

Koronavirusna infekcija lovačkih pasa

Krivak, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:344886>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-07**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ivana Krivak

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Zootehnika

Koronavirusna infekcija lovačkih pasa

Završni rad

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ivana Krivak

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Zootehnika

Koronavirusna infekcija lovačkih pasa

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. prof. dr. sc. Tihomir Florijančić, mentor
2. prof. dr. sc. Boris Antunović, član
3. izv. prof. dr. sc. Ivica Bošković, član

Osijek, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda, smjer Zoothenika

Završni rad

Ivana Krivak

Koronavirusna infekcija lovačkih pasa

Sažetak:

U ovom radu opisana je koronavirusna infekcija u pasa odnosno etiologija, epizootiologija, klinička slika, patološke promjene, dijagnostika, liječenje i preventiva. Trenutno su poznata dva genotipa psećeg korona virusa koji su označeni kao tip I (CCoV-1) i tip II (CCoV-2). CCoV-2 je evoluirao u dva različita patogena enterički (klasični) i pantropski na temelju virulencije. Pseći korona virus (CCoV) prvi put je opisan u psećoj vojnoj jedinici u Njemačkoj 1971. godine, nakon toga postaje enzootski prisutan i identificiran širom svijeta. Serološka i virološka istraživanja pokazala su da je virus široko rasprostranjen u populaciji pasa, naročito u uzgajivačnicama i skloništima za životinje, dok nema posebnih istraživanja kod lovačkih pasmina pasa. Enteričku ili crijevnu infekciju virusom karakterizira visoki morbiditet i niska smrtnost. Prirodni put prijenosa je fekalno-oralni, a virus u fekalijama je glavni izvor infekcije. Obzirom da je pseći korona virus vrlo zarazan prevenciju može osigurati jedino izbjegavanje kontakta sa zaraženim psima i njihovim izlučevinama. Dokazivanje psećeg korona virusa provodi se testovima neutralizacije virusa i imunoenzimskim testom ELISA. Ne postoji terapija za liječenje psećeg korona virusa. Tretiranje sekundarnih bakterijskih infekcija antibioticima i rana medicinska intervencija može uvelike pomoć u liječenju teških slučajeva. Bolesti koje uzrokuje pseći korona virus mogu se spriječiti vakcinacijom.

Ključne riječi: korona virus, psi, infekcija, pantropski, crijevni

23 stranice, 2 tablice, 12 slika, 13 literaturnih navoda

Rad je pohranjen u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih radova i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
Undergraduate university study Agriculture, Course Zootechnique

BSc Thesis

Ivana Krivak

Corona virus infection in hunting dogs

Summary:

In this assignment, corona virus infection in dogs is described, respectively etiology, epizootiology, clinical picture, pathological changes, diagnosis, treatment and prevention. Currently, two genotypes of canine coronavirus are known, which are designated as type I (CCoV-1) and type II (CCoV-2). Based on virulence CCoV-2 has evolved into two distinct pathogens enteric (classical) and pantropic. Canine corona virus (CCoV) was first described in a military dog unit in Germany in 1971., after that it became enzootic and has been identified worldwide. Serologic and virologic investigations demonstrated that virus is widespread in the dog population, especially in kennels and shelters for animals, while there are no special studies in hunting dog breeds. Enteric or intestinal infection is characterized by high morbidity and low mortality. The natural route of transmission is fecal-oral, the virus in feces is the main source of infection. Since the canine corona virus is highly contagious, avoiding contact with infected dogs and their excretions is the only way to ensure disease prevention. Detection of CCoV can be performed by virus neutralization (VN) tests and immunoenzymatic ELISA. There is no specific treatment for canine coronavirus. Antibiotic treatment of secondary bacterial infections and early medical intervention is the key to successful treatment of severe cases. Diseases caused by canine corona virus can be prevented by vaccination.

Key words: corona virus, dogs, infection, pantropic, intestinal
23 pages, 2 tables, 12 figures, 13 references

BSc Thesis is archived in Library of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Popis kratica:

CCoV- pseći korona virus

CCoV-1 - pseći korona virus tip 1

CCoV-2 - pseći korona virus tip 2

CCoV-2a - pseći korona virus tip 2 subtip, pantropski pseći korona virus

CCoV-2b - pseći korona virus tip 2 subtip, klasični pseći korona virus

PCR - lančana reakcija polimeraze

RT-PCR - reverzna transkripcija lančane reakcije polimeraze RT-PCR (engl. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

ORF - otvoreni okvir čitanja (engl. Open reading frame)

ELSA - imunoenzimski test (engl. Enzyme-linked immunosorbent assay)

VN - test neutralizacije virusa

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. KORONA VIRUSNE INFEKCIJE PASA.....	2
2.1. Etiologija.....	2
2.2. Epizootiologija.....	5
2.3. Klinička slika	11
2.3.1. <i>Crijevni korona virus</i>	11
2.3.2. <i>Pantropski korona virus</i>	11
2.4. Patološke promjene.....	11
2.5. Dijagnostika	18
2.6. Liječenje.....	19
2.7. Preventiva	19
3. ZAKLJUČAK.....	21
4. POPIS LITERATURE.....	22

1. UVOD

Korona virusi u sisavaca i ptica uzrokuju različite bolesti kao što su gastroenteritis, bronhitis, hepatitis, infektivni peritonitis i encefalitis (Pratelli, 2006.).

Infekcije korona virusima kod pasa, kako lovačkih, tako i drugih pasmina, kao i bolesti koje uzrokuje, poznate su desetljećima prije nego su se pojavile kod čovjeka. Ovaj virus često uzrokuje uginuća pasa, posebice štenadi u leglu, a moguće ga je prevenirati vakcinacijom. Poznata su dva tipa psećeg korona virusa: pseći korona virus (CCoV) i pseći respiratorni korona virus (CRCoV) (Wahed and Truyen, 2021.). Prvi put je identificiran 1971. u Njemačkoj kod pasa s proljevom, no tada bolest nije bila adekvatno istražena, kao ni uloga koju virus ima kod pojave crijevnih bolesti pasa. Kasnije je zbog visoke učestalosti mutacija virusa s pozitivnim lancem ribonukleinske kiseline virus evoluirao i identificiran je novi genotip u fekalijama zaraženih pasa (Pratelli, 2006.). Crijevni pseći korona virus izaziva infekcije lokalizirane u tankom crijevu koja može dovesti do blagog gastroenteritisa, dok pantropski soj, izoliran 2005. u Italiji, uzrokuje ozbiljnu kliničku sliku i lezije u različitim organa (Timurkan i sur., 2021.).

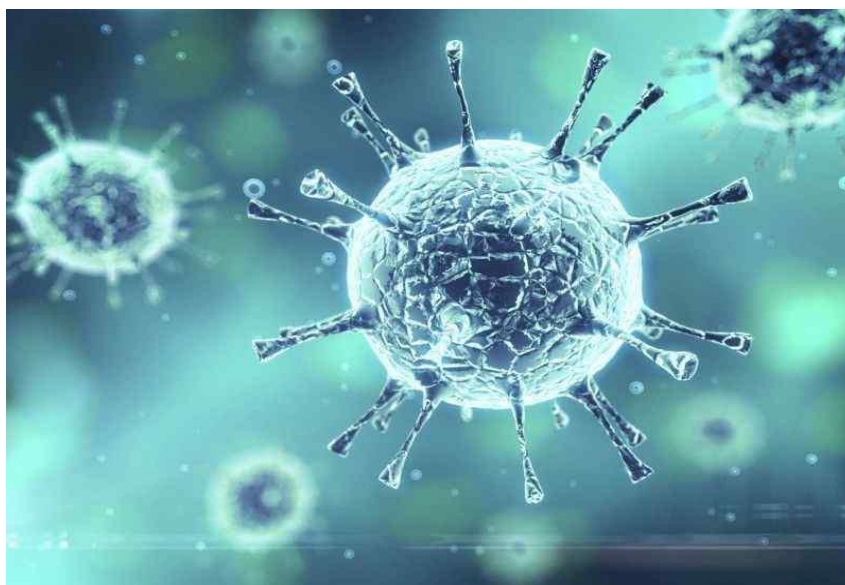
Zbog široke rasprostranjenosti psećeg korona virusa među populacijama pasa naglašena je potreba za njegovim istraživanjem kao i epizootiološke važnosti imunizacije pasa (Pratelli, 2006.).

