

Koronavirusi životinja

Požarić, Fran

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:406138>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

KORONAVIRUSI ŽIVOTINJA

ANIMAL CORONAVIRUSES

SEMINARSKI RAD

Fran Požarić

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Mirna Ćurković-Perica

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na Mikrobiološkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Mirne Čurković-Perice

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
2	OSNOVE BIOLOGIJE KORONAVIRUSA.....	2
2.1	Svojstva genoma koronavirusa.....	2
2.2	ORF1ab.....	2
2.3	Strukturni i pomoćni proteini.....	3
3	FILOGENIJA I TAKSONOMIJA KORONAVIRUSA.....	5
3.1	Rod <i>Alphacoronavirus</i>	5
3.2	Rod <i>Betacoronavirus</i>	6
3.3	Rodovi <i>Gammacoronavirus</i> i <i>Deltacoronavirus</i>	7
4	KORONAVIRUSI ŠIŠMIŠA.....	8
4.1	Raznolikost koronavirusa šišmiša.....	9
4.2	Kina kao mjesto visoke raznolikosti šišmiša i koronavirusa.....	9
4.3	Fiziološki i imunološki čimbenici odnosa šišmiša i koronavirusa.....	9
5	MUTACIJA, REKOMBINACIJA I PRIRODNA SELEKCIJA KAO MEHANIZMI EVOLUCIJE KORONAVIRUSA NA PRIMJERU SARS-COV-2.....	10
5.1	Mutacije.....	11
5.2	Adaptivna evolucija.....	12
5.3	Prirodna selekcija.....	12
5.4	Rekombinacija.....	13
6	KORONAVIRUSI OSTALIH ŽIVOTINJA.....	14
6.1	Koronavirusi svinja.....	14
6.2	Koronavirusi goveda.....	18
6.3	Koronavirusi pasa.....	19
6.4	Koronavirusi mačaka.....	20
6.5	Koronavirusi ptica.....	21
6.6	Koronavirusi kukaca i kukcojeda.....	22
7	RASPRAVA.....	22
8	ZAKLJUČAK.....	24
9	LITERATURA.....	25
10	SAŽETAK.....	41
11	SUMMARY.....	42
12	ŽIVOTOPIS.....	43

1 UVOD

Koronavirusi su uzročnici brojnih bolesti u životinja. Sedam koronavirusa uzrokuje ljudske respiratorne bolesti, od toga su tri (SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2) uzrokovala epidemije u zadnjih dvadeset godina. Epidemija SARS-a trajala je od 2002. do 2003. a oboljelo je 8096 ljudi, (Domańska-Blicharz i sur. 2020), epidemija MERS-a započela je 2012. i traje do danas, a oboljelo je 2574 ljudi (podaci Svjetske zdravstvene organizacije) (<http://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html>). U prosincu 2019. počela je epidemija SARS-CoV-2, da bi u ožujku 2020. Svjetska zdravstvena organizacija proglasila pandemiju koja je još u tijeku. Zabilježeno je preko 220 milijuna slučajeva i preko 4 milijuna uzrokovanih smrti (podaci Sveučiliša John Hopkins, Center for Systems Science and Engineering) (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>).

Nakon epidemije SARS-CoV 2003. počelo se intenzivno istraživati koronavirus šišmiša, za koje se smatra da su ishodište i rezervoari većine koronavirusa (Drexler i sur. 2014). Genski raznoliki koronavirusi slični SARS-CoV virusu pronađeni su u kineskih šišmiša roda *Rhinolophus* (Lau i sur. 2010), a najbliži srodnik SARS-CoV-2 također je koronavirus ovih šišmiša. Šišmiši su nositelji i prenositelji koronavirusa goleme raznolikosti. Smatra se da su koronavirusi šišmiša izvor svih alfakoronavirusa i betakoronavirusa koji zaražavaju životinje, a ptice izvor gamakoronavirusa i deltakoronavirusa (Woo i sur. 2012). Pokazuje se da šišmiše njihova sposobnost leta, heterogene kolonije i specifičan imunosni sustav čine jedinstvenim domaćinima za koronavirus (Hayman 2019). Biološka raznolikost šišmiša, a time i njihovih koronavirusa, među najvećima je u Kini odakle su brojne epidemije potekle (Lin i sur. 2017; Fan i sur. 2019).

Koronavirusi životinja poznati su od 1930-ih i služe kao paradigmatički primjer prijenosa, patologije i evolucije koronavirusa (Decaro i sur. 2020). Na virusu epidemijskog proljeva svinja (PEDV) utvrđeno je da su šišmiši i izvor i prenositelj koronavirusa (Huang i sur. 2013). Pojava novih sojeva s različitom viruelncijom i patologijom očituje se u nastanku respiratornog koronavirusa svinja (PRCV) iz virusa transmisivnog gastroenteritisa svinja (TGEV) (Wang i sur. 2019). Znanje o životinjskim koronavirusima je ključno u razumijevanju zoonotskih koronavirusa i temelj za prevenciju.

Za razliku od ostalih emergentnih virusa koji su se pojavili u zadnja dva desetljeća, koronavirusi imaju veliku sposobnost rekombinacije (Boni i sur. 2020). Njihov veliki jednolančani RNA genom, združen s visokom stopom mutacija i rekombinacijskim potencijalom čini koronavirusu podložnima „skokovitom“ prijenosu s jedne vrste na drugu (Woo i sur. 2009; Kenney i sur. 2021).

2 OSNOVE BIOLOGIJE KORONAVIRUSA

Pripadnici porodice *Coronaviridae* su veliki virusi s vanjskom ovojnicom i jednolančanim RNA genomom. Koronavirusi su najveći poznati RNA virusi s genomima veličine od 28 do 32 kb i virionima od 80 do 220 nm u promjeru (Lai i Cavanagh 1997; Brownlie i Whittaker 2010). Strukturno su pleomorfni i pokazuju veliku plastičnost genoma te sposobnost rekombinacije i interspecijskog prijenosa (Woo i sur. 2009a; Decaro i sur. 2020).

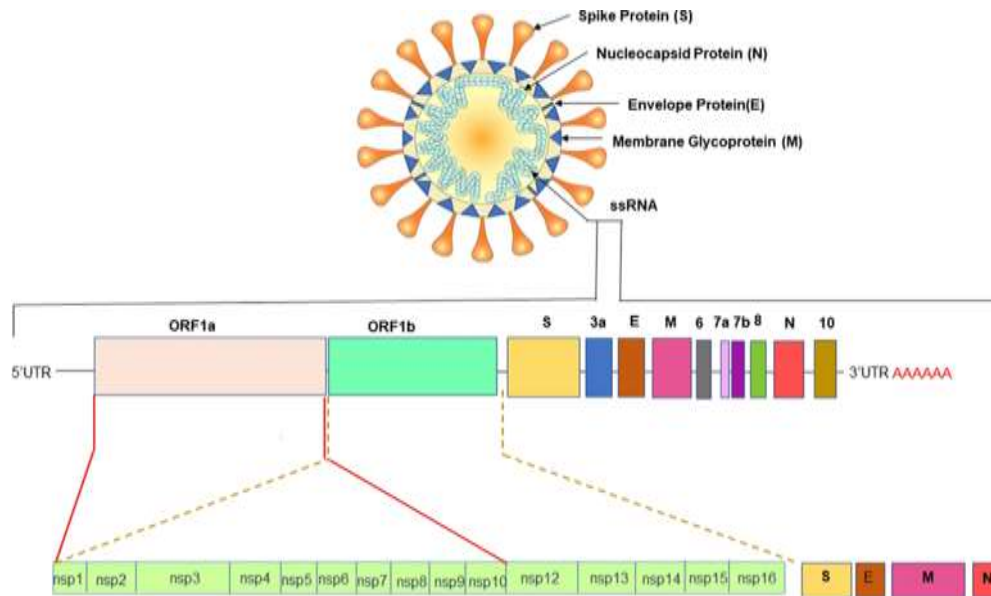
2.1 Svojstva genoma koronavirusa

Genomska ssRNA je pozitivna (eng. *positive-sense*), nesegmentirana, u kompleksu s proteinom nukleokapside i najčešće sadrži 10 i više otvorenih okvira čitanja (ORF (Wang i sur. 2020). Svi koronavirusi posjeduju sličnu organizaciju genoma ukratko opisanu kao 5'-pol1ab-S-E-M-N-3' (Slika 1.) (Domańska-Blicharz i sur. 2020). Gotovo dvije trećine genoma kodiraju proteine koji sudjeluju u replikaciji i transkripciji, a preostala trećina kodira strukturne te niskomolekularne pomoćne proteine (Fehr i Perlman 2015).

2.2 ORF1ab

Nestrukturni proteini (nsp - eng. *nonstructural protein*) koronavirusa se sintetiziraju kao dugački prekursori poliproteini pp1a i pp1b (kodirani otvorenim okvirom čitanja ORF1ab) (Slika1.) koji se cijepaju i aktiviraju proteazama (Fehr i Perlman 2015; O'Leary i sur. 2021). Početak sekvence za ORF1b preklapa se sa završetkom sekvence za ORF1a pa do transkripcije dolazi ribosomalnim pomicanjem okvira čitanja (Jungreis i sur. 2021a). Prvi dio prekursora je poliprotein pp1a (kodiran otvorenim okvirom čitanja ORF1a) čijim rezanjem nastaju mali proteini nsp1-nsp11 vidljivi na Slici 1. Oni služe kao papainu slična proteaza (P1pro), glavna proteaza (Mpro), cink vezujući kofaktor za aktivnost nsp16 i ostali sudionici u replikaciji. Poliprotein pp1b (kodiran otvorenim okvirom čitanja ORF1b) je drugi dio koji rezanjem daje nsp12-nsp16 (Slika 1.) koji imaju uloge: RdRp (nsp12), protein s helikaznom i fosfataznom aktivnosti (nsp13), protein

s egzonukleaznom i metiltransferaznom aktivnosti, (nsp14), endonukleaza (nsp15) i druga metiltransferaza (nsp16) (Sawicki i sur. 2007). Uloge svih nsp-ova nisu do kraja poznate i potrebno je daljnje istraživanje.

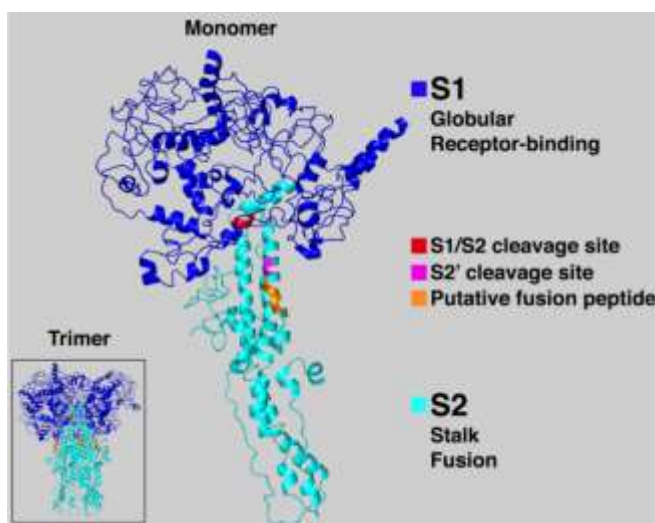


Slika 1. Shematski prikaz strukture viriona (gore), strukture genoma (sredina) i transkriptoma (dolje) SARS-CoV-2 (preuzeto iz: Rastogi i sur. 2020).

2.3 Strukturni i pomoćni proteini

Strukturni proteini u genomu kodirani su u visoko konzerviranom redosljedu S, E, M, N (Slika 1.). Redosljedom proteini šiljka (eng. *spike*), vanjske ovojnice (eng. *envelope*), membrane (eng. *membrane*) i nukleokapside (eng. *nucleocapsid*). Među genima za strukturne proteine razbacani su geni za pomoćne proteine (eng. *accessory proteins*) koji su manje konzervirani i smatra se da svi nisu nužni za replikaciju koronavirusa u kulturi stanica (Narayanan i sur. 2008). Unatoč tome, pokazalo se da mutacije u genima za pomoćne proteine bitno utječu na replikaciju i virulenciju u organizmu domaćina (Payne 2017). Pomoćni proteini virusa SARS-CoV-2 imaju ulogu u patogenzi i supresiji imunskog sustava, a oni kodirani slijedovima ORF3b, ORF6, ORF7a i ORF8 djeluju kao antagonisti interferona (Redondo i sur. 2021).

Virioni koronavirusa su sferičnog oblika (Slika 1.) najčešće veličine od 118 do 140 nm. Vanjska ovojnica je najprominentniji dio viriona s velikim proteinima šiljka (protein S) (Slika 1.) izgledom poput toljage (Slika 2.), koji izbijaju s površine ovojnice. Od tuda potječe ime cijele porodice *Coronaviridae* jer izraženi proteini ovojnici daju izgled sunčeve korone. Protein S (~150 kDa) je homotrimer (Slika 2.) koji se funkcionalno sastoji od S1 i S2 domene (Beniac i sur. 2006). U većine koronavirusa protein S se cijepa staničnom proteazom na furinskom S1/S2 restriksijskom mjestu. Osim S1/S2 restriksijskog mjesta neki koronavirusi poput SARS-CoV i SARS-CoV-2 posjeduju i S2' restriksijsko mjesto. Oba restriksijska mjesta vide se na Slici 2. Protein je aktiviran za fuziju tek kada je pocijepan na oba mjesta (Belouzard i sur. 2009; Peacock i sur. 2021).



