

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

Algériai denevérek által terjesztett virális zoonózisok

PhD értekezés

Zeghib Safia

Témavezető:

Prof. Dr. Ferenc Jakab

PhD, habil



PÉCS, 2022

1. Bevezetés

A denevérek rendje az emlősök legváltozatosabb és legnagyobb rendje, nagyjából 1423 elismert fajjal, valamint kivételes repülési és visszhang alkotási képességgel (Han et al., 2015). Széles földrajzi elterjedésűek, eltekintve a sarki régióktól, a szélsőséges sivatagi éghajlattól és néhány óceáni szigettől (Irving et al., 2021). A filogenetikai elemzés alapján a denevérek 52,5 millió évvel ezelőttre vezethetők vissza. Ez lehetővé tette számos vírussal való koevolúciójukat, így természetes rezervoár gazdákká váltak (Wynne & Wang, 2013). Továbbá a napjainkban a denevérek immunitásával, anyagcseréjével és mitokondriális dinamikájával kapcsolatos összes tanulmány rámutat, hogy a denevérek felépítése adaptálódott a repülés igényeihez és következményeihez. A megváltozott veleszületett immunválaszuk mellett, amelyek egyensúlyban tartják az immuntolerancia mechanizmusait és a gazdaszervezet védekezési stratégiáit, hipotetikusan hozzájárulnak hosszú élettartamukhoz és a rákos megbetegedések előfordulási arányának csökkenéséhez, amellet, hogy kivételes tünetmentes vírushordozók (Banerjee et al., 2020; Gorbunova et al., 2020; Irving et al., 2021).

A zoonózisok a gerinces állatokról az emberre természetes úton terjedő betegségek. Az újonnan megjelenő zoonózisos megbetegedések körülbelül 70%-a vadon élő állatoktól származik, főként azoktól, amelyek taxonómiaiilag változatos fajokat tartalmaznak, mint például a denevérek (Hassell et al., 2017; Jones et al., 2008). Ezenkívül az emberi populáció globális terjeszkedése és a természetes állati élőhelyek elfoglalása az állatok és az emberek közötti érintkezési arány növekedéséhez vezetett (Hassell et al., 2017). Míg a globalizáció, az utazás és a kereskedelem megkönnyíti a terjedést, és biztosítja a nehezen ellenőrizhető járványok előfordulását a jól bevált mérséklő intézkedések végrehajtása ellenére (Sabin et al., 2020). Nem meglepő módon az elmúlt évtizedben számos súlyos, kialakulóban lévő vírusos betegség társult a denevérekhez: például a Kínában 2002-ben bejelentett súlyos akut légúti szindróma (SARS) járvány számos vizsgálatot követően a kínai patkós denevérekhez köthető (Shi & Hu, 2008). Hasonlóképpen az ezt követő koronavírus járvány: a közel-keleti légúti koronavírus (MERS) először 2012-ben jelentették be, mely denevérektől származhatott (Han et al., 2016). Végül 2019-ben az újonnan felbukkanó SARS-CoV-2 súlyos megbetegedéseket okozott Kínában, Vuhanban, majd világméretű járványt. Függetlenül attól, hogy a SARS-CoV-2 milyen homályos úton terjedt az emberekre, a legtöbb hipotézis szerint a denevérek a természetes vírushordozók (Prince et al., 2021; Temmam et al., 2021). Mindezzel párhuzamosan, a vírusokkal és a vírusgazda denevérekkel kapcsolatos intenzív molekuláris elemzések alapján számos vírus családot azonosítottak denevérekből, többek között, de nem kizárólagosan: *Lyssaviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Hepeviridae*, *Picornaviridae*, *Arenaviridae*, *Filoviridae*, *Hantaviridae*, *Nairoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Adenoviridae*, *Herpesviridae* and *Hepadnaviridae* (Chen et al., 2020; Letko et al., 2020). Ennek ellenére számos szempont, mint például a zoonózis-potenciál, a továbbgyűrűző események, az evolúció és még sok szempont kevésbé ismert. Az említett okok miatt, további kutatások indokoltak az ismeretek megszerzése szempontjából az esetleges járványokra való felkészüléshez (Aarestrup et al., 2021; Simpson et al., 2020).