Cilj rada je opisati korona virusne infekcije pasa, posebice lovačkih, odnosno etiologiju, epizootiologiju, patologiju, liječenje i prevenciju.

2. KORONA VIRUSNE INFEKCIJE PASA

2.1. Etiologija

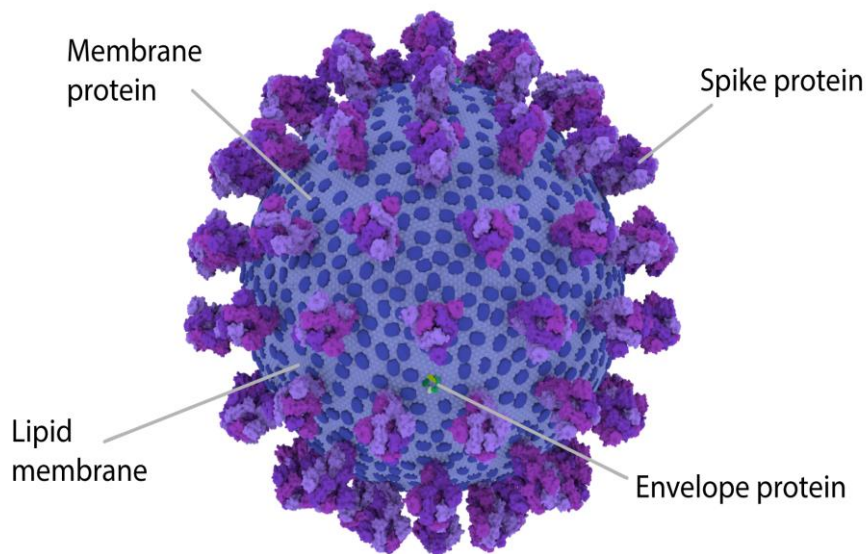
Etiologija se u humanoj i veterinarskoj medicini bavi uzročnikom bolesti. Pseći korona virus (CCoV) pripada redu *Nidovirales*, porodici *Coronaviridae*, rodu *Alphacoronavirus* (Slika 1.) Ovaj virus povezan je s korona virusima mačaka (*Feline coronavirus*), svinja (*Transmissible gastroenteritis virus*, TGEV) i tvorova (*Ferret coronavirus*) s kojima je uključen u jedinstvenu virusnu skupinu. Danas su poznata dva različita serotipa psećeg korona virusa, CCoV-1 i CCoV-2. Glavne razlike između ova dva serotipa prisutne su u genu S. Posljednjih godina identificirani su sojevi rekombinanta svinja i pasa, te mačaka i pasa (Wahed i Truyen, 2021.). Okrugli i ponekad pleomorfni koronavirus, promjera je 80-120 nm, obavijen linearnim, pozitivno usmjerenim genom ribonukleinske kiseline i nukleokapsidom N koja je spiralno simetrična (Decaro i Buonavoglia, 2011.). Nukleokapsida korona virusa je strukturni protein koji oblikuje komplekse s genetskom ribonukleinskom kiselinom, komunicira s proteinom virusne membrane tijekom sastavljanja viriona i ima ključnu ulogu u povećanju učinkovitosti transkripcije te ugradnje virusa (McBride i sur., 2014.).



Slika 1. Pseći korona virus

Izvor: <https://www.creative-biolabs.com/vaccine/images/Canine-Coronavirus-Vaccines-1.jpeg>

Membrana virusa građena je od lipidnog dvosloja i najmanje tri virusna proteina. Virusni proteini su: glikoprotein S, protein E i protein M (Slika 2.) (Decaro i Buonavoglia, 2011.).



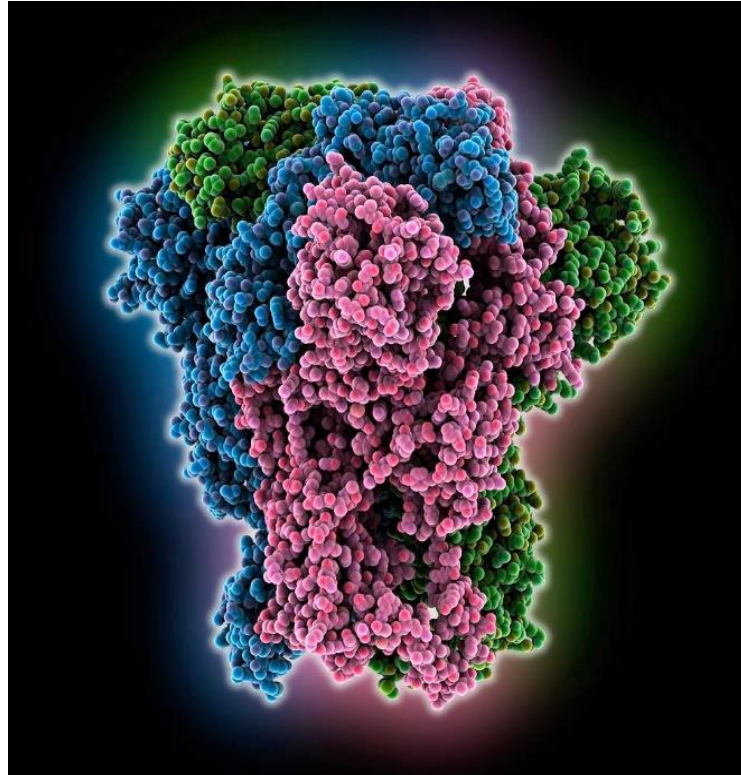
Slika 2. Slika prikazuje M, S, E protein i lipidnu membranu virusa

Izvor: <https://coronavirusexplained.ukri.org/images/article/Whole-virion.png>

Glikoprotein S tvori veliku strukturu na virusnoj ovojnici koju nazivamo šiljak ili peplomer (Slika 3.). Glikoproteini S su proteini s velikim vanjskim ektodomenama i jednom transmembranskom domenom, koja usidri protein u virusnoj ovojnici (Zhang i sur., 2021.).

Oni mogu stvarati interakcije s drugim virusnim proteinima. Glikoprotein S posreduje vezanju virusa na specifične stanične receptore, spajanju i ulasku u stanicu domaćina. Njegov smještaj na površini čini ga glavnom metom za virusna-neutralizirajuća antitijela domaćina. Obzirom na ključnu ulogu u virusnoj infekciji i prilagodljivom imunitetu S protein je u fokusu većine strategija za razvoj cjepiva i terapije (Duan i sur., 2020.).

Protein E ili protein ovojnice je integralni membranski protein koji ima važnu ulogu u sastavljanju virusnih ovojnica. E protein je najmanji od strukturnih proteina. Građen je od kratke hidrofilne N-terminalne regije, hidrofobne spiralne transmembranske domene i hidrofilne C-terminalne regije (Zhou i sur., 2023.).



Slika 3. Glikoprotein S

Izvor: <https://images.fineartamerica.com/images-medium-large-5/coronavirus-spike-glycoprotein-laguna-designscience-photo-library.jpg>

M proteini ili membranski proteini su najzastupljeniji. M protein je glikoprotein tipa III koji se sastoji od kratke amino-terminalne ektodomene, trostruke transmembranske domene i dugog C-terminalnog unutarnjeg kraja. Neki korona virusi imaju dodatni strukturni protein hemaglutinin estarazu (Decaro i Buonavoglia, 2011.).

Među virusima koji sadrže ribonukleinsku kiselinu kao svoj genetički materijal, korona virusi posjeduju najveći genom veličine 27.6-32 kilobaze. Repliciraju se jedinstvenim mehanizmom koji rezultira visoku učestalost rekombinacije. Genom uključuje 7 do 10 otvorenih okvira čitanja (engl. Open reading frame) koji kodiraju oba strukturna i nestrukturne proteine. Gen jedan se sastoji od dviju regija koje se preklapaju (Otvoreni okvir čitanja 1a i Otvoreni okvir čitanja 1b) koji su prevedeni u poliprotein prekursor virusne replike. Četiri su strukturna proteina (5'-Rep-S-E-M-N-3') nizvodno od replikaze gena, koji sadrže nekoliko otvorenih okvira čitanja koji kodiraju razne nestrukturne proteine, te u nekim sojevima hemaglutinin esterazu. Otvoreni okviri čitanja se značajno razlikuju među koronavirusima u broju, slijedu nukleotida, redoslijedu gena i metodama ekspresije gena (Slika 4.) (Pratelli, 2006.).



