a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (ICTV) iránymutatásainak megfelelően (<https://ictv.global>) [13]. Négy különálló nemzetségre oszthatók, amelyek közül elsősorban az alfa- és betakoronavírusok fertőznek emlősöket, köztük denevéreket [14].

Az alfa-CoV-ok 15 alnemzetsége közül 10 természetes gazdaszervezete a denevér [14]. A számos denevérfajon kívül más állatokat is megfertőznek, mint például sertéseket, kutyákat, macskákat és rágcsálókat [15]. Két világszerte elterjedt humán alfa-CoV-t ismerünk, a HCoV-229E-t és a HCoV-NL63-at [16, 17]. Mindkettőre jellemző, hogy enyhe, megfázásszerű tüneteket okoznak [17, 18].

A denevérek és az emberek közötti érintkezési pontoknál olyan koronavírusokat is azonosítottak, amelyek szoros rokonságban állnak a sertésekben betegséget okozó koronavírusokkal [13]. Az egyik jelentős sertés patogén a sertések járványos hasmenésének vírusa (PEDV). Ez a vírus a szeronegatív újszülött malacokban akut hasmenést/hányást, kiszáradást és magas elhullási arányt okoz. Az elmúlt három évtizedben a PEDV-fertőzés jelentős gazdasági veszteségeket okozott az európai és ázsiai sertéságazatban, azonban 2013–2014-ben a betegség előfordulását az Egyesült Államokban, Kanadában és Mexikóban is jelentették. Az Egyesült Államokban 2013 áprilisától napjainkig tartó PEDV-járvány több mint 10%-os veszteséget okozott az amerikai sertéspopulációban.

A hepatitis E vírusok (HEV) globálisan jelentős okozói az akut vírusos hepatitisznek, különösen a fejlődő országokban, ahol komoly közegészségügyi problémát okoznak. A hepatitis E vírusok burokkal nem rendelkező, egyszálú RNS-vírusok, amelyek a *Hepeviridae* családba tartoznak, és elsősorban fekál-orál úton terjednek, gyakran szennyezett vízforrásokon keresztül [19]. Négy fő HEV genotípus fertőzi az embereket: az 1-es és 2-es genotípusok főként rossz higiéniai körülmények között fordulnak elő, míg a 3-as és 4-es genotípusok zoonotikusak, és mind a fejlett, mind a fejlődő országokban megtalálhatók [19].

Bár a HEV-fertőzések általában nem okoznak komoly megbetegedéseket, de súlyos következményekhez vezethetnek várandós nők, immunhiányos személyek és májbetegségben szenvedők esetében [20].

A HEV-eket egyre inkább zoonotikus patogénként ismerik el, ami rávilágít arra, hogy szükség van a diagnosztikai képességek javítására és átfogó közegészségügyi stratégiákra a vírusok terjedésének megfékezése érdekében. A HEV-ek, amelyeket hagyományosan emberi fertőzésekkel hoztak összefüggésbe szennyezett víz és élelmiszer révén, egyre gyakrabban kerülnek elő különféle állati gazdaszervezetekben, a denevérek pedig jelentős rezervoárként említhetők. Kutatások több hepevírust azonosítottak denevérekben különböző földrajzi régiókban, ami kiemeli azok szerepét a vírus ökológiájában és a HEV-ek potenciális zoonotikus átvitelében [21]. Ezek a denevérekből származó HEV-törzsek jelentős genetikai sokféleséget mutatnak, ami arra utal, hogy régóta tartó és bonyolult evolúciós kapcsolat áll fenn a denevérek és a hepatitis E vírusok között [21]. Ez a sokféleség hangsúlyozza a folyamatos kutatás szükségességét annak érdekében, hogy megértsük a HEV-ek zoonotikus potenciálját és a fajok közötti átvitel dinamikáját a denevérektől az emberek felé [22]. A denevérek szerepének megértése a HEV-ek epidemiológiájában kulcsfontosságú a felmerülő vírusokkal kapcsolatos közegészségügyi kockázatok előrejelzéséhez és mérsékléséhez [23].

A vietnami denevérekben jelen lévő vírusok feltérképezése nemcsak az adott régió közegészségügyi helyzetére nézve kulcsfontosságú, hanem globális szinten is jelentős lehet, hiszen az itt felfedezett új vírusok akár világméretű járványokat is okozhatnak. Ezen vírusok kimutatása és azonosítása hozzájárulhat a zoonózisok terjedésének megértéséhez és a potenciális járványok megelőzéséhez [24].

A metagenomikai módszerek elterjedésének köszönhetően az új vírusok felfedezése az utóbbi években hatalmas fejlődésen ment keresztül. Ezek ugyanis lehetővé teszik a különböző környezeti mintákban – például denevérektől származó guanóban – jelen lévő genetikai anyagok átfogó vizsgálatát anélkül, hogy előzetesen ismerni kellene a keresett vírusok specifikus génszekvenciáit. Ez a molekuláris biológiai technológia tehát különösen hasznos olyan esetekben, amikor teljesen ismeretlen vírusokat keresünk, mivel képes felfedni a mintában található összes genetikai anyagot, beleértve a még nem katalogizált vírusokat is [25]. A denevérekből származó minták metagenomikai elemzése lehetőséget ad arra, hogy az eddig ismeretlen vagy kevésbé vizsgált vírusokat felfedezzük, ami hozzájárulhat a globális virológiai kutatásokhoz és a jövőbeli járványok megelőzéséhez.

3. CÉLKITŰZÉS

Jelen dolgozat célja egy 2017-es vietnami denevérkutató expedíció során gyűjtött guanóminták virális metagenomikai elemzése. A kutatás egyrészt hozzájárul a vietnami denevérek viromjának jobb megértéséhez, másrészt új vírusok azonosításával segíthet felkészülni a jövőbeli zoonózisok megelőzésére.

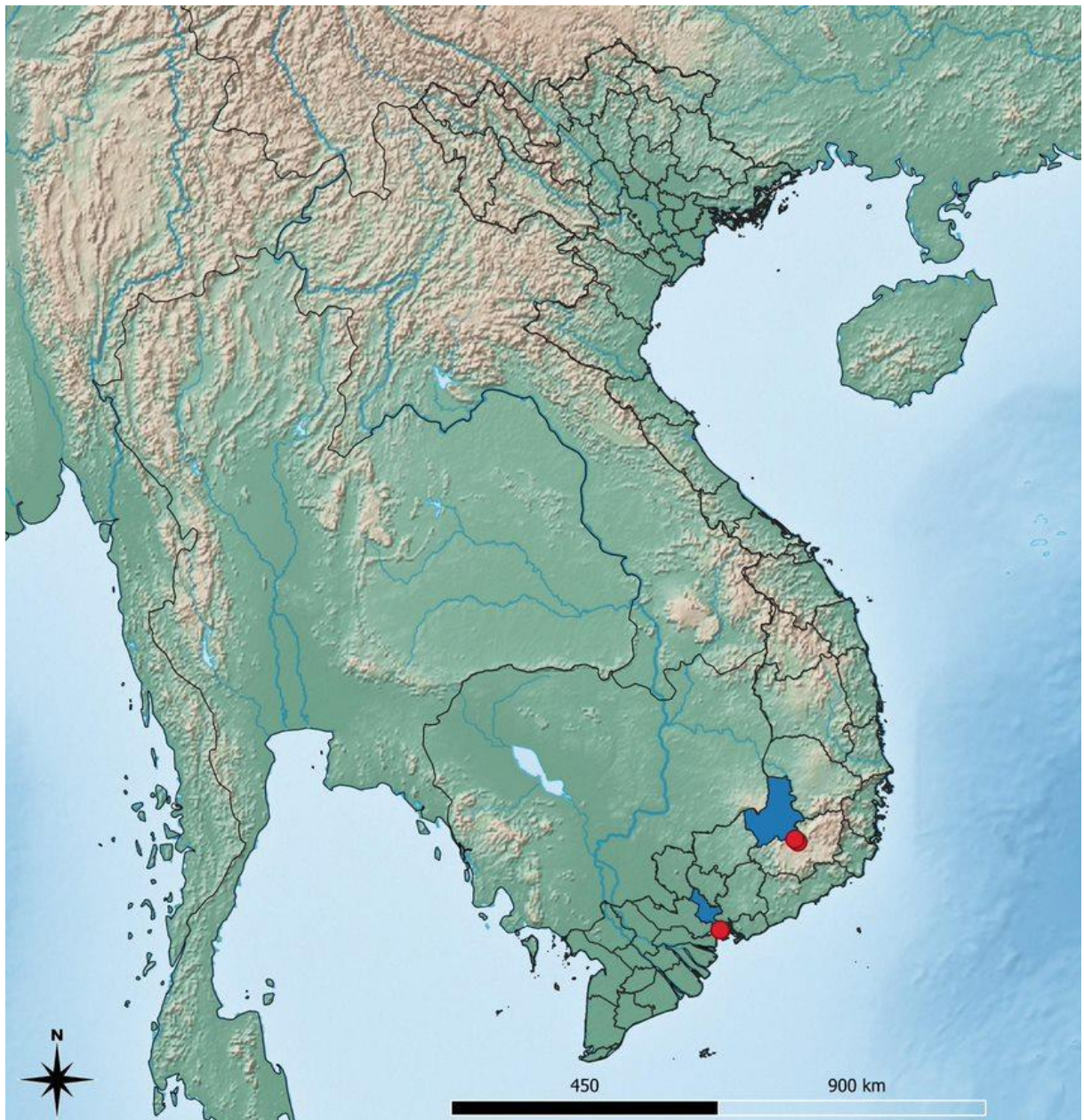
Célunk továbbá a megtalált új vírusok egy részének genetikai jellemzése, valamint filogenetikai viszonyaik tisztázása, evolúciós kontextusba helyezése.

