

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

ЛІСОВА В.В., РАДЗИХОВСЬКИЙ М.Л.

КОРОНАВІРУСНА ІНФЕКЦІЯ СОБАК

МОНОГРАФІЯ

Київ 2019

УДК 636.7.09:616.98:578

Л_63

*Рекомендовано до друку Вченою радою Національного університету біоресурсів і природокористування України
(протокол № 1 від 28 серпня 2019 р.)*

Рецензенти:

Недосєков В. В. – доктор ветеринарних наук, професор, Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

Горальський Л. П. – доктор ветеринарних наук, професор, Житомирський національний агроекологічний університет, м. Житомир

Скрипка М. В. – доктор ветеринарних наук, професор, Одеський державний аграрний університет, м. Одеса

Лісова В. В.

Л_63 Коронавірусна інфекція собак : [Монографія] / В. В. Лісова, М. Л. Радзиховський. – К. : ЦП «Компринт», 2019. – 126 с.

ISBN

У монографії узагальнено дані сучасної літератури та наведені результати власних досліджень щодо коронавірусної інфекції собак, зокрема хвороба розглядається з різних сторін і на різних рівнях деталізації біологічних і молекулярно-генетичних характеристик етіологічного фактору, філогенезу, патогенетичних механізмів та особливостей епідеміології та епізоотології, клінічного прояву та патоморфологічних змін. З урахуванням одержаних авторами даних, детально описано макроскопічні й мікроскопічні зміни в різних органах за коронавірусної інфекції в собак.

Монографія розрахована на фахівців ветеринарної медицини, науковців і студентів напряму (спеціальності) «Ветеринарна медицина».

УДК 636.7.09:616.98:578

ISBN

© В. В. Лісова, 2019
© М. Л. Радзиховський 2019

ЗМІСТ

Передмова.....	4
ВСТУП.....	7
Історія вивчення коронавірусів.....	13
Біологічні і молекулярно-генетичні особливості коронавірусів	19
Класифікація коронавірусів.....	34
Видові особливості коронавірусів	46
Патогенез коронавірусної інфекції	56
Епізоотологічна характеристика коронавірусної інфекції собак.....	61
Клінічні ознаки коронавірусної інфекції собак.....	69
Патоморфологія коронавірусної інфекції собак.....	73
Діагностика коронавірусних захворювань.....	100
Імунітет і профілактика.....	105
Заключення.....	110
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	115

Передмова

Відомо, що у далекому зарубіжжі більшість ветеринарних спеціалістів працює саме з дрібними домашніми тваринами (собаками, котами тощо). Тому в зарубіжній науковій літературі значна увага приділяється проблемам, пов'язаним із здоров'ям домашніх тварин. У розвинених країнах проблема інфекційної патології дрібних домашніх тварин, як і в нас, має свої етапи загострення, оскільки збудники ряду захворювань, поширених в світі, еволюціонують, пристосовуються, займають нові ніші і, таким чином, не дають послабити уваги до себе. У той же час, бракує вітчизняної літератури, присвяченої проблемам інфекційної патології дрібних тварин, викладеної з урахуванням сучасних даних, отриманих науковцями в світовому масштабі. Можливо, така ситуація виникає в зв'язку з тим, що більшість наукових досліджень в нашій країні присвячена вирішенню проблем, пов'язаних з глобальним підвищенням рівня сільськогосподарського виробництва. У той час, як собака, яка є другом або ж компаньйоном людини, принаймні в цивілізованих країнах, в нашому суспільстві, нажаль, ще має другорядне значення. Але тенденція до зміни даної ситуації в найближчому майбутньому все ж таки прослідковується.

Особливістю даної монографії є багатоплановість викладу матеріалу, в якому основна проблема розглядається з різних сторін і на різних рівнях деталізації біологічних і молекулярно-генетичних характеристик етіологічного фактору, аналогій і феноменів філогенезу, патогенетичних механізмів та особливостей епідеміології та епізоотології. Такий стиль і спосіб викладу матеріалу спрямований, в першу чергу, на формування в читача цілісного і об'ємного сприйняття вивчаемого питання. З іншого боку, в книзі поряд з основними теоретичними засадами наведені конкретні приклади, з точки зору сучасного стану проблеми і, вже класичні, гіпотези і припущення, без знання яких неможливе справжнє професійне оволодіння предметом дослідження.

У процесі досліджень нам доводилось достатньо багато працювати з інфекційною патологією в домашніх тварин, зокрема собак. З часом було накопичено певний об'єм науково-практичного матеріалу щодо найпоширеніших, на нашу думку, і не тільки нашу, захворювань собак вірусної етіології, таких як парвовірози і коронавірусні інфекції. Крім того, за роки роботи в сфері інфекційної патології постійно проводився глибокий аналіз досвіду закордонних авторів стосовно інфекційної патології, насамперед вірусної етіології, який дозволив узагальнити багато сучасних, інколи суперечливих, наукових даних з різних країн і частин світу й надав змогу викласти цей матеріал у достатньо доступній для сприйняття формі. Жанр монографії дозволив, певним чином, більш детально зупинитися на основних аспектах хвороби і, навпаки, дещо поверхнево зупинитися на другорядних, на нашу думку, моментах даної проблеми.

Загальноприйнятим є висвітлення інфекційної патології з точки зору патогенезу патологічних процесів, що виникають в організмі під час хвороби. Тому всі розділи, більше чи менше, прив'язані до патогенезу, адже якщо механізм розвитку патологічних процесів в організмі тварини є зрозумілим ветеринарному лікарю, він чітко уявляє, які терапевтичні заходи необхідно протиставити даному захворюванню.

З огляду на складність організації живого організму, вивчення структурних основ хвороби проводиться на різних рівнях: молекулярному, субклітинному, клітинному, тканинному, органному, системному й рівні цілісного організму. Крім того, вивчення структурних основ хвороби є не можливим без урахування її етіології, а вивчення морфогенезу хвороби (динаміки розвитку морфологічних змін від початку хвороби до її закінчення) і зіставлення його з клінічними ознаками дає можливість розкрити її патогенез, що дозволяє розробляти обґрунтовані й ефективні методи діагностики, лікування і профілактики хвороб. А клінічний прояв хвороби, у свою чергу, в певній мірі є відображенням саме патогенетичних й імунологічних механізмів, що розвиваються в макрорганізмі за впливу на нього мікроорганізмів. Навіть у

розділі присвяченому характеристиці збудника й циклу його розвитку, ми намагалися викласти інформацію, яка також пов'язана з механізмами патогенезу й імуногенезу. Ефективне комплексне лікування інфекційних захворювань передбачає використання препаратів, які діють в різних напрямках: на збудника (етіотропна терапія), на нейтралізацію патогенних механізмів (патогенетична терапія), на ліквідацію клінічних симптомів хвороби (симптоматична терапія). Відомо, що саме вибір такого напрямку терапевтичних дій є правильним і вирішальним за більшості інфекцій. Але у випадку більшості хвороб вірусної етіології і, зокрема, коронавірусної інфекції, на перший план все ж таки виступають превентивні заходи, тому більше уваги, звичайно, було приділено профілактиці.

ВСТУП

Головною загрозою глобального здоров'я, економічної стабільності й національної безпеки є зоонозні вірусні захворювання, як нові так і ті, що знову з'являються [42]. З розвитком людського суспільства, кожна революційна епоха у тваринництві привносила нові проблеми у здоров'я людства й нові можливості для виникнення зоонозних збудників [50]. Отже, передача патогенних мікроорганізмів від інших видів до людської популяції є звичайним результатом наших взаємовідносин з тваринами та навколишнім середовищем. Виникнення зоонозів, як недавніх, так і історичних, можна вважати логічним наслідком екології та еволюції збудників, які використовують нові ніші та пристосовуються до нових господарів [50]. Завдяки постійному втручання людини в середовище існування тварин і нашому тісному контакту з домашніми тваринами, зоонози продовжуватимуть збільшуватися з огляду на поширення чисельності й щільності населення і тваринництва протягом наступного століття [42]. За останніми оцінками, захворюваність на зоонозні захворювання людини перевищує 1 мільярд випадків на рік, а економічні втрати від нових інфекційних захворювань становлять сотні мільярдів доларів, що значно збільшуються, коли нові віруси, такі як коронавіруси (CoVs) знищують економічно життєво важливе поголів'я по всьому світу [50]. Загалом, більше 60% інфекційних захворювань людини викликаються хвороботворними мікроорганізмами, притаманними диким або домашнім тваринам. До мікроорганізмів, які викликають зоонози, належать ті, що є ендемічними у популяціях людей або ензоотичними у популяціях тварин з частою міжвидовою передачею людям [50]. Отже, можна стверджувати, що роль вірусів у виникненні та розвитку інфекційних захворювань людини невпинно зростає. Тільки на початку 21 століття з'явилося чимало нових вірусів, які не були відомі раніше, проте більшість з яких здатні викликати тяжкі інфекційні захворювання, що нерідко завершуються летально. Серед них велике занепокоєння викликають нові коронавіруси людини, які отримали назву

SARS-CoV (англ. – Severe acute respiratory syndrome, SARS) і MERS-CoV (англ. – Middle East respiratory syndrome, MERS). Обидва з них спричиняють гострий респіраторний дистрес-синдром (ГРДС) і пов'язані з високими показниками летальності [1, 58, 59, 64, 80]. Так О.К. Дуда і співав. (2015) в своїй статті влучно наводять цитату глави ВООЗ Маргарет Чен, яка була озвучена на 66-й сесії асамблеї Всесвітньої організації охорони здоров'я, що проходила в м. Женеві (Швейцарія): «...новий коронавірус MERS-CoV є глобальною загрозою людству. Це тривожний дзвінок, і ми повинні на нього відповісти. Ми занадто мало знаємо про цей вірус. Кожна нова хвороба, яка поширюється швидше, ніж наші знання про неї, виходить з-під контролю» [2].

Отже, недавно виявлений SARS-CoV, який став причиною тяжкого гострого респіраторного синдрому, був першим прикладом серйозної хвороби людини, викликаной коронавірусом [85]. SARS-CoV абсолютно відрізняється від усіх інших відомих коронавірусів, унікальність його полягає в тому, що він може інфікувати як верхні, так і нижні дихальні шляхи, крім того, може викликати гастроентерит [64]. До появи SARS-CoV існували два прототипи коронавірусів людини, OC43 і 229E, обидва є етіологічними агентами звичної застуди. Вже давно з'явилися гіпотези щодо зв'язку людських коронавірусів з більш серйозними захворюваннями в людей, такими як розсіяний склероз, гепатит або кишкова хвороба новонароджених. Однак, поки що, вони не були обґрунтовані [85]. Вже після появи SARS-CoV, з'явилися повідомлення про два нових коронавіруси людини, пов'язаних з респіраторними захворюваннями [39, 86]. Хоча досі лишається не ясним питання, чи зможе SARS-CoV знову з'явитися в людській популяції, це спонукало рахуватися з коронавірусами, як вагомою причиною людських респіраторних і, можливо, інших типів захворювань [85]. Поява таких захворювань зумовлена непрогнозованою антигенною мінливістю вірусів, пов'язаною з якісними змінами їх антигенних детермінант, спонтанними чи такими, що виникають під дією популяційного імунітету [2]. Біологічні вектори коронавірусу не відомі. Однак серологічні й

генетичні дані різних досліджень підтримують саме зоонозне походження SARS-CoV [44].

Хоча мало відомо щодо патогенезу будь-якого з коронавірусів людини (229E, OC43, HKU1, NL63 і SARS-CoV), натомість, були проведені детальні дослідження патогенезу деяких коронавірусів тварин, які можуть сприяти кращому розумінню вірусів людини [85]. Різке збільшення кількості виявлених коронавірусів і послідовностей коронавірусних геномів надали безпрецедентну можливість для проведення геномного й біоінформативного аналізів у даній родині вірусів [87]. Від початку появи тяжкого гострого респіраторного синдрому в 2002 р., а потім Близькосхідного респіраторного синдрому в 2012 р., спеціалісти ВООЗ суттєво підвищити рівень епідеміологічної безпеки по відношенню до збудників цих тяжких захворювань людини, а інтенсивне вивчення нових представників родини *Coronaviridae* призвело до стрімкого накопичення наукових даних щодо їх молекулярної біології, структури, таксономії, особливостей епідеміології, етіологічної діагностики та лікування, розібратися в яких практичному лікарю самотійно досить складно [1].

У літературному огляді N. Decaro й C. Buonavoglia (2008) щодо генетичної еволюції CCoV і появи нових CoVs в собачих, також наголошується, що поява тяжкого гострого респіраторного синдрому в людини спровокувала новий інтерес, в тому числі, і до коронавірусів тварин, як до потенційних агентів прямих і непрямих зоонозів [20]. Отже, посилення, останнім часом, епідеміологічного нагляду за CoVs призвело до виявлення нових вірусів, генотипів, патотипів, а також безлічі варіантів, як у тварин, так і в людини [20].