Algériában, amely Észak-Afrikában található, területe 2,4 millió km² és 45 millió lakosú, a különféle biotópokból adódóan hatalmas denevér diverzitás alakult ki (Ahmim, 2018). Annak ellenére, hogy széles körben elterjedtek és jelen vannak az emberek közelében lévő városi területeken is, a denevéreket és vírusgazda szerepüket

még mindig kevésbé tanulmányozzák. Figyelemre méltó, hogy a denevérekkel kapcsolatos vírusos zoonózisokkal kapcsolatban nem állnak rendelkezésre más publikációk, kivéve a Pikornavírusokkal (Zeghib et al., 2019) és Koronavírusokkal (Zeghib et al., 2021) kapcsolatos tanulmányainkat.

2. Célkitűzés

- Mintavétel denevérektől városi területeken és az emberekhez közeli barlangokból.
- A gyűjtött minták széleskörű virológiai elemzése, valamint gazdaszervezeteik meghatározása genomikai elemzések segítségével
- Az azonosított vírusok evolúciós, valamint genomikai összehasonlító elemzése.
- Az új SARS-CoV-2 világvárvány vizsgálata Algériában *in silico* elemzésekkel.
- Az algériai járványhoz kapcsolódó többszörös behurcolási események, valamint a vírus országon belüli átviteli mintázatának jellemzése.
- Az algériai szekvenciákhoz tartozó nukleotid- és aminosav mutációk leírása, valamint azok várható hatásainak előrejelzése az érintett fehérje működését illetően.
- ‘Molecular tracing’ elvégzése és rámutatás a hiányzó mintavétel nélküli adatokra.
- A végrehajtott járványügyi intézkedések értékelése statisztikai elemzéssel

3. Anyag és módszer

Mintagyűjtés

A guanó mintagyűjtés 2016 és 2018 között zajlott az algériai tengerparton fekvő Bejaia város Aoukas és Melbou barlangjaiból. Továbbá 2018-ban további mintavétel történt a Konstantin városában található Ibn-Ziad barlangban. Összesen 97 guanó minta állt rendelkezésre a további feldolgozás és elemzés céljából.

Denevér guanó minták előkészítése és nukleinsav extrakció

A mintákat 500 µl 1X PBS és két darab 2,0-2,5 mm átmérőjű üvegyöngy felhasználásával homogenizáltuk (Kisker Biotech GmbH & CO., Németország) 60 másodpercig maximális sebességgel Minilys® homogenizátorral (Bertin Corp., USA). A nukleinsav extrakciót a gyártó ajánlásainak szigorú betartásával végeztük 200 µl felülúszóból a GeneJET Viral DNS/RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific., USA) vagy Genaid viral nucleic extraction kit II (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) segítségével elérhetőségtől függően. A tisztított nukleinsavat 50 µl nukleáz mentes vízben eluáltuk, majd -80°C-on tároltuk.

Polimeráz láncreakció (PCR)

Számos oligonukleotidot és PCR típust használtunk vírusspecifikus nukleinsav kimutatásra, molekuláris azonosításra (‘barcoding’) vagy teljes genom helyreállításra. A 800 bp-ig terjedő fragmentumok esetében a reverz transzkripció polimeráz láncreakciókat (RT-PCR) a QIAGEN OneStep RT-PCR kittel (Qiagen, Németország), míg a hosszabb fragmentumokat (>1000 bp) a SuperScript® III One- Step RT-PCR rendszer Platinum® Taq DNS polimeráz kittel (Thermo Fisher Scientific, USA) végeztük el. Hasonlóképpen a hagyományos PCR-eket GoTaq®

G2 Flexi DNS polimeráz kittel (Promega, USA) végeztük (fragment \leq 800 bp). Míg a Phusion High-Fidelity DNS-polimerázt (Thermo Fisher Scientific, USA) használták hosszú amplikonokhoz ($>$ 800 bp).

Klónozás és Sanger szekvenálás

A denevér Koronavírusok esetében, a PCR amplikonok pGEM-T Easy vectorba történő ligálása zajlott (Promega, USA) és a rekombináns plazmidokat tartalmazó Escherichia coli JM109 kompetens sejtek (Promega, USA) transzfektálása a gyártói utasításokat követve. A rekombináns telepek kék/fehér szelekciójához a transzfektált sejtek Luria-Bertani (LB; Sigma Ltd.) táptalajra történő szélesztése zajlott: a lemezek tartalmaztak $100\mu\text{g/ml}$ ampicillin, 0.5mM IPTG és $40\mu\text{g/ml}$ X-Gal és egy éjszakán át tartó inkubálás történt 37°C -on. A pozitív klónok colony-PCR-on estek át pGEM-T Easy Vector-specifikus primerek alkalmazásával. Ezt követően egy tisztítási lépést végeztünk a Geneaid Gel/PCR DNS fragment kittel (Geneaid Biotech Ltd, Taiwan). A BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kitet (Applied Biosystems, USA) alkalmaztuk a szekvenáláshoz. A mintákat ABI Prism 310 DNS Sequencer (Applied Biosystems, USA) berendezésen dolgoztuk fel.