A vietnami denevérek viromjának feltárása nemcsak regionális, hanem globális szinten is fontos eredményeket hozhat, hozzájárulva jövőbeni világjárványok elkerüléséhez. A dolgozat célja, hogy ezen a területen új ismereteket nyújtson, és felhívja a figyelmet a denevérek és az általuk hordozott vírusok fontosságára.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Mintavételi helyszínek

A vietnami denevérkutató expedíció során három mintavételi helyszín került vizsgálatra 2017.05.28. és 2017.06.11. között. Két mintavételi pont egymáshoz közel helyezkedett el a Ta Dung Természetvédelmi Területen, Vietnam Dak Nong tartományában, míg a harmadik helyszín Rung Sac, Can Gio térségében, Ho Si Minh-város közelében található (1. ábra).



1. ábra A mintavételi helyszínek térképe. A kék a tartományokat jelöli, a piros pontok pedig a mintavételi helyeket mutatják.

4.2. Mintagyűjtés

A denevérek befogására szolgáló hálók és húrscapdák naplemente előtt kerültek felállításra, és azokat legalább négy órán keresztül rendszeresen ellenőrizték. A befogott denevéreket papírzacskókban helyezték el tíz percre, hogy székletmintákat gyűjtsenek. Az azonosítás külső jegyek, határozóbélyegek alapján történt, és nem egyértelmű esetekben morfológiai vizsgálatra szánt példányok megőrzésére került sor. Az ivar, kor és szaporodási állapot meghatározása után a denevéreket vagy szabadon engedték, vagy más kutatási célok esetén (pl. taxonómiai vagy anatómiai vizsgálatok) elaltatták és felboncolták. Ilyen esetekben a tüdő és mellizmok eltávolításra kerültek, és a mintákat folyékony nitrogénben tárolták. A minták további tárolása -80 °C-os fagyasztóban történt. Viroológiai vizsgálatok céljából denevér példányok nem kerültek megőrzésre.

A denevérek befogása és mintázása a helyi hatóságok és a vietnami Mezőgazdasági és Vidékfejlesztési Minisztérium Erdővédelmi Osztályának engedélyével, az Amerikai Emlőskutatók Társasága által jóváhagyott irányelvek szerint történt, amelyek a vadon élő emlősök kutatási és oktatási célú használatára vonatkoznak [26].

4.3. Metagenomikai szekvenálás

A mintákat 400 µl foszfátpufferolt sóoldat (PBS) és üveggyöngyök hozzáadása után homogenizálták. Az Illumina szekvenálást egy dúsítási eljárás előzte meg a vírusos readok arányának növelésére, módosítva egy korábban publikált protokollt [27]. A homogenátumokat $16\,000 \times g$ -n centrifugálták 10 percen keresztül, majd a felülúszót 0,8 µm-es centrifugális szűrőn (Millipore) szűrték át. A mintát nukleázokkal kezelték, majd a nukleázoktól való megszabadulás és a fehérjék bontása után az RNS extrakciója a Direct-Zol RNA MiniPrep Kit segítségével történt.

Az RNS könyvtárat az NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep készlettel hozták létre az ehhez tartozó protokollt követve. A fragmentációs lépéshez 10 ng teljes RNS-t használtak. A cDNS előállítása random primerekkel történt, majd előkészítés és adapterrel való ligálás után a könyvtár amplifikálása következett. A minőségellenőrzés Agilent 4200 TapeStation System segítségével történt, míg a mennyiség meghatározására Qubit 3.0

eszközt használtak. Az Illumina szekvenálás NextSeq 550 platformon, 2×150 futtatási konfigurációban történt.

4.4. Taxonómiai besorolás

A kapott readeket a fastp program [28] alapbeállításával trimmeltük, hogy az adapter és rossz minőségű szekvencia részeket eltávolítsuk. A trimmelt szekvenciákat ezután a MEGAHIT program [29] segítségével, *de novo* összeszereltük, hogy hosszabb kontigokat kapjunk. A MEGAHIT-et szintén alapbeállításokkal futtattuk, melynek eredményeként minimum 200 bp hosszúságú szekvenciákat kaptunk. A kontigokat ezután a Diamond blastx funkciójával, -f 100 beállítással hasonlítottuk az NCBI nem-redundáns fehérje adatbázisához. A kapott .daa állományokat a MEGAN meganizer funkciójával alakítottuk át olyan formátumra, mely már grafikusán megjeleníthető a MEGAN-ban [31]. Az így talált, kutatásaink szempontjából érdekesebb vírusokat kigyűjtöttük.

4.5. Teljes genom összeállítás

A kiválasztott víruscsoportokhoz tartozó hosszabb kontigokat megkerestük a MEGAHIT eredmények között, majd BLAST homológia keresést végeztünk az NCBI Genbankban. A legközelebbi teljes genomokat referenciaként használtuk a Geneious Prime v.2024.0.3 programban történő mappinghez. A mappinget a nyers Illumina olvasatokkal végeztük low-med beállítások mellett a Geneious beépített mapping funkciójával. A kapott genomokat manuálisan ellenőriztük az esetleges hibák korrigálása érdekében és referenciaként használva remap-et alkalmaztunk, szintén a Geneious Prime v2024.0.3 szoftverrel. Egy újabb manuális ellenőrzés során kaptuk meg a végleges genomokat.

4.6. Filogenetikai és rekombinációs elemzés

A megtalált koronavírusok teljes genomjaival és a hepevírusok RdRp génjének (327 nukleotid), valamint teljes genomoknak a segítségével törzsfákat generáltunk az evolúciós kapcsolatok feltérképezéséhez. A szekvenciákat a MAFFT v7.505 [31] segítségével

illesztettük alapbeállításokkal. Manuális ellenőrzés után a törzsfákhoz használt modelleket a MrModeltest v2.4 [32] segítségével választottuk ki. A fák generálásához a MrBayes v3.2.7a [33] programot használtuk, tízmillió generáció és minden 1000. generációnál történő mintázás beállítások mellett. A modellek paraméterezése mindegyik esetben GTR+I+G volt, ami lehetővé tette, hogy a nukleotidok közötti szubsztitúciós ráta szimmetrikus, de független legyen, így rugalmasan alkalmazkodva a valós evolúciós folyamatokhoz. A modellben szerepelnek az invariáns helyek, ahol a szekvenciák változatlanok maradnak, a helyettesítési ráta variabilitását pedig egy gamma-eloszlás segítségével írja le, hogy a szekvenciák különböző helyein eltérő evolúciós sebességeket vehessen figyelembe. A generációk tíz százalékát "burn-in"-ként kezeltük és elvetettük. A poszterior valószínűségeket a fennmaradó fák konszenzusából számoltuk ki. A fákat az iToL v6.9 [34] segítségével vizualizáltuk.