У собак CoV, пов'язаний з легким ентеритом, собачий коронавірус (CCoV), був відомий ще з 1970-х років. Але штами CoV з різними біологічними і генетичними властивостями, по відношенню до класичних штамів CCoV, були виявлені в собак протягом останніх років, що призвело до повного перегляду CoV-індукованих захворювань собачих. Генетична еволюція CoVs собак є парадигмою, як CoVs еволюціонують через накопичення точкових мутацій, вставок або делецій у вірусному геномі, які призвели до появи нових генотипів

(ССoV типу I), біотипів (пантропний CCoV) й інших варіантів (собачий респіраторний коронавірус) [20, 25]. Хоча вірус, зазвичай, відповідає за помірний гастроентерит, пантропний варіант CCoV-IIa, штам CB/05, був пов'язаний з системним смертельним захворюванням у молодих собак, і подібні вірулентні штами були виявлені в декількох країнах [15, 24, 91]. Нещодавно F. Alfano і співав. (2018) повідомили про випадок виявлення пантропної коронавірусної інфекції собачих в італійського вовка (*Canis lupus italicus*), яка раніше була виявлена тільки в собак. У вовка виявили ко-інфекцію собачим парвовірусом типу 2b і собачим аденовірусом типу 2, що підкреслює вирішальну роль проведення епідеміологічних досліджень в європейських диких м'ясоїдних тварин [12]. Оскільки, пантропний CCoV був описаний лише недавно, наразі бракує інформації щодо молекулярних детермінант його підвищеної вірулентності [53]. Собачий респіраторний коронавірус (CRCoV), який є новим коронавірусом собак, з часу його виявлення в 2003 році, вже встиг поширитися серед собак у ряді європейських країн, Канаді та Японії [32, 33, 74, 88]. Даний вірус за генетичними і антигенними властивостями відрізняється від кишкового собачого коронавіруса, а тому для встановлення діагнозу необхідні специфічні тести [33]. Коронавіруси демонструють унікальні молекулярні механізми транскрипції та рекомбінації [53]. Отже, виходячи з високого рівня природних рекомбінацій і мутацій серед коронавірусів, особливо в геномі протеїна шипу, в майбутньому існує ймовірність продовження виникнення нових CCoV з вираженими патогенними властивостями, наголошує [54]. Одним з найбільш важливих знань, отриманих за останні кілька років, на думку [53], є те, що коронавіруси перетнули і, ймовірно, продовжуватимуть перетинатися між різними видами, тим самим викликаючи появу хвороб у нових видів-господарів, як це було у випадку епідемії SARS в 2003 році. Коронавіруси в тварин-компаньонів були описані задовго до появи SARS-CoV. Вони ілюструють характерні риси коронавірусів, такі як: наявність різних біотипів і генотипів в межах кожного виду, вирішальна роль додаткових білків у вірулентності й можливість міжвидової передачі [53].

У останні роки відмічається тенденція збільшення випадків захворювання собак з ознаками діареї не тільки в Україні, а й в Європі. Загалом, хвороби з проявом такої характерної клінічної ознаки, як діарея, можуть викликати віруси, бактерії і гельмінти [40]. У загальній патології собак ентеровірусні інфекції цуценят посідають провідне місце. У ветеринарних клініках невеликих міст з відсутністю діагностичних лабораторій диференціацію таких хвороб частіше об'єднують під назвою «парвовірусний» ентерит. Дане ствердження є цілком слушним, аналізуючи дані діагностичних установ або науково дослідних інститутів. Разом з тим практика проведення специфічної профілактики дає можливість стверджувати, що в етіологічному спектрі провокатором виникнення хвороб даного симптомокомплексу є не тільки парво, а й корона – та ротавірусний ентерити [9]. У повідомленні S.A. Godsall й співав. (2010) також наголошується, що парвовірус собак (CPV) і кишковий коронавірус собак (CCoV) часто є причиною діареї в собак. Хоча кишковий коронавірус собак є менш поширеним, але все ще лишається потенційно важливим збудником, зазначають автори [41]. Дані ентерити надзвичайно небезпечні для цуценят і собак мініатюрних розмірів, в зв'язку з швидким зневодненням, і як наслідок летальним кінцем [9].

На думку А. Pratelli (2005), CCoV є ензоотичним в усьому світі, адже присутність вірусу була продемонстрована в Європі, Сполучених Штатах, Таїланді й Австралії. Дослідження сироватки, зібраної як від здорових собак, так і від собак при спалахах ентериту в розплідниках Нідерландів, показали високий рівень антитіл до CCoV в обох категоріях. Серологічні дослідження проведені в деяких країнах демонструють, що показники поширеності коливаються від 0 до 80%; за даними проведеного масштабного дослідження, 45% серопозитивних випадків були зареєстровані в здорових собак, в порівнянні з 61% собак з діареєю [68]. У сучасних літературних джерелах є численні повідомлення з різних регіонів світу щодо виявлення CCoV-позитивних зразків фекалій: 43,75% в Китаї [84], 32,83% в Кореї [48], 50,46% в Японії [78], 54,39% в Албанії [16], 12% в Бразилії [18], 61,1% в Греції [65],

51,3% в Італії, 80% в Бельгії, 60% в Нідерландах, 38,09% в Німеччині, 12,5% у Великобританії, 36,17% в Іспанії і 11,54% у Франції [31]. Наведені дані чітко демонструють, що прояви коронавірусної інфекції різняться в різних географічних регіонах. Також поширеність SCoV в собак з діареєю значно відрізняється за статусом імунізації, сезонами і віковими групами [84]. У літературі щодо захворювань, викликаних SCoVs, мало або немає корисної інформації і, хоча додаткові важливі дані, отримані за останні роки, проливають світло на більш незрозумілі аспекти інфекції, необхідно і надалі проводити дослідження задля розширення знань щодо обох генотипів SCoV. Отримані дані про геном кишкових SCoVs, а також про їх еволюцію зосереджені на важливих епідеміологічних результатах на місцях, з точки зору як профілактики, так і еволюції вірусів. Отже, серологічна кореляція між цими двома вірусами потребує подальшого вивчення, а також лишається надати відповіді на питання щодо патобіології SCoV-I і ефективності доступних в даний час SCoV вакцин, які містять лише SCoV-II [73]. Крім того, морфогенез і патоморфологія хвороб, спричинених різними типами коронавірусів, доступні лише в невеликій кількості повідомлень, зокрема в англomовних джерелах [21, 68, 90, 91], тому також потребують подальшого всебічного вивчення.

Історія вивчення коронавірусів

Вперше коронавірус був виділений в 1937 році – це був вірус інфекційного бронхіту птиці, який мав (і все ще має) здатність суттєво знищити поголів'я птиці. За даними Агентства охорони здоров'я (АОЗ) Великобританії, він також може інфікувати сечостатевий тракт курчат, а також поширюватися на інші органи [64]. Загалом, коронавіруси описані вже понад 50 років, як головні агенти респіраторних, кишкових або системних інфекцій свійських і домашніх тварин [53]; наприклад, щодо виділення прототипу мишачого коронавірусу штаму JHM, повідомлялося ще в 1949 р. Молекулярні механізми реплікації, а також патогенна дія деяких коронавірусів активно почали вивчатися з 1970-х років. Деякі віруси тварин, такі як вірус трансмісивного гастроентериту свиней (TGEV), бичачий коронавірус (BCoV), віруси інфекційного бронхіту птахів (IBV), мають ветеринарне значення. А коронавірус гепатиту мишей (MHV) вивчається і використовується як модель захворювань людини [85].

ССoV вперше був визнаний в якості кишкового патогена собак після виділення прототипу 1-71 вірусу в 1971 році під час спалаху гастроентериту в собачому військовому підрозділі у Німеччині [20, 54, 68, 73, 74, 84]. Хоча ще раніше було отримано серологічні докази, того, що собаки можуть бути природними носіями коронавірусу спорідненого із вірусом трансмісивного гастроентериту свиней (TGEV). Наразі, ССoV визнається важливим, але ще недостатньо зрозумілим патогеном в собак [68]. Оскільки захворювання, яке викликається коронавірусом собак, з моменту своєї першої ізоляції в 1971 році, не було достатньо дослідженим, а роль вірусу в кишкових захворюваннях собак, детально не встановлена. ССoV постійно еволюціонує і лише протягом останніх десятиліть, дослідники зосередилися на геномній мінливості штамів ССoV, виявляючи нові генотипи / типи [73].

Ця родина вірусів залишалася відносно неясною, ймовірно, через відсутність серйозних захворювань людини, які можна було б віднести до

коронавірусів; до того існували два прототипи коронавірусів людини, OC43 і 229E, обидва є етіологічними агентами звичної застуди [85]. Коронавірус людини вперше було виділено від хворого на ГРВІ у 1965 р. вченими D.Tyrell та М. Вупое [1]. Проте, навесні 2003 року, коли стало ясно, що новий коронавірус людини відповідальний за тяжкий гострий респіраторний синдром (SARS), коронавіруси стали набагато більш впізнаваними [59, 85]. Вже після появи SARS-CoV, з'явилися повідомлення щодо ще двох нових коронавірусів людини, пов'язаних з респіраторними захворюваннями [39, 85, 86]. НКУІ є коронавірусом II групи, виділеним у літніх пацієнтів з пневмонією [86]. НCoV-NL63 є коронавірусом I групи, ізольованим від 7-місячної дитини в Нідерландах, яка страждала на бронхіоліт і кон'юнктивіт [39]. Згодом подібна інформація з'являлася в інших частинах світу, включаючи Канаду, Японію, Гонконг, Австралію і Бельгію [85].

Отже, в лютому 2003 року Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) отримала з Китаю повідомлення щодо нового спалаху респіраторного захворювання в провінції Гуандун. Хоча, перший випадок «атипової пневмонії» з'явився в провінції Гуандун на півдні Китаю ще 16 листопада 2002 року [1, 85]. Новий вірус виділяли з легень і мокротіння пацієнтів і культивували на клітинній лінії нирки мавпи (Vero E6). Інформація щодо послідовностей показала, що це був раніше невідомий коронавірус. Докази того, що цей вірус є етіологічним агентом ГРВІ, надали результати інфікування приматів, які були виконані відповідно до постулатів Коха. Епідемія атипової пневмонії офіційно контролювалася до липня 2003 року тільки суворою ізоляцією пацієнтів. До кінця епідемії ВООЗ повідомили про більш ніж 8000 випадків, з понад 800 смертей в усьому світі, оскільки катастрофічно не вистачало інформації про природу збудника, не існувало відповідної вакцини та ефективної етіотропної хіміотерапії [1, 85]. Про випадки атипової пневмонії повідомлялося в 29 країнах, переважно в Азії, хоча Північна Америка також зазнала впливу, особливо в Торонто, Канада. У Сполучених Штатах було зареєстровано 156 підозрілих випадків ГРВІ, хоча лише у 8-ми випадках серологічні дані

підтвердили наявність інфекції SARS-CoV [85]. Ціною надзвичайних зусиль світової спільноти пандемія — атипової пневмонії була зупинена 5 липня 2003 р [1, 64]. Проте, до кінця 2003 р. було виявлено ще 2 випадки захворювання на ТГРС у співробітників вірусологічних лабораторій, що працювали над виділенням вірусу в культурі клітин [1]. На початку 2004 р. у Китаї були зареєстровані нові 4 випадки захворювання, у квітні цього ж року в Пекіні та у південнокитайській провінції Аньхой ще 9 випадків, у тому числі – 1 летальний, джерела збудника інфекції при цьому встановлені не були [1]. З виникненням епідемії атипової пневмонії коронавіруси тепер можна вважати «виникаючими патогенами». Походження коронавірусу SARS (SARS-CoV) викликає цікаві питання щодо еволюції коронавірусу та специфіки видів [85].

Біологічні вектори коронавірусу не відомі. Однак серологічні й генетичні дані різних досліджень підтримують зоонозне походження SARS-CoV [44]. Першою була гіпотеза, що базувалася на епідеміологічних даних, які свідчать про те, що перші пацієнти з ГРВІ в провінції Гуандун контактували з живими дикими тваринами, які знаходяться на ринках, що обслуговують ресторанну торгівлю [44]. Для виявлення тварин-носіїв SARS-CoV в провінції Гуандун було досліджено ряд домашніх і диких ссавців. Цікаво, що SARS-подібні віруси, генетично і антигенно пов'язані з коронавірусом SARS людини, були виявлені за допомогою RT-PCR в назальних і фекальних мазках цівети (*Paguma larvata*) і єнотоподібного собаки (*Nyctereutes procyonoides*). Серологічні докази інфекції були виявлені у цих видів, а також в китайського тхора-барсука (*Melogale moschata*) [44]. Дивним було те, що торговці, які працюють з живими тваринами на цих ринках, мали високий рівень серопоширеності обох SARS коронавірусів, як людських так і тваринних, хоча вони не мали в анамнезі SARS-подібного захворювання. SARS-подібні віруси, виділені у тварин, мали більше 99% гомології з людським SARS-CoV, зазначають автори. Проте, порівняно з вірусами тварин, SARS-CoV людини, виділений як з ранньої фази епідемії, так і з травня 2003 року демонстрував делеції в ORF 8, які відрізнялися

довжиною (від 29 до 82 нуклеотидів на ранній фазі до делеції 415 нуклеотиду, що призводить до втрати всієї області ORF 8 на пізній фазі спалаху) [85].

Було припущено, що попередник тваринного коронавірусу SARS може бути неефективним при зараженні людини, а повторний вплив цього вірусу може призвести до абортівної інфекції або антигенної стимуляції, в результаті якої і спостерігалася серологічна реакція у торговців тваринами. Таким чином, ринки живих тварин були, ймовірно, місцем, де відбувалася міжвидова передача вірусу від тварин до людини [85]. У цьому сенсі, за результатами молекулярних епідеміологічних досліджень запропоновано декілька варіантів потрапляння тваринного коронавірусу до людини, наголошує автор. Наприклад, філогенетичний аналіз кількох випадків людського захворювання, що стався в грудні 2003 року в провінції Гуандун, показав, що цей SARS-CoV набагато ближче до CoV пальмової цівети, ніж будь-який SARS-CoV, виділений у людей на початку епідемії. Чи має SARS-CoV резервуар у диких видів тварин, ще потрібно з'ясувати. До того ж, тхори і домашні кішки є чутливими до SARS-CoV інфекції. Коли неінфіковані тхори і кішки були розміщені з інфікованою твариною, відбувалася передача, і вірусні титри поступово збільшувалися. Але більш цікавим виявилось те, що зусилля декількох груп науковців, які намагалися визначити гаданий резервуар серед диких тварин, призвели до відкриття нових коронавірусів тварин у кажанів і птахів [85]. О.К. Дуда і співав. (2015) у своїй статті також зазначають, що природним резервуаром SARS-CoV є кажани (*Chiroptera: Microchiroptera*). Від кажанів у природі заражаються віверові (*Viverridae*), яких жителі Південно-Східної Азії доглядають як домашніх тварин і часто використовують для харчування. Найбільш вірогідний шлях проникнення SARS-CoV у популяцію людини: кажани → дрібні дикі ссавці (гімалайські цівети, єнотоподібні собаки, бірманські борсуки) → м'ясо неякісної термічної обробки в ресторанах → людина [2].