Slika 4. Genomska organizacija psećeg koronavirusa CCoV-1 i CCoV-2, te respiratornog korona virusa pasa CRCoV

Izvor: <https://www.vetline.de/canine-coronaviruses-emerging-and-re-emerging-pathogens-of-dogs#&gid=1&pid=2>

2.2. Epizootiologija

Pseći korona virus (CCoV) prvi put je opisan u psećoj vojnoj jedinici u Njemačkoj 1971. godine, nakon toga postaje enzootski prisutan i identificiran širom svijeta. Serološka i virološka istraživanja pokazala su da je virus široko rasprostranjen u populaciji pasa, naročito u uzgajivačnicama i skloništima za životinje. Enteričku ili crijevnu infekciju virusom karakterizira visoki morbiditet i niska smrtnost. Prirodni put prijenosa je fekalno-oralni, a virus u fekalijama je glavni izvor infekcije.

Jureša (2018.) navodi da je enterička koronavirusna infekcija, uobičajena u pasa širom svijeta, no prijavljeni su slučajevi koronavirusnih enteritisa u divljih pasa. Slični ili isti alfa-koronavirusi uzrokuju infekcije lisica (*Vulpes*), mačaka (*Felis catus*) te kunopasa (*Nyctereutes procyonoides*). Nadalje navodi da je prirodni put širenja virusa je feko oralni put, no ipak još nije jasno je li to jedini put prijenosa, odnosno postoji li mogućnost prijenosa virusa aerosolom (citirajući Licitra i sur., 2014.).

Trenutno su poznata dva genotipa psećeg korona virusa koji su označeni kao tip I (CCoV-1) i tip II (CCoV-2). Ovi genotipovi se razlikuju uglavnom po S proteinima koji dijele samo 54% identiteta. Sojevi virusa tip I posjeduju jedinstveni otvoreni okvir čitanja duljine 624 nukleotida koji je potpuno odsutan u sojevima mačjeg korona virusa tip I (FCoV-I) i od kojeg u genomima psećeg korona virusa tipa II (CCoV-2) i svinjskog korona virusa (TSGV) ostaju samo ostaci. Osim toga, pseći korona virusi rekombinantnog podrijetla između CCoV-

2 i TGEV identificirani su u izmetu pasa s proljevom i utvrđeno je da su rašireni u populacijama pasa. CCoV-2 je također podijeljen na dva subtipa (CCoV-2a), klasični pseći korona virus i (CCoV-2b) koji su nastali rekombinacijom (CCoV-2a) s korona virusom svinja TGEV (Decaro i Buonavoglia, 2011.).

Posljednjih godina studije o korona virusa dobile su na važnosti zbog učestale pojave infekcija korona virusom. Mutacije korona virusa mogu rezultirati smrtnim ishodom kod prvi put zaraženih jedinki ili smanjiti otpornost organa i tkiva te pogoršati patogenezu. U nedavnim studijama o različitim vrstama psećeg korona virusa vjeruje se da se pojavljuju pantropski sojevi koje karakteriziraju hipervirulentne i multisistematske infekcije, za razliku od klasičnih enteričkih infekcija korona virusom. Molekularnom i bioinformatičkom analizom istraženi su novi hipervirulentni i multisistematski sojevi psećeg korona virusa, te ispitane razlike između enteričkih i pantropskih sojeva na filogenetskoj razini. Pseći korona virus se općenito smatra etiološkim čimbenikom infekcije lokalizirane u tankom crijevu koja može dovesti do blagog gastroenteritisa. Takvi se sojevi nazivaju enterički. Prije nekoliko godina visoko virulentni, multisistematski i smrtonosni sojevi izolirani su kod štenaca. Tip CCoV-2 je evoluirao u dva različita patogena enterički (klasični) i pantropski na temelju virulencije. Hipervirulentni soj CCoV-2a, nazvan pantropski, izoliran je od mrtvih štenaca iz trgovine za kućne ljubimce u Italiji 2005. godine. Ovaj soj uzrokuje ozbiljne kliničke znakove i lezije u različitim organima, što se može primijetiti nakon smrti kod štenaca. Kod eksperimentalnih infekcija u pasa utvrđeno je da jačina bolesti varira ovisno o dobi i jačini imuniteta životinje, štoviše može pogoršati bolesno stanje. U razdoblju između 2012. i 2014. godine provedeno je istraživanje hipervirulentnih pantropskih sojeva psećeg korona virusa koji su nastali kao rezultat evolucije enteričkih sojeva, temeljenih na S i M genskim aminokiselinama i nukleotidnim sekvencama. Test reverzna transkripcija lančane reakcije polimeraze RT-PCR (engl. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) je proveden sa specifičnim premazima za identifikaciju gena korona virusa M i S, a uzorci su zatim podvrgnuti sekvenciranju DNK. U filogenetskoj analizi 4 od 26 uzoraka su razvrstana kao CCoV-1. Preostala 22 uzorka razvrstana su kao CCoV-2a. U skupini CCoV-2a šest uzoraka bilo je u granama blizu enteričkih sojeva, a 16 uzoraka bilo je u granama u blizini pantropskih sojeva. Enterički i pantropski sojevi uspoređeni su molekularnom genotipizacijom. Filogenetska analiza hipervirulentnih pantropskih sojeva provedena je na razini aminokiseline i nukleotidne sekvence. Utvrđeno je da se pseći korona virus razlikuje od izvornog soja. To podrazumijeva da su neki sojevi virusa postali pantropski sojevi koji