4.7. Térkép készítése

A térképet a QGIS Desktop v3.6 segítségével készítettük, a Natural Earth 1:10 m Cross-blended Hypsometric Tints alapréteget használva.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Mintavétel

Összesen 55 ürülmintát gyűjtöttek Vietnámban 16 denevérfajtól, amelyek 7 nemzetséghez és 4 családhoz tartoztak (1. táblázat). A mintázott fajok között szerepelt Délkelet-Ázsia három fő táplálkozási típusa, de a denevérek többsége rovarévó volt. Az elemzések során figyelembe kellett venni azt, hogy a táplálékból is kerülhettek az ürülékbe különböző vírusok, ezért nem minden kimutatott vírus denevér eredetű.

1. táblázat Minták száma a különböző fajokból és táplálkozási mód

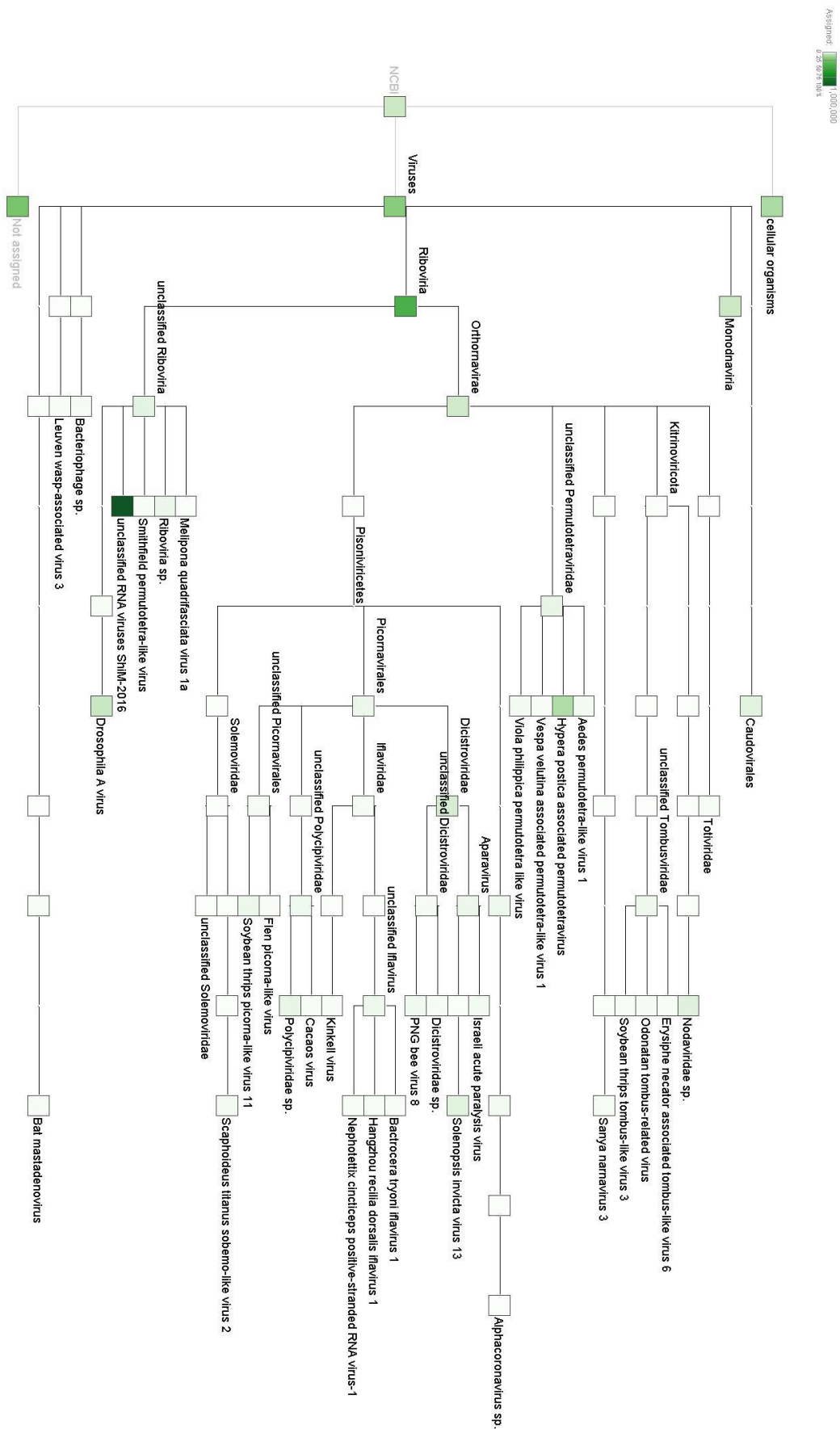
Faj	Táplálkozási mód	Mintasám
<i>Cynopterus cf. sphinx</i>	gyümölcsevő	1
<i>Hipposideros armiger</i>	rovarevő	2
<i>Hipposideros galeritus</i>	rovarevő	8
<i>Hipposideros pomona</i>	rovarevő	1
<i>Kerivoula hardwickii</i>	rovarevő	2
<i>Kerivoula titania</i>	rovarevő	1
<i>Macroglossus cf. minimus</i>	nektárfogyasztó	5
<i>Murina cf. harrisoni</i>	rovarevő	1
<i>Murina huttoni</i>	rovarevő	1
<i>Rhinolophus affinis</i>	rovarevő	5
<i>Rhinolophus lepidus</i>	rovarevő	11
<i>Rhinolophus microglobosus</i>	rovarevő	2
<i>Rhinolophus pearsonii</i>	rovarevő	5
<i>Rhinolophus thomasi</i>	rovarevő	8
<i>Scotomanes ornatus</i>	rovarevő	1
<i>Tylonycteris fulvida</i>	rovarevő	1
Összesen		55

5.2. Metagenomikai diverzitás

Összesen 453 920 982 olvasat (átlag: $8\,253\,109 \pm 3\,997\,431$; min.: 511 024; max.: 8 253 109) született az 55 mintából. A legtöbb mintában megtalálható volt legalább egy denevérvírus, melyek a következő víruscsoportokba tartoztak: koronavírusok, adenovírusok, circovírusok, hepatitis B vírusok, hepatitis E vírusok, herpeszvírusok, picornavírusok, genomovírusok és parvovírusok (2-4. ábra).



15



4. ábra A KG74 számú mintában található virális readok, koronavírus és adenovírus is megtalálható a mintában.

5.3. Új koronavírusok és hepevírusok

A metagenomikai módszerekkel kimutatott vírusok közül az alfakoronavírusokat és a hepatitis E vírusokat választottuk ki további vizsgálataink alanyául.

Teljes vagy közel teljes alfakoronavírus genomokat összesen hét mintából sikerült összeraknunk (2. táblázat). Hepevírusokat pedig egy *Scotomanes ornatus* és egy *Kerivoula titania* példányból mutattunk ki. Mind a koronavírusok mind a hepevírusok a Ta Dung Természetvédelmi Terület mintavételi pontjain kerültek elő.

2. táblázat A mintákban talált korona- és hepevírusok gazdafajai.