Перші відомі випадки Близькосхідного респіраторного синдрому (MERS), пов'язані з інфікуванням новим коронавірусом (CoV), сталися в 2012 році в

Йорданії, але були повідомлені пізніше. Випадок, який вперше був офіційно повідомлений, стався в Джидда, в Королівстві Саудівська Аравія (KSA) [1, 2, 55, 58, 64, 89]. Клінічна картина була надзвичайно схожою з початком вибуху тяжкого гострого респіраторного синдрому (SARS) у 2003 році, що нагадало людству, що коронавіруси тварин можуть викликати важкі захворювання у людей [62, 89]. Вже з вересня 2012 р. ВООЗ стала проводити регулярний моніторинг випадків БСРС у повній відповідності із Міжнародними медико-санітарними правилами, а в травні 2013 року на спеціальному засіданні групи експертів Міжнародного комітету з таксономії вірусів збудник БСРС отримав свою сучасну назву – коронавірус близькосхідного респіраторного синдрому – та місце в таксономічній системі царства *Virae* [1, 2]. Більшість випадків MERS в світі були повідомлені або отримані з Саудівської Аравії (принаймні, 80%). З початку спалаху MERS, різними джерелами повідомлялись випадки захворювання в наслідок можливої зоонозної передачі в Ірані, Йорданії, Кувейті, Лівані, Омані, Катарі, Саудівській Аравії, ОАЕ та Ємені. Завезені або пов'язані із завозом інфекції випадки повідомлялися з Алжиру, Австрії, Китаю, Єгипту, Франції, Німеччини, Греції, Італії, Малайзії, Нідерландів, Філіппін, Республіки Корея, Таїланду, Тунісу, Туреччини, Великобританії та США [1, 11, 55]. За даними [2], на IX нараді Комітету з надзвичайних ситуацій ВООЗ Маргарет Чен було повідомлено, що відповідно до Міжнародних медикосанітарних правил (ММСП, 2005) випадки інфекції MERSCoV зареєстровані у 25 країнах світу.

Наймасштабніший спалах БСРС, який зафіксовано за межами Аравійського півострова, стався в Південній Кореї. Перше повідомлення до ВООЗ надійшло 21 травня 2015 р. Станом на 15.06. 2015 р. зареєстровано 150 випадків, з них 17 (11,3%) мали летальні наслідки [2]. Спалах захворювання у Південній Кореї (травень – червень 2015 р.) підтверджує передачу вірусу від людини до людини, зафіксовані вторинні і третинні випадки передачі [2]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), станом на 10 березня 2016 року, загальна кількість хворих на MERS становила 1651 лабораторно

підтверджених випадків, у тому числі, щонайменше 590 смертельних випадків (смертність 36%), оскільки перші випадки були зареєстровані у вересні 2012 року [11]. За результатами молекулярно-генетичних досліджень, природним резервуаром збудника є кажани [1, 2]. Кажани можуть бути резервуаром MERS-CoV, але мало ймовірно, що вони є безпосереднім джерелом для більшості випадків захворювання людини, адже її контактування з кажанами є рідкістю, повідомляє [2]. Але, як зазначає [1], не виключена можливість передачі вірусу людині через продукти життєдіяльності кажанів, які живуть на горищах житлових будівель. Зважаючи на те, що кажани багатьох видів здатні здійснювати сезонні міграції та зимувати на певних територіях, вірус може бути занесений і на територію України, зауважує автор. Є припущення, що MERS може поширюватися від верблюда до людини [58, 62, 64]. Антитіла до вірусу були виявлені у верблюдів дромедарів у Катарі, Єгипті й Саудівській Аравії, а також в кажанів в Саудівській Аравії [62]. MERS-CoV спричиняє ензоотичне помірне захворювання респіраторного тракту у верблюдів дромедарів, які є резервуаром інфекції на Аравійському півострові і в частині Африки і, відносно рідко, спорадичні інфекції людини. Точно, як вірус передається людині, залишається невідомим, але припускається тісний і тривалий контакт [58]. Також висловлювались припущення, що передача вірусу людині здійснюється повітряно-крапельним шляхом, а також через споживання сирого верблюжого молока або сирого м'яса верблюда [62].

Отже, можливості міжвидової передачі й наявність природних резервуарів не є новими поняттями щодо коронавірусів. Наприклад, І група коронавірусів свиней, собак і котів антигенно пов'язані між собою і можуть навіть ставати в господарях мутантами, які походять від спільного предка. Згідно даного припущення, коронавірусна інфекція може виникати між видами в свиней, собак і котів. Крім того, дикі та домашні хижаки, такі як собаки і лисиці, можуть бути резервуарами TGEV [85]. Можливо, всі дикі *Canidae* можуть бути заражені вірусом повідомляє [68], але поки CCoV був ізольований лише в койотів з діареєю.

Біологічні і молекулярно-генетичні особливості коронавірусів

Структура коронавірусу

Назва "coronavirus", бере початок з 1968 року, і походить від грецького *korónē*, що означає корона (короноподібна будова, що спостерігається в цих вірусів в електронному мікроскопі [85, 87].

Коронавіруси (CoVs) - вкриті оболонкою віруси з сферичними, а іноді плеоморфними віріонами діаметром від 80 до 120 нм (рис. 1).

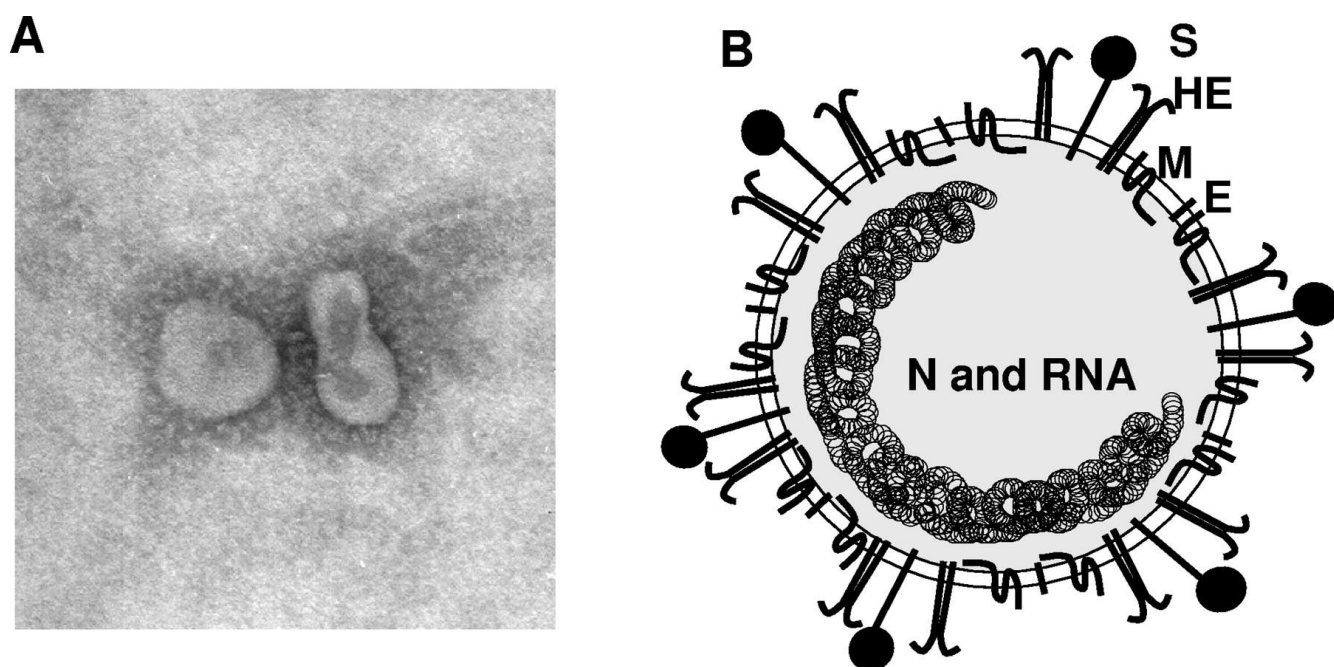


Рис. 1. Віріон коронавірусу. (А) Електронна мікрофотографія частинок МНВ. (Б) Схема віріона. Вірусні частинки містять внутрішній спіральний РНК-протеїн нуклеокапсиду, оточений оболонкою, що містить вірусні глікопротеїни. Нуклеокапсидний (N) білок являє собою фосфопротеїн, який разом з геномною РНК і утворює нуклеокапсид. Глікопротеїн шипа (S) утворює великі глікозилзовані пепломери, характерні для коронавірусів. М, трансмембранний білок, дуже гідрофобний і охоплює мембрану три рази. Е, проникаючий крізь мембрану білок, є другорядним компонентом мембрани. Деякі віруси II групи експресують інший глікопротеїн, гемаглютинин-естеразу (HE), який утворює менші шипи на віріонах. Susan R. Weiss, and Sonia Navas-Martin Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2005; doi:10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005

Коронавіруси мають найбільші, відомі на сьогоднішній день з усіх РНК-вірусів, геноми середньою довжиною від 27 до 31 тис. пар нуклеотидів і реплікуються за допомогою унікального механізму, що призводить до високої частоти рекомбінацій [2, 20, 52, 68, 73, 84, 85, 87]. Геном представлений одонитчатою лінійною молекулою нефрагментованої РНК з позитивною полярністю (РНК+) [1, 2]. Віріони під родини *Coronavirinae* мають щільну суперкапсидну оболонку, зовні вкриту грушеподібними виступами завдовжки 5–10 нм, що складаються з масивної сферичної або овальної голівки та тонкої шийки [1, 22]. На негативно забарвлених електронно-мікроскопічних (ЕМ) фотографіях коронавірусні частинки набувають вираженого ефекту сонячної корони, яка оточує віріон, ефект виникає за рахунок виступів (пепломерів) у проекції поверхні у формі булав довжиною приблизно 12 - 24 нм і шириною близько 10 нм [1, 22, 68, 85]. Пепломери утворені тримерами білку S, який розщеплюється на дві субодиниці S1 та S2. Під суперкапсидною оболонкою розташовані трансмембранні білки М і Е [1]. Мембранний М-білок тричі охоплює мембрану, має короткий N-кінцевий ектодомен і цитоплазматичний хвіст; малий мембранний Е-білок є надзвичайно гідрофобним білком [85]. Серцевина віріону представлена нуклеокапсидом із спіральним типом симетрії та розмірами 60–70 нм у діаметрі [1]. Отже, геном РНК з'єднаний з нуклеокапсидним (N) фосфопротейном, який утворює спіральний нуклеокапсид [1, 22, 46, 68].

У представників під родини *Coronavirinae* наявний додатковий поверхневий глікопротеїд HE, який проявляє гемаглютинуючу та естеразну активність [1, 2, 85]. Коронавірусний HE- глікопротеїд на оболонках деяких коронавірусів II групи утворює другий тип шипу, менший (від 5 до 7 нм), ніж шипи білку пепломерів. Хоча функція HE-глікопротеїну не відома, він не є важливим білком, але сприяє проникненню вірусу та/або патогенезу *in vivo*. Вважається, що HE було отримано шляхом гомологічної рекомбінації РНК за участю коронавірусу II групи перед відщепленням SARS-CoV, який не кодує

НЕ-білок. Коронавірусним НЕ-білкам не приділяли особливої уваги в минулому, ймовірно, тому, що вони не є важливими для реплікації в культурі тканин або, у випадку MNV, для вірулентності у мишей [85]. У віріони можуть бути включені й інші незначні білки, які ще не виявлені [85].

S-глікопротеїн (150 – 200 kd), який утворює великі пепломери у вигляді шипів на поверхні віріонів, складається з трьох структурних доменів: великий зовнішній домен, трансмембранний домен і короткий карбоксил-термінальний домен [68, 73, 87]. Деякі коронавірусні S-білки (більшість з вірусів II і III групи) розщеплюються під час або після дозрівання вірусу за допомогою фуриноподібної ферментативної активності під час обробки в Гольджи на дві субодиниці S1 і S2 [1, 73, 85]. Натомість, S-білок CoVs I філогрупи (*Alphacoronavirus*) не розщеплюється, хоча деякі з цих вірусів можуть індукувати злиття між клітинами [73]. Розщеплення на S1 і S2 залежить в основному від типу клітини-хазяїна і може посилювати активність клітинного злиття або вірусну інфекційність; проте, нерозщеплений S-протеїн може бути медіатором злиття клітин, хоча й малоефективним. Послідовність в S1 є змінною, і мутації в ній пов'язані зі зміною патогенності й антигенності вірусу; натомість, послідовність в S2 більш стабільна [68, 87].

Таким чином, S-глікопротеїн відіграє важливу роль в біології і патогенезі CCoV інфекцій, оскільки індукує як злиття вірусної оболонки з мембраною клітини господаря, так і злиття між клітинами, отже є основним індуктором вірус-нейтралізуючих антитіл [22, 54, 68, 73]. Саме підвищення ступеню тяжкості захворювання в собак і виникнення нових варіантів CCoVs можуть бути пов'язані з високим рівнем рекомбінацій в S-гені, які можуть виникати під час інфікування більш ніж одним типом CCoV в того ж господаря [54, 84]. Тому CCoV отримав багато уваги в якості нової причини інфекційного захворювання в собак [18, 23, 24, 65, 67, 83].