Következő generációs szekvenálás IonTorrent PGM és Illumina platformokon

A könyvtár készítést megelőzően a mintákat alacsony fordulatszámon Sartorius (Sartorius, Germany) szűrő cső segítségével a törmelékeltávolítottuk majd enzimátikus emésztést végeztünk [Micrococcal nuclease (Thermo Fisher Scientific, USA) and Benzonase (Sigma-Aldrich., USA)] a virális eredetű nukleinsav további tisztítása érdekében. Mindezen felül, célzottan az RNS vírusok felszaporozása érdekében szekvencia független egy primer amplifikációs eljárást alkalmaztunk (SISPA). Az IonTorrent platformon történő szekvenálás kivitelezéséhez a könyvtárkészítés a NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent™ kit (New England Biolabs, USA) valamint az IonTorrent Xpress barcode adapters kit segítségével történt. Ezt követően a klonális amplifikációt az Ion PGM Template Kit használatával a OneTouch v2 eszköz (Life Technologies, USA) segítségével végeztük. A pozitív gyöngyöket az Ion OneTouch™ ES pipettázó robot használatával dúsítottuk. A szekvenálás 316-os chip felhasználásával zajlott (Life Technologies, USA). Mindezzel párhuzamosan, az IonTorrent szekvenálás eredményeinek megerősítése érdekében, Illumina platformra is készítettünk könyvtárakat NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) használatával. A szekvenálás Illumina NextSeq készüléken 2×150 bp leolvasási hosszúsággal zajlott (Illumina). Az szekvenálási eredmények nyers adatainak kiértékelését, trimmelését és minőségellenőrzését CLC Genomics Workbench version 9.0 (<http://www.clcbio.com>) program segítségével végeztük. A szekvenálás során keletkezett szekvencia adatok taxonómiai besorolását Diamond v0.8.3 adatbázis segítségével végeztük.

A cDNS-végek amplifikációja polimeráz láncreakcióval (3' RACE-PCR)

A denevér Picornavírus genomjára vonatkozóan elvégzett kísérletek. A SuperScript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, USA) és a 2nd Generation RACE kit (Roche, Svájc) felhasználásával az első szál cDNS-t az Oligo dT-Anchor Primerrel kombinálva, egy tervezett szekvencia specifikus primerrel (1/3' race) kaptuk. Ezt követően a cDNS-amplifikációt PCR Anchor Primerrel (Roche, Svájc) és egy második szekvencia specifikus primerrel

folytattuk (2/3' race). A kapott amplikonokat először 1,2%-os agaróz gélen tettük láthatóvá, majd a Geneaid Gel PCR DNS fragmentum extrakciós kittel tisztítottuk (Geneaid, Taiwan). A szekvenálást Ion Torrent (Life Technologies, USA) segítségével végeztük. Végül a CLC Genomics Workbench-et (<http://www.clcbio.com/>) használtuk a de novo szekvencia összeállításhoz és a referencia térképezéshez.

Szekvencia szerkesztés, temporal signal assessment, filogenetikai és filogeográfiai elemzés

A denevér picornavírus BtPV-analízisével kapcsolatban az adatkészlet 70 RNS-függő RNS polimeráz (RdRp) szekvenciát és 29 denevérrrel kapcsolatos citokróm B szekvenciát tartalmazott. A szekvenciák illesztése a MAFFT webszerveren történt (Kato et al., 2002). Ezután a non-molecular clock Bayesian filogenetikai analízist végeztünk MrBayes v3.2.4 szoftverrel (Ronquist et al., 2012) mind a BtPV-k, mind a gazdaszervezetek esetében. Mindegyik elemzés 10 millió generáción keresztül működött és 1000 generációként történt mintavétel. Az eredményül kapott fákat vizuálisan iTOL segítségével kerültek szerkesztésre (Letunic & Bork, 2016).