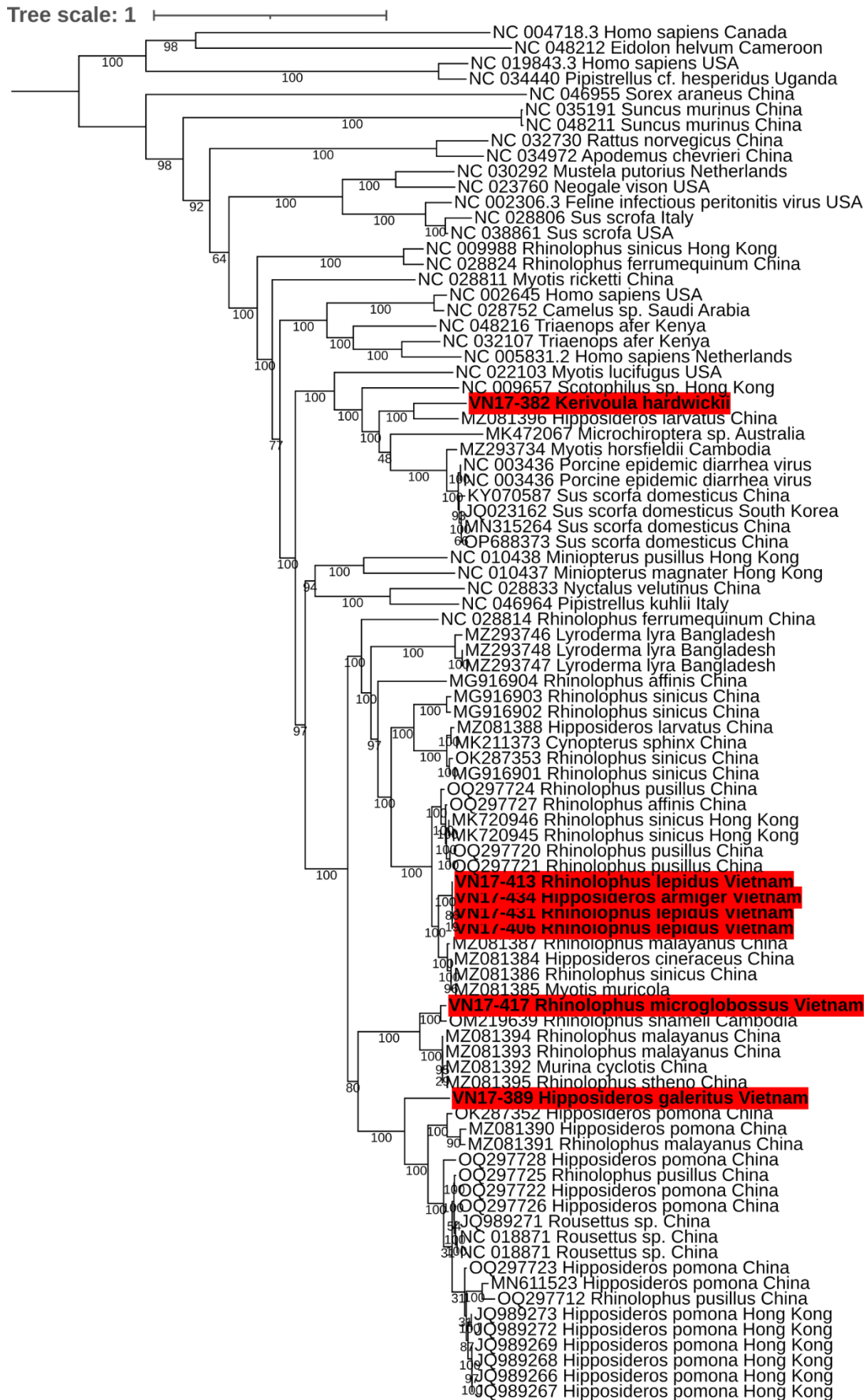
Faj	CoV pozitív	HEV pozitív	Összesen
<i>Cynopterus cf. sphinx</i>	-	-	1
<i>Hipposideros armiger</i>	1	-	2
<i>Hipposideros galeritus</i>	1	-	8
<i>Hipposideros pomona</i>	-	-	1
<i>Kerivoula hardwickii</i>	1	-	2
<i>Kerivoula titania</i>	-	1	1
<i>Macroglossus cf. minimus</i>	-	-	5
<i>Murina cf. harrisoni</i>	-	-	1
<i>Murina huttoni</i>	-	-	1
<i>Rhinolophus affinis</i>	-	-	5
<i>Rhinolophus lepidus</i>	3	-	11
<i>Rhinolophus microglobosus</i>	1	-	2
<i>Rhinolophus pearsonii</i>	-	-	5
<i>Rhinolophus thomasi</i>	-	-	8
<i>Scotomanes ornatus</i>	-	1	1
<i>Tylonycteris fulvida</i>	-	-	1
Összesen	7	2	55

5.4. Filogenetika

A teljes vagy közel teljes koronavírus genomok alapján a *Kerivoula hardwickii*-ből kimutatott koronavírus valószínűleg egy új fajt képvisel, és a *Pedacovirus* nemzetség tagja (5. ábra). Ebbe a nemzetségbe tartozik a sertések vírusos hasmenését okozó PEDV is.

A többi alfakoronavírus a *Decacovirus* nemzetségbe tartozik. A három *Rhinolophus lepidus*-ban és a *Hipposideros armiger*-ben talált vírus nagyon közel áll egymáshoz. Mindegyik denevér példány befogása a Ta Dung Természetvédelmi Terület kutatóháza közelében történt, bár nem ugyanazon a napon.

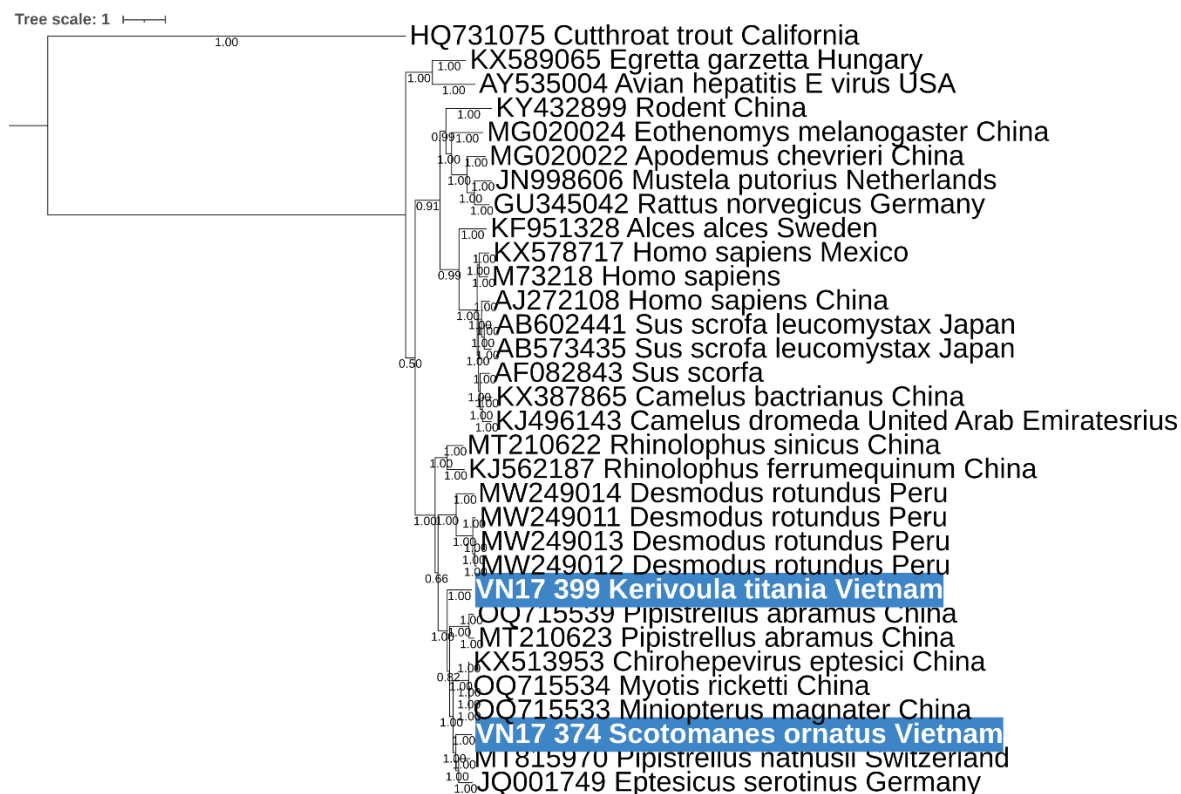
A *Rhinolophus microglobosus*-ban talált koronavírus egy kambodzsai *R. shameli*-ből kimutatott vírussal mutatott legközelebbi rokonságot. Míg a *Hipposideros galeritus* koronavírus a monofiletikus egy sor egyéb, *Hipposideros*, *Rhinolophus* és meglepő módon, *Rousettus* koronavírussal, de genetikai kódjukban viszonylag nagyobb különbségek vannak.