Slika 2. Pretpostavljena trodimenzionalna struktura SARS-CoV proteina šiljka (eng. *spike protein*) tj. proteina S. Označene su S1 i S2 domene monomera te S1/S2 i S2' furinsko restriksijsko mjesto. Narandžastom bojom je označen navodni peptid odgovoran za fuziju. U kutu dolje lijevo vidi se trimerni oblik proteina (preuzeto iz: Belouzard i sur. 2012).

Opseg cijepanja ovisi o količini bazičnih aminokiselina na furinskom restriksijskom mjestu. S1 postaje N- terminalna, a S2 C-terminalna domena i sparuju se nekovalentnim vezama (Kam i sur. 2009). S1 formira globularnu glavu proteina S te se nalazi na distalnom kraju proteina koji prvi dolazi u kontakt s receptorom stanice. RBD domena (eng. *receptor binding domain*) reagira s receptorom i započinje infekciju stanice. S2 domena oblikuje dršku proteina S i ukorjenjuje ga u vanjsku ovojnica. Ona posreduje prilikom fuzije vanjske ovojnice virusa i plazmaleme stanice (Li

2016). Genska sekvenca S2 domene visoko je konzervirana u cijeloj porodici *Coronaviridae* (Madu i sur. 2009). Suprotno tome, sklonost S1 domene mutaciji i rekombinaciji ključ je prilagođavanja koronavirusa novim domaćinima što posljedično vodi do prijenosa s jedne vrste na drugu (eng. *cross-species transmission*) (Boni i sur. 2020).

3 FILOGENIJA I TAKSONOMIJA KORONAVIRUSA

Do epidemije izazvane SARS-CoV virusom 2003. godine bilo je sekvencirano svega deset koronavirusnih genoma; sedam koji zaražavaju sisavce (MHV, BCoV, PHEV, TGEV, PEDV, PRCV i FCoV), dva ljudska (HCoV-229E i HCoV-OC43) te jedan ptičji (IBV). Ovi koronavirusi podijeljeni su u tri grupe, od kojih su grupa 1 i 2 sadržavale viruse sisavaca i ljudi, a grupa 3 ptičje viruse (McIntosh i sur. 1969; Pensaert i sur. 1981). Nakon epidemije SARS-a sekvencirano je i klasifikaciji pridruženo još 16 novootkrivenih koronavirusa, od kojih dva ljudska, deset koji zaražavaju sisavce (osam šišmišjih), jedan konjski i četiri ptičja. Taksonomija je proširena na četiri podgrupe za grupu 2 i tri podgrupe za grupu 3 (Woo i sur. 2009a).

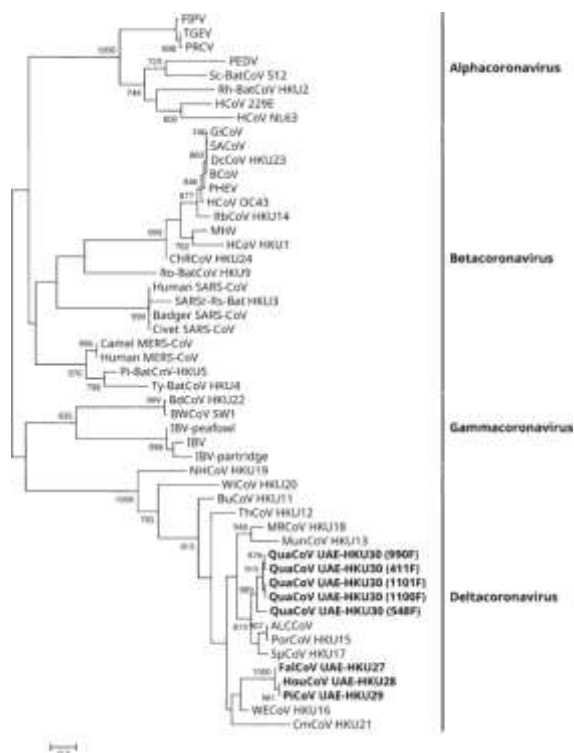
U prosincu 2008. je *Coronavirus Study Group of the International Committee for Taxonomy of Viruses* (ICTV) predložila odmicanje od tradicionalnih grupa i klasifikaciju u rodove *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* i *Gammacoronavirus*, a u međuvremenu je dodan rod *Deltacoronavirus* (https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae). Rodovi se dijele na 14 podrodova za alfakoronavirus, 5 za betakoronavirus, 3 za gamakoronavirus, 3 za deltakoronavirus (Walker i sur. 2019). Šira klasifikacija svrstava porodicu *Coronaviridae* (ime od latinskog corona što znači „kruna“) unutar reda *Nidovirales* (Le i sur. 2007).

3.1 Rod *Alphacoronavirus*

Alfakoronavirusi (tradicionalno grupa 1 koronavirusa) podijeljeni su na 14 podrodova i svima je zajedničko da se protein S pri obradi ne cijepa proteazama (Wrapp i McLellan 2019). Podrod *Tegacovirus* sadržava virus transmisivnog gastroenteritisa svinja (TGEV), svinjski respiratorni koronavirus (PCRV), virus epidemijskog proljeva svinja (PEDV) (Slika 3.) i koronavirus sindroma akutnog proljeva u svinja (SADS-CoV). Ovi respiratorni i enterički virusi svinja mogu uzrokovati

velike štete u uzgoju i obično imaju veliku smrtnost, posebno u mladim svinja gdje smrtnost može biti i do 100% (Lin i sur. 2016; Kenney i sur. 2021).

Unutar podroda *Tegacovirus* nalazi se i jedan od najbolje istraženih primjera nastanka nove vrste koronavirusa homolognom rekombinacijom postojećih varijanti. Virus mačjeg infektivnog peritonitisa (FIPV) (Slika 3.) rezultat je dvostruke rekombinacije mačjeg koronavirusa (FCoV) serotipa I, te psećeg koronavirusa (CCoV) (Wesseling i sur. 1994; Brown 2011).



Slika 3. Prikaz filogenije četiri roda porodice *Coronaviridae*. Na filogramu se vide istaknuti pripadnici rodova *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* i *Deltacoronavirus*. Filogram je konstruiran na temelju 371 pb fragmenata RdRp, izrađen MLE metodom (eng. *maximum likelihood estimation*). Na filogramu tamno otisnuto je osam deltakoronavirusa ptica otkrivenih na bliskom istoku, uključujući koronavirus sokola (preuzeto iz: Lau i sur. 2018)

3.2 Rod *Betacoronavirus*

Betakoronavirusi su daleko najbolje istražena skupina koronavirusa. Prije otkrića SARS-CoV smatralo se da svi pripadaju jednoj evolucijskoj liniji jer se činilo da svi imaju karakterističan nsp1

gen i nizvodno gen za dvije papainu-slične proteaze (PL1pro and PL2pro) u sklopu nsp3 (kodirano otvorenim okvirom čitanja ORF1ab) (Chan i sur. 2015; Min i sur. 2020).

Različito podroda *Embecovirus* je u posjedovanju gena za strukturni protein ovojnice, hemaglutinin esterazu (HE), za koju se smatra da je u genom ušla putem rekombinacije s virusom gripe C (Bakkers i sur. 2017). Dva ljudska koronavirusa spadaju u podrod *Embecovirus*, HCoV-HKU1 i HCoV-O43. Oba virusa adheriraju na 9-*O*-acetilirane sialoglikane preko proteina S, dok hemaglutinin esteraza (HE) djeluje kao receptor-uništavajući enzim. Smatra se da ovakva aktivnost HE pospješuje zaobilazak staničnog glikokaliksa te adherenciju proteina S s receptorom na ciljanoj stanici (Lang i sur. 2020).

Istraživanja ljudskih i životinjskih koronavirusa pokazuju da je HCoV-HKU1 najrodniji mišjem virusu hepatitisa (MHV) (Slika 3.) što posljedično upućuje na glodavce kao vjerojatan izvor i rezervoar ovog ljudskog koronavirusa (Woo i sur. 2005). Za HCoV-O43 pak se pokazalo da se u ljudskoj populaciji pojavio putem prijenosa s goveda jer najbliži srodnik mu je goveđi BCoV (Kin i sur. 2016; Lang i sur. 2020).

Za viruse podroda *Sarbecovirus* specifično je da imaju samo jednu papainu-sličnu proteazu (Plpro) kodiranu otvorenim okvirom čitanja ORF1ab (Woo i sur. 2010). Ovaj podrod najviše je uzdrmao svjetsku scenu jer ubraja dva ljudska epidemijaska koronavirusa, SARS-CoV i SARS-CoV-2. Šišmiši su rezervoar virusa podroda *Sarbecovirus* (Hu i sur. 2015) te se pretpostavlja da ovi koronavirusi imaju dugu koevoluciju sa šišmišima iz porodice *Hipposideridae*. Iz šišmiša porodice *Hipposideridae* prešli su u šišmiše porodice *Rhinolophidae*, a za njih se zna da sadrže ogromnu raznolikost infektivnih koronavirusa, između ostaloga koronavirusu SARS-CoV slične viruse (SARSr-CoV), od kojih su neki prikazani na Slici 3. (Cui i sur. 2007; Gouilh i sur. 2011).

3.3 Rodovi *Gammacoronavirus* i *Deltacoronavirus*

Rod *Gammacoronavirus* donedavno je bio slabo poznata skupina koronavirusa. Više od 50 godina ptičji infektivni virus bronhitisa (IBV) (Slika 3.) (Fabricant 1998), koji obično zaražava kokoši, bio je jedini znani gamakoronavirus. U zadnjih tridesetak godina opisano je i sekvencirano nekoliko novih ptičjih gamakoronavirusa, uključujući pureći koronavirus (TCoV) (Gomaa i sur. 2008). Veličina, sadržaj G + C baza te organizacija genoma tih ptičjih koronavirusa je slična, sugerirajući nedavno odvajanje od zajednočkog pretka (Woo i sur. 2009a).

Zatim su 2008. napravljena važna otkrića kada su pronađeni koronavirus s najvećim poznatim genom izoliran iz beluge (BWCoV-SW1) (Slika 3.) te koronavirusi s najmanjim poznatim genomom iz triju različitih ptičjih porodica (Pycnonotidae BuCoV HKU11, Thurdidae ThCoV HKU12 i Estrildidae MuCoV HKU13) (Mihindukulasuriya i sur. 2008; Woo i sur. 2009b). Zanimljivo je da su ova tri gamakoronavirusa filogenetski u istoj grupi s koronavirusom izoliranim 2007. iz leoparda (ALC-CoV) (Dong i sur. 2007), što je najbliža zabilježena veza koronavirusa ptica i sisavaca.

Kao dokaz zahtjevnosti i složenosti virusne taksonomije primjer je da su ranije navedeni ptičji koronavirusi (BuCoV HKU11, ThCoV HKU12 i MuCoV HKU13) i koronavirus leoparda (ALC-CoV) ICTV-ovim povjerenstvom predloženi da budu klasificirani u rod *Deltacoronavirus*, dakle prebačeni iz roda *Gammacoronavirus* (Slika 3.) (de Groot i sur. 2011). U rod *Gammacoronavirus* pak dodani su tada novootkriveni koronavirusi pataka i gusaka (Chu i sur. 2011).

Za rod *Deltacoronavirus* svojstven je nastanak novih sojeva putem rekombinacije, koja također potiče prijenos s jedne vrste na drugu. Tako je rekombinacijom gena za protein S nastao koronavirus sokola (FalCoV UAE-HKU27) kada su pticu koinficirali koronavirusi vrapčarki iz porodice Zosteropidae (WECOV HKU16) i Muscicapidae (MRCOV HKU18) od kojih su svi prikazani filogenetski na Slici 3. (Lau i sur. 2018).

4 KORONAVIRUSI ŠIŠMIŠA

Otkriće šišmišjeg SARS-CoV, sličnog ljudskom SARS-CoV, označilo je početak „lova“ na koronavirus šišmiša. Intenzivna potraga za evolucijskom prošlosti koronavirusa navela je na zaključak da koronavirusi šišmiša posjeduju najveću gensku raznolikost te da su stariji od koronavirusa prisutnih u drugim životinja (Woo i sur. 2009a). Koronavirusi u šišmišima imaju stabilnu razinu populacije dok koronavirusi u ostalim životinjama pokazuju eksponencijalan rast populacije. Ova činjenica upućuje na zaključak da koronavirusi nisu endemični za divlje životinje odnosno da su one koronavirus stekle relativno nedavno. Sukladno tome, postoje indicije da je hipotetski predak svih koronavirusa šišmišji koronavirus (Vijaykrishna i sur. 2007). Ovaj predak svih koronavirusa (MRCA) datiran je na ~8100 godina pr. n. e., predak *Alphacoronavirus* na

~2400 pr. n. e., *Betacoronavirus* na ~3300 pr. n. e., *Gammacoronavirus* na ~2800 pr. n. e. i *Deltacoronavirus* na ~3000 pr. n. e. (Woo i sur. 2012).