Hasonlóképpen, a denevér koronavírus adatkészlete 24 részleges helikáz gént és 806 részleges RdRp szekvenciát tartalmazott. Először a szekvenciák igazítása a MAFFT webszerverentörtént az alapértelmezett paraméterekkel (Kato et al., 2002). Ezt követően az IQTREE webszerverben mindegyik 'substitution model selections' és 'maximum likelihood' filogenetikai fák 'ultrafast bootstrapping' módszerrel valósították meg.

Végül a SARS-CoV-2 szekvencia elemzés két adatkészletből állt; egy globális 95 genomot tartalmazóból (29 Algéria és 66 világszerte), és egy helyi adatkészlet csak az algériai szekvenciákból állt. A 'time calibrated' filogenetikai fák értelmezése előtt mindkét adatkészleten belüli 'temporal signal'-t a TempEst segítségével értékeltünk, a fentebb leírtak szerint (Rambaut et al., 2016). Ezt követően a BEAST 1.10.4 program segítségével a 'molecular clock' filogenetikai fát használtuk a rekonstrukcióhoz a globális világjárványra vonatkozóan a GTR+I alatt és egy 'lognormal uncorrelated relaxed clock' modellt. Figyelembe véve a népesség növekedését, egy exponenciális növekedésű koaleszcens modellt választottunk (Drummond et al., 2006; Suchard et al., 2018). Ezzel párhuzamosan az algériai világjárványra filogenetikai, valamint diszkrét és folyamatos filogeográfiai elemzéseket végeztünk az alábbi paraméterek mellett: a 'time calibrated' filogenetikai fa a GTR+I szubsztitúciós modell alapján 'lognormal uncorrelated relaxed clock' és egy 'skyline plot coalescent' modellel állapítottuk meg a népességdinamikát. A diszkrét filogeográfiához a Bayes-féle sztochasztikus 'search variable selection' (BSSVS) kombináltunk és egy 'standard symmetric substitution modellt a diszkrét diffúziós folyamatot illetően az algériai városok közötti jelentős átmenetekre lehet következtetni a Bayes-faktorgeneráció (BF) alapján. Ezzel szemben a folyamatos diffúziós modell a Brown-diffúzió alapul, homogén eloszlási sebességet feltételezve a filogenezisben, és következtetni lehet az ősi állapotokra, amelyekhez a folyamatos filogeográfiai diffúziós elemzésekhez koordinátákon (szélességi és hosszúsági fok) alapuló koordinátákat alkalmaztunk (Lemey et al., 2010). Ezt követően a Spread3 v0.9.7 szoftvert használtuk a transzmissziós útvonalak megjelenítésére és a Bayes-tényező kiszámítására (BF) (Bielejec et al., 2011).

Páronkénti genetikai távolság

MegAlign pro programmal (DNASTAR v15.2.0) illetve a MEGA v6 programmal (Tamura et al., 2013) a nukleotid- vagy aminosav változások számát a szekvenciapárok között számítottuk ki.

Filogenetikai ‘trait association’ vizsgálat

A BtPiV esetében a filogenezis és a mintavételi hely, a gazda nemzetség vagy a gazdafaj közötti asszociáció mértékét a BaTS csomag segítségével becsültük meg (Parker et al., 2008).

Vírus-gazdaszervezet koevolúciós elemzése

A JANE v 4.0 (Conow et al., 2010) programot használtuk a koevolúció elemzéséhez, amely levezeti a különböző evolúciós események gyakoriságát (kospeciáció, duplikáció, gazda váltás, elvesztés és a szétválás) a Picornavírusok és a hozzájuk tartozó denevér gazdáik között.

Szelekciós nyomás és mutációanalízis

A vizsgálat során az algériai szekvenciákat a kínai referencia szekvenciákkal hasonlítottuk össze. A szelekciós nyomást a ω hányados határozza meg, amely a nem szinoním mutációk (Ka/dn) és a szinoním mutációk (Ks/ds) arányán alapul (Nei és Gojobori, 1989). Vizsgálatunk során az említett hányadost az *ORF1a*, *ORF1b*, *S*, *E*, *M*, *N*, *ORF3a* és *ORF8* gének esetében a SNAP v2.1.1 program segítségével határoztuk meg (Bromberg & Rost, 2007; Masatoshi Nei & Takashi Gojobori, 1986; Yang & Bielawski, 2000). Ezzel párhuzamosan, az algériai szekvenciákat érintő nukleotid- és aminosav mutációk azonosítását a GISAID adatbázisba beépített CoVserver mutations App segítségével hajtottuk végre (Elbe & Buckland-Merrett, 2017). Ezt követően az aminosav változások várható hatását az érintett fehérjére PredictSNP webszerver segítségével határoztuk meg (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp/>, accessed on 1 August 2021).