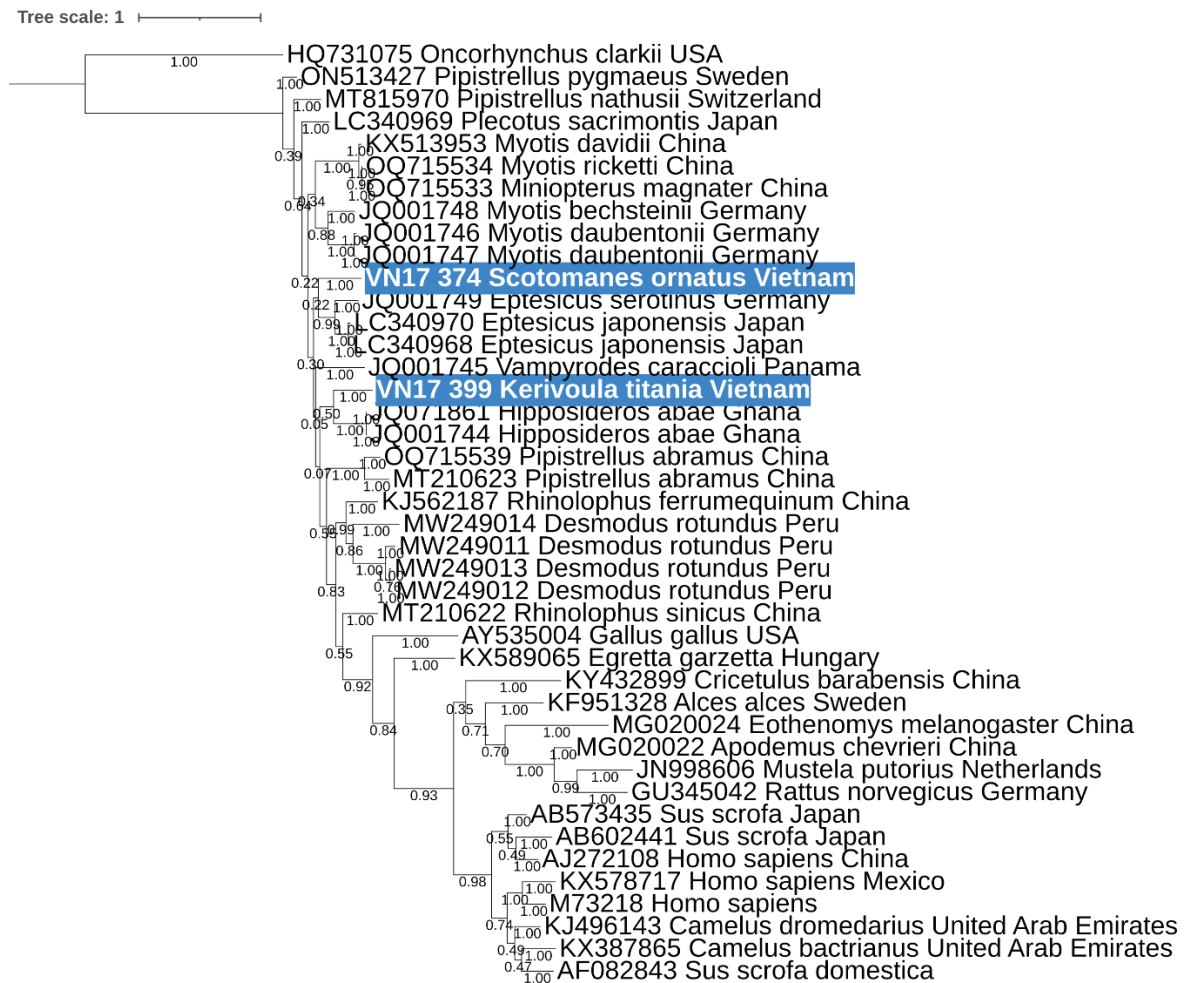
5. ábra Bayesiánus koronavírus törzsfa a teljes genomok alapján. A pirossal jelölt minták a jelen dolgozatban tárgyaltak.

A filogenetikai fa alapján a két új hepevírus a *Chirohepevirus*-ok közé tartozik (6. ábra). A *Kerivoula titania* hepevírusa bazális helyzetűnek tűnik a teljes genomok alapján generált törzsfán a Vespertilionidae denevércsalád képviselőiben talált hepevírusok között. Két *Pipistrellus abramus*-ban talált hepevírus a viszonylag távoli rokonai. A *Scotomanes ornatus* hepevírusa egy svájci *Pipistrellus nathusii* és egy németországi *Cnephaeus serotinus* (korábban *Eptesicus* nemzetség) hepevírussal alkot egy monofiletikus ágat.

Más a helyzet a több vírust tartalmazó, viszont csak a rövid RdRp szekvencián alapuló törzsfá esetében (7. ábra). Itt a *Kerivoula titania* hepevírus két ghánai *Hipposideros abae*-ből kimutatott hepevírussal áll a legközelebbi rokonságban, míg a *Scotomanes ornatus* három *Cnephaeus* hepevírus rokona, melyeket Japánban és Németországban gyűjtöttek.



6. ábra Bayesiánus hepevírus törzsfá a teljes genomok alapján. A kékkel jelölt minták a jelen dolgozatban tárgyaltak.



7. ábra Bayesiánus hepevírus törzsfa az RdRp régió alapján. A kékkel jelölt minták a jelen dolgozatban tárgyaltak.

6. DISZKUSSZIÓ

A denevérek ökológiai szerepük mellett vírusrezervoárként is kulcsfontosságúak, amit a jelen tanulmány eredményei is megerősítenek. Kutatásunk alátámasztja, milyen elképesztő gazdag vírusdiverzitás búvik meg a délkelet-ázsiai denevérekben, ahogy erre több más kutatás is rámutatott [35–37].

A korábbi vizsgálatokban számos víruscsoport tagjait kimutatták már Vietnamból, az általunk találtakon kívül többek között astrovírusokat, bunyavírusokat, paramyxovírusokat, filovírusokat, lyssavírusokat, hantavírusokat, stb. [38–41]. A paramyxovírusoknak új tagjait fedezték fel, az ebbe a családba tartozó, repülőróákban (*Pteropus* nemzetség) előforduló Nipah vírust – mely a WHO betegség prioritási listáján is szerepel – még csak szerológiai vizsgálatokkal találták meg [42]. Az új paramyxovírusok filogenetikai elemzése azt mutatta, hogy a denevér-paramyxovírusok, valamint a denevér- és patkány-koronavírusok rokonságban állnak a Föld egyéb régióiban előforduló denevérek és rágcsálók vírusaival, azonban nem találtak fajok közötti vírusátvitelt a vietnámi denevér- és patkánypopulációk között [41]. Ez a tanulmány azt is kimutatta, hogy új, potenciálisan jelentős paramyxovírus- és koronavírus-variánsok gyakran fordulnak elő Vietnám denevér- és patkánypopulációiban, ami rámutat ezen vírusok további vizsgálatának szükségességére [41].