4.1 Raznolikost koronavirusa šišmiša

Koronavirusi koji zaražavaju šišmiše pripadaju rodovima *Alphacoronavirus* i *Betacoronavirus* (Wong i sur. 2019) te većinu rodova šišmiša zaražavaju oba roda koronavirusa (Latinne i sur. 2020). Bajezijanska analiza filogenije pokazala je da porodica Rhinolophidae (rod *Rhinolophus*) i Miniopteridae (rod *Miniopterus*) igraju ključnu ulogu u evoluciji i interspecijskom prijenosu virusa roda *Alphacoronavirus*. Uz Rhinolophidae važnu ulogu u evoluciji virusa roda *Betacoronavirus* ima porodica šišmiša Hipposideridae. Smatra se da pradavno podrijetlo Rhinolophidae u Aziji upućuje na koevoluciju i diverzifikaciju šišmiša i koronavirusa, uključujući viruse slične SARS-CoV (Vijaykrishna i sur. 2007; Latinne i sur. 2020).

4.2 Kina kao mjesto visoke raznolikosti šišmiša i koronavirusa

Obzirom da se nalazi na dodiru Palearktičke i Orijentalne zoogeografske regije, Kina je mjesto velike biološke raznolikosti šišmišjih CoV i intenzivna znanstvena istraživanja na tom području traju već dvadesetak godina (od epidemije SARS-a). Raznolika fauna šišmiša broji više od 100 vrsta od kojih su neke endemične te omogućava kolanje i evoluciju CoV-a kao nigdje drugdje (Lin i sur. 2017, Lattine i sur. 2020). Kina je mjesto ubrzanog rasta gospodarstva i populacije što dovodi ljude i pitome životinje sve bliže divljini koja je rezervoar potencijalno emergentnih virusa. Specifičan odnos ljudi, divljih životinja i emergencije potvrđuje činjenica da su čak tri (SARS-CoV, SADS-CoV, SARS-CoV-2) od četiri recentne epidemije uzrokovane širenjem koronavirusa započele u Kini (Fan i sur. 2019). Štoviše, smatra se da su sve četiri epidemije uzrokovane „skokom“ koronavirusa sa šišmiša na druge životinje (Hu i sur. 2015; Zhang i Holmes 2020). U južnim provincijama Kine zabilježen je najveći broj šišmišjih koronavirusa (Ge i sur. 2016; Lin i sur. 2017).

4.3 Fiziološki i imunološki čimbenici odnosa šišmiša i koronavirusa

Čimbenici koji rezultiraju šišmišima kao izvorom koronavirusa (i drugih zoonotskih virusa) su život u gusto napučenim kolonijama, miješanje različitih kolonija, bliske socijalne interakcije te sposobnost leta (Calisher i sur. 2006). Upravo let ima ključan utjecaj u odnosu šišmiša i njihovih virusa. Smatra se da let iziskuje tako veliku potrebu za energijom da je oksidativna fosforilacija pod jakom pozitivnom selekcijom u šišmiša (Shen i sur. 2010). Let također uzrokuje opći fiziološki

stres u organizmu i uzrokuje oštećenje tkiva. Štetni produkti oksidativnog metabolizma i stresa uzrokuju oštećenje stanične DNA. Fragmenti oštećene vlastite DNA te nukleinske kiseline mikroorganizama snažno aktiviraju imunski sustav i potiču upalu (Abbas i sur. 2016).

Jedno istraživanje otkrilo je da mutacija koja vodi do supstitucije serina u STING proteinu šišmišima omogućuje smanjenu upalu odnosno suprimirani imunski odgovor (Xie i sur. 2018). STING je citosolni receptor za nukleinske kiseline i pokreće autokrino i parakrino lučenje interferona tipa I (IFN- α), proteina koji promiču upalno i antivirusno stanje (Andreis i sur. 2010). Nefunkcionalni STING ne pokreće snažnu upalu u stresnom ili patološkom stanju, što je evolucijski nastalo kao prilagodba na let, ali rezultiralo i visokom virusnom opterećenošću (eng. *viral load*) (Xie i sur. 2018). Također, smatra se da je dugačak životni vijek šišmiša posljedica ove prilagodbe (Hayman 2019).

Suprotno znanstvenim rezultatima koji ukazuju na slabu ekspresiju IFN- α u šišmiša, drugo istraživanje pokazalo je da konstitutivna ekspresija IFN- α štiti šišmiše od infekcije virusom bez potrebe za velikim titrima antitijela, omogućujući koegzistenciju virusa i šišmiša (Zhou i sur. 2016; Fan i sur. 2019). Smatra se da šišmišji koronavirusi imaju veliku patogenost u nešišmišjem domaćinu upravo zbog koevolucija virusa i imunskog sustava šišmiša u kojem je stvaranje interferona konstitutivno pa interferon u novom domaćinu nema uobičajen utjecaj na virus (Hayman 2019).

Očigledno je da imunski sustav šišmiša ima specifične adaptacije vezane uz način života šišmiša, no takve adaptacije omogućuju visoku stopu replikacije virusa i dopuštaju koegzistenciju više različitih koronavirusa unutar kolonije šišmiša (Ge i sur. 2016). Homologna rekombinacija koronavirusa u šišmišima javlja se i unutar roda i između rodova virusa (Stanhope i sur. 2004).

5 MUTACIJA, REKOMBINACIJA I PRIRODNA SELEKCIJA KAO MEHANIZMI EVOLUCIJE KORONAVIRUSA NA PRIMJERU SARS-COV-2

SARS-CoV-2 vjerojatno je najbolji primjer za prikaz molekularne evolucije koronavirusa. Postoji velik broj analiza genomske strukture SARS-CoV-2, mogućih događaja rekombinacije i

svojstava potrebnih za širenje na novog domaćina. Također to je najaktualniji primjer bolesti uzrokovane koronavirusom te najozbiljniji jer do sada je uzrokovao preko 200 milijuna slučajeva zaraze ljudi i preko 4 milijuna smrtnih slučajeva (podaci Sveučiliša John Hopkins, Center for Systems Science and Engineering) (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>).

5.1 Mutacije

Genom SARS-CoV-2 sastoji se gotovo potpuno od protein-kodirajućih sekvenci (Jungreis i sur. 2021b), isto kao u svih pripadnika porodice. Kada se promatra evolucija protein kodirajućih sekvenci moraju se odvojeno uzeti u obzir supstitucije nukleotida koje promijene aminokiselinu te one koje ne utječu na aminokiselinu. Prvi tip supstitucije naziva se pogrešna supstitucija, a drugi neutralna ili „tihan“ supstitucija (Graur 2003) pa je za očekivati da različito pogone evoluciju.

Pogrešna supstitucija, zato što mijenja aminokiselinsku podjedinicu proteina, modificira biološku funkciju proteina. Stoga pogrešna mutacija je posljedično pod jačom prirodnom selekcijom, nego što bi to bila neutralna mutacija gdje se funkcija ne mijenja pa supstitucija ostaje „tihan“ ili „skrivena“ (Chamary i sur. 2006). Ipak neutralna supstitucija u nekim slučajevima može biti pod selekcijom, no u pravilu utjecaj mutacija i nasumičnog genskog drifta je značajniji (Singh i Soojin 2021).

U genomima se pogrešne supstitucije događaju mnogo rjeđe zbog negativne („pročišćavajuće“) selekcije koja se nastoji riješiti pogrešnih mutacija jer potencijalno mogu uzrokovati gubitak ili modifikaciju funkcije proteina. Omjer pogrešnih prema neutralnim mutacijama (dN/dS ili ω) u genomu SARS-CoV-2 je 0.028 za devet ORF-ova SARS-CoV-2 (Tang i sur. 2020). Inače koronavirus karakterizira visoka stopa mutacija (Lio i Goldman 2004) i na primjer dovoljne su samo dvije točkaste mutacije u genu za protein S da promijeni tropizam svinjskog TGEV s probavnog sustava crijeva na respiratorni sustav što je karakteristika PRCV serotipa TGEV-a (Ballesteros i sur. 1997; Domańska-Blicharz i sur. 2020).

U istraživanju supstitucija u genomu SARS-CoV izračunato je da dS iznosi 0.0016-0.003 supstituiranih nukleotida po mjestu po godini (Zhao i sur. 2004), a drugo istraživanje za SARS-CoV-2 otkrilo je 0.0015-0.0033 supstituiranih nukleotida po mjestu u genomu, po godini (Chaw i sur. 2020). Rezultati zajedno sugeriraju da je stopa mutacije SARS-CoV i SARS-CoV-2 uobičajena za *Coronaviridae*, no umjerena u odnosu na ostale RNA viruse (Zhao i sur 2014).

5.2 Adaptivna evolucija

Magnituda pandemije SARS-CoV-2 nameće pitanje je li zaražavanje čovjeka podržano adaptivnom evolucijom? Na prvi mah može se tako činiti jer protein S ovojnice SARS-CoV-2 veže svoj receptor, angiotenzin-konvertirajući enzim 2 (ACE2), velikim afinitetom što nije uočeno u srodnih šišmišjih koronavirusa (Shang i sur. 2020). Usporedbom genoma srodnih koronavirusa putem omjera dN/dS (ω) može se utvrditi jačina pozitivne (veliki dN/dS) ili negativne selekcije (malen dN/dS). Iz omjera se može izvući zaključak pogoduje li pozitivna selekcija zadržavanju pogrešnih supstitucija ili pak negativna selekcija odbacuje štetne mutacije iz populacije (Singh i Soojin 2021).

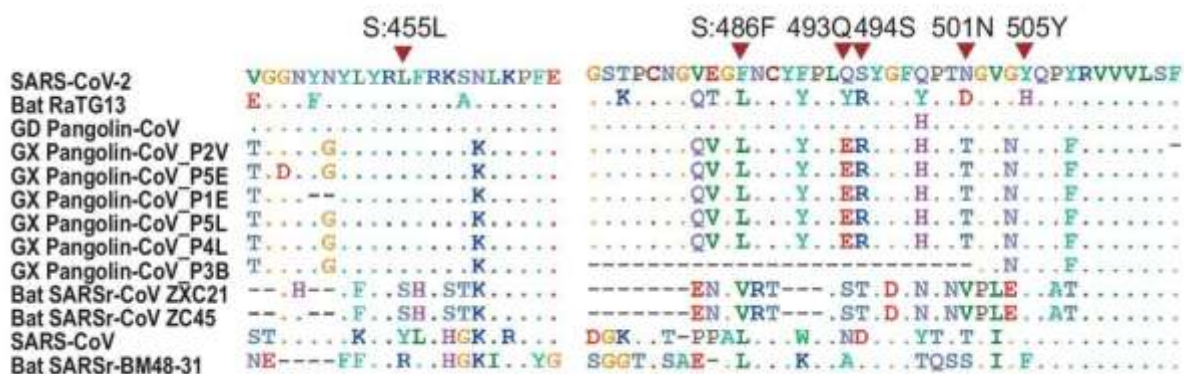
5.3 Prirodna selekcija

Rezultati istraživanja selekcije nad SARS-CoV-2 ukazuju na negativnu selekciju i relativno sporu evoluciju. Tang i sur. usporedili su nekoliko blisko srodnih koronavirusa šišmiša i ljuskavaca s ljudskim SARS-CoV (Tang i sur. 2020). Jedan od koronavirusa šišmiša je RaTG13 (nađen 2013. u šišmišjem uzorku iz špilje u provinciji Yunnan, Kina) koji sa SARS-CoV-2 dijeli 96% identičnu sekvencu nukleotida (Ge i sur. 2016; Latinne i sur. 2020; Zhou i sur. 2020), iako prosjek genomske dS vrijednosti iznosi 0.17 što znači da je divergencija na neutralnim mjestima 17% između ova dva virusa. Neutralna mjesta ne nalaze se pod selekcijom, stoga ih u analizi divergencije treba razdvojiti od događaja pogrešne supstitucije koji su pod snažnom negativnom selekcijom (Chamary i sur. 2006). Uparena usporedba sekvenci metodom dN/dS iznosi 0.044-0.124 što je značajno manje od 1, ukazujući na snažnu negativnu selekciju (Tang i sur. 2020).

Ipak, kako bi provjeri postoje li pokazatelji pozitivne selekcije na specifičnim pozicijama aminokiselina, izvršili su analizu dS vrijednosti za gen proteina S u odnosu na ostale gene. Povišena vrijednost dS za protein S najvjerojatnije je uzrokovana visokom stopom mutacije (Tang i sur. 2020), a to je biološki podržano ulogom proteina S u adheziji i fuziji sa stanicom pa mutacija može povećati šansu za prijenos na novog domaćina (Li 2016).

Cijeli genom ne pokazuje pritisak pozitivne selekcije k infekciji čovjeka, no tragovi pozitivne selekcije uočeni su na receptor-vezujućoj domeni (RBD) SARS-Cov-2. Pet od šest ključnih aminokiselina u RBD-u su različite između SARS-CoV i SARS-CoV-2 (Slika 4.), a 3D strukturna analiza indicira da protein S virusa SARS-Cov-2 ima znatno veći afinitet prema ACE2 nego što to ima SARS-CoV (Wrapp i sur. 2020). Zanimljivo je da je istih šest aminokiselina u S1 podjedinici

proteina identično između GD Pangolin-CoV i SARS-CoV-2, no iznenađujuće RaTG13 dijeli samo jednu od tih šest aminokiselina sa SARS-CoV-2, unatoč tome što je RaTG13 bliži SARS-CoV-2 nukleotidnom sekvencom genoma nego koronavirus ljuskavca GD Pangolin-CoV (Slika 4.) (Wong i sur. 2020; Zhou i sur. 2020).