Rekombinációs analízis

A rekombinációs eseményeket az RDP4 szoftver (Martin et al., 2015) (SARS-CoV-2) segítségével vagy a különböző génekből (BtPiV P1, P2, P3) konstruált filogénekből megfigyelt inkongruenciák alapján detektáltuk.

Statisztikai analízis

Spearman koefficiensalkalmaztunk a Picornaviridae családban, hogy megbecsüljük a korreláció erősségét a picornavírusok sokfélesége között, amelyet a picornavírusok kimutatott klasztereinek száma és a Picornavirus fajok száma négy nemzetségben képvisel. Másrészt az algériai SARS-CoV-2 pandémia elleni védekezés kapcsán végrehajtott mérséklő intézkedések értékeléséhez a fertőzött, felépült és halmozott halálozási esetek összegyűjtése után a lineáris, exponenciális és logaritmusos trendvonalakat hasonlítottunk össze. Ezt követően az R^2 értékek alapján választottuk ki a legjobb modellt. Ezt követően kiszámítottuk a korrelációs együtthatót a népsűrűség (az egyes algériai városokra számítva) és a megerősített esetek száma között (minden városon belül).

Haplotípus hálózatelemzés

A részleges algériai szekvenciák adatbázisból történő eltávolítását követően a 84 teljes genomot tartalmazó adathalmazból haplotípus fájlt generáltunk DnaSP v6.12.03 programcsomag segítségével (Rozas et al., 2017) majd, a POPART szoftvert használtuk a haplotípus hálózat elemzéshez, amely a származási ország alapján a medián csatlakozási hálózat módszerével készült, mint (epsilon=0) alapértelmezett beállítás (Bandelt et al., 1999; Leigh & Bryant, 2015).

4. A főbb eredmények és jelentőségük összefoglalása

A *Picornaviridae* családdal kapcsolatban:

- Az első picornavírus genom leírása egy algériai *Miniopterus schreibersii* denevérből. Az új vírus a *Mischivirus* nemzetségbe sorolható a filogenetikai fán a magyar *Mischivirus B* szekvenciákkal.
- Kiemelésre kerültek a gazdaszervezet ugrási pontok a denevér gazdaszervezetek körében a BtPVs esetében valamint a hipotetikus funkciója a szimpátiának a növekvő gazda átugrási eseményekben.
- A Phylogenetic-trait association vizsgálat során nyomatékosítottuk a részleges összefüggést a gazdaszervezet nemzetsége és a gazdaszervezet faja között, ami arra utal, hogy a picornavírusok különböző nemzetségekhez és fajokhoz tartozó denevérek között terjednek. Ezzel párhuzamosan, a kapott részleges összefüggés a filogenetikai vizsgálat eredménye és a nagyléptékű mintavételi helyszínek között rávilágított a tényre hogy a vírus terjedését a földrajzilag távoli területeken található denevér populációk között valószínűleg a denevérek vándorló képessége könnyítette meg.
- A páronkénti genetikai távolságok elemzése alapján megfigyelhettük, hogy ugyanabból a gazda nemzetségből származó BtPV-k nagyon elkülönültek és nem voltak szoros rokonságban, ami arra utal, hogy feltételezhetően a denevérek többször találkoztak a vírussal a denevérekre jellemző együttélés miatt. Kimutattuk a lehetséges és szignifikáns rekombinációs eseményeket a BtPV-k között, jelezve ezzel a potenciális szerepet a BtPV-k sokféleségében és evolúciójában egyaránt.
- Mindemellett, felmerültek hátrányok is a vizsgálatainkat illetően, mint a nem megfelelő mintakészlet (néhány nemzetség és mintavételi helyszín nagyobb arányú részvétele az adatkészletben, míg mások alulmintázottnak bizonyultak), a kapott szekvenciák hossza valamint mennyisége (rövid szekvenciák, kis méretű adathalmaz) voltak a vizsgálataink fő limitáló tényezői.