A veszettség az egyik legkorábban azonosított és legjobban tanulmányozott fertőző betegség [43], mégis a lyssavírusokról és fő természetes gazdáikról, a denevérekről még mindig kevés ismeret áll rendelkezésre [44]. Ez a zoonózis akut, progresszív és gyógyíthatatlan vírusos agyvelőgyulladást okoz, amelyet klinikailag központi idegrendszeri rendellenességek jellemeznek, kezelés hiányában végül halálhoz vezet [45]. A betegséget a *Rhabdoviridae* családba tartozó különböző lyssavírus fajok okozzák [46]. Egy Észak-Vietnamban végzett kutatás során szerológiai vizsgálatokkal kimutatták, hogy az ott élő denevérekben különböző lyssavírusok ellen termelődött antitestek vannak jelen, köztük a veszettség vírusával (RABV) szembeni antitestek is. A vizsgálatok arra utaltak, hogy a denevérek többféle lyssavírussal kerülhettek kapcsolatba, de a pontos vírusok nem azonosíthatók, mivel vírusokat nem izoláltak. Az antitestek jelenléte ugyanakkor megerősítette, hogy a denevérek ezeknek a vírusoknak a hordozói lehetnek [47].

A vírusok közül több komoly zoonotikus potenciállal rendelkezik, ami kiemelt jelentőségű a közegészségügyi kockázatok szempontjából, különösen mivel a délkelet-ázsiai régióban a denevérek és az emberek közötti érintkezés viszonylag gyakori. Az élőhelyek pusztítása, a

denevérszálláshelyek eltűnése miatt az emberek és denevérek gyakran kerülnek kapcsolatba, mivel azok beköltözhetnek az emberi építményekbe. Még manapság is gyakori jelenség a guanó kitermelése barlangokból, egyéb építményekből, mivel rendkívül gazdag tápanyagokban és előszeretettel használják fel a mezőgazdaságban trágyázásra [10]. Egy további rendkívül jelentős tényező a denevérek táplálékként való felhasználása [9]. Nem csak a nagyobb testű repülőkuttyákat, hanem még a kisebb méretű rovarrevő denevéreket is fogyasztják a helyi emberek. Patogének egyrészt a nem megfelelően elkészített táplálékkal, vagy más – az állatpiacokon a denevérekkel együtt tartott – állatokon keresztül juthatnak be az emberekbe.

Az 55 vietnami denevérguanó minta metagenomikai vizsgálata során szinte minden mintából legalább egy vírus kimutatható volt az alábbi víruscsaládokból: koronavírusok, adenovírusok, circovírusok, hepatitis B vírusok, hepatitis E vírusok, herpeszvírusok, picornavírusok, genomovírusok és parvovírusok. Természetesen nagy mennyiségű táplálék eredetű vírust is találtunk, melyek az elfogyasztott rovarok, egyéb ízeltlábúakból kerültek a denevérek ürülékébe. Az adatok kiértékelése során ezért különösen figyelni kellett az olyan víruscsoportokra, melyek gerinces és gerinctelen gazdában egyaránt megtalálhatóak (pl. circovírusok). A fentiekén kívül nagy mennyiségben találtunk fágokat is, melyek a denevérekben található baktériumokat fertőzték és így előfordulnak a denevérguanóban is.

Jelen kutatásban az alfakoronavírusok és a hepatitis E vírusok filogenetikáját vizsgáltuk, amihez megpróbáltunk teljes vagy közel teljes genomokat összeállítani, ez az alfakoronavírusoknál összesen hét mintából, hepevírusoknál pedig kettőből sikerült. Az alfakoronavírusok két nemzetséghez tartoztak (*Pedacovirus* és *Decacovirus*), melyek mindegyike elsősorban denevérekben előforduló vírusokat foglal magába.

A *Pedacovirus* nemzetségbe tartozó, *Kerivoula hardwickii*-ben megtalált alfakoronavírus viszonylag közel helyezkedik el a törzsfán a szintén ide tartozó sertések járványos hasmenését okozó vírussal (PEDV). Hasonló kapcsolatot már korábbi kutatás is feltárt, ami arra utalhat, hogy a denevérek szerepe a vírusok fajok közötti átugrásában és azok gazdaszervezetek közötti evolúciójában kritikus fontosságú [13]. A PEDV-hez legközelebbi, nem sertéseket fertőző vírust a *Myotis horsfieldii* denevérfajból mutatták ki. Ez a vírus annyira hasonló a PEDV-hez, hogy nagy a valószínűsége annak, hogy a PEDV denevér eredetű. Kambodzsában, ahol a *Myotis horsfieldii*-t mintázták gyakran előfordul, hogy a *Myotis* nemzetségbe tartozó denevérek épületekben vagy istállóknak tanyáznak, így

előfordulhat, hogy ilyen módon fertőződtek meg a sertések [35]. Észak-Vietnamból, a Tan Lap barlangból *Mops plicatus* denevérből mutattak ki PEDV-szerű vírust más alfakoronavírusokkal egyetemben [13]. Ezek a vírusok a vietnami denevérpopulációkban való jelenlétük miatt fontos szerepet játszhatnak a gazdasági állatokra, különösen a sertésekre veszélyes járványok kialakulásában. A PEDV a sertéspopulációban súlyos gazdasági károkat okozott, és közeli rokonának azonosítása a denevérekben azt sugallja, hogy ezek a vírusok egy újabb közegészségügyi veszélyforrást jelenthetnek [13].

Érdekes módon az egy helyen gyűjtött, de két külön fajban, három *Rhinolophus lepidus*-ban és egy *Hipposideros armiger*-ben talált koronavírusok szinte teljesen megegyeztek. Bár nem ugyanazon éjszaka fogták be őket, elképzelhető, hogy egyazon kolónia tagjai. A koronavírusok vizelettel, aeroszollal és ürülékkel is terjedhetnek, a kolóniákban esetenként szoros kontaktusban lévő állatok könnyedén megfertőzhetik egymást.

A mintavételi helyszínek „evolúciós léptékkal” nincsenek nagy távolságra Kambodzsától, ez magyarázatot adhat arra, hogy a *Rhinolophus microglobosus*-ban talált koronavírus viszonylag közel áll a szintén ebbe a nemzetségbe tartozó *Rhinolophus shameli*-ből kimutatott vírussal. Bár a patkósdenevérek (*Rhinolophus* nemzetség) általában nem vonulnak nagyobb távolságokra, elképzelhető, hogy a most megtalált koronavírus és rokonai ezen a Dél-Vietnam, Kambodzsa területen cirkulálnak a denevérpopulációkban.

A hepatitis E vírusokkal kapcsolatos eredmények megerősítik, hogy a denevérek nemcsak természetes gazdaszervezetek, hanem olyan vírusok rezervoárjai is, amelyek zoonotikus átvitelére szintén van esély. A HEV zoonotikus terjedése különösen fontos lehet olyan területeken, ahol az emberek és denevérek közötti érintkezés gyakoribb, például a guanógyűjtő farmokon. Korábbi kutatások már felvetették, hogy a guanógyűjtés során az emberek potenciálisan ki vannak téve a denevérek által hordozott vírusoknak, köztük a hepatitis E vírusnak is [21]. Az ezekről a területekről származó minták vizsgálata során talált HEV-ek genetikai sokfélesége tovább erősíti ezt a megállapítást, kiemelve, hogy a denevérek és a hepatitis E vírusok közötti kapcsolat hosszú távú evolúciós együttélés eredménye lehet. Ezek az eredmények is alátámasztják, hogy a denevérek kulcsfontosságú szereplők a HEV ökológiájában, és megerősítik a korábbi kutatások által feltárt kapcsolatot a vírus és a denevérek, mint természetes rezervoárok között [21].