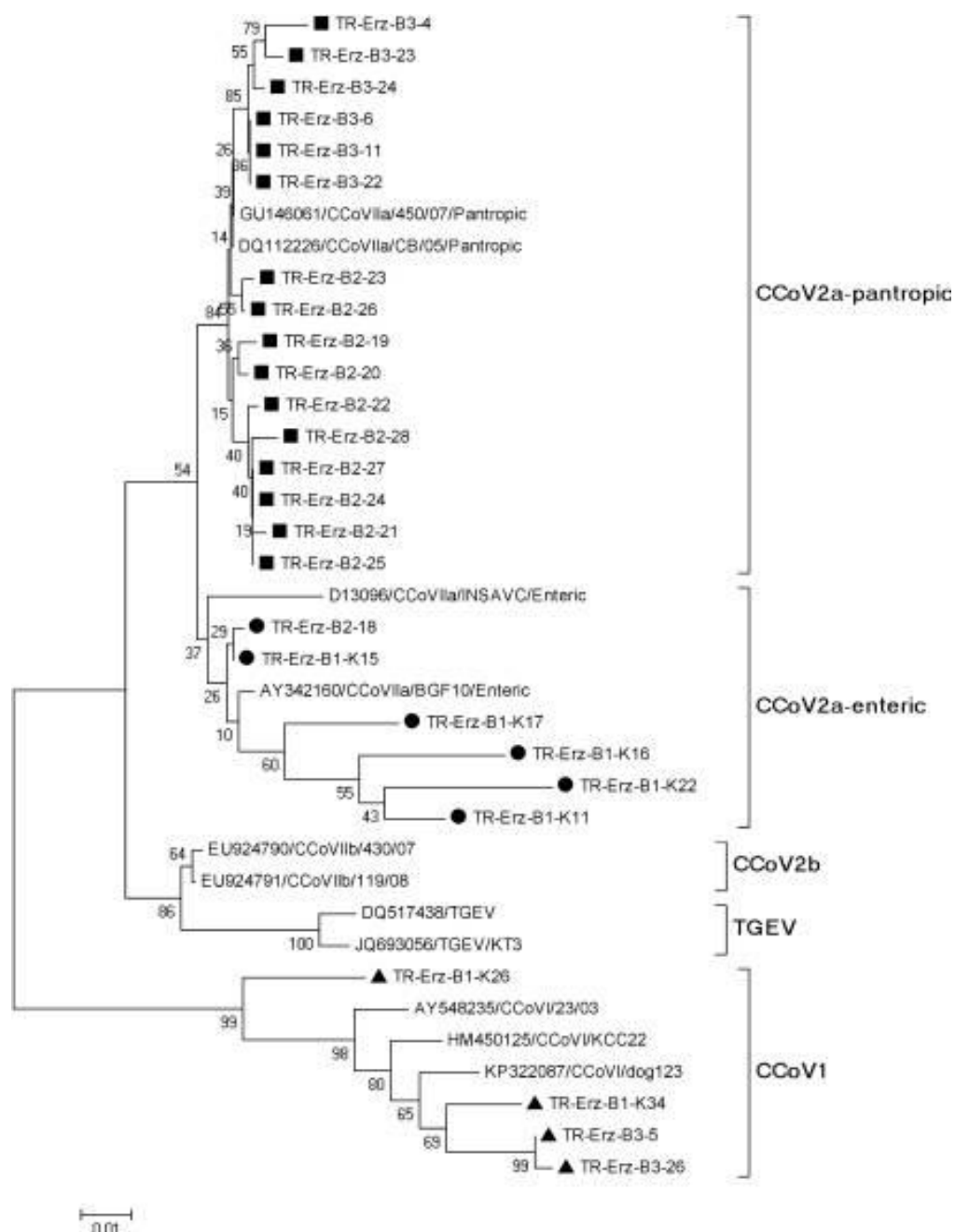
uzrokuju multisistemske infekcije i ne treba ih isključiti kao uzrok istih te teškog proljeva. U svrhu istraživanja je korišteno ukupno 26 pasa s poviješću teškog proljeva, od kojih su dva uginula od posljedica teške dehidracije. U istraživanju su analizirani rektalni brisevi svih 26 pasa i autopsijski materijali dvaju pasa koji su uginuli od teške dehidracije. Svi rektalni brisevi testirani su pomoću kompleta za brzo testiranje na pseći koronavirus. Od 26 pasa pozitivnih na pseći korona virus, osam su bile ženke, a 18 mušjaci. Najmlađa životinja bila je dobi mjesec dana, a najstarija 10 mjeseci (prosječna dob 4 mjeseca). Jedanaest pasa uključenih u studiju su identificirani kao mješanci, a preostalih petnaest su pasmina kangal, rottweiler, labrador, pinčer i koker španijel. Svi uzorci uzeti su od pasa koji su dovedeni na liječenje u bolnicu za životinje Sveučilišta Atatürk u Turskoj. Od uginulih pasa uzet je uzorak tkiva iz pluća, slezene, jetre i crijeva. Svi uzorci, uključujući pripravke tkiva, podvrgnuti su testovima reverzne transkripcije lančane reakcije polimeraze (RT-PCR) s specifičnom početnicom za S i M gen. Za molekularnu detekciju psećeg korona virusa proveden je polu-ugniježđeni test reverzne transkriptaze lančane reakcije polimeraze (engl. Nested RT-PCR) pomoću M genskih početnica za pseći korona virus. Zatim je lančana reakcija polimeraze za S gen virusa primjenjena u svrhu genotipizacije i podtipiziranja. Za CCoV-1 korišten je početni par EL1F i EL1R, a za CCoV-2 početni par S5F i S6R (Tablica 1.). Proizvodi lančane reakcije polimeraze analizirani su elektroforezom 1% agaroznog gela i sekvencirani. Svi uzeti uzorci su testirani lančanom reakcijom polimeraze na slijedeće enteričke patogene: pseći parvovirus 2 (CPV-2), virus pseće kuge, pseći adenovirus 1-2 i rotavirus pseće skupine A, koristeći prethodno opisane specifične početnice. Međutim, niti jedan od uzoraka nije bio pozitivan na ta sredstva. Za filogenetsku analizu iz baze podataka "GenBank" dobivene su referentne sekvence M i S gena psećeg korona virusa. Za stvaranje filogenetskih stabala izvedena je metoda višestrukog poravnanja svih ciljnih sekvenci pomoću višestrukog poravnanja Clustal W. Filogenetska stabla maksimalne vjerojatnosti izgrađena su pomoću modela Kimura. Za identifikaciju klasičnog enteričkog i hipervirulentnih višesistemskih sojeva psećeg korona virusa 26 uzoraka iz Turske analizirano je molekularnim i filogenetskim metodama. Svih 26 uzoraka je bilo pozitivno na pseći korona virus. Amplikoni očekivane veličine dobiveni su iz 10 uzoraka za S gen i iz svih 26 uzoraka za M gen, koristeći RT-PCR specifičan za gen. Ti su amplikoni sekvencirani i korišteni za filogenetsku analizu koja je pokazala pozitivne stope za CCoV-1 i CCoV-2 od 15,38 % ili 4/26, te 84,62 % ili 22/26. Svi uzorci CCoV-2 bili su podtipa 2a. Podvrsta 2b nije pronađena. Enterički i pantropski sojevi grupirani su u podtip 2a unutar genotipa CCoV-2. U podtipu CCoV-2a utvrđeno je da je šest sojeva 27,27 % ili 6/22 slično enteričkom

psećem korona virusu dok je utvrđeno da je 16 sojeva 72,73 % ili 16/22 slično pantropskom psećem korona virusu. (Slika 5. i Slika 6.). Usporedbe nukleotidnih sekvenci provedene za gen S i M rezultatom sugeriraju da M gen ima dovoljnu selektivnost za identifikaciju pantropskih sojeva CCoV kao i S gen. Različite mutacije otkrivene su na pet različitih mjesta u djelomičnim aminokiselinskim sekvencama S gena od oko 222 aminokiseline. Neke mutacije mogu se koristiti za razlikovanje pantropskih od enteričkih sojeva (Timurkan i sur., 2021.).

Tablica 1. Oligonukleotidne početnice korištene u istraživanju.

Početnica	Gen	Sekvenca (5'-3')	Pozicija	bp
CCV1	M	TCCAGATATGTAATGTTCGG	337-356	409
CCV2		TCTGTTGAGTAATCACCAGCT	726-746	211
CCV3		GGTGTCACTCTAACATTGCTT	535-556	
EL1F	S/I	CAAGTTGACCGTCTTATTACTGG TAG	2611-2636	346
EL1R		TCATATACGTACCATTATAGCTGAAGA	2930-2956	
S5	S/II	TGCATTTGTGTCTCAGACTT	3991-4010	694
S6		CCAAGGCCATTTTACATAAG	4665-4684	

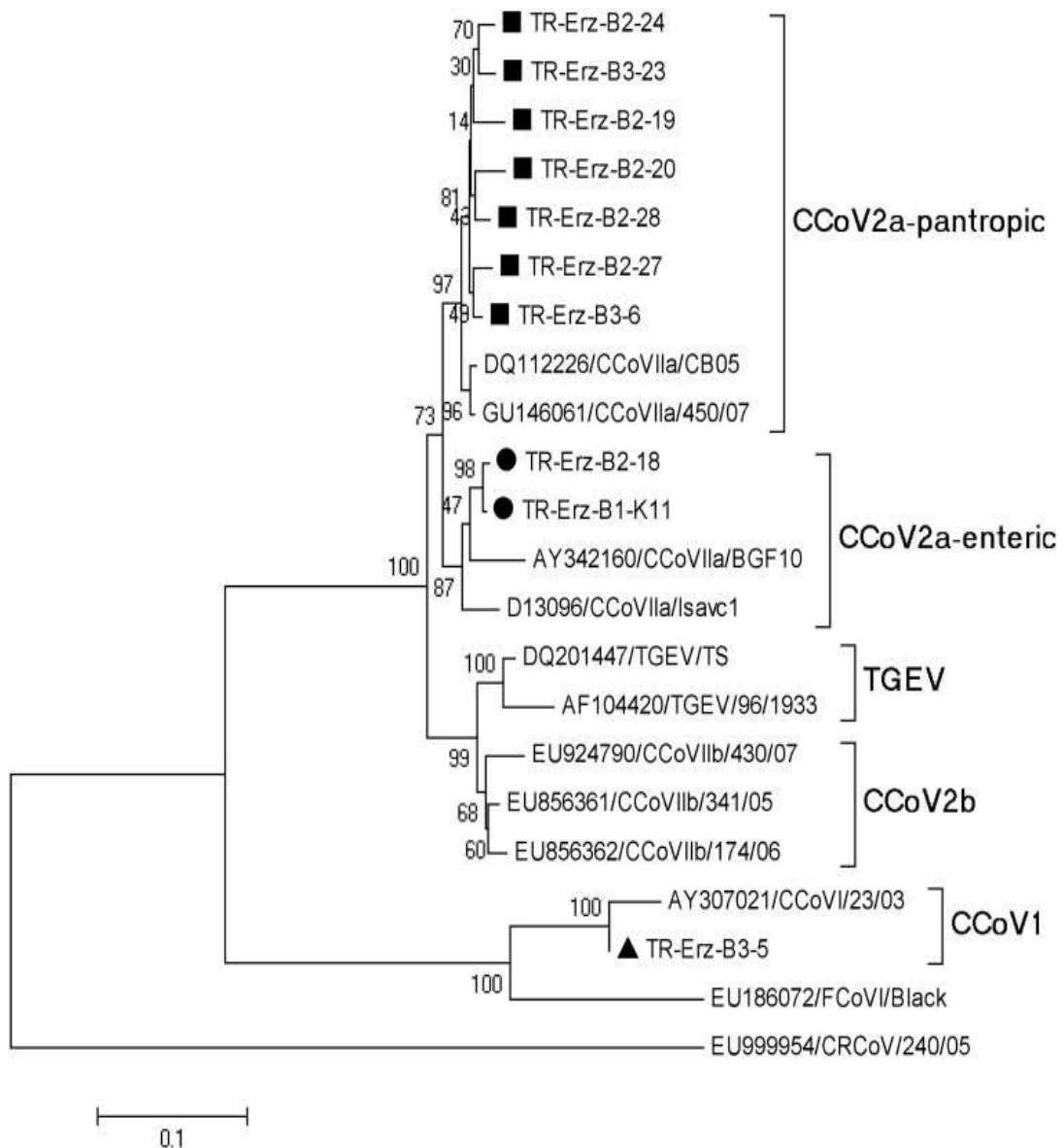
Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7529357/table/Tab2/?report=objectonly>