Slika 4. Prikaz sekvenci aminokiselina u RBD domeni proteina šiljka za trinaest koronavirusa, uključujući viruse SARS-CoV i SARS-CoV-2 te viruse ljuskavca i šišmiša. Označeno je šest ključnih aminokiselinskih mjesta za SARS-CoV-2 (L455, F486, Q493, S494, N501, Y505). SARS-CoV-2 s RaTG13 dijeli samo jedno identično mjesto, dok s GD Pangolin-CoV čak pet mjesta (preuzeto i prilagođeno prema: Tang i sur. 2020)

5.4 Rekombinacija

Sličnost proteina S koronavirusa ljuskavca GD Pangolin-CoV sa SARS-CoV-2 navela je na pretpostavku da je uzrok tome nedavna rekombinacija u domaćinu ljuskavcu (Zhang i sur. 2020). Iako postoje pokazatelji o drevnoj rekombinaciji unutar proteina S (Ji i sur. 2020), vjerojatniji je slučaj da sličnost u RBD domeni S1 podjedinice potječe od konvergentne evolucije, pogonjene visokom stopom mutacije u proteinu S i prirodnom selekcijom nad mutacijama (Tang i sur. 2020). Ako je i došlo do rekombinacije, izračunato je da se morala dogoditi prije 19.2-53.7 godina, a to se ne slaže s činjenicom da se SARS-CoV-2 odvojio vrlo nedavno što dokazuje sličnost genoma osam izoliranih virusa od 99.98% na samom početku pandemije (Lu i sur. 2020).

Unatoč nepobitnom stjecanju specifičnih aminokiselina u RBD-u proteina S SARS-CoV-2 koje omogućavaju interakciju ljudskog ACE2 receptora i receptor-vezujuće domene virusa, trenutno se

ne smatra da su stečene rekombinacijom. Rezultati ukazuju na emergenciju pretka SARS-CoV-2 unutar šišmiša potkovnjaka (rod *Rhinolophus*) za koje se sve više utvrđuje da su rezervoar šišmišjih koronavirusa podroda *Sarbecovirus* (Boni i sur. 2020; Latinne i sur. 2020). Adaptacija vezanja RBD-a i ACE2 mogla je nastati u nekom od srodnika virusa sličnih SARS-CoV-2 i RaTG13, jer je raznolikost tih virusa velika; RaTG13 dijeli genomsku razliku od ~4% sa SARS-CoV-2, a razlika je još veća kada se u obzir uzmu pogrešne i neutralne supstitucije pa je divergencija na neutralnim mjestima 17% (Tang i sur. 2020).

Mogućnost direktnog srodstva dodatno otežava velika geografska udaljenost provincije Hubei, gdje je prvi put zabilježen SARS-CoV-2, i provincije Yunnan gdje je zabilježena velika raznolikost koronavirusa te između ostalih i virus RaTG13. Stoga se nastavlja potraga za domaćinom izvorom i koronavirusom srodnikom SARS-CoV-2. Uspješnost potrage bit će osigurana samo ako se nastavi istraživanje raznolikosti šišmišjih koronavirusa. Rezultati su neskloni rekombinantnom porijeklu SARS-CoV-2, no koronavirusi kao porodica pokazuju veliku moć rekombinacije i bogatu povijest iste (Graham i Baric 2010), što je najbolje vidljivo na koronavirusima ostalih životinja koji su također šišmišjeg (te neki ptičjeg) porijekla (Woo i sur. 2009a; Wertheim i sur. 2013).

6 KORONAVIRUSI OSTALIH ŽIVOTINJA

6.1 Koronavirusi svinja

Čini se da su svinje česta meta infekcija koronavirusima. Koronavirusi svinja spadaju u šest različitih vrsta: virus epidemijskog proljeva svinja (PEDV), virus transmisivnog gastroenteritisa svinja (TGEV), respiratorni koronavirus svinja (PRCV), koronavirus sindroma akutnog proljeva svinja (SADS-CoV), svinjski hemaglutinirajući virus encefalomijelitisa (PHEV) i svinjski deltakoronavirus (PDCoV). Na Slici 3. i 5. vidljivi su filogenetski odnosi ovih koronavirusa (Kenney i sur. 2021). Četiri od njih, poimence PEDV, TGEV, PRCV, SADS-CoV, spadaju u rod *Alphaacoronavirus*, dok PHEV spada u *Betacoronavirus* te PDCoV u *Deltacoronavirus* (Domańska-Blicharz i sur. 2021). Svi osim PRCV-a uzrokuju svinjsku enteričku koronavirusnu bolest (SECD) koju je po patološkim manifestacijama gotovo nemoguće povezati s točnim virusnim uzročnikom bez serološkog ili molekularnog testa (Kenney i sur. 2021).



Slika 5. Filogenetsko stablo čestih koronavirusa životinja, svih sedam ljudskih koronavirusa te nekoliko koronavirusa šišmiša (za koje se smatra da su uključeni u prijenos na ljude) (preuzeto iz: Kenney i sur. 2021).

Što se tiče gubitaka, virus epidemijskog proljeva svinja (PEDV) je gospodarski značajan s visokom stopom zaraze i visokom stopom smrtnosti, u prašćića čak do 100% (dok je u odraslih svinja niža s oko 20%). Kao uzročnik bolesti otkriven je 1971. u Engleskoj (Oldham 1972; Pensaert i Martelli 2016) te je opisana bolest sličila TGEV-u, a 1977. godine u Belgiji je determiniran PEDV kao zaseban virus (Wood 1977). Do danas je diagnosticiran u SAD-u i Europi, a stvara sve veće probleme u zemljama Azije (Li i sur. 2012). Postoji samo jedan serotip PEDV-a klasificiran u dvije genske grupe (G1 i G2); G1 je europska grupa i uzrokuje blage simptome, dok je G2 nađena u Americi i Aziji te je znatno virulentnija. Moguće da je uzrok tome insercija ili delecija u S genu nazvana S-INDEL koju klasični soj CV777 iz Belgije nema (Chen i sur. 2016; Rasmussen i sur. 2018; Domańska-Blicharz i sur. 2021).

PEDV se može lako prenositi preko asimptomatski zaraženih svinja koje u okolinu ispuštaju virus putem fekalija te on potencijalno može kontaminirati hranu, vodu ili predmete (Lee 2015). Otprilike 36 sati nakon infekcije virus ozbiljno oštećuje crijevne resice što se očituje lošom

apsorpcijom hrane, disbalansom elektrolita, proljevom i čak ugibanjem prašćića (Popischil i sur. 2002).

Za liječenje najvažnije je dijagnostički razlikovati PEDV od TGEV-a, čemu obično služe serološki ELISA ili molekularni PCR testovi. Za PEDV postoji opasnost emergencije u ljudskoj populaciji jer pokazalo se da protein S može reagirati s ljudskim ACE2 (Liu i sur. 2015). Obrnuto, moguća je zaraza svinja ljudskim SARS-CoV-2 zbog adsorpcije na isti receptor (Schlottau i sur. 2020; Wan i sur. 2020). Za profilaksu se, osim visoke razine higijene na farmama, koriste cjepiva najčešće s inaktiviranim virusom ili podjedinicom ovojnice te povratna imunizacija suprasnihkrmača homogenatom crijeva prašćića uginulih od PEDV-a. (Domańska-Blicharz i sur. 2021).

Virus transmisivnog gastroenteritisa svinja (TGEV) otkriven je 1946. u SAD-u (Doyle i Hutchings 1946). Od tada virus je potvrđen u cijelom svijetu, posebice u zemljama s velikim uzgojem svinja. Smrtnost prašćića do dva tjedna starosti može biti do 100%, usporedivo sa smrtnošću od PEDV-a. Razlika je u kraćoj inkubaciji TGEV-a koja traje od 24 do 36 sati (Domańska-Blicharz i sur. 2021). Simptomi su patološki nerazlučivi od onih PEDV-a i uzrok ugibanja je također ozbiljna dehidracija uzrokovana proljevima i oštećenjem crijevnog epitela (Saif 1999). No, bolest također može biti subakutna ili asimptomatska. TGEV osim enteričkog sustava može inficirati i gornje dišne puteve uz prolazno otpuštanje viriona preko sekreta, no rijetko uzrokuje upalu pluća ili lezije na plućima (Saif 2004).

Respiratorni koronavirus svinja (PRCV) je zapravo varijanta TGEV-a (dijele 98% istih nukleotidna u mnogim otvorenim okvirima čitanja) (Britton i sur. 1991) nastala velikom delecijom (207-227 aminokiselina) na genu za protein S, rezultirajući okrnjenim proteinom (Wang i sur. 2019). Posljedica je promjena tkivnog tropizma od enteričkog sustava na dišni sustav (Sanchez i sur. 2020). Inficira stanice gornjih i donjih dišnih puteva poput SARS-CoV i SARS-CoV-2 i obično uzrokuje blage simptome, no može se razviti atipična upala pluća ili sekundarna upala uzrokovana koinfekcijom i potaknuta stresom (Jung i sur. 2009; Kenney i sur. 2021). Upala pluća zna zadesiti čak do 60% površine. PRCV se replicira u alveolarnim makrofazima te pneumocitima tipa I i II te istovremeno u sluznici crijeva, no nema uništavanja crijevnih resica i otpuštanje viriona fekalijama je ograničeno (Cox i sur. 1990; Saif 2004).

Zanimljivo da je širenje PRCV-a smanjilo pristunost TGEV-a na farmama diljem Europe, ukazujući na unakrsnu zaštitu (eng. *cross-protection*) protiv TGEV-a nakon infekcije PRCV-om.

U pokusima, PRCV je inducirao humoralnu zaštitu IgA i IgG antitijelima u sluznici crijeva, a nakon probne infekcije TGEV-om, stečena imunost dala je djelomičnu zaštitu i uzrokovala smanjeno otpuštanje TGEV-a fekalijama (VanCott i sur. 1994; Brim i sur. 1995). Pojedinačna infekcija suprasnih krmača PRCV-om inducira samo djelomičnu, pasivnu imunost prema TGEV-u, s tim da se odgovor pojačava nakon višestrukih infekcija (Sestak i sur. 1996).

Svinjski hemaglutinirajući virus encefalomijelitisa (PHEV) uzročnik je bolesti povraćanja, defekacije i encefalomijelitisa. Virus je prvi put dijagnosticiran 1957. u Kanadi (Roe i Alexander 1958). Iako je PHEV čest na farmama diljem svijeta i obično ne uzrokuje nikakve simptome, u prašćića do četiri mjeseca starih može dosegnuti smrtnost i do 100% (Mora-Díaz i sur. 2019). PHEV se primarno replicira u gornjim i donjim dišnim putevima s nešto replikacije u tankome crijevu. Virus putuje iz respiratorne mukoze preko živaca u središnji živčani sustav (CNS) gdje zaražava i oštećuje ganglije produžene moždine i kralježnične moždine, čak i malog i velikog mozga (Kenney i sur. 2021). Simptom širenja na CNS je manjak motoričke koordinacije. Jedina metoda dostupne profilakse je prijenos antitijela krmače na prašćiće preko kolostruma što ih štiti do četiri tjedna starosti nakon čega su manje podložni zarazi i razvijaju lakše simptome (Domańska-Blicharz i sur. 2021; Li i sur. 2016).

Koronavirus sindroma akutnog proljeva svinja (SADS-CoV) je također uzročnik česte svinjske enteričke koronavirusne bolesti (SECD). Prva epidemija pogodila je 2016. farme u kineskoj provinciji Guangdong, nakon čega je val epidemije splasnuo (Zhou i sur. 2018). Ponovno pojavljivanje 2018. i 2019. u provincijama Fujian i Guangdong podsjeća na epidemiju SARS-CoV zbog snažnog vale zaraze nakon čega je došlo naglo jenjavanje (Li i sur. 2018; Zhou i sur. 2019). Simptomi enteričke bolesti slični su bolestima uzrokovanim PEDV-om i TGEV-om, a prašćići mlađi od pet dana imaju smrtnost do 90%. SADS-CoV je srodan koronavirusu šišmiša potkovnjaka HKU2-CoV te s njime dijeli 95% nukleotidne sličnosti genoma (Zhou i sur. 2018; Yang i sur. 2020). Smatra se da je prijenos sa šišmiša na svinje uzrokovan kontaminacijom šišmišjim fekalijama.. Eksperimentalno majmunske i ljudske kulture stanica su efikasno zaražene SADS-CoV virusom što opućuje na nužan oprez i praćenje situacije zbog opasnosti od emergencije za ljude (Cui i sur. 2019).

6.2 Koronavirusi goveda

Goveđi koronavirus (BCoV) pripadnik je roda *Betacoronavirus* (podroda *Embecovirus*) te se njegov filogenetski položaj među ostalim koronavirusima životinja vidi na Slici 3. i 5. Uzročnik je telećeg neonatalnog proljeva, zimske dizenterije (hemoragičnog proljeva) te infekcije dišnog sustava goveda svih životnih dobi. BCoV je pneumoenterički virus često izoliran iz uzoraka uzetih od telića s proljevom i starije stoke s respiratornim simptomima. Virus je prvi put zabilježen 1973. u SAD-u i od tad je dijagnosticiran po cijelom svijetu (Mebus i sur. 1973). Patogeneza enteričke bolesti slična je kao u svinjskih koronavirusa (Benfield i Saif 1990).