A denevérekhez köthető *Coronaviridae*-vel kapcsolatban:

- Négy denevérrrel kapcsolatos alfakoronavírust és két béta-koronavírust írtunk le különböző denevérfajokból, amelyek az emberhez közeli városi területeken fordulnak elő.
- Az általunk azonosított Bétakoronavírusok a SARS-CoV-2 legközelebbi rokonának számító RATG13-mal 100%-ban azonos szekvenciával csoportosultak, ami utalhat szekvenciáink rokonságára az új koronavírussal.
- Első alkalommal számoltunk be *Plecotus gaisleri* denevértől származó alfakoronavírusról.

- Kiemeltük az alfakoronavírus és a bétakoronavírus kocirkulációját *Rhinolophus ferrumequinum* denevérben, amely potenciális rekombinációs eseményeket és egy későbbi új variáns megjelenését válthatja ki.
- Mindazonáltal a szekvenciák rövid hossza és a *Plecotus gaisleri* koronavírusaira vonatkozó irodalom hiánya megnehezítette mind a pontos elemzéseket, mind a megbízható következtetéseket.

A SARS-CoV-2 világjárvánnyal kapcsolatban:

- Az idővonal kalibrált filogenetikai elemzés alapján meg tudtuk becsülni az algériai világjárvány kezdetét.
- A filogenetikai és haplotípus hálózatelemzés vizsgálatoknak köszönhetően meghatározásra került a vírus többszöri behurcolási eseménye.
- Áttekintést készítettünk a vírus algériai terjedését illetően mind a diszkrét (városok között) mind a folytonos (országon belüli elterjedés következtetve a származási országra a GPS koordináták alapján) filogenetikai vizsgálatok során.
- Megbecsültük a különböző kódoló gének evolúcióját a negatív szelekció mellett, amelyek megtartják funkciójukat. Az adatkészlet azonban csak 29 algériai szekvenciát tartalmazott (plusz a referenciaszekvenciát), amelyeket a világjárvány kezdetéről származnak, így több adattal az eredmények eltérőek lehetnek.
- A mutációs mintázatot mind nukleotid, mind aminosav szinten jellemeztük és ennek alapján molekuláris nyomkövetést végeztünk, majd azonosíthatjuk az importált és exportált mutációkat. Ezen kívül megállapítottuk a káros aminosav cseréket (megváltoztatja a fehérje működését) és semleges cseréket is.
- Felmértük a betegség visszaszorítása érdekében végrehajtott mérséklő intézkedések hatékonyságát (összességében jó intézkedések) tekintettel a megerősített lineáris növekedésre, felépülési és halálesetek számával. Továbbá azonosítottunk néhány magas népsűrűségű várost, amelyekben alacsony a megerősített esetek száma, annak ellenére, hogy a város sűrűsége és az esetek száma között pozitív összefüggés van. Ez hangsúlyozza a lakossági tudatosság szerepét a betegségek terjedésében.
- Amint arról korábban beszámoltunk, a szekvenciák száma és hossza jelentette a fő limitáló tényezőt az elvégzett elemzések során.

5. Felhasznált irodalom

- Bandelt, H. J., Forster, P., & Rohl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Banerjee, A., Baker, M. L., Kulcsar, K., Misra, V., Plowright, R., & Mossman, K. (2020). Novel Insights Into Immune Systems of Bats. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00026>
- Bielejec, F., Rambaut, A., Suchard, M. A., & Lemey, P. (2011). SPREAD: Spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics*, 27(20), 2910–2912. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr481>
- Bromberg, Y., & Rost, B. (2007). SNAP: Predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Research*, 35(11), 3823–3835. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm238>
- Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 418–423. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>
- Conow, C., Fielder, D., Ovadia, Y., & Libeskind-Hadas, R. (2010). Jane: A new tool for the cophylogeny reconstruction problem. *Algorithms for Molecular Biology : AMB*, 5, 16. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-5-16>
- Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J., & Rambaut, A. (2006). Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence. *PLoS Biology*, 4(5), e88. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040088>
- Elbe, S., & Buckland-Merrett, G. (2017). Data, disease and diplomacy: GISAID’s innovative contribution to global health. *Global Challenges*, 1(1), 33–46. <https://doi.org/10.1002/gch2.1018>
- Gorbunova, V., Seluanov, A., & Kennedy, B. K. (2020). The World Goes Bats: Living Longer and Tolerating Viruses. *Cell Metabolism*, 32(1), 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.013>
- Han, H.-J., Wen, H., Zhou, C.-M., Chen, F.-F., Luo, L.-M., Liu, J., & Yu, X.-J. (2015). Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Research*, 205, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.05.006>
- Hassell, J. M., Begon, M., Ward, M. J., & Fèvre, E. M. (2017). Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife–Livestock–Human Interface. *Trends in Ecology & Evolution*, 32(1), 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.09.012>