Slika 5. Filogenetsko stablo na bazi psećih sekvenci gena koronavirusa M iz Turske i referentnih sekvenci iz GenBank. (Sekvence iz turskih pantropnih sojeva CCoV-2a označene su (■), turski enterički sojevi CCoV-2a (●), turski sojevi CCoV-1 o (▲), a referentne sekvence označene su njihovim pristupnim brojem

Izvor:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=7529357_705_2020_4826_Fig1_HTML.jpg



Slika 6. Filogenetsko drvo na bazi psećih sekvenci gena koronavirusa S iz Turske i referentne sekvence iz GenBanka. Sekvence iz turskih pantropskih sojeva CCoV-2a označene su (■), turski enterički sojevi CCoV-2a (●), turski sojevi CCoV-1 (▲), a referentne sekvence označene su njihovim pristupnim brojem

Izvor:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=7529357_705_2020_4826_Fig2_HTML.jpg

2.3. Klinička slika

2.3.1. Crijevni ili enterički korona virus

Infekcija je općenito vezana za probavni trakt, što dovodi do pojave kliničkih znakova tipičnih za gastroenteritis, kao gubitak apetita, povraćanje, dehidracija, dijareja, rijetko može doći i do smrtnog ishoda. Općenito, virus ne uzrokuje sistemske bolesti. Kod pokusno zaraženih štenaca virus je izoliran iz nekoliko tkiva: krajnika, pluća i jetre. Simptomi su ozbiljniji u mladim štenaca, a bolest je smrtonosna kada se javlja u kombinaciji s drugim patogenom najčešće s psećim parvovirusom tipa 2 (CPV-2), psećim adenovirusom tipa I (CAV1) ili virusom pseće kuge (Decaro i Buonavoglia, 2011.).

2.3.2. Pantropski korona virus

Klinička slika za ovaj tip virusa puno je teža, a očituje se visokom temperaturom, povraćanjem, anoreksijom, letargijom, hemoragičnim proljevom i neurološkim znakovima bolesti. Najugroženiji su štenci kod kojih bolest ima smrtonosni ishod, dok su simptomi kod pasa od šest mjeseci starosti puno lakši i oni se uspješno oporavljaju od infekcije (Decaro i Buonavoglia, 2011.).

2.4. Patološke promjene

Obdukcija štenaca uginulih od pantropskog psećeg korona virusa 2005. u Italiji otkrila je teške lezije u probavnom traktu, krajnicima, plućima, jetri, slezeni i bubrezima. Najistaknutija lezija bila je hemoragijski gastroenteritis. Krajnici su bili povećani i sadržavali su multifokalna krvarenja. Lobarna subakutna bronhopneumonija bila je vidljiva i u kranijalnim i u kaudalnim režnjevima i pratila je izljeve u torakalnoj šupljini (Slika 7.). Slezene su bile povećane i izlagale su subkapsularna krvarenja. Nekroza i lipidoza s krvarenjima bila je vidljiva u jetri. Infarkt i krvarenja otkriveni su u korteksu i meduli bubrega (Slika 8.) (Decaro i Buonavoglia, 2011.). Također, rezultati obdukcije dvaju pasa iz bolnice za životinje u Turskoj, uginulih od teške dehidracije, pokazali su slične lezije. Makroskopski je uočen hemoragijski enteritis u tankim crijevima, upala pluća, područja nekroze u jetri i povećanje slezene. Regionalni mezenterični limfni čvorovi povećani su ili

petehijom ili opsežnijim krvarenjem. Ti su nalazi upućivali na sustavnu uključenost (Timurkan i sur., 2021.).