Specifičnost BCoV koronavirusa (kao i ostalih pripadnika podroda *Embecovirus*) je posjedovanje hemaglutinin-esteraze (HE) proteina na vanjskoj ovojnici, svojstvo koje ostali pripadnici roda *Betacoronavirus* nemaju. HE (uz protein S) služi kao protein za adsorpciju i fuziju sa stanicom pa u kombinaciji sa proteinom S omogućuje zaražavanje većeg broja domaćina (Keha i sur. 2019). Pretpostavlja se da je gen za protein HE stečen nedavnom heterolognom rekombinacijom između pretka podroda *Embecovirus* i virusa gripe tipa C, što je samo još jedan dokaz sposobnosti rekombinacije porodice *Coronaviridae* (Zeng i sur. 2008; Domańska-Blicharz i sur. 2021).

Virus uništava crijevne resice i sluznicu što vodi nepotpunoj apsorpciji hrane te gubitku vode i elektrolita. Najčešće zaražava teliće od jednog do tri tjedna starosti, nakon što titar majčinskih antitijela u mlijeku počne opadati. Bolest je simptomatična u 20% do 100% slučajeva, no smrtnost je obično oko 2% (Saif 2010). Respiratorni simptomi dolaze u obliku kašlja, sekreta iz nosa, upale pluća i temperature. Virus se replicira u epitelu nosa i dušnika te nekad u plućima. Bakterijska koinfekcija vodi do nekrozne upale plućnih krila, često zahvaćajući od 50% do 80% volumena pluća (Kenney i sur. 2021). Otpuštanje virusa prilikom respiratorne infekcije događa se kapljičnim putem i fekalno (Heckert i sur. 1990). Respiratorne reinfekcije su česte, mogu doći bez pojave simptoma, no uz povišen titar antitijela i nekoliko ciklusa širenja virusa.

Sve zajedno sugerira manjak dugoročne imunosti u sluznici gornjih dišnih puteva čak i nakon ponovnih infekcija, a nešto slično se primjećuje i u ljudskih respiratornih koronavirusa te SARS-CoV-2 (Callow i sur. 1990; Saif 2004). Još jedna paralela s ljudskim koronavirusima je pojava ozbiljnijih patoloških simptoma u goveda starije životne dobi oboljelih od zimske dizenterije uzrokovane BCoV, kao što stariji ljudi lakše oboljevaju i razvijaju težu bolest prilikom zaraze virusima SARS-CoV i SARS-CoV-2 (Donnelly i sur. 2003; Saif 2004; Landi i sur. 2020).

Postoje pokazatelji zoonotskog potencijala BCoV-a i opasnosti za ljude. *In vitro* istraživanja pokazala su da velik broj kvazivrsta BCoV-a ima predispoziciju za infekciju ljudske kulture stanica, preko selekcije varijanti s promjenama u proteinu S (Borucki i sur. 2013). Moguće da se skok na ljude već i dogodio jer visoka nukleotidna sličnost genoma od 96% između BCoV i ljudskog HCoV-OC43 upućuje na zajedničko podrijetlo (Kin i sur. 2016). Usporedba molekularnog sata genoma sugerira da se dogodio zoonotski prijenos virusa s goveda na čovjeka u 1890-ima. Pretpostavilo se da je vjerojatna adaptacija za prijenos na čovjeka osigurana 290 nukleotida dugačkom delecijom nizvodno od gena za protein S (Vijgen i sur. 2004). Ipak, kada je u djeteta s proljevom izoliran i 1994. opisan virus biološki, genomski i antigenski sličniji BCoV koronavirusu nego HCoV-OC43, pokazalo se da BCoV može zaraziti čovjeka i bez radikalnih promjena u genskoj strukturi virusa (Zhang i sur. 1994; Domańska-Blicharz i sur. 2021).

6.3 Koronavirusi pasa

Pseće koronaviruse predstavljaju pseći koronavirus (CCoV) i pseći respiratorni koronavirus (CRCoV). CCoV je prvi put zabilježen 1971. u Njemačkoj i od tada je dijagnosticiran po cijelom svijetu kao uzročnik pseće enteričke bolesti (Decaro i Buonavoglia 2011). Inficira enterocite, koji oblažu crijevne resice u tankom crijevu, putem interakcije s aminopeptidazom (APN) stanice domaćina. Patogeneza je posredovana apoptozom enterocita što je inducirano virusima (Ruggieri i sur. 2007). Simptomi psećeg gastroenteritisa su povraćanje, proljev, manjak apetita i dehidracija, a put rasprostranjivanja virusa je posljedično preko fekalija. Opisani su pantropski sojevi CCoV-a, nastali delecijama na genu za S i NSP proteine, kao mogući uzročnici pseće sistemske bolesti sa simptomima pireksije, anoreksije, depresije, povraćanja, a ponekad nastupa i smrt. (Buonavoglia i sur. 2006).

CCoV spada u rod *Alphacoronavirus* (Slika 3. i 5.). Smatra se da je u rekombinaciji s TGEV-om (također *Alphacoronavirus*) stekao novu varijantu gena za protein S, otkrivši rekombinaciju kao mehanizam evolucije CCoV i moguće kolanje koronavirusa između svinja i pasa (Zhang i sur. 2020). Zamijećeno je da protein S koronavirusa CCoV tipa II može interagirati osim s psećim i s mačjim APN-receptorom. Ova biološka karakteristika je u suprotnosti s tezom da virusi koriste vrsno-specifične receptore i izravan je pokazatelj potencijala CCoV za prijenos s jedne vrste na drugu (Buonavoglia i sur. 2006; Decaro i sur. 2009). Postoje cjepiva s deaktiviranim ili

atenuiranim virusom od 1980-ih, no veterinari ih ne koriste često zbog uglavnom umjerenih simptoma infekcije.

Nešto novije opisan je pseći respiratorni koronavirus (CRCoV). Izoliran je iz uzoraka pluća zaraženih pasa u Ujedinjenom Kraljevstvu 2003. (Erles i sur. 2003) te je kasnije nađen u Europi, Japanu, SAD-u i Kanadi (Kenney i sur. 2021). Taksonomski spada u rod *Betacoronavirus* što ga čini filogenetski bližim srodnikom virusima BCoV-u i HCoV-OC43 nego virusu CCoV-u (Erles i sur. 2007). Čak se smatra da je predak CRCoV-a goveđi koronavirus ili su CRCoV i BCoV imali zajedničkog pretka (Lorusso i sur. 2009). Sialične kiseline i moguće HLA1 služe kao receptori za adsorpciju i fuziju CRCoV. CRCoV uzrokuje brojne simptome, od respiratornih do probavnih, no karakteristične su lezije u organima s detektiranim CRCoV antigenom npr. pluća, bubrezi, jetra, limfni čvorovi itd. (Kenney i sur. 2020).

6.4 Koronavirusi mačaka

Koronavirusi mačaka (FCoV) pripadaju rodu *Alphacoronavirus* (Slika 3. i 5.) i dolaze u dva različita biotipa (mačji probavni koronavirus (FECV) i virus mačjeg infektivnog peritonitisa (FIPV)) i dva serotipa (I i II). Prvi je zabilježen FIPV još 1950-ih kao uzročnik bolesti mačjeg infektivnog peritonitisa (FIP) (Holzworth 1963).

Antigenski, koronavirusi mačaka klasificiraju se u dva serotipa temeljeno na diferencijalnoj neutralizaciji antitijelima zbog varijabilnosti aminokiselina u proteinu S (Kipar i Meli 2014). Serotip I je prevladavajući cirkulirajući soj, dok je serotip II rjeđi i nastao je kao rezultat dvostruke rekombinacije između FCoV tipa I i psećeg koronavirusa CCoV, kada je gen za protein S psećeg koronavirusa ukorporiran u genom mačjeg koronavirusa. Oba serotipa uključuju viruse i FECV i FIPV biotipova (Jaimes i sur. 2020), no 70-85% infekcija FIPV-om je uzrokovano koronavirusom serotipa I (Herrewegh i sur. 1995; Domańska-Blicharz i sur. 2021).

Biotip FECV obično uzrokuje enteritis s umjerenim simptomima, nekad subkliničan. No, mačji koronavirus koji zaražava enterocite može razviti specifične mutacije postavši mačji koronavirus infektivnog peritonitisa (FIPV) (Kenney i sur. 2021). Mutacija odgovorna za prijelaz nalazi se u ORF-ovima za 3c i 7b za nestrukturane pomoćne proteine (nsp) (Zhang i sur. 2020) i proksimalnu domenu proteina S (Rottier i sur. 2005). Vjerojatnije je da FIP iz FECV-a nastaje mutacijama unutar domaćina te potom zaražava jedinku autoinfekcijom nasuprot pretpostavci da je prijenos od jedinke do jedinke primarni put zaraze (Pedersen 2009).

Uz prijelazak FECV-a u FIPV dolazi promjena tropizma virusa od epitelnih stanica probavnog sutava do monocita i makrofaga. Sposobnost da zarazi krvne monocite čini FIPV visoko virulentnim i patogenim te omogućuje sistemsku infekciju (Rottier i sur. 2005). Infekciju FIPV-om karakterizira sistemska pirogranulomatozna upala. Bolest je neizlječiva i fatalna za mačke (Jaimes i Whittaker 2018). Cjepivo protiv FIPV-a postoji, no efikasnost je upitna jer postoji rizik od razvoja pojačanih simptoma ovisnih o antitijelima (eng. *antibody-dependent enhancement*, ADE) što vodi još ozbiljnijoj upali (Day i sur. 2016).

6.5 Koronavirusi ptica

Koronavirusi ptica (eng. *avian coronavirus*, AvCoV) spadaju u rodove *Gammacoronavirus* i *Deltacoronavirus*. Virus infektivnog bronhitisa (IBV) je najistaknutiji gamakoronavirus ptica (Slika 3. i 5.). IBV je općenito prvi ikad zabilježeni koronavirus, a otkriven je 1931. u pilića (Fabricant 1998). Duge godine istraživanja IBV-a pokazale su da se radi o kompleksu serološki i genski vrlo heterogenih sojeva klasificiranih u genotipe i srodstvene loze na temelju strukture gena za S1 (Valastro i sur. 2016). Trenutno se zna za 7 genotipova podijeljenih na 34 loze, s time da su neki genotipovi kozmopolitski rasprostranjeni dok ostali kolaju lokalno (de Wit i sur. 2011) te osim kokoši mogu zaražavati purice, biserke i prepelice (de Wit i Cook 2020).

Svi uzrokuju infektivni bronhitis s tropizmom virusa za dišni sustav, no moguća je infekcija probavnog, ekskretornog ili reproduktivnog sustava od strane različitih sojeva (Cook i sur. 2012). IBV se inicijalno replicira u respiratornim tkivima uzrokujući bolesti dišnog sustava s klasičnim simptomima. U infekcije rektuma i nečisnice bolest je često asimptomatska što potiče perzistenciju virusa u organizmu, uz ponovnu pojavu bolesti tijekom polaganja jaja zbog stresa i time suprimiranog imunskog sustava (Cavanagh 2003; Kenney i sur. 2021). Virus se replicira i u jajovodu što smanjuje proizvodnju jaja i nanosi ekonomsku štetu farmama (Saif 2004).

Cjepivo protiv IBV-a je najraširenije i najviše korišteno cjepivo protiv životinjskih koronavirusa te su cjepiva s atenuiranim virusom (proizvedena pasažiranjem) dostupna još od 1950-ih (de Wit i sur. 2011; Laconi i sur. 2020). Cjepiva su i do 100% djelotvorna protiv bolesti, ali svejedno neke kokoši ne dosegnu potrebnu imunost i sposobne su dalje širiti virus (Kenney i sur. 2021). Dodatni problem je što cjepivo na bazi jednog serotipa često ne štiti protiv infekcije drugim serotipovima (Bandi i sur. 2015; Zhang i sur. 2020).

6.6 Koronavirusi kukaca i kukcojeda

Koronavirusi su nedavno nađeni i u kukcojednim životinjama, poput ježeva (Drexler i sur. 2014). Na temelju proučavanja koronavirusa kukcojednih životinja i otkrića koronavirusa iz reda *Nidovirales* u kucima, postavljena je zanimljiva hipoteza o kucima kao ishodištu koronavirusa (Nga i sur. 2011; Drexler i sur. 2014).

7 RASPRAVA

Gotovo sva filogenetska istraživanja koronavirusa koja uključuju šišmiše ili druge životinje temelje se na PCR testovima. Za amplifikaciju se ciljaju dijelovi otvorenog okvira čitanja ORF1ab, obično RNA ovisna RNA polimeraza (RdRp). Veličine dobivenih amplikona mogu iznositi 121 do 404 pb (Anthony i sur. 2013; Drexler i sur. 2014). Tako kratki odsječci DNA mogu omesti rekonstrukciju filogenije koronavirusa. Također, pokazalo se da visoka stopa rekombinacije u koronavirusa otežava vjerodostojan prikaz evolucijske povijesti koronavirusa (Boni i sur. 2020). Stoga, treba pristupiti sa sumnjom kada se bilo kakvi zaključci izvode iz analiza kratkih dijelova genoma te modulariti filogenetski pristup jer nemaju sve regije genoma jednaku prošlost.