Хоча основна імунологічна роль була приписана білку S, антитіла до M-білка MNV можуть нейтралізувати інфекційність вірусу, але тільки за наявності комплементу [85].

М-глікопротеїн (близько 29 kd) є найбільш багатим мембранним білком віріону. М-глікопротеїн відрізняється від інших білків, оскільки лише короткий аміно-термінальний домен білка виділяється з вірусної оболонки. Цей домен продовжується тримембранним доменом і великим карбоксил-термінальним доменом всередині оболонки [68]. Він може бути О-глікозильованим (групи I і III) або N-глікозильованим (група II). Хоча глікозилювання не є важливим для вірусного збирання або інфекційності, стан глікозилювання М-білка, ймовірно, відіграватиме роль у взаємодії вірус-господар. Для TGEV було показано, що М-білок має інтерфероногенну активність, і мутації в ектодоміні М-білка, які погіршують N глікозилювання, зменшують цю активність. Для MHV відбір рекомбінантних вірусів з N, O або без глікозилювання продемонстрував, що в той час як стан глікозилювання М-білка змінює здатність до реплікації *in vitro*, це може впливати на здатність індукувати IFN- α *in vitro*, а також для реплікації у печінці *in vivo* [85]. Незважаючи на те, що основна імунологічна роль належить S-протеїну, як аміно-, так і карбоксильні кінці М-протеїну викликають сильну імунну реакцію, що включає утворення антитіл, комплемент-опосередковану нейтралізацію вірусу [68]. Таким чином, окрім своєї ролі в збиранні вірусів, коронавірусний М-білок, як вважають, має функції взаємодії з господарем [85].

Е-протеїн коронавірусу являє собою інтегральний мембранний білок (9–12 kd). Поряд з М білком, Е відіграє важливу роль в утворенні віріонів [22, 54, 68, 85] і необхідний для вірусної бутонізації [73]. Хоча обидва гени М і Е зберігаються серед усіх коронавірусів, вони не є хорошими об'єктами для філогенетичних досліджень через їх короткі послідовності, вважає [87]. Рекомбінантний MHV з делецією гена Е має низьку інфекційність і погано реплікується, що вказує на те, що в той час як він є незначущим для MHV, білок Е відіграє важливу роль у продукції інфекційного вірусу [51]. Натомість, Е білок TGEV є вирішальним; випадіння гена Е в межах білків TGEV є летальним. Окрім своєї ролі у зборі вірусів, Е-білок має додаткові функції під час інфекції. Е-білок також відіграє роль у взаємодії вірус -господар, зокрема, в

індукції апоптозу. Є дані, що Е-білок SARS-CoV індукує апоптоз при експресії в Т-клітинах Jurkat, і ця активність інгібується експресією антиапоптозного білка Bcl-xL. Тому було припущено, що апоптоз Т-клітин може сприяти лімфопенії, індукованій SARS-CoV, що спостерігається в більшості пацієнтів з SARS, було повідомлено в роботі [85].

N-протеїн (50–60 kd) є основним фосфопротеїном, який відіграє роль у синтезі вірусної геномної РНК і забезпечує структурну основу спірального вірусного нуклеокапсиду. N-білок у вірусному нуклеокапсиді взаємодіє з М-білком, що веде до утворення віріонів [60, 68, 73]. На додаток до своєї ролі як структурного білка, N білок грає роль в транскрипції, а також в патогенезі. Експресія N білка необхідна для ефективного відновлення вірусу з інфекційних клонів кДНК, а також було показано, що він посилює реплікацію геному РНК HCoV-229E [85]. Подібно до консервативних білків, кодованих ORF1ab, ген N також є поширеним об'єктом для філогенетичного аналізу. Завдяки своїй імуногенності, він, крім того, є звичайним об'єктом для клонування і генерування рекомбінантних білків для серологічних аналізів, зауважує [87].

Білки реплікази можуть впливати на тропізм і патогенез, визначаючи швидкість вірусної реплікації, ймовірно, через взаємодії з некодуючими послідовностями 5' і/або 3' UTR вірусного геному, з типоспецифічними клітинними факторами або з елементами імунної відповіді [85].

Як і інші РНК-віруси, всі коронавіруси кодують, крім структурних білків і білків реплікази, малі другорядні білки невідомої функції. Існує безліч прикладів таких білків, кодованих РНК-вірусами, які взаємодіють з альфа-бета-інтерфероном, компрометуючи його відповідь; серед них є VP35 вірусу Ебола, 5 білків деяких параміксовірусів, а також NS1 і NS2 білки людських і бичачих респіраторно-синцитіальних вірусів. Хоча ще немає конкретних прикладів коронавірусних білків, які протистоять господарю шляхом пригнічення його природної імунної відповіді, цілком вірогідно, що один або кілька коронавірусних другорядних білків служать такою «допоміжною» функцією під час інфекції *in vivo* [85]. Коронавірусні гени, що кодують ці білки, іноді

називають «малими ORF» або «групо-специфічними» генами, оскільки вони зберігаються серед кожної групи коронавірусів [85]. Отже, велика кількість змінних малих ORF існують між різними консервативними генами в різних родах родини *Coronaviridae*. У деяких коронавірусів малі ORF знаходяться нижче гена N. Генوم FCoV і CCoV включає дві групи генів, що кодують неструктурні білки: ORFs 3a, 3b, 3c (розташовані між генами S і E) і ORFs 7a, 7b (розташовані нижче за N геном) [53]. ORF 7b є специфічним для FCoV, CCoV і коронавірусів тхорів. Він кодує розчинний неструктурний глікопротеїн 24 кДа, функція якого залишається невідомою [53]. Відносно пантропного CCoV, найбільш яскравий генетичний маркер, ідентифікований в унікальному геномі пантропного CCoV (штам CB/05), складався з 38-nt делецій в ORF3b, що прогнозовано призведе до укорочення неструктурного білка 3b [15, 27]. Але це спостереження має бути підтверджено дослідженням додаткових пантропних послідовностей.

Отже, більшість малих ORF мають невідомі функції. Єдиним виключенням є невеликі ORF, що знаходяться нижче N у вірусу інфекційного перитоніту котятих (FIPV) і TGEV, які відіграють важливу роль у вірулентності й вірусній реплікації/збірці, відповідно [87]. Іншим сутєвим винятком є білок 3a SARSr-CoV, який утворює трансмембранний комплекс гомотетрамерів з функцією іонного каналу і модулює вивільнення вірусу [87]. Генوم MHV містить ORF 2a, 4 і 5a; вважається, що білки закодовані в цих трьох ORF, не є сутєвими для реплікації. Невирішеним залишається інтригуюче питання про те, чи кодує один або більше з цих ORF білки, які є вирішальними в патогенезі, зауважує [85]. У випадку свинячого коронавірусу TGEV експресія гену 7 не важлива для реплікації; однак рекомбінантний вірус, в якому експресія гену 7 була скасована, відображає знижену вірулентність з меншою реплікацією вірусу в легенях і кишечнику, що означає, що ген 7 впливає на реплікацію і вірулентність *in vivo*. ORF 3a і 3b TGEV також не сутєві для реплікації. Різні ізоляти PRCoV мають делеції в ORF 3a і 3b, а це означає, що втрата експресії цих ORF може бути пов'язана з ослабленням; однак аттенуація в цих штаммах

пов'язана з делеціями в гені шипу, а не з ORF 3a і 3b. Крім того, рекомбінант з делецією цих ORF демонструє тропізм дикого типу, ефективно реплікується у тварин і проявляє лише незначне зниження вірулентності [85]. Рекомбінантні FIPVs з делеціями ORF 3a, 3b і 3c або ORF 7a і 7b розмножуються ефективно в культурі клітин, але показують ослаблений фенотип в котів. Це говорить про те, що один або більше білків, кодованих в цих ORF, можуть грати роль у вірулентності [45]. Геном SARS-CoV людини кодує багато малих відкритих рамок зчитування (ORF 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b і 9b), що передбачає кодування восьми групо- специфічних білків [85]. Таким чином, функції додаткових генів часто невідомі, але вони регулярно задіяні при зміні тропізму або при адаптації штамів вірусу до нового організму [52].

Структура коронавірусів значною мірою обумовлює цілий ряд дуже важливих властивостей збудника, а саме – їх резистентність до впливу різних фізико-хімічних чинників та навколишнього середовища. Так, коронавіруси зберігають інфекційну активність упродовж кількох років у ліофілізованому стані при температурі +4°C, а у замороженому стані – при температурі -70°C [1, 68]. Ультрафіолетове (УФ) випромінювання інактивує віруси за 15 хв, органічні розчинники та детергенти – впродовж декількох хвилин. Віруси термолабільні: при температурі +37°C інактивуються за 10 год., при +33°C – за 16 год, при 56°C – за 10 хв. Дія сонячних променів спричинює повільну інактивацію збудника. Коронавіруси зберігаються у складі аерозолі впродовж 8–10 год, у питній воді – до 9 діб, у приміщенні при температурі 0–18°C – від 4 до 11 діб [1]. Як і інші оболонкові віруси, SCoV чутливий до тепла, жирових розчинників, неіонних миючих засобів, формальдегіду й окислювачів [68].

Організація вірусного геному

Перший повний геном коронавірусу, вірусу гепатиту мишей (MHV), був впорядкований більше 50 років після його виділення. До епідемії атипової пневмонії в 2003 році було доступно менше 10 коронавірусів з повною послідовністю геномів. Вони включали два коронавіруси людини (HCoV-229E і

HCoV-OC43), чотири коронавіруси інших ссавців (MHV, BCoV, TGEV, PEDV) і один пташиний коронавірус (IBV) [87]. Після SARS епідемії до квітня 2010 року було виявлено 15 нових коронавірусів з їх повними геномними послідовностями. Серед цих 15 раніше невідомих коронавірусів були два людських коронавіруси (HCoV-NL63 і HCoV-HKU1); 10 інших коронавірусів ссавців, SARS-споріднений коронавірус *Rhinolophus bat*, (SARSr-Rh-BatCoV), коронавірус *Rhinolophus bat* HKU2 (Rh-BatCoV HKU2), коронавірус *Tylonycteris bat* HKU4 (Ty-BatCoV HKU4), коронавірус *Pipistrellus bat* HKU5 (Pi-BatCoV HKU5), коронавірус *Miniopterus bat* HKU8 (Mi-BatCoV HKU8), коронавірус *Rousettus bat* HKU9 (Ro-BatCoV HKU9), коронавірус *Scotophilus bat* 512 (Sc-BatCoV 512), коронавірус *Miniopterus bat* 1A/B (Mi-BatCoV 1A/B), коронавірус коней (ECoV) і коронавірус *beluga whale* SW1; і три пташиних корона віруси: коронавірус солов'я HKU11 (BuCoV HKU11), коронавірус дрозда HKU12 (ThCoV HKU12) і коронавірус амадини HKU13 (MunCoV HKU13) [87].

Отже, коронавіруси мають найбільші геноми [від 26,4 kb (ThCoV HKU12) до 31,7 kb (SW1)] серед усіх відомих РНК-вірусів. Великий геном дав цій родині вірусів додаткову пластичність у розміщенні й модифікації генів [87].

Геноми всіх коронавірусів мають подібну структуру (рис. 2). 5'-кінець геному складається з 65-98 nt-послідовностей, які називаються головною РНК, що також присутня на 5'-кінці всіх субгеномних мРНК. Нетрансльована ділянка (UTR) від 200 до 400 nts є наступною після головної послідовності. На 3-му кінці генома РНК знаходиться інша UTR від 200 до 500 nts, яка слідує за послідовністю poly (A) змінної довжини [73]. Як вважають, обидві і 5- і 3'-UTRs, взаємодіють з господарем і, можливо, вірусними білками для контролю транскрипції і реплікації РНК, що включає синтез позитивного і негативного ланцюга геномної РНК [73, 85]. Аналогічно, існують збережені послідовності на початку ділянок транскрипції для кожної з численних субгеномних мРНК, які називаються транскрипційними регуляторними послідовностями (TRS), раніше відомими як міжгенні послідовності. На 5'-кінці кожний ген, всіх CoVs

має загальну міжгенну послідовність, з приблизно 7 основ, яка відіграє важливу роль в реплікації субгеномних РНК CoV [73, 83, 85].

Решта геномної послідовності включає різні відкриті рамки зчитування (ORF), які помітно відрізняються між коронавірусами за кількістю, послідовністю nt, порядком генів і способом експресії [73]. Геном містить від 7 до 10 відкритих рамок зчитування (ORFs), що кодують як структурні, так і неструктурні білки.