Slika 7. Pluća psa s pantropskom CCoV infekcijom

Izvor:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=7114679_gr1_lrg.jpg

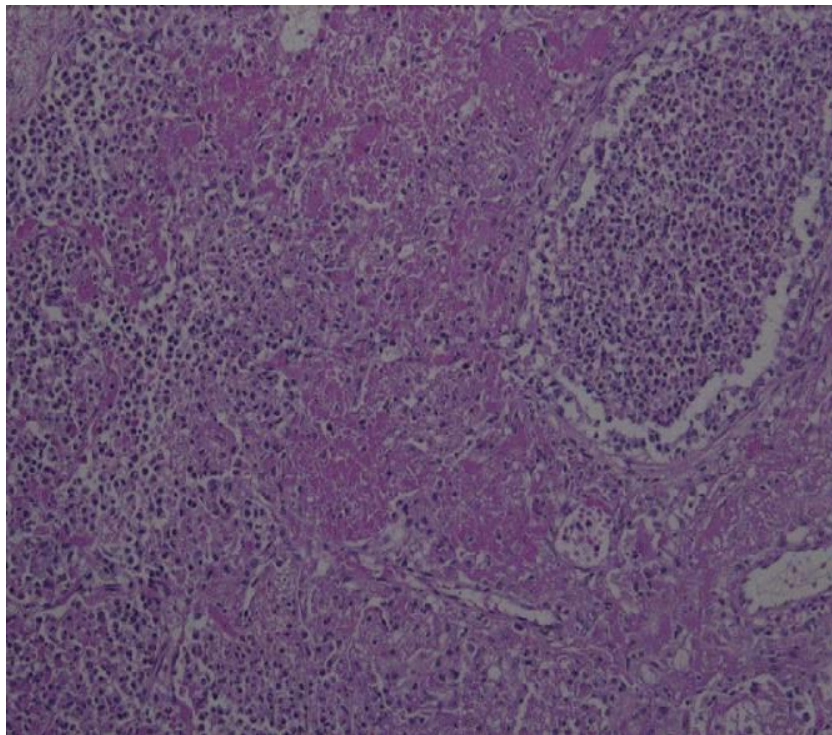


Slika 8. Bubrež psa s pantropskom CCoV infekcijom

Izvor:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=7114679_gr2_lrg.jpg

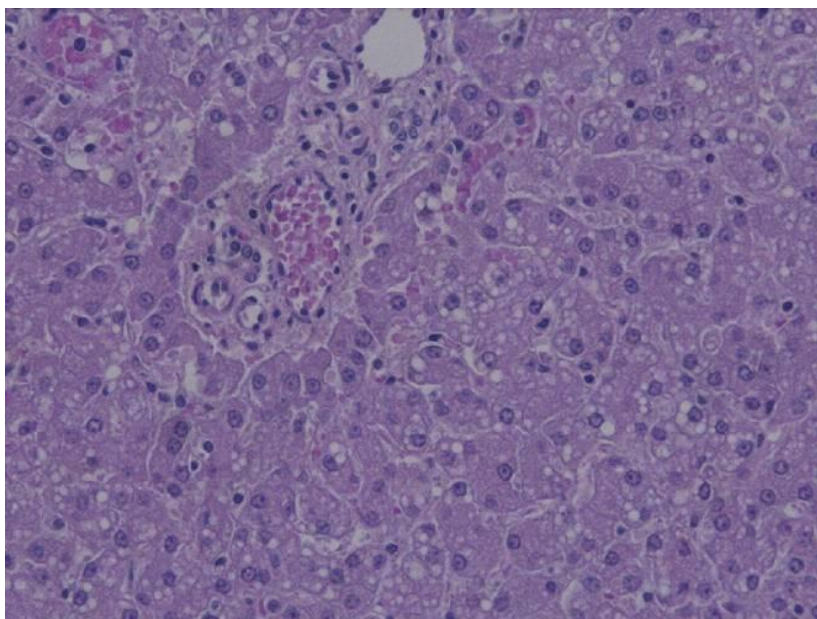
Histopatologija sluznice tankog crijeva sastojala se od atrofije i izravnavanja većine resica, s denudacijom epitela sluznice, mononuklearnom infiltracijom lamina proprije i iscrpljivanjem stanica središta limfoidnih folikula. Teške bronhoalveolarne lezije u plućima sastojale su se od gusto staničnog fibrinopurulentnog eksudata (Slika 9.). Difuzna degeneracija hepatocita bila je prisutna s umjerenom mikrovakuolarnom masnom promjenom i minimalnom slučajnom nekrozom (Slika 10.). Lezije slezene karakterizirala je difuzna fibrinoidna degeneracija s arteriolarnom nekrozom. Došlo je do leukocitolize unutar zaostalih folikula i mnogi makrofagi infiltrirali su se u hemoragijski i hiperemični parenhim. Difuzno limfoidno osiromašenje zabilježeno je u slezeni. Difuzna duboka i površinska područja bubrežne kore pokazala su koagulativnu nekrozu s perifernom hiperemijom i degeneracijom arteriolarnih zidova (Slika 11.) (Decaro i Buonavoglia, 2011.).



Slika 9. Fotomikrograf pluća psa s pantropskom CCoV infekcijom

Izvor:

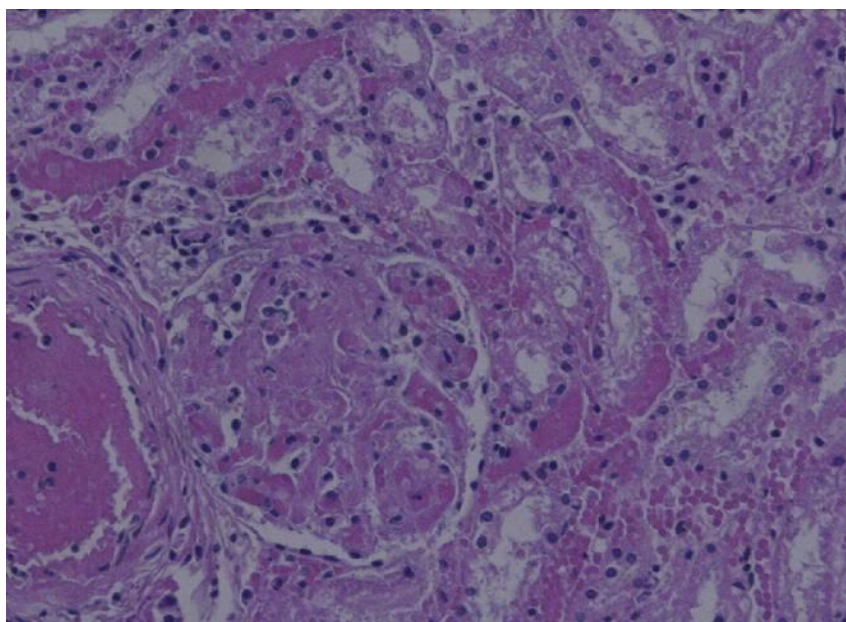
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=7114679_gr3_lrg.jpg



Slika 10. Fotomikrograf jetre psa s pantropskom CCoV infekcijom.

Izvor:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=7114679_gr4_lrg.jpg



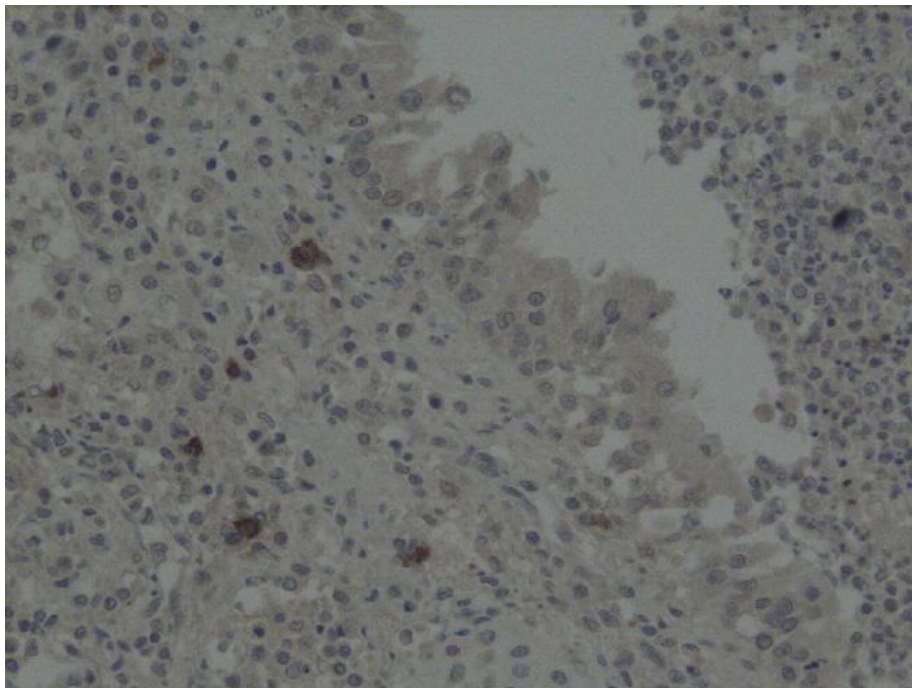
Slika 11. Fotomikrograf bubrega psa s pantropskom CCoV infekcijom

Izvor:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=7114679_gr5_lrg.jpg

Virološka i bakteriološka istraživanja na parenhimoznim organima nisu uspjela otkriti uobičajene pseće patogene, dok su CCoV-1 i CCoV-2 identificirani u crijevnom sadržaju svih štenaca testovima reverzne transkriptaze lančane reakcije polimeraze specifične za genotip u stvarnom vremenu (RT-PCR). Neočekivano, ribonukleinska kiselina CCoV-2 također je otkrivena u visokim razinama u plućima, slezeni, jetri, bubrezima i mozgu. Soj koronavirusa (CB/05) izoliran je na stanicama A-72 iz svih ispitivanih tkiva osim mozga. Imunohistokemija pomoću monoklonskog protutijela Alphacoronavirus-1 otkrila je virusni antigen u svim tkivima, uključujući pluća (Slika 12.) (Decaro i Buonavoglia, 2011.).

Pet CCoV seronegativnih štenaca inficirano je sojem CB/05. Infekcija je reproducirala bolest s pojavom teških kliničkih znakova, uključujući pireksiju, anoreksiju, depresiju, povraćanje, proljev i leukopeniju. Uočen je drugačiji klinički tijek prema dobi zaraženih štenaca. Stariji psi, u dobi od 6 mjeseci, polako su se oporavili od bolesti, dok su dva od tri dvomjesečna psa eutanazirana zbog težine bolesti izazvane sojem CB/05 (Tablica 2.).



Slika 12. Imunohistokemijsko bojenje monoklonskim anti-CCoV protutijelima plućnog dijela od psa s pantropnom CCoV infekcijom. Stanice zaražene CCoV-om su smeđe boje.