Što se tiče interspecijskog prijenosa koronavirusa, naročito treba voditi računa o koronavirusima koji imaju širok krug domaćina, ali ne treba zanemariti ni one koji imaju uzak krug domaćina koje zaražavaju. Primjer koronavirusa koji imaju širok krug domaćina je BCoV koji uz goveda zaražava ljude, konje, jelene, antilope, deve, žirafe, pse i purice (Drexler i sur. 2014; Kenney i sur. 2021). Primjer koronavirusa koji imaju uzak krug domaćina su alfakoronavirusi i neki sojevi SARS-CoV koji zaražavaju rodove šišmiša *Rhinolophus*, *Myotis*, *Miniopterus*, *Carollia* itd. Neki rod-specifični virusi detektirani su u jedinkama šišmiša udaljenima i po više tisuća kilometara (Tang i sur. 2006; Corman i sur. 2013).

Pretpostavlja se da velik genom, učestala rekombinacija te visoka stopa mutacija olakšavaju interspecijski prijenos koronavirusa (Woo i sur. 2009). Nedavno istraživanje pokazalo je umjernu stopu rekombinacije virusa SARS-CoV-2 u prvoj godini pandemije ali nisku u epidemiji SARS-CoV (Pollet i sur. 2021). Drugo istraživanje sugerira da afinitet proteina S virusa SARS-CoV-2 za receptor (angiotenzin-konvertirajući enzim 2) vjerojatno nije stečen rekombinacijom već pritiskom prirodne selekcije (Tang i sur. 2020).

Ipak, rekombinacija u RNA virusa je višestruko zabilježen fenomen. U jednom istraživanju, u 67 od 68 analiziranih genoma pripadnika roda *Sarbecovirus*, otkriveni su tragovi homologne rekombinacije u bližoj ili daljoj evolucijskoj prošlosti (Boni i sur. 2020). No, uvjeti i osobitosti rekombinacije u koronavirusa nisu do kraja poznati.

U odnosu na ostale RNA viruse, stopa mutacija koronavirusa nije drastična jer posjeduju enzime koji provjeravaju ugradnju nukleotida (eng. *proofreading enzyme*) (Minskaia i sur. 2006). Stoga su koronavirusi vjerojatno evoluirali finom granicom između mutacija i provjere ugradnje nukleotida (Drexler i sur. 2014). Visoka stopa mutacija koronavirusa javlja se samo u nekim dijelovima genoma poput gena za protein S za koji se zna da je nisko konzerviran i njegova sekvenca može varirati između izolata iste varijante koronavirusa (Payne 2017).

Veći napori moraju se uložiti u praćenje šišmišjih koronavirusa. Dinamika prijenosa koronavirusa u populacijama šišmiša u divljini trenutno je slabo poznata (Latinne i sur. 2020). Ptice su vjerojatan izvor i rezervoar koronavirusa roda *Gammacoronavirus* i *Detacoronavirus* (Woo i sur. 2012), stoga potrebno je bolje razumijevanje koronavirusa u ptica i mogućnosti interspecijskog prijenosa. Osim ptica i šišmiša, razborito bi bilo steći više znanja o koronavirusima ostalih kukcojednih životinja i koronavirusima kukaca (Nga i sur. 2011; Drexler i sur 2014). Veterinarsko praćenje koronavirusa domaćih životinja je od pomoći u razumijevanju ljudskih koronavirusa, posebice aktualnog SARS-CoV-2.

8 ZAKLJUČAK

Zbog iskorištavanja prirodnih resursa pri čemu ljudi dolaze u kontakt sa životinjama koje su rezervoari virusa, te konzumiranjem divljih životinja, ljudi doprinose interspecijskom prijenosu virusa. Potrebna je kvalitetnija i sustavnija strategija prevencije epidemija i treba se raditi na holističkom pristupu ovako složenom problemu; moraju se integrirati mnoge grane ljudske djelatnosti od politike, zakonodavstva i javnog zdravstva do ekologije, zaštite prirode i upravljanja prirodnim resursima.

Koronavirusi su rašireni u mnogim životinjskim vrstama i u čovjeka. Uzrokuju visoko patogene bolesti i rasprostranjuju se brzo, često kapljičnim putem. Pošto su RNA virusi, lako mutiraju i sposobni su za rekombinaciju s drugim virusima, što pogoduje emergenciji novih patogena. Mogu se prenositi asimptomatski za što su zoran primjer svinjski koronavirusi i ljudski SARS-CoV-2.

Uzevši u obzir dugoročno iskustvo koje su stekli s životinjskim koronavirusima, veterinari su u jedinstvenoj poziciji da medicini i biologiji pomognu u slaganju potpunije slike o koronavirusima, kako bi se unaprijedilo liječenje i spriječila ponovna emergencija ovih virusa.

9 LITERATURA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2016). *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. Elsevier Inc., Philadelphia, 27-53
- Allen, T., Murray, K. A., Zambrana-Torrel, C., Morse, S. S., Rondinini, C., Di Marco, M., ... & Daszak, P. (2017). Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. *Nature communications*, 8(1), 1-10.
- Andreis, I., Batinić, D., Čulo, F., Grčević, D., Lukinović-Škudar, V., Marušić, M., Taradi, M., Višnjic, D. (2010). *Imunologija*. Medicinska naklada, Zagreb, 122-139.
- Anthony, S. J., Ojeda-Flores, R., Rico-Chavez, O., Navarrete-Macias, I., Zambrana-Torrel, C. M., Rostal, M. K., ... & Lipkin, W. I. (2013). Coronaviruses in bats from Mexico. *The Journal of General Virology*, 94(Pt 5), 1028-1038.
- Bakkers, M. J., Lang, Y., Feitsma, L. J., Hulswit, R. J., De Poot, S. A., Van Vliet, A. L., ... & De Groot, R. J. (2017). Betacoronavirus adaptation to humans involved progressive loss of hemagglutinin-esterase lectin activity. *Cell Host & Microbe*, 21(3), 356-366.
- Ballesteros, M. L., Sanchez, C. M., & Enjuanes, L. (1997). Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism. *Virology*, 227(2), 378-388.
- Belouzard, S., Chu, V. C., & Whittaker, G. R. (2009). Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), 5871-5876.
- Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N., & Whittaker, G. R. (2012). Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, 4(6), 1011-1033.
- Benfield, D. A., & Saif, L. J. (1990). Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(6), 1454-1457.
- Beniac, D. R., Andonov, A., Grudeski, E., & Booth, T. F. (2006). Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(8), 751-752.

- Boni, M. F., Lemey, P., Jiang, X., Lam, T. T., Perry, B. W., Castoe, T. A., Rambaut, A., & Robertson, D. L. (2020). Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nature Microbiology*, 5(11), 1408–1417.
- Brim, T. A., VanCott, J. L., Lunney, J. K., & Saif, L. J. (1995). Cellular immune responses of pigs after primary inoculation with porcine respiratory coronavirus or transmissible gastroenteritis virus and challenge with transmissible gastroenteritis virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 48(1-2), 35-54.
- Brown, M. A. (2011). Genetic determinants of pathogenesis by feline infectious peritonitis virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143(3-4), 265-268.
- Buonavoglia, C., Decaro, N., Martella, V., Elia, G., Campolo, M., Desario, C., ... & Tempesta, M. (2006). Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerging Infectious Diseases*, 12(3), 492-494.
- Calisher, C. H., Childs, J. E., Field, H. E., Holmes, K. V., & Schountz, T. (2006). Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 531-545.
- Callow, K. A., Parry, H. F., Sergeant, M., & Tyrrell, D. A. J. (1990). The time course of the immune response to experimental coronavirus infection of man. *Epidemiology & Infection*, 105(2), 435-446.
- Cavanagh, D. (2003). Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathology*, 32(6), 567-582.
- Chamary, J. V., Parmley, J. L., & Hurst, L. D. (2006). Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nature Reviews Genetics*, 7(2), 98-108.
- Chan, J. F., Lau, S. K., To, K. K., Cheng, V. C., Woo, P. C., & Yuen, K. Y. (2015). Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 465-522.
- Chaw, S. M., Tai, J. H., Chen, S. L., Hsieh, C. H., Chang, S. Y., Yeh, S. H., ... & Wang, H. Y. (2020). The origin and underlying driving forces of the SARS-CoV-2 outbreak. *Journal of Biomedical Science*, 27, 1-12.

- Chen, Q., Gauger, P. C., Stafne, M. R., Thomas, J. T., Madson, D. M., Huang, H., ... & Zhang, J. (2016). Pathogenesis comparison between the United States porcine epidemic diarrhoea virus prototype and S-INDEL-variant strains in conventional neonatal piglets. *Journal of General Virology*, 97(5), 1107-1121.
- Chu, D. K., Leung, C. Y., Gilbert, M., Joyner, P. H., Ng, E. M., Tse, T. M., ... & Poon, L. L. (2011). Avian coronavirus in wild aquatic birds. *Journal of Virology*, 85(23), 12815-12820.
- Cook, J. K., Jackwood, M., & Jones, R. C. (2012). The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathology*, 41(3), 239-250.
- Corman, V. M., Rasche, A., Diallo, T. D., Cottontail, V. M., Stoecker, A., Souza, B. F. D. C. D., ... & Drexler, J. F. (2013). Highly diversified coronaviruses in neotropical bats. *Journal of General Virology*, 94(9), 1984-1994.
- Cox, E., Hooyberghs, J., & Pensaert, M. B. (1990). Sites of replication of a porcine respiratory coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus. *Research in Veterinary Science*, 48(2), 165-169.
- Cui, J., Han, N., Streicker, D., Li, G., Tang, X., Shi, Z., ... & Zhang, S. (2007). Evolutionary relationships between bat coronaviruses and their hosts. *Emerging Infectious Diseases*, 13(10), 1526-1532.
- Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181-192.
- Day, M. J., Horzinek, M. C., Schultz, R. D., & Squires, R. A. (2016). WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats. *The Journal of Small Animal Practice*, 57(1), E1-E45.
- de Groot i sur. (2011): Family Coronaviridae. U: King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J., Carstens, E. B. (ur.). (2011). *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (Vol. 9)*. Elsevier, 806-828.
- de Wit, J. J., Cook, J. K., & Van der Heijden, H. M. (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathology*, 40(3), 223-235.

- de Wit, J. J., & Cook, J. K. (2020). Spotlight on avian coronaviruses. *Avian Pathology*, 49(4), 313-316.
- Decaro, N., Mari, V., Campolo, M., Lorusso, A., Camero, M., Elia, G., ... & Buonavoglia, C. (2009). Recombinant canine coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus of swine are circulating in dogs. *Journal of Virology*, 83(3), 1532-1537.
- Decaro, N., Martella, V., Saif, L. J., & Buonavoglia, C. (2020). COVID-19 from veterinary medicine and one health perspectives: What animal coronaviruses have taught us. *Research in Veterinary Science*, 131, 21-23.
- Decaro, N., & Buonavoglia, C. (2011). Canine coronavirus: not only an enteric pathogen. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 41(6), 1121-1132.
- Domańska-Blicharz, K., Woźniakowski, G., Konopka, B., Niemczuk, K., Welz, M., Rola, J., ... & Cuvelier-Mizak, B. (2020). Animal coronaviruses in the light of COVID-19. *Journal of Veterinary Research*, 64(3), 333-345.
- Dong, B. Q., Liu, W., Fan, X. H., Vijaykrishna, D., Tang, X. C., Gao, F., ... & Guan, Y. (2007). Detection of a novel and highly divergent coronavirus from Asian leopard cats and Chinese ferret badgers in Southern China. *Journal of Virology*, 81(13), 6920-6926.
- Donnelly, C. A., Ghani, A. C., Leung, G. M., Hedley, A. J., Fraser, C., Riley, S., ... & Anderson, R. M. (2003). Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *The Lancet*, 361(9371), 1761-1766.
- Doyle, L. P., & Hutchings, L. M. (1946). A transmissible gastroenteritis in pigs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 108, 257-259.
- Drexler, J. F., Corman, V. M., & Drosten, C. (2014). Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Research*, 101, 45-56.
- Erles, K., Toomey, C., Brooks, H. W., & Brownlie, J. (2003). Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology*, 310(2), 216-223.
- Erles, K., Shiu, K. B., & Brownlie, J. (2007). Isolation and sequence analysis of canine respiratory coronavirus. *Virus Research*, 124(1-2), 78-87.

- Fan, Y., Zhao, K., Shi, Z. L., & Zhou, P. (2019). Bat coronaviruses in China. *Viruses*, 11(3), 210-224.
- Fehr, A. R., Perlman, S. (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. U: Maier, H. J., Bickerton, E., Britton, P., (ur.). (2015). *Coronaviruses: Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology*, 1282, 1–23.
- Ge, X. Y., Wang, N., Zhang, W., Hu, B., Li, B., Zhang, Y. Z., ... & Shi, Z. L. (2016). Coexistence of multiple coronaviruses in several bat colonies in an abandoned mineshaft. *Virologica Sinica*, 31(1), 31-40.
- Gomaa, M. H., Barta, J. R., Ojkic, D., & Yoo, D. (2008). Complete genomic sequence of turkey coronavirus. *Virus Research*, 135(2), 237-246.
- Gouilh, M. A., Puechmaille, S. J., Gonzalez, J. P., Teeling, E., Kittayapong, P., & Manuguerra, J. C. (2011). SARS-Coronavirus ancestor's foot-prints in South-East Asian bat colonies and the refuge theory. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), 1690-1702.
- Graham, R. L., & Baric, R. S. (2010). Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *Journal of Virology*, 84(7), 3134-3146.
- Graur, D. (2003): Single-base mutation. U: Cooper, D. N., (ur.). (2003). *Nature Encyclopedia of the Human Genome*. Macmillan Publishers Ltd., 287-290.
- Hayman, D. T. (2019). Bat tolerance to viral infections. *Nature Microbiology*, 4(5), 728-729.
- Heckert, R. A., Saif, L. J., Hoblet, K. H., & Agnes, A. G. (1990). A longitudinal study of bovine coronavirus enteric and respiratory infections in dairy calves in two herds in Ohio. *Veterinary Microbiology*, 22(2-3), 187-201.
- Holzworth, J. (1963). Some important disorders of cats. *The Cornell Veterinarian*, 53, 157-160.
- Hu, B., Ge, X., Wang, L. F., & Shi, Z. (2015). Bat origin of human coronaviruses. *Virology Journal*, 12(1), 1-10.
- Jaimes, J. A., Millet, J. K., Stout, A. E., André, N. M., & Whittaker, G. R. (2020). A tale of two viruses: the distinct spike glycoproteins of feline coronaviruses. *Viruses*, 12(1), 83-97.