- Irving, A. T., Ahn, M., Goh, G., Anderson, D. E., & Wang, L.-F. (2021). Lessons from the host defences of bats, a unique viral reservoir. *Nature*, *589*(7842), 363–370. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03128-0>
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). *Global trends in emerging infectious diseases*. *451*, 5.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, *30*(14), 3059–3066.
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). popart: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, *6*(9), 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Lemey, P., Rambaut, A., Welch, J. J., & Suchard, M. A. (2010). Phylogeography Takes a Relaxed Random Walk in Continuous Space and Time. *Molecular Biology and Evolution*, *27*(8), 1877–1885. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq067>
- Letko, M., Seifert, S. N., Olival, K. J., Plowright, R. K., & Munster, V. J. (2020). Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(8), 461–471. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0394-z>
- 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 Research*, *44*(Web Server issue), W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>
- Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., & Muhire, B. (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*, *1*(1). <https://doi.org/10.1093/ve/vev003>
- Masatoshi Nei & Takashi Gojobori. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040410>
- Parker, J., Rambaut, A., & Pybus, O. G. (2008). Correlating viral phenotypes with phylogeny: Accounting for phylogenetic uncertainty. *Infection, Genetics and Evolution*, *8*(3), 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.08.001>
- Rambaut, A., Lam, T. T., Max Carvalho, L., & Pybus, O. G. (2016). Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evolution*, *2*(1). <https://doi.org/10.1093/ve/vev007>

- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*, *61*(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(12), 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, *4*(1). <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Wynne, J. W., & Wang, L.-F. (2013). Bats and Viruses: Friend or Foe? *PLOS Pathogens*, *9*(10), e1003651. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003651>
- Yang, Z., & Bielawski, J. P. (2000). Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends in Ecology & Evolution*, *15*(12), 496–503. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01994-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01994-7)
- Zeghib, S., Herczeg, R., Kemenesi, G., Zana, B., Kurucz, K., Urbán, P., Madai, M., Földes, F., Papp, H., Somogyi, B., & Jakab, F. (2019). Genetic characterization of a novel picornavirus in Algerian bats: Co-evolution analysis of bat-related picornaviruses. *Scientific Reports*, *9*(1), 15706. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52209-2>
- Zeghib, S., Somogyi, B. A., Zana, B., Kemenesi, G., Herczeg, R., Derrar, F., & Jakab, F. (2021). The Algerian Chapter of SARS-CoV-2 Pandemic: An Evolutionary, Genetic, and Epidemiological Prospect. *Viruses*, *13*(8), 1525. <https://doi.org/10.3390/v13081525>

6. Publikációk

Publikációk a PhD értekezés témájában

Zeghib, S., Herczeg, R., Kemenesi, G., Zana, B., Kurucz, K., Urbán, P., Madai, M., Földes, F., Papp, H., Somogyi, B., & Jakab, F. (2019). Genetic characterization of a novel picornavirus in Algerian bats: Co-evolution analysis of bat-related picornaviruses. *Scientific Reports*, 9(1), 15706. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52209-2>

Zeghib, S., Somogyi, B. A., Zana, B., Kemenesi, G., Herczeg, R., Derrar, F., & Jakab, F. (2021). The Algerian Chapter of SARS-CoV-2 Pandemic: An Evolutionary, Genetic, and Epidemiological Prospect. *Viruses*, 13(8), 1525. <https://doi.org/10.3390/v13081525>

Előadások a PhD értekezés témájában

Zeghib S. Genetic and evolutionary characterization of a novel picornavirus in Algerian *Miniopterus schreibersii* bats *5th International Congress on Infectious Diseases* Berlin, Germany, March 01-02, 2018.

Zeghib S. Facteurs climatiques et maladies virales – Rôle de la biologie moléculaire, *L'association FIKR pour la santé, l'Environnement et le Développement en Collaboration avec la Faculté des Sciences*, M'Sila, Algeria, April 28 2016.