Izvor:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=7114679_gr6_lrg.jpg

Prisutnost grubih lezija u unutarnjim organima mrtvih pasa, kao i otkrivanje virusne ribonukleinske kiseline u tim tkivima, uključujući mozak, potvrđuje pantropski soj, iako sa nižim razinama u odnosu na one otkrivene kod pasa koji su podlegli prirodnoj infekciji (Tablica 2.). Tragovi virusne ribonukleinske kiseline otkriveni su u krvi jednog psa, iako su daljnja neobjavljena istraživanja pokazala da se vidljiva viremija može lako pojaviti tijekom eksperimentalne infekcije CB/05. Nakon toga, dokazano je da su psi oporavljeni od nedavne infekcije enteričkim psećim korona virusom mogli ponovno biti zaraženi sojem CB/05, što je izazvalo pojavu blagih kliničkih znakova. Iako su psi korišteni u toj studiji imali snažan humoralni imunitet na enterički pseći korona virus, eksperimentalna infekcija sojem CB/05 bila je uspješna kod svih mladunaca bez obzira na primljenu virusnu dozu. Izloženost čak i malim količinama virusa imala bi sličan oblik infekcije na seropozitivnim životinjama, jer su psi cijepljeni različitim virusnim opterećenjima prikazivali isto trajanje izlučivanja virusa i ne toliko različite razine virusa u izmetu. Trajanje izlučivanja virusa bilo je kraće, a klinički znakovi blaži u odnosu na prethodna opažanja kod seronegativnih pasa, koji se uglavnom pripisuju unakrsnoj zaštiti izazvanoj protutijelima protiv enteričkog psećeg korona virusa. Limfotropizam soja CB/05 jasno je dokazan pojavom umjerene limfopenije kod nekoliko zaraženih štenaca. Unatoč umjerenoj limfopeniji i prisutnosti virusa u limfoidnim tkivima, virusna ribonukleinska kiselina ni u jednom trenutku nije otkrivena u krvi. Daljnji eksperiment imao je za cilj procijeniti učinke pantropne infekcije psećeg korona virusa na cirkulirajuće monocite i populacije limfocita. Infekcija štenaca starih 11 tjedana sojem CB/05 rezultirala je dubokim iscrpljivanjem T limfocita i blagim gubitkom B limfocita u prvom tjednu nakon infekcije. Konkretno, dok su se CD8+ i B limfociti vratili na početnu razinu do sedmog dana postinfekcije, CD4+T limfociti ostali su značajno niski mjesec dana i potpuno se oporavili nakon 2 mjeseca. Monocitoza je također primijećena nakon infekcije CB/05 s vrhuncem petog dana nakon infekcije. U ovoj studiji nije promijenjena poliklonska proizvodnja imunoglobulin G seruma ili imunoglobulin M seruma protiv psećeg korona virusa. Međutim, dugotrajno iscrpljivanje cirkulirajućih CD4+T limfocita može utjecati na humoralni, kao i na stanični posredovani imunitet, čime se ugrožava sposobnost stvaranja ili održavanja učinkovitog imunološkog odgovora (Decaro i Buonavoglia, 2011.).

Tablica 2. Razina ribonukleinske kiseline psećeg korona virusa u organima pasa podleglih prirodnoj ili eksperimentalnoj infekciji sojem CB/05. RRT-PCR predstavlja stvarno vrijeme RT-PCR-a, Rezultati su izraženi brojem kopije RNK CCoV-2/ μ l materijala. VI predstavlja izolaciju virusa (rezultati su označeni kao pozitivni + ili negativni -).

Psi podlegli prirodnoj infekciji sojem CB/05						
Uzorak tkiva	117/05-A		117/05-B		117/05-C	
	RRT-PCR	VI	RRT-PCR	VI	RRT-PCR	VI
Feces	6.12×10^5	+	9.24×10^4	+	3.17×10^5	+
Pluća	1.08×10^6	+	2.74×10^4	+	2.32×10^6	+
Slezena	4.46×10^6	+	1.20×10^5	+	6.87×10^6	+
Jetra	9.02×10^4	+	5.98×10^4	+	3.12×10^5	+
Bubreg	7.54×10^6	+	1.40×10^4	+	2.53×10^5	+
Mezenterični limfni čvor	8.09×10^4	+	2.01×10^4	+	5.17×10^4	+
Mozak	5.23×10^3	-	9.52×10^2	-	1.25×10^4	-
Psi eutanazirani nakon eksperimentalne infekcije						
Uzorak tkiva	Pas 1		Pas 3			
	RRT-PCR	VI	RRT-PCR	VI		
Feces	5.14×10^4	+	1.09×10^5	+		
Pluća	6.79×10^3	-	2.99×10^4	+		
Slezena	5.48×10^4	+	3.07×10^4	+		
Jetra	1.93×10^4	+	4.70×10^3	-		
Bubreg	5.11×10^3	-	2.94×10^3	-		
Mezenterični limfni čvor	2.19×10^4	-	3.61×10^4	+		
Mozak	3.32×10^2	-	6.00×10^2	-		

Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7117318/table/tbl2/?report=objectonly#tbl2fn1>

2.5. Dijagnostika

Otkrivanje protutijela psećeg korona virusa može se provoditi testovima neutralizacije virusa VN i imunoenzimskim testom ELISA. Pokazano je da testovi neutralizacije virusa možda ne će otkriti antitijela u nekim pozitivnim serumima i neće dati točne informacije o epidemiologiji infekcije. Nedavno razvijena ELISA bila je osjetljivija od VN testa. Iako je antigen pripremljen od psećeg korona virusa, zaražene stanice mogu dati različite rezultate, ovisno o metodi pripreme antigena. Nedavno je dokazano da se antitijela protiv M proteina konstantno prisutna u seropozitivnim psećim serumima nakon infekcije psećim korona virusom. Na temelju tih nalaza razvijen je ELISA test s rekombinantnim M proteinom (rMP) psećeg korona virusa tipa 2 koji postaje alternativna dijagnostička metoda za detekciju antitijela. Rekombinantni M protein antigenski je sličan prirodnom proteinu. Zbog širenja psećeg korona virusa tipa 1 u populaciji pasa stvorila se potreba za detaljnim istraživanjem serološkog odnosa između dva genotipa. U tu svrhu dva rekombinantna polipeptida S glikoproteina psećeg korona virusa tipa 1 su ugrađena u prokariotski sustav i koriste se za razviti ELISA test za otkrivanje protutijela psećeg korona virusa tipa 1. Pseći serumi prikupljeni od pasa cijepljenih inaktiviranim komercijalnim cjepivom CCoV-2 i naknadno zaraženih eksperimentalnim psećim korona virusom tipa 2 ispitani su zajedno s negativnim kontrolnim serumima i serumima pasa prirodno zaraženih psećim korona virusom tipa 1. Svi serumi pozitivni na pseći korona virus tip 1 snažno su reagirali s oba polipeptida, dok su, serumi cijepljenih pasa imali nisku reaktivnost. Budući da pseći korona virus tip 1 nije uzgajan u staničnim kulturama rekombinantni polipeptidi predstavljaju novu metodu za proučavanje imunološke i patogenetske karakteristike toga virusa. Dijagnostičke tehnike koje se koriste za otkrivanje psećeg korona virusa u fekalnim uzorcima uključuju elektronsku mikroskopiju (EM), izolaciju u staničnim kulturama (VI) i RT-PCR. Razvijena su dva fluorogena RT-PCR testa specifičnog genotipa za otkrivanje i kvantifikaciju ribonukleinske kiseline psećeg korona virusa tipa 1 i tipa 2 u fekalijama pasa s proljevom. Oba fluorogena testa omogućila su kvantifikaciju specifične ribonukleinske kiseline u fekalnim uzorcima prikupljenim od pasa koji su prirodno ili eksperimentalno zaraženi CCoV-1 i CCoV-2 ili s oba genotipa CCoV. Visoka osjetljivost, jednostavnost i ponovljivost fluorogenih RT-PCR testova čine ove metode posebno pogodane za ispitivanja učinkovitosti cjepiva za pseći korona virus (Pratelli, 2006.).

2.6. Liječenje

Ne postoji poseban tretman za pseći korona virus. Antibiotici su neučinkoviti protiv virusa, ali mogu biti korisni u kontroli sekundarnih bakterijskih infekcija. Uskraćivanje hrane dvadeset i četiri sata nakon prestanka proljeva i postupno ponovno uvođenje malih količina hrane može biti jedini potreban tretman. Dehidrirani pacijent može zahtijevati infuzijske terapije za ispravljanje neravnoteže tekućine i elektrolita. Rana medicinska intervencija ključ je uspješnog liječenja teških slučajeva (<https://vcahospitals.com/>).

2.7. Preventiva

Nedavna istraživanja koja su koristila diferencijalne PCR testove i sekvencijsku analizu M i S gena za proučavanje psećeg korona virusa otkrivenog u fekalnim uzorcima štenaca pokazala su da je 14,5 % infekcija psećim korona virusom uzrokovano tipom 1, 8,7 % tipom 2 i 76,8 % s oba genotipa, istovremeno. Pseći korona virus je vrlo zarazan, a nakon što se virus uspostavi u okolišu, širenje infekcije teško je kontrolirati. Izbjegavanje kontakta sa zaraženim psima i njihovim izlučevinama jedini je način da se osigura prevencija bolesti. Prenapučeni, ne higijenski uvjeti, stres tijekom treninga i drugi čimbenici pogoduju razvoju kliničkih bolesti. Kao i druge viruse s omotačem, pseći korona virus inaktivira većina germicidnih sredstava kao što su lipidna otapala, formalin, fenol, otopina hipoklorita i β -propiolakton, ali te tvari ne sprječavaju prijenos s psa na psa. Virus je stabilan na kiseline i nije inaktiviran pri pH 3,0 i +20 ili -22 °C. Kao i drugi koronavirusi, pseći korona virus je relativno toplinski stabilan; može se skladištiti godinama zamrznut na -70°C ili liofiliziran na +4°C (Pratelli, 2008.).