- Jaimes, J. A., Millet, J. K., & Whittaker, G. R. (2020). Proteolytic cleavage of the SARS-CoV-2 spike protein and the role of the novel S1/S2 site. *IScience*, 23(6), 101212.
- Jaimes, J. A., & Whittaker, G. R. (2018). Feline coronavirus: Insights into viral pathogenesis based on the spike protein structure and function. *Virology*, 517, 108-121.
- Ji, W., Wang, W., Zhao, X., Zai, J., & Li, X. (2020). Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 433–440.
- 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. *Nature*, 451(7181), 990-993.
- Jung, K., Renukaradhya, G. J., Alekseev, K. P., Fang, Y., Tang, Y., & Saif, L. J. (2009). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modifies innate immunity and alters disease outcome in pigs subsequently infected with porcine respiratory coronavirus: implications for respiratory viral co-infections. *The Journal of General Virology*, 90(Pt 11), 2713-2723.
- Jungreis, I., Nelson, C. W., Ardern, Z., Finkel, Y., Krogan, N. J., Sato, K., ... & Kellis, M. (2021a). Conflicting and ambiguous names of overlapping ORFs in the SARS-CoV-2 genome: A homology-based resolution. *Virology*, 558, 145-151.
- Jungreis, I., Sealfon, R., & Kellis, M. (2021b). SARS-CoV-2 gene content and COVID-19 mutation impact by comparing 44 *Sarbecovirus* genomes. *Nature Communications*, 12(1), 1-20.
- Kam, Y. W., Okumura, Y., Kido, H., Ng, L. F., Bruzzone, R., & Altmeyer, R. (2009). Cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein by airway proteases enhances virus entry into human bronchial epithelial cells *in vitro*. *PLoS One*, 4(11), e7870.
- Keha, A., Xue, L., Yan, S., Yue, H., & Tang, C. (2019). Prevalence of a novel bovine coronavirus strain with a recombinant hemagglutinin/esterase gene in dairy calves in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(5), 1971-1981.
- Kenney, S. P., Wang, Q., Vlasova, A., Jung, K., & Saif, L. (2021). Naturally Occurring Animal Coronaviruses as Models for Studying Highly Pathogenic Human Coronaviral Disease. *Veterinary Pathology*, 58(3), 438-452.

Kin, N., Mischczak, F., Diancourt, L., Caro, V., Moutou, F., Vabret, A., & Gouilh, M. A. (2016). Comparative molecular epidemiology of two closely related coronaviruses, bovine coronavirus (BCoV) and human coronavirus OC43 (HCoV-OC43), reveals a different evolutionary pattern. *Infection, Genetics and Evolution*, 40, 186-191.

Kipar, A., & Meli, M. L. (2014). Feline infectious peritonitis: still an enigma?. *Veterinary Pathology*, 51(2), 505-526.

Laconi, A., Weerts, E. A. W. S., Bloodgood, J. C. G., Marrero, J. D., Berends, A. J., Cocciolo, G., ... & Verheije, M. H. (2020). Attenuated live infectious bronchitis virus QX vaccine disseminates slowly to target organs distant from the site of inoculation. *Vaccine*, 38(6), 1486-1493.

Lai, M. M., & Cavanagh, D. (1997). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 48, 1-100.

Landi, F., Barillaro, C., Bellieni, A., Brandi, V., Carfi, A., D'Angelo, M., ... & Bernabei, R. (2020). The new challenge of geriatrics: saving frail older people from the SARS-COV-2 pandemic infection. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 24(5), 466-470.

Lang, Y., Li, W., Li, Z., Koerhuis, D., Van Den Burg, A. C., Rozemuller, E., ... & De Groot, R. J. (2020). Coronavirus hemagglutinin-esterase and spike proteins coevolve for functional balance and optimal virion avidity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(41), 25759-25770.

Latinne, A., Hu, B., Olival, K. J., Zhu, G., Zhang, L., Li, H., ... & Daszak, P. (2020). Origin and cross-species transmission of bat coronaviruses in China. *Nature Communications*, 11(1), 1-15.

Lau, S. K., Li, K. S., Huang, Y., Shek, C. T., Tse, H., Wang, M., ... & Yuen, K. Y. (2010). Ecoepidemiology and complete genome comparison of different strains of severe acute respiratory syndrome-related Rhinolophus bat coronavirus in China reveal bats as a reservoir for acute, self-limiting infection that allows recombination events. *Journal of Virology*, 84(6), 2808-2819.

Lau, S. K., Wong, E. Y., Tsang, C. C., Ahmed, S. S., Au-Yeung, R. K., Yuen, K. Y., ... & Woo, P. C. (2018). Discovery and sequence analysis of four deltacoronaviruses from birds in the Middle East reveal interspecies jumping with recombination as a potential mechanism for avian-to-avian and avian-to-mammalian transmission. *Journal of Virology*, 92(15), e00265-18.

- Le, T. M., Wong, H. H., Tay, F. P., Fang, S., Keng, C. T., Tan, Y. J., & Liu, D. X. (2007). Expression, post-translational modification and biochemical characterization of proteins encoded by subgenomic mRNA8 of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *The FEBS Journal*, 274(16), 4211-4222.
- Lee, C. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus: an emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology Journal*, 12(1), 1-16.
- Li, F. (2016). Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annual Review of Virology*, 3, 237-261.
- Li, K., Li, H., Bi, Z., Gu, J., Gong, W., Luo, S., ... & Tang, Y. (2018). Complete genome sequence of a novel swine acute diarrhea syndrome coronavirus, ch/fjw/2018, isolated in fujian, china, in 2018. *Microbiology Resource Announcements*, 7(22), e01259-18.
- Li, W., Li, H., Liu, Y., Pan, Y., Deng, F., Song, Y., ... & He, Q. (2012). New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, 18(8), 1350-1353.
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., ... & Wang, L. F. (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*, 310(5748), 676-679.
- Li, Z., He, W., Lan, Y., Zhao, K., Lv, X., Lu, H., ... & Gao, F. (2016). The evidence of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus induced nonsuppurative encephalitis as the cause of death in piglets. *PeerJ*, 4, e2443.
- Liò, P., & Goldman, N. (2004). Phylogenomics and bioinformatics of SARS-CoV. *Trends in Microbiology*, 12(3), 106-111.
- Lin, C. M., Saif, L. J., Marthaler, D., & Wang, Q. (2016). Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains. *Virus Research*, 226, 20-39.
- Lin, X. D., Wang, W., Hao, Z. Y., Wang, Z. X., Guo, W. P., Guan, X. Q., ... & Zhang, Y. Z. (2017). Extensive diversity of coronaviruses in bats from China. *Virology*, 507, 1-10.
- Liu, C., Tang, J., Ma, Y., Liang, X., Yang, Y., Peng, G., ... & Li, F. (2015). Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus. *Journal of Virology*, 89(11), 6121-6125.

- Lorusso, A., Desario, C., Mari, V., Campolo, M., Lorusso, E., Elia, G., ... & Decaro, N. (2009). Molecular characterization of a canine respiratory coronavirus strain detected in Italy. *Virus Research*, 141(1), 96-100.
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., ... & Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565-574.
- Brownlie J., Whittaker G. (2010): Coronaviridae. U: Maclachlan, N. J., Dubovi, E. J. (u.). (2010). *Fenner's veterinary virology*. Academic Press. 435-461
- McIntosh, K., Kapikian, A. Z., Hardison, K. A., Hartley, J. W., & Chanock, R. M. (1969). Antigenic relationships among the coronaviruses of man and between human and animal coronaviruses. *The Journal of Immunology*, 102(5), 1109-1118.
- Madu, I. G., Roth, S. L., Belouzard, S., & Whittaker, G. R. (2009). Characterization of a highly conserved domain within the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein S2 domain with characteristics of a viral fusion peptide. *Journal of Virology*, 83(15), 7411-7421.
- Mebus, C. A., Stair, E. L., Rhodes, M. B., & Twiehaus, M. J. (1973). Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a coronavirus-like agent. *Veterinary Pathology*, 10(1), 45-64.
- Mikkelsen, T., Hillier, L., Eichler, E., Zody, M., Jaffe, D., Yang, S. P., ... & Waterston, R. (2005). Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature*, 437(7055), 69-87.
- Min, Y. Q., Mo, Q., Wang, J., Deng, F., Wang, H., & Ning, Y. J. (2020). SARS-CoV-2 nsp1: bioinformatics, potential structural and functional features, and implications for drug/vaccine designs. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Minskaia, E., Hertzog, T., Gorbalenya, A. E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B., & Ziebuhr, J. (2006). Discovery of an RNA virus 3'→5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(13), 5108-5113.

- Mora-Díaz, J. C., Piñeyro, P. E., Houston, E., Zimmerman, J., & Giménez-Lirola, L. G. (2019). Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus: a review. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 53.
- Narayanan, K., Huang, C., & Makino, S. (2008). SARS coronavirus accessory proteins. *Virus Research*, 133(1), 113-121.
- Nga, P. T., Parquet, M. D. C., Lauber, C., Parida, M., Nabeshima, T., Yu, F., ... & Gorbalenya, A. E. (2011). Discovery of the first insect nidovirus, a missing evolutionary link in the emergence of the largest RNA virus genomes. *PLoS pathogens*, 7(9), e1002215.
- Oldham, J. (1972). Epidemic diarrhea-how it all began. *Pig Farming*, 72-3.
- O’Leary, V. B., Dolly, O. J., Höschl, C., Černa, M., & Ovsepian, S. V. (2021). Unpacking Pandora from Its Box: Deciphering the Molecular Basis of the SARS-CoV-2 Coronavirus. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 386.
- Payne S. (2017). Family Coronaviridae. *Viruses*, 149–158.
- Peacock, T. P., Goldhill, D. H., Zhou, J., Baillon, L., Frise, R., Swann, O. C., ... & Barclay, W. S. (2021). The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. *Nature Microbiology*, 6(7), 899-909.
- Pedersen, N. C. (2009). A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963–2008. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(4), 225-258.
- jaimePensaert, M. B., Debouck, P., & Reynolds, D. J. (1981). An immunoelectron microscopic and immunofluorescent study on the antigenic relationship between the coronavirus-like agent, CV 777, and several coronaviruses. *Archives of Virology*, 68(1), 45-52.
- Pensaert, M. B., & Martelli, P. (2016). Porcine epidemic diarrhea: a retrospect from Europe and matters of debate. *Virus Research*, 226, 1-6.
- Pollett, S., Conte, M. A., Sanborn, M. A., Jarman, R. G., Lidl, G. M., Modjarrad, K., & Berry, I. M. (2021). A comparative recombination analysis of human coronaviruses and implications for the SARS-CoV-2 pandemic. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.03.07.434287>

- Pospischil, A., Stuedli, A., & Kiupel, M. (2002). Diagnostic notes: update on porcine epidemic diarrhea. *Journal of Swine Health and Production*, 10(2), 81-85.
- Rasmussen, T. B., Boniotti, M. B., Papetti, A., Grasland, B., Frossard, J. P., Dastjerdi, A., ... & Belsham, G. J. (2018). Full-length genome sequences of porcine epidemic diarrhoea virus strain CV777; Use of NGS to analyse genomic and sub-genomic RNAs. *PLoS One*, 13(3), e0193682.
- Rastogi, M., Pandey, N., Shukla, A., & Singh, S. K. (2020). SARS coronavirus 2: from genome to infectome. *Respiratory Research*, 21(1), 1-15.
- Ravel, A., Marivaux, L., Qi, T., Wang, Y. Q., & Beard, K. C. (2014). New chiropterans from the middle Eocene of Shanghuang (Jiangsu Province, Coastal China): new insight into the dawn horseshoe bats (Rhinolophidae) in Asia. *Zoologica Scripta*, 43(1), 1-23.
- Redondo, N., Zaldívar-López, S., Garrido, J. J., & Montoya, M. (2021). SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Frontiers in Immunology*, 12.
- Roe, C. K., & Alexander, T. J. L. (1958). A disease of nursing pigs previously unreported in Ontario. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 22(9), 305.
- Rottier, P. J., Nakamura, K., Schellen, P., Volders, H., & Haijema, B. J. (2005). Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *Journal of Virology*, 79(22), 14122-14130.
- Ruggieri, A., Di Trani, L., Gatto, I., Franco, M., Vignolo, E., Bedini, B., ... & Buonavoglia, C. (2007). Canine coronavirus induces apoptosis in cultured cells. *Veterinary Microbiology*, 121(1-2), 64-72.
- Saif, L. J. (2004). Animal coronaviruses: what can they teach us about the severe acute respiratory syndrome?. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 23(2), 643-660.
- Saif, L. J. (2010). Bovine respiratory coronavirus. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 26(2), 349-364.
- Saif, L. J. (1999). Comparative pathogenesis of enteric viral infections of swine. *Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases* 2, 47-59.