A hepevírusok RdRp génjén és teljes genomokon alapuló törzsfák közötti különbség jól mutatja, hogy mennyire fontos a megfelelő génszakasz, esetleg teljes genom kiválasztása a

filogenetikai elemzéseknél. Az RNS vírusok kutatása során általában a viszonylag konzervált RdRp gént szokták vizsgálni, ezért általában jelentősen több gazdafajból áll rendelkezésre szekvencia az analízishez. Nincs ez másként a hepevírusok esetében sem, ezért fordulhatott elő, hogy míg a teljes genomokból álló törzsfán a *Kerivoula titania* hepevírus két *Pipistrellus abramus*-hoz (ázsiai simaorrú denevér-félék közé tartoznak, mint a *Kerivoula titania*) állt közel, addig az RdRp törzsfán afrikai *Hipposideros abae*-vel mutat közelebbi rokonságot. Eredményeink azt is feltételezik, hogy a denevérek a hepevírusoknak is rezervoár szervezetei, annak ellenére, hogy viszonylag kevés hepevírus fajt ismerünk belőlük, egyre több új kerül elő.

Mind a koronavírusok mind a hepevírusok a Ta Dung Természetvédelmi Terület mintavételi pontjain kerültek elő. A Ho Shi Minh-városban lévő mintavételi pontokon is találtunk azonban vírusokat, bár kisebb mennyiségben. A mintázott fajkészlet is alacsonyabb volt a városhoz közeli, viszonylag degradált élőhelyen, mely magyarázhatja, hogy a koronavírusok és hepevírusok esetében is inkább a természetes élőhelyeken találtuk meg őket.

A denevérek vírusaival végzett vizsgálataink eredményei mindössze kiegészítik azt a komplex képet, amit a koronavírus járványok miatt fellendült denevérvírus kutatások eddig elértek, és jelzik a terület további intenzív kutatásának fontosságát.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Görföl Tamásnak a rengeteg segítséget, amit dolgozatom elkészítése során nyújtott. Köszönöm a támogatást, a türelmet kérdéseim megválaszolásához és a tanácsokat, amivel hozzájárult szakmai fejlődésemhez és munkám elkészüléséhez.

A dolgozat alapjául szolgáló mintákat Dr. Kemenesi Gábor és Dr. Vuong Tan Tu gyűjtötték. Köszönöm a Pécsi Tudományegyetem, Virologiai Nemzeti Laboratórium és a HUN-REN Állatorvostudományi Kutatóintézet munkatársainak, hogy az általuk generált metagenomikai adatokon dolgozhattam.

Köszönöm Dr. Szabó Krisztiánnak, hogy belső témavezetőmként ügyelt rá, hogy az Egyetem követelményeinek megfelelően a dolgozatom.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ramírez-Fráncel LA, García-Herrera LV, Losada-Prado S, Reinoso-Flórez G, Sánchez-Hernández A, Estrada-Villegas S, Lim BK, Guevara G (2022) Bats and their vital ecosystem services: a global review. *Integr Zool* 17:2–23. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12552>
2. Gross M (2019) Why we should care about bats. *Curr Biol* 29:R1163–R1165. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.10.053>
3. Kerth G (2008) Causes and Consequences of Sociality in Bats. *BioScience* 58:737–746. <https://doi.org/10.1641/B580810>
4. Xie J, Li Y, Shen X, Goh G, Zhu Y, Cui J, Wang L-F, Shi Z-L, Zhou P (2018) Dampened STING-Dependent Interferon Activation in Bats. *Cell Host Microbe* 23:297–301.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.006>
5. Zhang G, Cowled C, Shi Z, Huang Z, Bishop-Lilly KA, Fang X, Wynne JW, Xiong Z, Baker ML, Zhao W, Tachedjian M, Zhu Y, Zhou P, Jiang X, Ng J, Yang L, Wu L, Xiao J, Feng Y, Chen Y, Sun X, Zhang Y, Marsh GA, Crameri G, Broder CC, Frey KG, Wang L-F, Wang J (2013) Comparative Analysis of Bat Genomes Provides Insight into the Evolution of Flight and Immunity. *Science* 339:456–460. <https://doi.org/10.1126/science.1230835>
6. Irving AT, Ahn M, Goh G, Anderson DE, Wang L-F (2021) Lessons from the host defences of bats, a unique viral reservoir. *Nature* 589:363–370. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03128-0>
7. Dacheux L, Cervantes-Gonzalez M, Guigon G, Thiberge J-M, Vandenbogaert M, Maufrais C, Caro V, Bourhy H (2014) A Preliminary Study of Viral Metagenomics of French Bat Species in Contact with Humans: Identification of New Mammalian Viruses. *PLOS ONE* 9
8. Allen T, Murray KA, Zambrana-Torrel C, Morse SS, Rondinini C, Di Marco M, Breit N, Olival KJ, Daszak P (2017) Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. *Nat Commun* 8:1124. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00923-8>
9. Mickleburgh S, Waylen K, Racey P (2009) Bats as bushmeat: a global review. *Oryx* 43:217–234. <https://doi.org/10.1017/S0030605308000938>
10. Sothearen T, Furey NM, Jurgens JA (2014) Effect of bat guano on the growth of five economically important plant species. *J Trop Agric* 52:169–173
11. Furey NM, Racey PA, Ith S, Touch V, Cappelle J (2018) Reproductive Ecology of Wrinkle-Lipped Free-Tailed Bats *Chaerephon plicatus* (Buchanan, 1800) in Relation to Guano Production in Cambodia. *Diversity* 10:91. <https://doi.org/10.3390/d10030091>
12. Huong NQ, Nga NTT, Long NV, Luu BD, Latinne A, Pruvot M, Phuong NT, Quang LTV, Hung VV, Lan NT, Hoa NT, Minh PQ, Diep NT, Tung N, Ky VD, Robertson SI, Thuy HB, Long NV, Gilbert M, Wicker L, Mazet JAK, Johnson CK, Goldstein T, Tremeau-Bravard A, Ontiveros V, Joly DO, Walzer C, Fine AE, Olson SH (2020)

- Coronavirus testing indicates transmission risk increases along wildlife supply chains for human consumption in Viet Nam, 2013-2014. *PLOS ONE* 15:e0237129. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237129>
13. Latinne A, Nga NTT, Long NV, Ngoc PTB, Thuy HB, PREDICT Consortium, Long NV, Long PT, Phuong NT, Quang LTV, Tung N, Nam VS, Duoc VT, Thinh ND, Schoepp R, Ricks K, Inui K, Padungtod P, Johnson CK, Mazet JAK, Walzer C, Olson SH, Fine AE (2023) One Health Surveillance Highlights Circulation of Viruses with Zoonotic Potential in Bats, Pigs, and Humans in Viet Nam. *Viruses* 15:790. <https://doi.org/10.3390/v15030790>
 14. Y H, P X, Y W, W Z, J Z, S Z, J W, Q J, Z W (2023) Panoramic analysis of coronaviruses carried by representative bat species in Southern China to better understand the coronavirus sphere. *Nat Commun* 14:. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41264-z>
 15. Zhou Z, Qiu Y, Ge X (2021) The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order. *Anim Dis* 1:5. <https://doi.org/10.1186/s44149-021-00005-9>
 16. McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM (1967) Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57:933–940. <https://doi.org/10.1073/pnas.57.4.933>
 17. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJM, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PME, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B (2004) Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 10:368–373. <https://doi.org/10.1038/nm1024>
 18. El-Sahly HM, Atmar RL, Glezen WP, Greenberg SB (2000) Spectrum of Clinical Illness in Hospitalized Patients with “Common Cold” Virus Infections. *Clin Infect Dis* 31:96–100. <https://doi.org/10.1086/313937>
 19. Ec T, Bh T, Ma P, Ps W, Pj T, Pj C, Ll O, A S, Cg T, Ck T (2017) Hepatitis E in Singapore: A Case-Series and Viral Phylodynamics Study. *Am J Trop Med Hyg* 96:. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0482>
 20. Dalton HR, Stableforth W, Thuraiajah P, Hazeldine S, Remnarace R, Usama W, Farrington L, Hamad N, Sieberhagen C, Ellis V, Mitchell J, Hussaini SH, Banks M, Ijaz S, Bendall RP (2008) Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20:784. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e3282f5195a>
 21. Drexler JF, Seelen A, Corman VM, Fumie Tateno A, Cottontail V, Melim Zerbinati R, Gloza-Rausch F, Klose SM, Adu-Sarkodie Y, Oppong SK, Kalko EKV, Osterman A, Rasche A, Adam A, Muller MA, Ulrich RG, Leroy EM, Lukashev AN, Drosten C (2012) Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J Virol* 86:9134–9147. <https://doi.org/10.1128/JVI.00800-12>
 22. Wang W, Wang Y, Qu C, Wang S, Zhou J, Cao W, Xu L, Ma B, Hakim MS, Yin Y, Li T, Peppelenbosch MP, Zhao J, Pan Q (2018) The RNA genome of hepatitis E virus