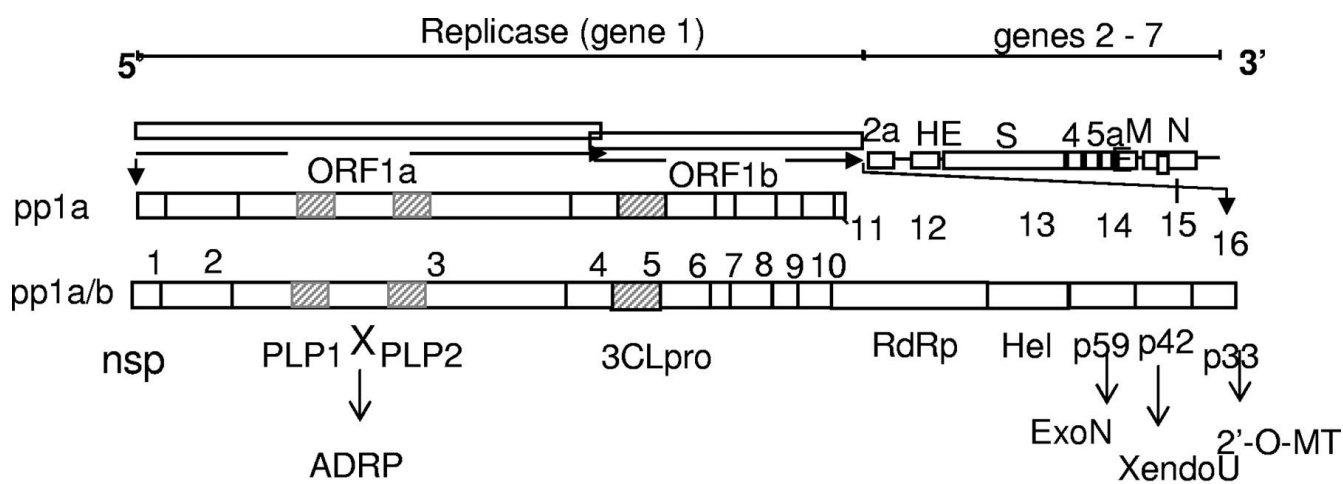


Рис. 2. Організація генома MHV і білки реплікази. Геном складається з семи генів. Перші 22 кб містять ген реплікази, який організований з двох відкритих рамок зчитування, ORFs 1a і 1b, які перекриваються. Ці ORF транслуються в поліпротеїни реплікази ~ 400-kDa pp1a та ~ 800-kDa pp1ab. ORF 1b транслується шляхом поступового зсуву рамок, закодованого в кінці ORF 1a. Білкові домени поліпротеїну реплікази позначені номерами неструктурних білків (nsp1 - 16) і підтвердженими або передбаченими функціями: PLP1 і PLP2, папаїноподібні протеази; X, домен, що кодує передбачувану аденозиндифосфат-рибоза1"-фосфатазну (ADRP) активність; 3CLpro, 3C-подібну протеазу; RdRp, передбачувану РНК-залежну РНК-полімеразу; Hel, хеліказу; ExoN, передбачувану екзонуклеазу; XendoU, передбачувану полі (U) -специфічну ендорибонуклеазу; 2'-O-MT, метилтрансферазу. Гени від 2 до 7 транслуються з субгеномних видів мРНК (не показано). Показано відносні місця розташування ділянок кодування структурних білків HE, S, E, M, N і I, а також ділянка кодування групоспецифічної ORF білків 2a (що кодує передбачену циклічну фосфодіестеразу), 4 і 5a. Susan R. Weiss, and Sonia Navas-Martin Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2005; doi:10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005

Дві третини 5' CoV генома (приблизно від 20 до 22 kb) складається з двох дуже великих відкритих рамок зчитування (ORF 1a і ORF 1b), які транслюються у два великих поліпептиди (pp1a і pp1ab) за допомогою механізму зсуву рамок і кодують неструктурний поліпротеїн, включаючи РНК-залежну РНК-полімеразу (RdRp). Інша третина 3' генома складається з ORF, які кодують структурні білки всіх коронавірусів: шипи (S), мембрану (M), оболонку (E) і нуклеокапсид (N) у порядку S-E-M-N, а також деякі неструктурні білки (nsr), 3a, 3b, 3c, 7a і 7b, а в деяких штаммах є HE-глікопротеїн, який помітно відрізняється серед коронавірусів складом nt-послідовностей, порядком генів і способами вираження. Коли білок HE експресується, він кодується від 5' до S [68, 85, 87]. Отже, послідовність основних генів: 5'-RdRp-HE-S-E-M-N-3' (див. рис. 2) [1, 68, 85, 87]. Кожна група коронавірусів додатково кодує групу унікальних малих білків; в той час як ці білки є неважливими, є припущення, що вони служать в якості допоміжних білків, які взаємодіють або пригнічують природну імунну відповідь господаря, але це не було продемонстровано для будь-якого з цих білків [85]. N. Desago і співав. (2015) було проведене дослідження з метою визначення повної довжини геному CCoV-Па, штамів CB/05, який був пов'язаний з системним смертельним захворюванням у молодих собак [24]. Показано, що довжина геному CB/05 становить 29266 нуклеотидів (nt), за винятком хвоста 3' poly (A), і демонструє типову організацію альфакоронавірусу: 5' нетрансльована область (UTR) (нуклеотиди [nt] 1 - 313); репліказний комплекс (відкрита рамка зчитування 1ab [ORF1ab], nt 314 – 20358); ген шипа (S) (nt 20355 - 24719); мембранний ген (M) (nt 26086 - 26874); ген нуклеокапсида (N) (nt 26887 - 28035); і 3' UTR (nt 28992 - 29266). Дві області, що кодують додаткові білки, були виявлені в геномі, ORF3abc (nt 24,772 - 25,840), між генами S і E, і ORF7ab (nt 28040 - 28991), нижче за геном N. Ці групи генів демонстрували таку ж організацію, як і в інших CCoVs, за винятком ORF1b, який мав довжину 22 амінокислоти (aa) (що на 49 амінокислот коротше, ніж очікувалося) через наявність 38-nt делеції і зміщення рамки зчитування в

послідовності нижче видалення, яка вводила ранній стоп-кодон. Як і в інших штаммах ССoV-II, в геномі CB/05 були знайдені лише залишки ORF3, тоді як було виявлено, що геном ССoV-I охоплює всю кодуєчу послідовність. Транскрипційні регуляторні послідовності, що передують кожній з 7 передбачуваних мРНК, що кодують структурні і неструктурні білки, містили консервативне ядро CUAААС [24].

Таким чином, співвідношення повних послідовностей геномів штаму CB/05 і еталонних альфакоронавірусів показало найбільш близьку генетичну спорідненість з ізолятами ССoV-IIa (від 92.07 до 93.49% nt ідентичності), за якими слідували TGEV (90.31%) і респіраторний коронавірус свиней (87.67%). ССoV-I і коронавіруси котятих (FCoVs) були більш віддалено пов'язані (nt ідентичності 84,16% і від 77,25 до 83,81%, відповідно) [24]. Не було можливим порівняння з ССoV-IIb, оскільки в базі даних GenBank для цих вірусів відсутня повна довжина послідовностей геномів, зазначають автори. Отже, штам CB/05 генетично схожий з іншими ізолятами ССoV-IIa, за винятком делеції ORF3b. Наскільки дана делеція пов'язана з патогенністю вірусу, в даний час невідомо, оскільки вона не була виявлена в інших, пантропних штаммах, про які було повідомлено [27].

Вірусний цикл життя і особливості репродукції

Коронавіруси людини можуть розмножуватись у первинно-трипсинізованій культурі клітин нирок мавп, легень, трахеї і нирок ембріону людини, у диплоїдній культурі легень ембріона людини в умовах *in vitro*. Окремі штами здатні розмножуватись лише в органній культурі [1]. В умовах *in vivo* основними клітинами-мішенями для коронавірусів є епітеліальні клітини та макрофаги, що мають на своїй поверхні спеціальні рецептори, які розпізнає та з якими взаємодіє поверхневий білок S вірусу [1]. Здатність коронавірусу реплікуватися в певному типі клітин залежить виключно від здатності взаємодіяти з його рецепторами [85]. Першим ідентифікованим рецептором коронавірусу був СЕАСАМ 1, використаний з МНУ. Було виявлено кілька

рецепторів коронавірусу. Усі коронавіруси І групи, людський HCoV-229E, котячий FIPV і свинячий TGEV, використовують амінопептидазу N (APN), цинк-зв'язуючу протеазу відповідних видів господарів як свої рецептори. Існує певна здатність розпізнавати відповідний APN-рецептор іншого виду; наприклад, HCoV-229E може використовувати або людський APN або котячий APN в якості рецептора, але не може використовувати APN свиней [85]. Загалом, рецептор APN альфакоронавіруси використовують за специфічним для виду способом, тобто людський APN є клітинним рецептором HCoV-229E, але не для свинячих коронавірусів, і навпаки, свинячий APN служить рецептором для коронавірусів свиней, але не для HCoV-229, FCoV або CCoV [53]. Однак котячий APN є функціональним рецептором багатьох альфакоронавірусів, включаючи котячих (FECV і FIPV), людини (HCoV-229E), свинячих (TGEV) і собачих коронавірусів [53]. APN людини, котячого та свинячого APN демонструють сильне збереження амінокислот і виявляють близько 78% ідентичності. Однак на видоспецифічний тропізм впливають незначні відмінності в деяких регіонах APN [53].

HCoV-229E, FCoV, TGEV і CCoV, ймовірно, розвивалися з одного і того ж спадкового альфакоронавірусу, який, можливо, інфікував кішок за допомогою котячого APN. Вибір мутацій у S-білку може призвести до появи вірусів, здатних інфікувати інші види господаря за допомогою своїх споріднених білків APN, хоча всі вони зберегли свою здатність використовувати котячий APN як рецептор *in vitro* [53].

Вірусне прикріплення викликає конформаційну зміну білка шипу, який стає медіатором злиття між вірусними і клітинними мембранами, що призводить до вивільнення нуклеокапсиду в клітину (рис. 3) [85]. Вважається, що для посередництва в злитті вірусних і клітинних мембран білок шипу може зазнавати змін, аналогічних іншим білкам злиття типу I, таким як гемаглютинін вірусу грипу і вірусу імунодефіциту людини gp120, зазначає автор. Адсорбція коронавірусів на чутливих клітинах триває 20–60 хв [1]. Проникнення коронавірусу, як правило, не залежить від рН, і, як вважають, відбувається

безпосередньо на плазматичній мембрані, а не через ендосомальний шлях (див. рис. 3). Однак є дані, що ендосомальний шлях може використовуватись деякими вірусами [85]. Дуже гепатотропний штам MHV-2 може входити в клітину ендосомальним шляхом, подібним до того, який використовує SARS-CoV.

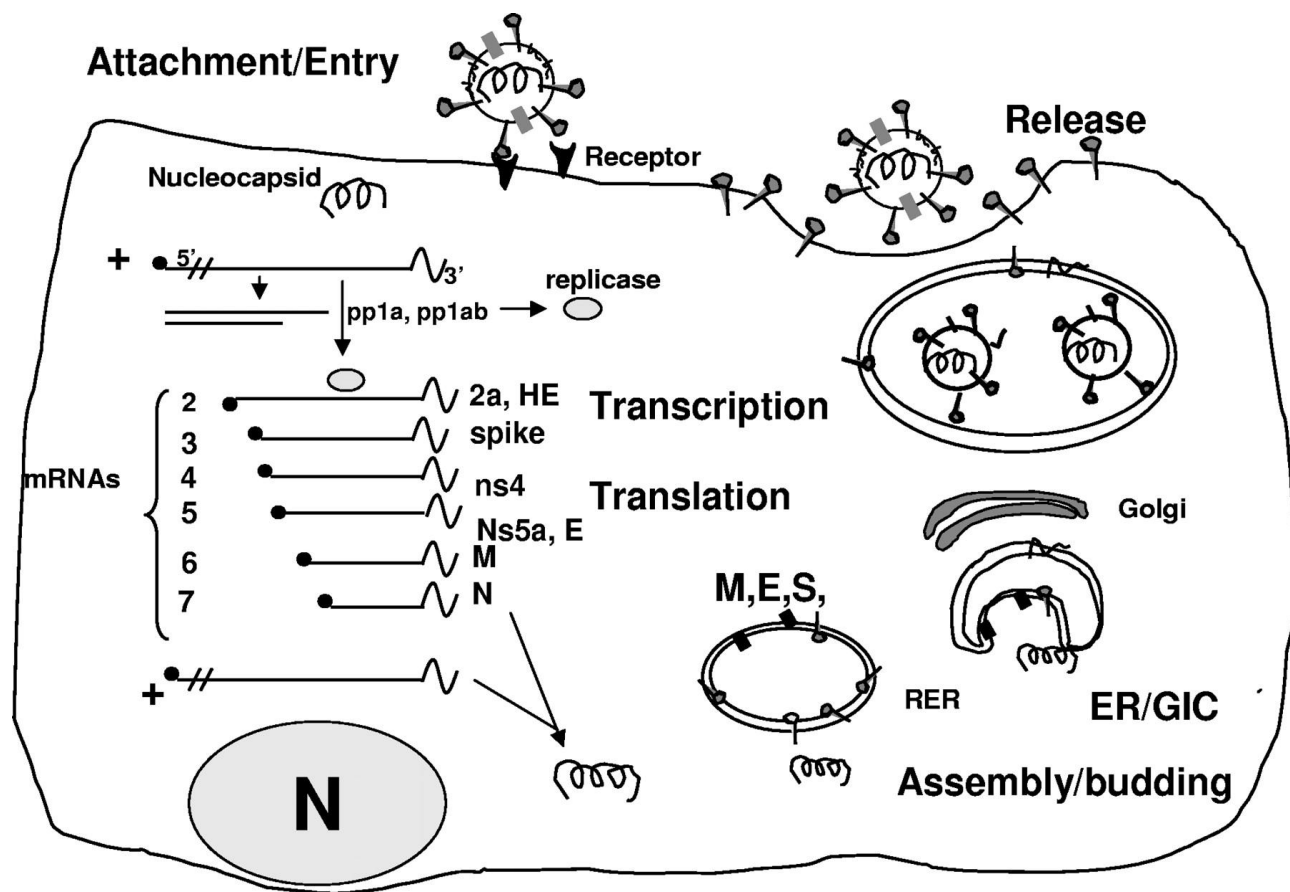


Рис. 3. Модель реплікації коронавірусу. Після взаємодії рецепторів і злиття вірусних і плазматичних мембран, ймовірно, повністю в цитоплазмі синтезується вірус-специфічна РНК і білки. Експресія коронавірусів починається з трансляції двох поліпротеїнів, pp1a і pp1ab, які проходять котрансляційну протеолітичну обробку в білки, що утворюють репліказний комплекс. Цей комплекс використовується для транскрипції 3'-котермінального набору вкладених субгеномних мРНК, а також геномної РНК, які мають загальну 5' «лідерну» послідовність, отриману з 5' кінця геному. Білки транслуються з 5'-кінця кожної мРНК. Нові віріони збираються шляхом бутонізації у внутрішньоклітинні мембрани і вивільняються через везикули клітинними секреторними механізмами. RER, шорсткий ендоплазматичний ретикулум; ER / GIC, ендоплазматичний ретикулум / проміжне відділення апарату Гольджі. Susan R. Weiss, and Sonia Navas-Martin Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2005; doi:10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005

MHV-2, подібно SARS-CoV, кодує нерозщеплений S білок і є чутливим до лізосомотропних агентів; однак обробка трипсином зв'язаного з клітиною шипу MHV-2 долає інгібування лізосомотропними агентами. Це говорить про те, що при вході через поверхню клітини може знадобитися розщеплення шипу вірусної мембрани, тоді як ендосомальний вхід може забезпечувати розщеплення під час входження. Нарешті, коронавіруси з розщепленими шипами можуть також потрапити в клітину ендосомальним шляхом [85].