Inaktivirano cjepivo s MF59™ pripremljeno je sojem CCoV-2b. Utvrđeno je da je ovo cjepivo sigurno jer ni lokalne ni sistemske reakcije nisu izazvane u potkožno ubrizganim mladuncima bigla. Cjepivo CCoV-2b bilo je imunogeno, izazivalo je serokonverziju kod cijepljenih štenaca i bilo učinkovito jer je moglo spriječiti bolest izazvanu psećim korona virusom. Kod necijepljenih štenaca blagi gastroenteritis se pojavio nakon izazvane infekcije. Pokazalo se da inaktivirana cjepiva protiv psećeg korona virusa dostupna na tržištu štite pse od bolesti, ali ne i od infekcije. S druge strane, eksperimentalno cjepivo protiv modificiranog virusa (MLV) koje se primjenjuje oronazalno moglo je spriječiti i bolest i infekciju psećim korona virusom. Inaktivirano cjepivo CCoV-2b, iako nije u potpunosti efikasno protiv

infekcije, uspjelo je značajno smanjiti izlučivanje virusa kod izazvane infekcije, sprječavajući tako širenje virulentnih sojeva u okolišu. Moguće objašnjenje dobre učinkovitosti cjepiva može se osloniti na dodatak MF59™ koji se koristi u formulaciji. MF59 je formulacija ulja u vodi koja sadrži površinski aktivne tvari, zajedno s skvalenom emulgiranim u uvjetima visokog tlaka. Ovo pomoćno sredstvo se uspješno koristi kod cjepiva koja se obično koriste za prevenciju sezonske i pandemijske gripe. Kod pasa pseći korona virus općenito uzrokuje blage, samoograničavajuće infekcije ograničene na gastrointestinalni trakt. U skladu s tim, cjepiva protiv istog se ne smatraju osnovnim cjepivima i njihova primjena nije česta. Svjetsko udruženje za veterinarstvo malih životinja trenutno ne preporučuje cijepljenje jer je učestalost potvrđenih kliničkih slučajeva psećeg korona virusa prilično niska. Iako nikada nije dokazano da cijepljenje protiv psećeg korona virusa smanjuje ozbiljnost mješovitih infekcija, cijepljenje bi trebalo smatrati prioritetom u uzgajivačnicama i skloništima za životinje, gdje se očekuje da će virus uvelike cirkulirati, mješovite infekcije su česte i životinje su podvrgnute stresnim uvjetima, što može potaknuti razvoj teških kliničkih oblika. Slične strategije profilakse mogle bi se donijeti kako bi se spriječile i kontrolirale bolesti povezane s CCoV-2b kod pasa. Jednosmjerna antigenska unakrsna reaktivnost, koja je već dokazana neutralizacijom *in vitro* između CCoV-2b i CCoV-2a, potvrđena je ovom studijom jer su protutijela izazvana rekombinantnim psećim korona virusom uspjela samo djelomično neutralizirati heterologni virus CCoV-2a. Na temelju tih nalaza, kao i o slaboj učinkovitosti formulacija koje se dodaju aluminijevom hidroksidu čak i protiv CCoV-2a, moglo bi se nagađati da komercijalno dostupna cjepiva nisu zaštitna od CCoV-2b (Decaro i sur., 2011.).

3. ZAKLJUČAK

Istraživanja su pokazala da je pseći korona virus široko rasprostranjen u populaciji pasa, naročito u uzgajivačnicama i skloništima za životinje zbog prenapučenosti, slabih higijenskih uvjeta, stresa tijekom treninga i drugih čimbenika koji pogoduju nastanku bolesti. Pri tome nema istraživanja jesu li češće infekcije korona virusom u uzgojima lovačkih pasmina. Mnoga su istraživanja provedena zbog čestih mutacija psećeg korona virusa. Trenutno su poznata dva genotipa psećeg korona virusa koji su označeni kao tip I (CCoV-1) i tip II (CCoV-2). CCoV-2 je evoluirao u dva različita patogena enterički (klasični) i pantropski na temelju virulencije. Enterički CCoV izaziva infekcije lokalizirane u tankom crijevu koja može dovesti do blagog gastroenteritisa. Pantropski CCoV soj uzrokuje ozbiljne kliničke znakove i lezije u različitim organima naročito u kombinaciji s drugim patogenom. CCoV inaktivira većina germicidnih sredstava. Poseban tretman za pseći koronavirus ne postoji. Obzirom da se najčešće pojavljuju blage infekcije ograničene na gastrointestinalni trakt cjepiva protiv CCoV nisu osnovna cjepiva i primjena im nije česta, preporuka je cijepiti visoko rizične skupine, kao što su štenci i psi u uzgajivačnicama i skloništima.

4. POPIS LITERATURE

1. Decaro, N. i Buonavoglia, C. (2011.): Canine Coronavirus: Not Only an Enteric Pathogen. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, 41(6): 1121–1132.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7114679/> (5.6.2023.)
2. Decaro, N., Mari, V., Sciarretta, R., Colao, V., Losurdo, M., Catella, C., Elia, G., Martella, V., Giudice, G., Buonavoglia, C. (2011.): Immunogenicity and protective efficacy in dogs of an MF59TM-adjuvanted vaccine against recombinant canine/porcine. Elsevier, 29: 2018-2023.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X11000569> (17.6.2023.)
3. Duan, L., Zheng, Q., Zhang, H., Niu, Y., Lou, Y. Wang, H. (2020.): The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Biosynthesis, Structure, Function, and Antigenicity: Implications for the Design of Spike-Based Vaccine Immunogens. *Front Immunol.*, 11: 576622.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7575906/> (5.6.2023.)
4. Gollakner, R., Ward, E.: Canine coronavirus disease <https://vcahospitals.com/know-your-pet/coronavirus-disease-in-dogs> (17.6.2023.)
5. Jureša, A. (2018.): Prevalencija i polimorfizam S gena psećeg koronavirusa u Hrvatskoj. Završni rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
<https://repositorij.vef.unizg.hr/islandora/object/vef:738> (18.9.2023.)
6. Licitra, B. N., Duhamel, G. E., Whittaker, G. R. (2014.): Canine enteric coronaviruses: emerging viral pathogens with distinct recombinant spike proteins. *Viruses* 6: 3363–3376. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4147700/> (18.9.2023.)
7. McBride, R., Zyl, M., Fielding, C. (2014.): The Coronavirus Nucleocapsid Is a Multifunctional Protein. *Viruses*, 6(8): 2991-3018
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4147684/> (5.6.2023)
8. Pratelli, A. (2006.): Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis. *Veterinary Research*, 37: 191-200.
<https://www.vetres.org/articles/vetres/pdf/2006/02/v6015.pdf> (5.6.2023.)
9. Pratelli, A. (2008.): Canine coronavirus inactivation with physical and chemical agents. *The Veterinary Journal*, 17: 71-79.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307001244>(12.6.2023.)
10. Timurkan, M. O., Aydin, H., Dincer, E., Coskun, N. (2021.): Molecular characterization of canine coronaviruses: an enteric and pantropic approach. *Arch Virol.*, 166(1): 35-42.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7529357/> (5.6.2023.)

11. Wahed, A., Truyen, U. (2021.): Canine coronaviruses: emerging and re-emerging pathogens of dogs. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 134: 1-6.
<https://www.vetline.de/canine-coronaviruses-emerging-and-re-emerging-pathogens-of-dogs> (5.6.2023.)
12. Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y., Chen B. (2021.): Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Curr Opin Virol.*, 50: 173–182.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8423807/> (6.9.2023.)
13. Zhon, S., Lv, P., Li M., Chen Z., Xin H., Reilly S., Zhang X. (2023.): SARS-CoV-2 E protein: Pathogenesis and potential therapeutic development. *Biomed Pharmacother.*, 159: 114242.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9832061/> (6.9.2023.)