- Sanchez, C. M., Pascual-Iglesias, A., Sola, I., Zuñiga, S., & Enjuanes, L. (2020). Minimum determinants of transmissible gastroenteritis virus enteric tropism are located in the N-terminus of spike protein. *Pathogens*, 9(1), 2.
- Sawicki, S. G., Sawicki, D. L., & Siddell, S. G. (2007). A contemporary view of coronavirus transcription. *Journal of Virology*, 81(1), 20-29.
- Schlottau, K., Rissmann, M., Graaf, A., Schön, J., Sehl, J., Wylezich, C., ... & Beer, M. (2020). SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. *The Lancet Microbe*, 1(5), e218-e225.
- Sestak, K., Lanza, I., Park, S. K., Weilnu, P. A., & Saif, L. J. (1996). Contribution of passive immunity to porcine respiratory coronavirus to protection against transmissible gastroenteritis virus challenge exposure in suckling pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 57(5), 664-671.
- Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., ... & Li, F. (2020). Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, 581(7807), 221-224.
- Shen, Y. Y., Liang, L., Zhu, Z. H., Zhou, W. P., Irwin, D. M., & Zhang, Y. P. (2010). Adaptive evolution of energy metabolism genes and the origin of flight in bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19), 8666-8671.
- Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., ... & Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. *Science*, 368(6494), 1016-1020.
- Simon-Loriere, E., & Holmes, E. C. (2011). Why do RNA viruses recombine?. *Nature Reviews Microbiology*, 9(8), 617-626.
- Singh, D., & Soojin, V. Y. (2021). On the origin and evolution of SARS-CoV-2. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(4), 537-547.
- Stanhope, M. J., Brown, J. R., & Amrine-Madsen, H. (2004). Evidence from the evolutionary analysis of nucleotide sequences for a recombinant history of SARS-CoV. *Infection, Genetics and Evolution*, 4(1), 15-19.

Tang, X., Wu, C., Li, X., Song, Y., Yao, X., Wu, X., ... & Lu, J. (2020). On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *National Science Review*, 7(6), 1012-1023.

Tang, X. C., Zhang, J. X., Zhang, S. Y., Wang, P., Fan, X. H., Li, L. F., ... & Guan, Y. (2006). Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *Journal of Virology*, 80(15), 7481-7490.

Tiwari, R., Dhama, K., Sharun, K., Iqbal Yattoo, M., Malik, Y. S., Singh, R., ... & Rodriguez-Morales, A. J. (2020). COVID-19: animals, veterinary and zoonotic links. *Veterinary Quarterly*, 40(1), 169-182.

Valastro, V., Holmes, E. C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M. W., Cattoli, G., & Monne, I. (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: an attempt to harmonize virus classification. *Infection, Genetics and Evolution*, 39, 349-364.

VanCott, J. L., Brim, T. A., Lunney, J. K., & Saif, L. J. (1994). Contribution of antibody-secreting cells induced in mucosal lymphoid tissues of pigs inoculated with respiratory or enteric strains of coronavirus to immunity against enteric coronavirus challenge. *The Journal of Immunology*, 152(8), 3980-3990.

Vijaykrishna, D., Smith, G. J., Zhang, J. X., Peiris, J. S. M., Chen, H., & Guan, Y. (2007). Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses. *Journal of Virology*, 81(8), 4012-4020.

Vijgen, L., Keyaerts, E., Moës, E., Thoelen, I., Wollants, E., Lemey, P., ... & Van Ranst, M. (2005). Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. *Journal of Virology*, 79(3), 1595-1604

Walker, P. J., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Dempsey, D. M., Dutilh, B. E., ... & Davison, A. J. (2019). Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Archives of Virology*, 164(9), 2417-2429.

Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S., & Li, F. (2020). Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *Journal of Virology*, 94(7), e00127-20.

- Wang, H., Li, X., Li, T., Zhang, S., Wang, L., Wu, X., & Liu, J. (2020). The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 1-7.
- Wang, Q., Vlasova, A. N., Kenney, S. P., & Saif, L. J. (2019). Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs. *Current Opinion in Virology*, 34, 39-49.
- Wertheim, J. O., Chu, D. K., Peiris, J. S., Kosakovsky Pond, S. L., & Poon, L. L. (2013). A case for the ancient origin of coronaviruses. *Journal of Virology*, 87(12), 7039-7045.
- Wesseling, J. G., Vennema, H., Godeke, G. J., Horzinek, M. C., & Rottier, P. J. (1994). Nucleotide sequence and expression of the spike (S) gene of canine coronavirus and comparison with the S proteins of feline and porcine coronaviruses. *Journal of General Virology*, 75(7), 1789-1794.
- Wong, A. C., Li, X., Lau, S. K., & Woo, P. C. (2019). Global epidemiology of bat coronaviruses. *Viruses*, 11(2), 174.
- Wong, M. C., Cregeen, S. J. J., Ajami, N. J., & Petrosino, J. F. (2020). Evidence of recombination in coronaviruses implicating pangolin origins of nCoV-2019. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.939207> (pristupljeno: 31.8.2021)
- Woo, P. C., Huang, Y., Lau, S. K., & Yuen, K. Y. (2010). Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*, 2(8), 1804-1820.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Chu, C. M., Chan, K. H., Tsoi, H. W., Huang, Y., ... & Yuen, K. Y. (2005). Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of Virology*, 79(2), 884-895.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Huang, Y., & Yuen, K. Y. (2009a). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Experimental Biology and Medicine*, 234(10), 1117-1127.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Lam, C. S., Lai, K. K., Huang, Y., Lee, P., ... & Yuen, K. Y. (2009b). Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. *Journal of Virology*, 83(2), 908-917.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Lam, C. S., Lau, C. C., Tsang, A. K., Lau, J. H., ... & Yuen, K. Y. (2012). Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus *Deltacoronavirus*

supports bat coronaviruses as the gene source of *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* and avian coronaviruses as the gene source of *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavirus*. *Journal of Virology*, 86(7), 3995-4008.

Wood, E. N. (1977). An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. *Veterinary Record*, 100, 243-244.

Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O., ... & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483), 1260-1263.

Wrapp, D., & McLellan, J. S. (2019). The 3.1-angstrom cryo-electron microscopy structure of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein in the prefusion conformation. *Journal of Virology*, 93(23), e00923-19.

Xie, J., Li, Y., Shen, X., Goh, G., Zhu, Y., Cui, J., ... & Zhou, P. (2018). Dampened STING-dependent interferon activation in bats. *Cell Host & Microbe*, 23(3), 297-301.

Yang, Y. L., Yu, J. Q., & Huang, Y. W. (2020). Swine enteric alphacoronavirus (swine acute diarrhea syndrome coronavirus): An update three years after its discovery. *Virus Research*, 285, 198024.

Zeng, Q., Langereis, M. A., Van Vliet, A. L., Huizinga, E. G., & De Groot, R. J. (2008). Structure of coronavirus hemagglutinin-esterase offers insight into corona and influenza virus evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(26), 9065-9069.

Zhang, Q., Zhang, H., Huang, K., Yang, Y., Hui, X., Gao, J., ... & Jin, M. (2020). SARS-CoV-2 neutralizing serum antibodies in cats: a serological investigation. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.01.021196> (pristupljeno: 31.8.2021.)

Zhang, T., Wu, Q., & Zhang, Z. (2020). Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. *Current Biology*, 30(7), 1346-1351.

Zhang, X. M., Herbst, W., Kousoulas, K. G., & Storz, J. (1994). Biological and genetic characterization of a hemagglutinating coronavirus isolated from a diarrhoeic child. *Journal of Medical Virology*, 44(2), 152-161.

Zhang, Y. Z., & Holmes, E. C. (2020). A genomic perspective on the origin and emergence of SARS-CoV-2. *Cell*, 181(2), 223-227.

Zhao, Z., Li, H., Wu, X., Zhong, Y., Zhang, K., Zhang, Y. P., ... & Fu, Y. X. (2004). Moderate mutation rate in the SARS coronavirus genome and its implications. *BMC Evolutionary Biology*, 4(1), 1-9.

Zhou, L., Li, Q. N., Su, J. N., Chen, G. H., Wu, Z. X., Luo, Y., ... & Ma, J. Y. (2019). The re-emerging of SARS-CoV infection in pig herds in Southern China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(5), 2180-2183.

Zhou, P., Fan, H., Lan, T., Yang, X. L., Shi, W. F., Zhang, W., ... & Ma, J. Y. (2018). Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature*, 556(7700), 255-258.

Zhou, P., Tachedjian, M., Wynne, J. W., Boyd, V., Cui, J., Smith, I., ... & Baker, M. L. (2016). Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of IFN- α in bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(10), 2696-2701.

Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., ... & Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270-273.

Internetski izvori:

<https://coronavirus.jhu.edu/map.html> (pristupljeno: 31.8.2021)

https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae (pristupljeno: 31.8.2021.)

<http://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html> (pristupljeno: 31.8.2021.)

10 SAŽETAK

Koronavirusi su patogeni ljudi, većine domaćih i mnogih divljih životinja. Koronavirusi šišmiša zadobili su posebnu pažnju nakon epidemije SARS-a, kada se spoznalo da su šišmiši izvor i rezervoar ogromne raznolikosti koronavirusa sa zoonotskim potencijalom. Taksonomski se koronavirusi klasificiraju u četiri roda; rodovi *Alphacoronavirus* i *Betacoronavirus* zaražavaju sisavce, a *Gammacoronavirus* i *Deltacoronavirus* uglavnom ptice. Šišmiši su se pokazali kao izvanredan domaćin koronavirusima zbog specifičnog imunskog sustava i života u napučenim i heterogenim kolonijama. Jugoistočna Azija dom je velike biološke raznolikosti šišmiša, a time i njihovih koronavirusa. Tri od četiri nedavne epidemije uzrokovane emergentnim koronavirusima ljudi ili životinja ishodište su imale u Kini. Mutacija, rekombinacija i prirodna selekcija mehanizmi su molekularne evolucije koronavirusa. Koronavirusi domaćih životinja uzrokuju niz respiratornih i enteričkih bolesti, sklone su nastanku novih sojeva, često s visokom stopom smrtnosti te niskim učinkom profilakse pa mogu predstavljati model za bolje, holističko razumijevanje koronavirusa te sprječavanje pojave budućih sojeva s epidemijskim potencijalom.

Ključne riječi: divlje životinje, domaće životinje, emergentni virus, protein šiljka, šišmiš

11 SUMMARY

Coronaviruses are pathogens of humans, most domestic and wild animals. Bat coronaviruses came into spotlight during SARS pandemic as bats proved to be the source and reservoir of numerous coronaviruses with zoonotic potential. Taxonomy classifies coronaviruses in four genera; *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* are pathogens of humans, bats and other mammals, while genera *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavirus* predominantly infect birds. Bats are unique hosts of coronaviruses because they have a specific immune system and live in diverse and dense colonies. Southeast Asia is characterized by biodiversity of bats and consequently their coronaviruses; three of four recent outbreaks caused by emergent coronaviruses of humans and livestock originated in China. Mutation, recombination and natural selection are mechanisms of molecular evolution of coronaviruses. Livestock and pet coronaviruses cause respiratory and enteric diseases and are prone to emergence of new strains, resulting in high mortality rates and low effectiveness of prophylaxis. As such they are compelling model for a better, holistic understanding of coronaviruses and future prevention of new strains with epidemic potential.

Key words: bat, domestic animals, emergent virus, spike protein, wild animals

12 ŽIVOTOPIS

Fran Požarić

Obrazovavnje

- 2018. - 2021. Preddiplomski studij biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
- 2014. - 2018. Opća gimnazija sa skupinom predmeta na engleskom jeziku, X. Gimnazija „Ivan Supek“, Zagreb
- 2007. - 2014. Osnovna škola Horvati, Zagreb

Certifikati

- Goethe-Zertifikat B1- Erreichte Gesamtpunktzahl 82 (CEFR Niveau B1)
- IELTS Academic - Overall Band Score 8.0 (CEFR Level C1)

Volontiranje

- Udruga studenata biologije – BIUS (2018. – 2021.)
 - Sudjelovanje na sastancima, predavanjima i u radu više sekcija
 - Voditelj sekcije za genetiku
 - Sudjelovanje na istraživačko-edukacijskim projektima „Zlarin 2019.“ i „Žumberak 2020.“
 - Organizacija istraživačko-edukacijskog projekta „Žumberak 2021.“
- Udruga Hyla (2017. - 2021.)
 - Volontiranje na nekoliko državnih i europskih projekata
 - Rad u zbirci i na terenu

Simpoziji

- 5. Simpozij studenata bioloških usmjerenja (2019.) – pasivni sudionik
- 6. Simpozij studenata bioloških usmjerenja (2021.) – pasivni sudionik

Stipendije

- STEM stipendija Ministarstva znanosti i obrazovanja (2019. - 2021.)