Репродукція відбувається в цитоплазмі без участі ядра. Проникнення, роздягання вірусу та синтез вірусспецифічних білків тривають 4–7 год [1]. Під час інфікування коронавірусами, як і в усіх інших РНК-вірусів, повинна відбуватися реплікація геному і транскрипція мРНК. Реплікація геному передбачає синтез негативного ланцюга повнорозмірної РНК, яка присутня в низькій концентрації, і служить шаблоном для повнорозмірної геномної РНК. Кожна мРНК має загальну лідерну послідовність (від 75 до 78 нуклеотидів) на своєму 5'-кінці; цей лідер виводиться з 5'-кінця генома РНК. Крім того, в низьких концентраціях присутні негативно-ланцюгові РНК, що відповідають довжині кожній з мРНК, а також повній довжині геному. Механізм, за допомогою якого синтезується група позитивних і негативних РНК, включає унікальний переривчастий механізм транскрипції, який є недостатньо зрозумілим. Однак, як вважають, субгеномний синтез мРНК регулюється регуляторами транскрипції послідовностей, які присутні в РНК геному на ділянках початку транскрипції для кожної мРНК. Вірусні білки транслюються з окремих мРНК, як правило, тільки з 5' ORF [85].

Після трансляції мембранні білки М і Е локалізуються біля внутрішньоклітинних мембран Гольджі, але тільки за межами проміжного відділу ендоплазматичного ретикулума Гольджі, який вважається дійсним місцем бутонізації. Таким чином, на додаток до М, ймовірно, необхідні інші вірусні та/або клітинні фактори для визначення ділянки бутонізації [85]. Отже, складання вірусних часток відбувається на ендоплазматичних мембранах у

навколоядерній зоні. Вони відбруньковуються в отвір ендоплазматичної мережі, крізь тубулярні цистерни пересуваючись до краю клітини [1].

М і Е білки, за вираженої відсутності інших вірусних білків і вірусної РНК, є достатніми для отримання вірус-подібних частинок. Білок шипу розподіляється як на внутрішньоклітинних мембранах, так і на плазматичній мембрані. Білок шипу взаємодіє з трансмембранною областю М-білка під час вірусного збирання. Для деяких вірусів відбувається шип-опосередковане злиття між клітинами, що сприяє утворенню синцитію і поширенню вірусу. N-білок разом з геномною РНК, формують спіральні структури. У результаті взаємодії N-білка з М-білком відбувається бутонізація у везикули [85].

Вихід вірусу з клітини відбувається шляхом брунькування без модифікації клітинної мембрани [1]. Цікаво, що TGEV і MHV, вірогідно, виходять з епітеліальних клітин з протилежних сторін [85]. Коли для експериментального зараження тих самих епітеліальних клітин свиней (що експресують MHV-рецептор) використовували два віруси, TGEV вивільнювався переважно на апікальну мембрану, тоді як MHV – переважно на базолатеральній поверхні, отже можна припустити, що везикули, які містять два коронавіруси, націлені на мішень по-різному. Це є свідченням того, що два віруси сортуються в апараті Гольджі на різні транспортні везикули, які несуть інформацію, що направляє їх на різні поверхні. Таким чином, різниця в місці вивільнення може сприяти різниці в розповсюдженні вірусу в TGEV і MHV. TGEV викликає локалізовану кишкову інфекцію, тоді як MHV поширюється на декілька органів [85].

Класифікація коронавірусів

Таксономія

Традиційно, вірусам надавали характеристику і класифікували на основі культивування, електронної мікроскопії та серологічних досліджень [87]. Раніше, коронавіруси поділялися на три роди (I - III), які зазвичай називалися групами і засновані на серологічній перехресній реактивності (табл. 1); проведений аналіз послідовностей геномів підтвердив це групування [85]. Ця філогенетична плеяда добре відома, і в публікаціях ці три групи послідовно згадуються як філогрупи I, II і III.

Філогрупа I CoV включає людські коронавіруси HCoV-229E і HCoV-NL63, які викликають респіраторні інфекції, коронавіруси котячих (FCoVs) 1 і 2 типу, вірус трансмісивного гастроентериту свиней (TGEV), респіраторний коронавірус свиней (PRCoV), вірус епідемічної діареї свиней (PEDV) і коронавіруси собак (CCoVs) [73, 85]. Нещодавно коронавірус тхорів був ідентифікований як член I філогрупи [73].

Філогрупа II CoV ссавців поділяється на дві підгрупи, бичачо-подібну підгрупу 2a і SARS-подібну підгрупу 2b [73]. Підгрупа 2a включає бичачий коронавірус (BCoV), вірус мишачого гепатиту (MHV), вірус сілодакриоаденіту щурів (SDAV), вірус гемаглютинуючого енцефаломієліту свиней (PHEV), коронавіруси людини (HCoV-OC43 і HCoV-NKU1), які викликають респіраторні інфекції, кишковий коронавірус людини (HECV-4408), недавно визнаний коронавірус коней (ECoV) і собачий респіраторний коронавірус (CRCoV) [73, 85]. Незабаром, після відкриття SARS-CoV очікувалося, що буде визначено нову IV групу [73]. Певний час існувала полеміка щодо того, чи визначає SARS-CoV нову групу коронавірусів чи він є віддаленим членом II групи [85]. Однак, на основі порівняння послідовностей, було припущено, що вірус тісно пов'язаний саме з II філогрупою. Таким чином, SARS-CoV було розміщено в межах підгрупи 2b разом з SARS-подібними CoV, виділеними від кажанів і диких м'ясоїдних тварин (див. Табл.1) [73, 85].

Таблиця 1.

Коронавіруси, господарі, хвороби, рецептори

Група	Вірус	Господар	Спричинені хвороби	Клітинний рецептор
I	229E	людина	Респіраторна інфекція	Human APN
	TGEV	свиня	Респіраторна й кишкова інфекції	Porcine APN
	PRCoV	свиня	Респіраторна інфекція	Porcine APN
	Canine coronavirus		Кишкова інфекція	Canine APN
	FeCoV		Кишкова інфекція	Feline APN
	FIPV	кіт	Респіраторна, кишкова і неврологічна інфекції та гепатит	Feline APN
	NL-63	людина	Респіраторна інфекція, круп	ACE2
II	OC43	людина	Респіраторна інфекція і, можливо, кишкова інфекція	Neu5,9Ac2-containing moiety
	MHV	миша	Кишкова і неврологічна інфекції та гепатит	Murine CEACAM1
	Sialodacryoadenitis coronavirus	щур	Неврологічна інфекція	ND ^a
	Hemagglutinating encephalomyocarditis virus	свиня	Респіраторна, кишкова і неврологічна інфекції	Neu5,9Ac2-containing moiety
	BCoV	врх	Кишкова інфекція	Neu5,9Ac2-containing moiety
	HKU1	людина	Респіраторна інфекція	
	SARS-CoV	людина	Тяжкий гострий респіраторний синдром	ACE2
III	IBV	курка	Респіраторна інфекція, гепатит та інші	ND
	Turkey coronavirus	індик	Респіраторна й кишкова інфекції	ND

^aND, не визначений.

III група, до того, включала тільки коронавірусів птахів, таких як вірус інфекційного бронхіту (IBV), коронавірус індиків (TCoV) [73] і коронавірус фазанів [17]. З часом, використовуючи ЗТ-ПЛР (RT-PCR), коронавірусні послідовності були виявлені в гуски сірої (*Anser anser*), дикого голуба (*Columbia livia*) і крижених (*Anas platyrhynchos*) [49]; філогенетичні аналізи послідовностей реплікази і нуклеокапсиду (N) дозволяють припустити, що ці віруси є членами III групи, але поки що вони не були виділені або описані [85].

Проте, з огляду на недавнє збільшення кількості нововиявлених коронавірусів, а також наступних дебатів і плутанини в літературі, щодо таксономії коронавірусів, учасники групи з дослідження Coronaviridae (CSG) розробили основу для узгодженої класифікації і встановили визначені критерії розмежування родів і видів. Міжгрупова попарна амінокислотна ідентичність справжніх коронавірусів була порівняна з розрахованими для структурних і неструктурних білків різних родів в інших родинях РНК-вірусів (наприклад, *Potyviridae*, *Picornaviridae*) [73].

Запропонований Виконавчим Комітетом Coronaviridae ICTV таксономічний перегляд і організація досі встановленої підродини *Coronavirinae* ґрунтуються на філогенезі та попарних порівняннях з використанням *Coronaviridae*-wide консервативних доменів реплікази поліпротеїну (ORF1ab), а також структурних білків S, E, M, N [73]. Виходячи з цього критерію, CSG де-факто сформулювала таксономічну пропозицію до Виконавчого комітету ICTV, яка б інтуїтивно слідувала неофіційній (але широко прийнятій) номенклатурі, щодо перетворення філогруп з I по III у роди, які визначені *Alpha* -, *Beta* - і *Gammacoronavirus*, відповідно. Віруси, згруповані у відомих в той час родах, формували окремі монофілогенетичні групи, але не мали інших очевидних рис (тропізм до господаря, органний тропізм і тип захворювання) для спільного знаменника [73].

Отже, в 1975 році Міжнародним комітетом з таксономії вірусів була створена родина *Coronaviridae*. У червні 2005 року, на 10-му Міжнародному Nidovirus симпозиумі в Колорадо-Спрінгс, штат Колорадо, було запропоновано

родину *Coronaviridae* розділити на дві підродини, *Coronavirinae* і *Torovirinae*, останні з яких викликають кишкові захворювання у великої рогатої худоби і, можливо, у людей [85]. Базуючись на організації консервативного генома та механізму реплікації, *Coronaviridae*, разом із сімействами *Arteriviridae*, *Mesoniviridae* і *Roniviridae*, належать до порядку *Nidovirales* [2, 82]. Назва останнього походить від унікальної стратегії зчитування генетичної інформації – формування мРНК з ідентичними 3' кінцями ланцюга під час інфекції [2].

Родина *Arteriviridae* включає збудників свиней і коней, а родина *Roniviridae* складається з вірусів безхребетних [85]. Отже, з точки зору сучасної таксономії вірусів родина *Coronaviridae* включає в себе дві підродини – *Coronavirinae* та *Torovirinae*, які демонструють подібність морфології, геномної організації та експресії генів [53]. Підродина *Coronavirinae* поєднує в собі більше десятка вірусів, що спричиняють захворювання у людей та тварин [1].

Згідно нової класифікації, затвердженої Міжнародним комітетом таксономії вірусів, у відповідності до генетичних та антигенних властивостей підродина *Coronavirinae* була розділена на чотири нових роди *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* і *Delta-coronavirus*, і кожен рід поділений на різні види [53]. Збудники, здатні спричиняти інфекційні захворювання у людини, віднесені до перших трьох родів, при цьому центральне положення займає рід *Betacoronavirus*, до якого входять віруси SARS-CoV та MERS-CoV [1].

Вірус трансмісивного гастроентериту свиней (TGEV), коронавірус собак (CCoV) і коронавірус котятих (FCoV) виявляють більш ніж 96% ідентичності послідовностей у поліпротеїновій репліказі pp1ab, тому були перегруповані разом утворивши, таким чином, перший вид *Alphacoronavirus 1* в межах роду *Alphacoronavirus* [52, 82, 83], що належить до родини *Coronaviridae*, підродини *Coronavirinae* [54, 84]. Обидва, ентеральний коронавірус тхорів (FRECV) і системний коронавірус тхорів (FRSCV) також належать до роду *Alphacoronavirus* [53]. Останнім часом, в геномі коронавірусу норок (MCoV), етіологічного агенту катарального гастроентериту норок, прослідковується близька генетична спорідненість з FRECV і FRSCV. Тому було запропоновано

об'єднати коронавіруси тхорів і норок у новий вид *Alphacoronavirus* 2 в роді *Alphacoronavirus* [53]. Інші, більш віддалено споріднені види в роді *Alphacoronavirus* включають вірус епідемічної діареї свиней (PEDV), людський коронавірус 229E (HCoV-229E) і людський коронавірус NL63 (HCoV-NL63) [82]. Виявлений собачий респіраторний коронавірус (CRCoV), став членом роду *Betacoronavirus* [34].

Філогенез

Коронавірус собак (CCoV) тісно пов'язаний з коронавірусами котів і свиней, з якими він входить до унікального вірусного виду [22, 54]. Тоді як респіраторний коронавірус собак (CRCoV) більш тісно пов'язаний з коронавірусом великої рогатої худоби [35].