Publikációk a PhD értekezés témáján kívül

Kemenesi, G., Tóth, G. E., Bajusz, D., Keserű, G. M., Terhes, G., Burián, K., **Zeghib, S.,** Somogyi, B. A., & Jakab, F. (2021). Effect of An 84-bp Deletion of the Receptor-Binding Domain on the ACE2 Binding Affinity of the SARS-CoV-2 Spike Protein: An In Silico Analysis. *Genes*, 12(2), 194. <https://doi.org/10.3390/genes12020194>

Kemenesi, G., Tóth, G. E., Mayora-Neto, M., Scott, S., Temperton, N., Wright, E., Mühlberger, E., Hume, A. J., Zana, B., Boldogh, S. A., Görföl, T., Estók, P., Lanszki, Z., Somogyi, B. A., Nagy, Á., Pereszlényi, C. I., Dudás, G., Földes, F., Kurucz, K., Madai, M., **Zeghib, S.,** Maes, P., Vanmechelen, B., Jakab, F. (2021). Reservoir host studies of Lloviu virus: First isolation, sequencing and serology in Schreiber's bats in Europe [Preprint]. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/2021.08.10.455806>

Kemenesi, G., **Zeghib, S.,** Somogyi, B. A., Tóth, G. E., Bányai, K., Solymosi, N., Szabo, P. M., Szabó, I., Bálint, Á., Urbán, P., Herczeg, R., Gyenesi, A., Nagy, Á., Pereszlényi, C. I., Babinszky, G. C., Dudás, G., Terhes, G., Zöldi, V., Lovas, R., ... Jakab, F. (2020). Multiple SARS-CoV-2 Introductions Shaped the Early Outbreak in Central Eastern Europe: Comparing Hungarian Data to a Worldwide Sequence Data-Matrix. *Viruses*, 12(12), E1401. <https://doi.org/10.3390/v12121401>

- Konrat, R., Papp, H., Szijártó, V., Gesell, T., Nagy, G., Madai, M., **Zeghibib, S.**, Kuczmog, A., Lanszki, Z., Helyes, Z., Kemenesi, G., Jakab, F., & Nagy, E. (2020). The Anti-histamine Azelastine, Identified by Computational Drug Repurposing, Inhibits SARS-CoV-2 Infection in Reconstituted Human Nasal Tissue In Vitro (p. 2020.09.15.296228). <https://doi.org/10.1101/2020.09.15.296228>
- Lanszki, Z., Kurucz, K., **Zeghibib, S.**, Kemenesi, G., Lanszki, J., & Jakab, F. (2020). Identification of Hepatitis E Virus in the Feces of Red Foxes (*Vulpes vulpes*). *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 10(10), 1841. <https://doi.org/10.3390/ani10101841>
- Lanszki, Z., Zana, B., **Zeghibib, S.**, Jakab, F., Szabó, N., & Kemenesi, G. (2021). Prolonged Infection of Canine Distemper Virus in a Mixed-Breed Dog. *Veterinary Sciences*, 8(4), 61. <https://doi.org/10.3390/vetsci8040061>
- Papp, H., **Zeghibib, S.**, Földes, F., Banfai, K., Madai, M., Kemenesi, G., Urbán, P., Kvell, K., & Jakab, F. (2020). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection triggers the upregulation of the Wnt signaling pathway inhibitor genes. *Virus Genes*, 56(4), 508–514. <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01759-z>
- Zana, B., Kemenesi, G., Buzás, D., Csorba, G., Görföl, T., Khan, F. A. A., Tahir, N. F. D. A., **Zeghibib, S.**, Madai, M., Papp, H., Földes, F., Urbán, P., Herczeg, R., Tóth, G. E., & Jakab, F. (2019). Molecular Identification of a Novel Hantavirus in Malaysian Bronze Tube-Nosed Bats (*Murina aenea*). *Viruses*, 11(10), 887. <https://doi.org/10.3390/v11100887>

Előadások a PhD értekezés témáján kívül

- Zana B, Kemenesi G, Urbán P, Kurucs K, Földes F, **Zeghibib S**, Oldal M, Jakab F. A nyugati mézelő méhekre (*Apis mellifera*) veszélyt jelentő vírusok jelenlétének kimutatása hazai denevér guano minták metagenomikai elemzése során *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2016. évi Nagygyűlése*, Keszthely 2016.Október 19-21.