- robustly triggers an antiviral interferon response. *Hepatology* 67:2096–2112. <https://doi.org/10.1002/hep.29702>
23. Johne R, Plenge-Bönig A, Hess M, Ulrich RG, Reetz J, Schielke A (2010) Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol* 91:750–758. <https://doi.org/10.1099/vir.0.016584-0>
 24. Furey NM, Mackie IJ, Racey PA (2010) Bat diversity in Vietnamese limestone karst areas and the implications of forest degradation. *Biodivers Conserv* 19:1821–1838. <https://doi.org/10.1007/s10531-010-9806-0>
 25. Govender KN, Street TL, Sanderson ND, Eyre DW (2021) Metagenomic Sequencing as a Pathogen-Agnostic Clinical Diagnostic Tool for Infectious Diseases: a Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Test Accuracy Studies. *J Clin Microbiol* 59:e0291620. <https://doi.org/10.1128/JCM.02916-20>
 26. Sikes R (2016) 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education: *J Mammal* 97:gyw078. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyw078>
 27. Conceição-Neto N, Zeller M, Lefrère H, De Bruyn P, Beller L, Deboutte W, Yinda CK, Lavigne R, Maes P, Van Ranst M, Heylen E, Matthijnsens J (2015) Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. *Sci Rep* 5:16532. <https://doi.org/10.1038/srep16532>
 28. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34:i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
 29. Li D, Liu C-M, Luo R, Sadakane K, Lam T-W (2015) MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct *de Bruijn* graph. *Bioinformatics* 31:1674–1676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>
 30. Buchfink B, Xie C, Huson DH (2015) Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods* 12:59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
 31. Bağcı C, Patz S, Huson DH (2021) DIAMOND+MEGAN: Fast and Easy Taxonomic and Functional Analysis of Short and Long Microbiome Sequences. *Curr Protoc* 1:. <https://doi.org/10.1002/cpz1.59>
 32. Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30:772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
 33. Nylander J (2004) MrModeltest V2. Program Distributed by the Author. *Bioinformatics* 24:581–583
 34. Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>

35. Letunic I, Bork P (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* 44:W242-245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>
36. Lacroix A, Duong V, Hul V, San S, Davun H, Omaliss K, Chea S, Hassanin A, Theppangna W, Silithammavong S, Khammavong K, Singhalath S, Greateorex Z, Fine AE, Goldstein T, Olson S, Joly DO, Keatts L, Dussart P, Afelt A, Frutos R, Buchy P (2017) Genetic diversity of coronaviruses in bats in Lao PDR and Cambodia. *Infect Genet Evol* 48:10–18. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.11.029>
37. Lunn TJ, Peel AJ, McCallum H, Eby P, Kessler MK, Plowright RK, Restif O (2021) Spatial dynamics of pathogen transmission in communally roosting species: impacts of changing habitats on bat-virus dynamics. *J Anim Ecol* 1365-2656.13566. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13566>
38. Gay N, Olival KJ, Bumrungsri S, Siriaronrat B, Bourgarel M, Morand S (2014) Parasite and viral species richness of Southeast Asian bats: Fragmentation of area distribution matters. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 3:161–170. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.06.003>
39. Drexler JF, Corman VM, Müller MA, Maganga GD, Vallo P, Binger T, Gloza-Rausch F, Cottontail VM, Rasche A, Yordanov S, Seebens A, Knörnschild M, Oppong S, Sarkodie YA, Pongombo C, Lukashev AN, Schmidt-Chanasit J, Stöcker A, Carneiro AJB, Erbar S, Maisner A, Fronhoffs F, Buettner R, Kalko EKV, Kruppa T, Franke CR, Kallies R, Yandoko ERN, Herrler G, Reusken C, Hassanin A, Krüger DH, Matthee S, Ulrich RG, Leroy EM, Drosten C (2012) Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun* 3:796. <https://doi.org/10.1038/ncomms1796>
40. Gu SH, Lim BK, Kadjo B, Arai S, Kim J-A, Nicolas V, Lalis A, Denys C, Cook JA, Dominguez SR, Holmes KV, Urushadze L, Sidamonidze K, Putkaradze D, Kuzmin IV, Kosoy MY, Song J-W, Yanagihara R (2014) Molecular Phylogeny of Hantaviruses Harbored by Insectivorous Bats in Cote d'Ivoire and Vietnam. *VIRUSES-BASEL* 6:1897–1910
41. Makenov MT, Le LAT, Stukolova OA, Radyuk EV, Morozkin ES, Bui NTT, Zhurenkova OB, Dao MN, Nguyen CV, Luong MT, Nguyen DT, Fedorova MV, Valdokhina AV, Bulanenko VP, Akimkin VG, Karan LS (2023) Detection of Filoviruses in Bats in Vietnam. *Viruses* 15:1785. <https://doi.org/10.3390/v15091785>
42. Berto A, Anh PH, Carrique-Mas JJ, Simmonds P, Van Cuong N, Tue NT, Van Dung N, Woolhouse ME, Smith I, Marsh GA, Bryant JE, Thwaites GE, Baker S, Rabaa MA, VIZIONS consortium (2018) Detection of potentially novel paramyxovirus and coronavirus viral RNA in bats and rats in the Mekong Delta region of southern Viet Nam. *Zoonoses Public Health* 65:30–42. <https://doi.org/10.1111/zph.12362>
43. Hasebe F, Thuy NTT, Inoue S, Yu F, Kaku Y, Watanabe S, Akashi H, Dat DT, Mai LTQ, Morita K Serologic Evidence of Nipah Virus Infection in Bats, Vietnam - Volume 18, Number 3—March 2012 - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC. <https://doi.org/10.3201/eid1803.111121>

44. Vella E (1975) RABIES. *The Lancet* 306:1206. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(75\)92691-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(75)92691-4)
45. Freuling C, Vos A, Johnson N, Fooks AR, Mueller T (2009) Bat Rabies - a Gordian knot? *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 122:425–433
46. Fischer M, Wernike K, Freuling CM, Mueller T, Aylan O, Brochier B, Cliquet F, Vazquez-Moron S, Hostnik P, Huovilainen A, Isaksson M, Kooi EA, Mooney J, Turcitu M, Rasmussen TB, Revilla-Fernandez S, Smreczak M, Fooks AR, Marston DA, Beer M, Hoffmann B (2013) Step Forward in Molecular Diagnostics of Lyssaviruses - Results of a Ring Trial among European Laboratories. *PLOS ONE* 8
47. Walker PJ, Blasdel KR, Calisher CH, Dietzgen RG, Kondo H, Kurath G, Longdon B, Stone DM, Tesh RB, Tordo N, Vasilakis N, Whitfield AE, Ictv Report Consortium null (2018) ICTV Virus Taxonomy Profile: Rhabdoviridae. *J Gen Virol* 99:447–448. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001020>
48. Nguyen ATK, Nguyen TT, Noguchi A, Nguyen DV, Ngo GC, Thong VD, Olowokure B, Inoue S (2014) Bat lyssaviruses, northern Vietnam. *Emerg Infect Dis* 20:161–163. <https://doi.org/10.3201/eid2001.130813>