Перше уявлення щодо філогенетичного положення штаму або виду коронавірусу, як правило, набувається конструюванням філогенетичного дерева з використанням короткого фрагмента консервативного гена, такого як Pol або N. Однак, іноді це може бути оманливим, оскільки результати філогенетичного аналізу з використанням різних генів або властивостей можуть бути різними. Коли SARSr-CoV вперше був виявлений, було запропоновано, створення четвертої групи коронавірусу. Проте, аналіз аміно-термінального домену S гену SARSr-CoV показав, що 19 з 20 залишків цистеїну були просторово збереженими в узгодженій послідовності *Betacoronavirus*. З іншого боку, тільки п'ять залишків цистеїну були просторово збережені в узгодженій послідовності *Alphacoronavirus* і *Gammacoronavirus*. Крім того, подальший філогенетичний аналіз із застосуванням повної послідовності геному дозволив зробити висновок, що SARSr-CoV, ймовірно, є раннім відокремленням від роду *Betacoronavirus*, тому SARSr-CoV згодом був класифікований саме як *Betacoronavirus* підгрупи B і історично *Betacoronavirus* як *Betacoronavirus* підгрупи A [87]. Тому філогенетичне положення коронавірусу краще оцінюється і підтверджується конструюванням філогенетичних дерев з використанням різних генів коронавірусного геному. Найчастіше для

філогенетичних досліджень використовуються гени вздовж генома коронавірусу, що включають хімотрипсин-подібну протеазу, Pol, геликазу, S і N, оскільки ці гени присутні у всіх коронавірусних геномах і мають значну довжину. Оболонки і мембрани генів, хоча і присутні у всіх геномах коронавірусу, занадто короткі для філогенетичних досліджень, вважає автор.

Дані молекулярної біології FCoV і CCoV швидко накопичувались з початку 2000-х років [52]. До 2000 року вважалося, що CCoV має лише один генотип, але в Італії було виявлено штам Elmo/02 з S-геном подібним до FCoV I типу. Штам Elmo/02 має новий ген ORF3 між генами S і ORF3a, який відсутній в інших *Alphacoronavirus* 1. Нарешті, цей подібний до FCoV-I CCoV був позначений, як CCoV I типу, а еталон – перший виявлений штам CCoV 1-71, був позначений, як CCoV II типу [54, 83]. Таким чином, існують два різних серотипи CCoV: тип I і тип II [20, 53, 81], які базуються на відмінностях у послідовностях амінокислот S-білка шипу [70, 81]. На відміну від FCoV, обидва генотипи CCoV зазвичай виявляються одночасно у однієї собаки, що допускає генетичну рекомбінацію. Крім того, нещодавно в штаммах CCoV-I було виявлено специфічний ген ORF, названий ORF3, розташований між кінцем гена S і геном ORF3a. Цей ген відсутній у всіх інших, досліджених до теперішнього часу, альфакоронавірусів (рис. 4). ORF3 кодує N-глікозильований білок 28 кДа з розщеплюваним N-кінцем, функція якого невідома. Ці дані надають уявлення про історію еволюції FCoV і CCoV [53]. Отже, CCoV-I і -II також можна розрізнити на основі наявності або відсутності цього гена [81]. Аналогічна ситуація в котів, де котячі коронавіруси також існують у вигляді двох еквівалентних серотипів (тип I і тип II), які різняться за антигенними білками шипів [54, 81]. Послідовності S білка є високо гомологічними між CCoV-I і FCoV-I, а також між CCoV-II і FCoV-II. Гомологія амінокислотної послідовності S білка становить близько 80% між CCoV-I і FCoV-I, тоді як між CCoV-I і CCoV-II / FCoV-II вона становить близько 50% [53, 81]. Було висловлено припущення, що тип I CCoVs і FCoVs еволюціонували зі спільного родового вірусу, і що лінії II типу собак і котів виникли внаслідок

багаторазових рекомбінацій з невідомим генетичним джерелом [53, 56]. ССoV-I, можливо, придбав ген ORF3 внаслідок розходження FCoV-I, або, в свою чергу, FCoV-I, можливо, втратив ген ORF3, присутній в спільного попередника. Придбання нового гена S призвело до виникнення ССoV-II, що, у свою чергу, призвело до появи FCoV-II через рекомбінацію з FCoV-I [56]. Більш детальна генетична характеристика призвела до того, що такі варіанти вірусів називаються "FCoV-подібними" ССoVs, виходячи з їх схожості із зазвичай циркулюючими штамми FCoV-I [70].

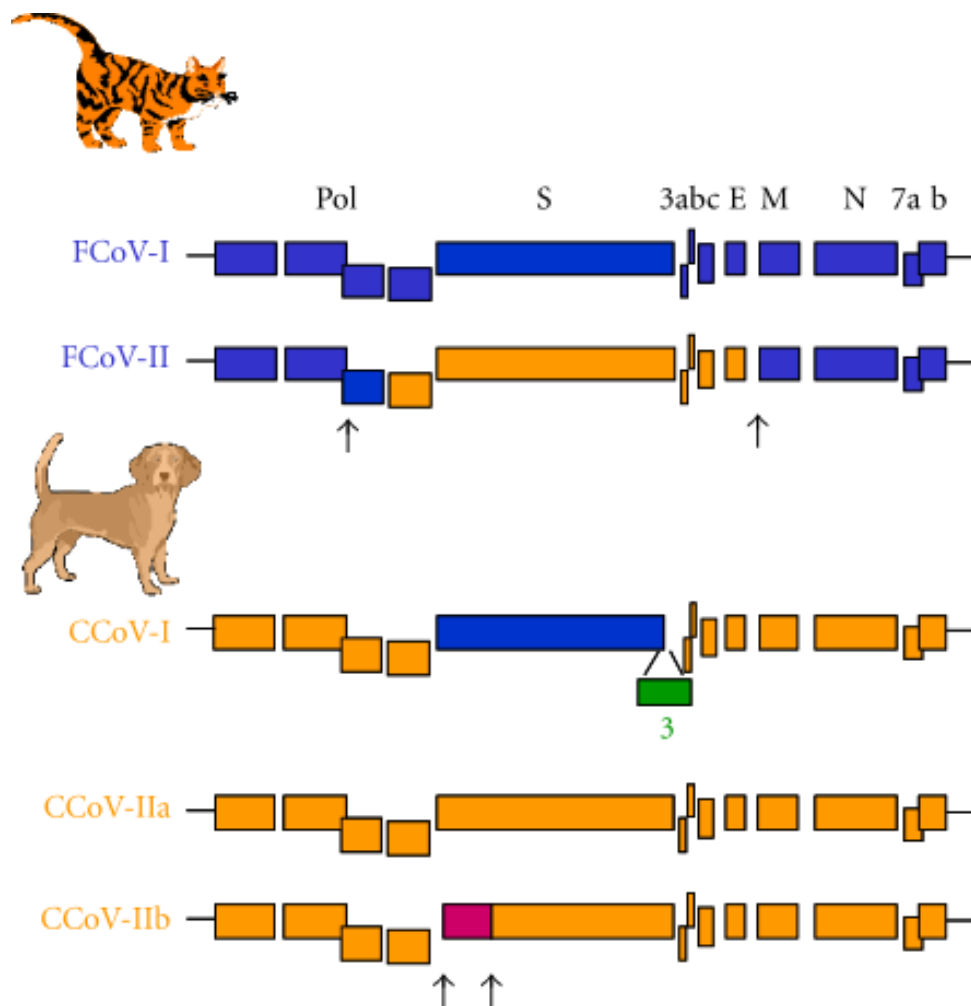


Рис. 4. Генетичні зв'язки між різними генотипами коронавірусів котячих і собачих (FCoV і ССoV): котячі послідовності пофарбовані в синій колір, собачі послідовності - в помаранчевий, а свинячі - у фіолетовий. Стрілки вказують на передбачувані ділянки рекомбінацій. Гени кодують полімеразний поліпротеїн (pol), структурний шип (S), оболонку (E), мембрану (M) і нуклеокапсид (N) вказаних білків. Гени, що кодують допоміжні білки, позначені цифрами. Le Poder S. Adv Virol., 2011; doi.org/10.1155/2011/609465

Подібно іншим CCoV, ці варіанти можуть бути виділені з фекалій молодих собак з діарейними захворюваннями [54]. Отже, штами CCoV-I були ідентифіковані на початку 2000-х років і спочатку були позначені як FCoV-подібні штами через гомологію їх послідовності в S гені з FCoV-I [70, 71]. У 2001 році, під час аналізу послідовностей CCoVs, виявлених у зразках фекалій, зібраних від собак з діареєю в Італії, спостерігали численні заміни nt, що накопичувалися над фрагментом гена M [73]. Точкові мутації, що впливають на ген M, пізніше спостерігалися в послідовностях CCoVs, виявлених у фекаліях двох природньо інфікованих цуценят на останніх стадіях тривалого виділення вірусу. Ці CCoVs відрізняються від CCoVs 1971 року, демонструючи очевидний генетичний дрейф у бік FCoVs типу II, тому було припущено, що дві собаки могли бути інфіковані змішаною популяцією генетично різних CCoVs, або що віруси, виявлені в обох цуценят були результатом мутацій/рекомбінацій [73]. Такі спостереження дали значущий імпульс до вивчення генетичної еволюції CCoVs. Екстенсивний аналіз послідовності на декількох ділянках (ORF1a, ORF1b, і зокрема ORF5) вірусного генома від CCoV-позитивних зразків фекалій, надав вагомі докази існування двох окремих генетичних груп CCoV. Перша група включає CCoVs, що змішуються з класичними штамами CCoV, такими як Insavc-1 і K378, тоді як друга група відокремлюється від CCoVs і, мабуть, являє собою генетичний витік, який згадується як FCoV-подібний CCoVs, зазначає автор. Можливим поясненням цих різних відокремлень є те, що в природних умовах часто відбуваються гомологічні рекомбінації між високо гомологічними CoV, такими як CCoV і FCoV [73, 81]. Де саме відбувається рекомбінація, неясно, але відомо, що CCoV здатний використовувати глікопротеїд котячої амінопептидази (fAPN) як клітинний рецептор і, що в експериментальних умовах коти можуть бути інфіковані CCoVs. А це означає, що часто відбувається міжвидова циркуляція, як FCoVs до собак, так і CCoVs до котів, оскільки змішані інфекції необхідні для рекомбінацій [73]. Отже, філогенетичний взаємозв'язок між, з одного боку, CCoV-I / FCoV-I, а з іншого боку, CCoV-II / FCoV-II, є очевидним, тому можна

припускати можливість міжвидової передачі збудників [52]. Зокрема, S-протеїн FCoV-II походить з CCoV-II, а S-протеїни FCoV-I і CCoV-I ідентичні на 81%, що потенційно може призвести до міжвидової передачі CoVs, оскільки S-протеїн є медіатором входу в клітину [52]. У 2006 році в австрійському притулку, де коти і собаки жили разом, Benetka й співавт. (2006) було проведено дослідження з метою кращого розуміння щодо штамів FCoV в котів, що живуть або ж ні в тісному контакті з собаками. Після аналізу послідовності фрагментів M і S генів, автори припустили, що деякі коти були інфіковані атиповими штамми, пов'язаними з CCoV-I [14]. Однак оскільки ген ORF3 не був описаний на той час, неможливо було підтвердити, що ці атипові штамми належали до генотипу CCoV-I [52]. Пізніше, Lorusso et al. (2008) описали додатковий ген ORF3, довжиною 624 nts, унікальний для CCoV-I. Ідентифікований додатковий ген ORF3, не виявлений в CCoV-II й інших альфакоронавірусів. ORF3 кодує неструктурний глікопротеїн з невідомою функцією [56]. За спостереженнями авторів, у білка з прогнозованою молекулярною масою близько 24 kd, довжиною 207 амінокислот, не було виявлено жодної трансмембранної області, що дозволяє припустити, що даний білок секретується з інфікованих клітин [73]. Le Poder S. й співавт. (2013) також було проведено дослідження серед котів приватних власників з метою вивчення можливого впливу присутності собак на поширеність коронавірусної інфекції в котів і генетичної характеристики штамів FCoV і штамів CoV собак, що мешкають з CoV інфікованими котами. За період 2003-2009 рр. у Франції та Румунії були зібрані ректальні мазки від 88 здорових котів і 11 зразків асцитної рідини від котів з клінікою вологої форми FIP. Серед них 19 жили з, принаймні, однією собакою в домогосподарстві, але відсоток інфікованих котів і неінфікованих котів, які перебували в тісному контакті з собакою статистично не відрізнявся [52]. Нарешті, дані авторів вперше продемонстрували циркуляцію атипових штамів FCoV серед котів, що містять ORF3 ген CCoV-I. Більше того, ORF3 гени, виявлені з котячих штамів, демонструють спільні делеції, які ніколи раніше не були описані, але саме такі делеції можуть мати

вирішальне значення при адаптації цих штамів до котячого організму. Але необхідно з'ясувати, чи будуть ці штами широко поширені серед популяції котів, для чого необхідно провести поглиблений філогенетичний аналіз послідовності геному по всій довжині, зауважують автори [52]. За іншим припущенням, рекомбінації розвивалися в господарів, відмінних від кішки або собаки, таких як дикі м'ясоїдні тварини або, можливо, вони мали безпосереднього предка CCoV. Аналіз коронавірусних РНК, виділених від різних м'ясоїдних тварин може пролити світло на ці гіпотези. Згідно цих теорій, в геномі CoVs можуть існувати обмежені рекомбінаційні ділянки, такі як області з дуже високою nt ідентичністю між високо гомологічними CoVs. Це тлумачення припускає, що CoVs у м'ясоїдних тварин мають свого роду «динамічний» геномом [73].

CCoV і TGEV також, очевидно, тісно пов'язані між собою. TGEV, ймовірно, виник з CCoV-II [56]. Подальша рекомбінація між цими вірусами призвела до появи нового кластера CCoV-II (раніше названого TGEV-подібним CCoVs), в якому N-кінець шипа білка був дуже схожий на TGEV, тоді як решта геному асоційовані з еталонними ізолятами CCoV-II (див. рис. 4) [29]. У свою чергу, після цього відкриття, генотип CCoV-II був розділений на два різних підтипи: CCoV-IIa, що містить референс-штам CCoV (класичні штами) і CCoV-IIb, що виник внаслідок рекомбінації між CCoV-IIa і вірусом трансмісивного гастроентериту (TGEV) [20, 22, 29, 52, 53, 56, 65]. Класифікація на CCoV IIa і IIb офіційно не прийнята в CCoV систематиці, але широко цитується в літературі. Дана класифікація CCoV-II в різних підтипах (CCoV-IIa, CCoV-IIb) була запропонована на основі послідовності перших 300 амінокислот білка шипу, ділянки, відомої як N-кінцевий домен (NTD). Останній є важливим фактором, який визначає кишковий тропізм в спорідненому TGEV [54]. Віруси CCoV-IIa мають NTD, що відповідає прототипу CCoV. Ці віруси існують у двох біотипах, які відрізняються патогенністю й тканинним тропізмом. Біотип "класичного" CCoV-IIa обмежується тонким відділом кишечника, де викликає ентерит. На відміну від нього "пантропний" біотип

ССоV-IIa, який з'явився, може поширюватися системно, викликаючи лейкопенію [23]. Buonavoglia С. і співавт. (2006) повідомляли, що в Європі було зареєстровано штам СВ/05 ССоV-IIa з високою вірулентністю. У СВ/05-інфікованих цуценят спостерігали такі клінічні ознаки, як млявість, блювота, діарея і гостра лімфопенія, а вірусний геном було виявлено в тканинах поза кишечником, включаючи мозок. Більше того, імунна відповідь, індукована кишковим ССоV, не захищала собак від інфікування СВ/05 [15, 29]. Другий варіант, ССоV-IIb був вперше ідентифікований в Італії та Великобританії [29]. ССоV-IIb генетично відрізняється від ССоV-IIa, причому в ССоV-IIb 5'-кінцева область S-гену подібна до TGEV і вважалося, що ССоV типу IIb виник через рекомбінацію між ССоV-IIa і TGEV [29]. Як і TGEV, ССоV-IIb викликає ентерит в новонароджених тварин. РНК ССоV-IIb була виявлена методами ПЛР в різних органах за межами кишкового тракту, переважно в собак, паралельно інфікованих парвовірусом, [29], але також в собак з невизначеним статусом захворювання [23]. Експерименти, в яких коронавіруси, відмінні від ССоVs, були введені собакам, ніколи не проводилися і в польових умовах від інфікованих тварин були виявлені тільки послідовності ССоVs. Проте порівняння послідовностей свідчить про те, що TGEV виникає внаслідок міжвидового стрибка ССоV-II від собак до свиней [53]. Крім того, нещодавно описаний ССоV-IIb, є результатом подвійної рекомбінації між ССоV-II і TGEV, що свідчить про те, що ко-інфекція відбулася, принаймні, в одного з видів господаря [53]. R. Graham і R. Baric (2010) також повідомляли, що CoVs, зокрема такі як SARS-CoV, мають тенденцію до зміни діапазону господарів шляхом мутації та/або рекомбінації [43]. Тому дослідження гомологічної рекомбінації CoVs можуть допомогти з'ясувати механізми, відповідальні саме за зміни діапазону господарів, зауважують [83]. Хоча, загалом, діапазон господарів коронавірусів надзвичайно вузький. Здатність коронавірусу реплікуватися в певному типі клітин залежить виключно від здатності взаємодіяти з його рецепторами [85]. Рекомбінації є добре описаним процесом, важливим для еволюції геному в багатьох біологічних системах,

який відіграє основну роль у поширенні, вірулентності та патогенезі. Загалом, стратегії побудови рекомбінантно-резистентних РНК-вірусів були обмежені CoVs і, меншою мірою, ентеровірусами. У контексті зараження CoV рекомбінація відбувається, коли вірусна РНК-залежна РНК-полімераза (RdRp) змінює шаблони під час синтезу РНК, використовуючи саму утворену РНК як праймер, як тільки RdRp реасоціюється з геном шаблону. Імовірність виникнення рекомбінації регулюється кількома вірусними факторами, включаючи швидкості реплікації, вторинну структуру РНК, розмір геному і природу реплікази/транскриптази протеїнового комплексу; однак спадковість рекомбінації, як тільки вона сталася, опосередковується реплікаційною здатністю отриманого потомками геному [42]. У декількох повідомленнях описано появу CoVs з посиленою вірулентністю, яка, за даними геномного аналізу, виникла в результаті рекомбінацій споріднених вірусів птиці і ссавців, включаючи SARS-CoV. Більше того, незаперечні докази свідчать, що обидва потенційно смертельні людські CoVs, SARS-CoV і MERS-CoV виникли з кількох видів CoV, було показано, що в резервуарах таких видів як кажани, в межах колоній і серед окремих інфікованих тварин часто ідентифікувалися геноми рекомбінантних РНК, збільшуючи ймовірність рекомбінаційних керованих змін у видовій специфічності і вірулентності [42]. Таким чином, адаптація SARS-CoV від кажана до людини супроводжувалася кількома мутаціями в різних ділянках геному, в тому числі характерною делецією 29-nt в межах додаткового гена ORF8 [52]. Отже, враховуючи драматичні наслідки SARS-CoV інфекції і, останнім часом, нової MERS-CoV інфекції, краще розуміння молекулярних процесів, що ведуть до появи коронавірусів, залишається вирішальним [89]. У цьому контексті спостереження за коронавірусами тварин залишається важливим не тільки тому, що коронавіруси тварин часто відповідають за основні ветеринарні захворювання, а також тому, що накопичені знання внесуть значний внесок у розуміння генетичної еволюції і патобіології коронавірусів [52].

Видові особливості коронавірусів

Коронавіруси є унікальними серед РНК-вірусів у багатьох аспектах їх біології. Вони характеризуються надзвичайно великим геномом, вкладеним набором субгеномних мРНК, переривчастим механізмом транскрипції і високою частотою рекомбінацій РНК через високу частоту помилок РНК-полімерази [73]. Генетична рекомбінація є важливим механізмом для генерування нових геномів, які можуть мати вибіркові переваги над попередніми геномами. В еволюції РНК-вірусів рекомбінація РНК є поширеним явищем, яке формує віруси шляхом перебудови вірусних геномів або поширення функціональних модулів серед різних вірусів [73]. Однією з найбільш інтригуючих особливостей РНК є її здатність нести генетичну інформацію, незважаючи на її лабільний характер [73]. Висока частота рекомбінації РНК у CoVs, ймовірно, є результатом унікального механізму синтезу коронавірусу, який передбачає переривчасту транскрипцію і стрибки полімерази. Можливо, що вірусна полімераза, пов'язана з неповною РНК, що народжується, дисоціює від свого шаблону в випадковій точці і переходить на гомологічну ділянку іншого шаблону РНК, щоб завершити синтез РНК за допомогою механізму копіювання [73]. Залежно від точності репаративного механізму, відновлений геном може бути подібним до батьківського геному або може містити в подальшому мутації. Це ілюструє, що різноманітність послідовностей в РНК, генерованих генетичною рекомбінацією, може включати як грубі зміни, так і незначні мутації. Генетична відмінність в межах альфакоронавірусу пояснюється лінійною еволюцією, а також різкими змінами, спричиненими делеціями або рекомбінацією РНК [73].

Коронавіруси викликають гострі та хронічні захворювання органів дихання, кишечника та центральної нервової системи (ЦНС) у багатьох видів тварин, включаючи людей [85, 77, 83].

Коронавіруси людини

Збудники, здатні спричиняти інфекційні захворювання у людини, віднесені до перших трьох родів (*Alpha-, Beta-, Gamma- coronavirus*), при цьому центральне положення займає рід *Betacoronavirus*, до якого входять віруси SARS-CoV та MERS-CoV [1]. У людей коронавіруси спричиняють гострі респіраторні захворювання верхніх дихальних шляхів, ТГРС та БСРС. Деякі представники роду *Alphacoronavirus* (HCoV-229E, HCoV-NL63) і *Torovirus* (HToV) здатні спричиняти гастроентерити та інші ускладнення з боку ШКТ, що проявляються гарячкою, болями у животі та діареєю [1]. Серед коронавірусів людини найкраще вивчені штами: HCoV-229E, HCoV-OC43, HECoV та SARS-CoV [1]. Коронавірусна інфекція верхніх дихальних шляхів зумовлена коронавірусами HCoV 229E, HCoV NL63, BetaCoV1 (стара назва HCoV OC43), HCoV HKU1 та HToV [1]. Коронавіруси HCoV 229E, HCoV NL63, BetaCoV1, HCoV HKU1 та HToV мають повсюдне поширення. Коронавірусна інфекція у вигляді спорадичних випадків реєструється впродовж усього року. В умовах помірного клімату характеризується підйомом захворюваності взимку та на весні. Хворіють діти та дорослі. Діти хворіють у 5–7 разів частіше, ніж дорослі. Інфекція поширюється повітряно-краплинним, фекально-оральним та контактним шляхами передачі [1]. Коронавіруси людини є зоонозними збудниками з великими й складними геномами [38].

За структурою, генетичними та антигенними властивостями SARS-CoV був віднесений до родини *Coronaviridae*. Було встановлено, що геном SARS-CoV представлений одноланцюговою молекулою РНК+, має 29727 пар нуклеотидів та 11 рамок зчитування (ORF). Геноми 4-х відомих на сьогодні штамів SARS-CoV різняться між собою за 24 позиціями нуклеотидів, а також мають певні відмінності від геномів інших добре вивчених коронавірусів людини і тварин. До найбільш важливої особливості геному належить висока частота рекомбінацій молекули РНК. Найбільшу генетичну спорідненість SARS-CoV має з коронавірусом котів та бичачим коронавірусом, а також з коронавірусом свиней [1]. За ознаками патогенності вірус віднесено до II групи,

тому робота із вірусовмісним матеріалом має проводитись із дотриманням правил та заходів біобезпеки, передбачених щодо мікроорганізмів II групи патогенності, у відповідних акредитованих лабораторіях, повідомляє автор.

MERS-CoV – це ГРБІ, спричинена новим коронавірусом, що відноситься до роду *Betacoronavirus* [2, 62, 89]. MERS у людей в основному відомий, як захворювання нижніх дихальних шляхів, що включає лихоманку, кашель, задишку й пневмонію, які можуть прогресувати до гострого респіраторного дистрес-синдрому; досить часто спостерігається загострення хронічної соматичної патології. Останні дві характеристики є основними причинами летальних наслідків (від 20% до 40% інфікованих) [1, 2, 55, 58, 64, 89]. Проте, MERS-CoV також може бути виявлений при легких і хворобах, схожих на грип, а також в тих, хто не має ознак або симптомів [58]. Описано легкі та безсимптомні випадки захворювання, що викликає занепокоєння фахівців у зв'язку з можливістю прихованого розповсюдження захворювання, хоча реальна оцінка ймовірності такого сценарію досі залишається невизначеною, зауважує [1]. Але, в порівнянні з важким гострим респіраторним синдромом (SARS) й іншими, іноді фатальними зоонозними коронавірусними хворобами, що з тих пір зникли, MERS дуже швидко прогресує до респіраторної недостатності й гострого ураження нирок (має спорідненість до розвитку в клітинах нирок в лабораторних умовах) в пацієнтів з основним захворюванням і часто є фатальним [58].

За побудованим філогенетичним деревом найбільшу генетичну спорідненість MERS-CoV має з вірусами котячого перитоніту FCoV (NC007025), HCoV-229E (NC002645), вірусами епідемічної діареї свиней PEDV (NC003436), HCoV-NL63 (DQ445911), коронавірусами кажанів BatCoV-1A (NC010437), BatCoV-512 (DQ648858), коронавірусами телят BCoV (NC003045), HCoV-OC43 (AY585228), HCoV-HKU1 (AY884001), вірусами гепатиту мишей MHV (NC006852), BatCoV-HKU5 (EF065509), BatCoV-HKU9 (EF065513), SARS-CoV (AY345988), BatCoV-HKU4 (EF065505), вірусом пташиного

інфекційного бронхіту IBV (NC001451) та коронавірусами білуг BWS-CoV (EU111742) і HCoV-EMC (JX869059) [1, 89].

Коронавіруси свиней

Вивчено кілька коронавірусів свиней [75]. Вірус трансмісивного гастроентериту був визнаний в 1946 р. Він є основною причиною вірусного ентериту і фетальної діареї у свиней; найбільш важкий перебіг зі смертністю у новонароджених, що призводить до значних економічних втрат [85]. У новонароджених TGEV уражує епітеліальні клітини тонкого кишечника, що призводить до потенційно смертельних гастроентеритів. Інфекція також трапляється у верхніх дихальних шляхах і, рідше, в легенях [75]. У дорослих TGEV викликає легке захворювання. Респіраторний вірус свиней (PRCoV) є ослабленим варіантом TGEV. PRCoV інфікує епітеліальні клітини легень і антиген знаходиться в пневмоцитах I і II типу, а також альвеолярних макрофагах; інфекція супроводжується інтерстиціальною пневмонією. Геноми TGEV і PRCoV на 96% є ідентичними, за винятком 5'області гена шипа, і різниця в патогенному результаті між двома штамами пов'язана з делеціями різної довжини (нуклеотиди 45-752) в межах 5' кінця гена шипа PRCoV. Отже, виникнення PRCoV з TGEV є результатом делеції в гені шипа і є прикладом еволюції коронавірусу зі зміненим тканинним тропізмом, а також зниженою вірулентністю [75]. Відносно новим коронавірусом свиней I групи є PEDV. Цей вірус з'явився в Європі наприкінці 1970-х у 1980-х роках і поширився в Азію, але в США повідомлень не було [75]. Цікаво, що антитіла до PEDV не нейтралізують TGEV. PEDV демонструє деякі характеристики людських коронавірусів в тому, що він генетично більш схожий з HCoV-229E, ніж інші коронавіруси I групи і, як SARS-CoV, повторюється в клітинах Vero [75]. Іншим свинячим коронавірусом II групи, є гемаглютинуючий ентєральний коронавірус, антигенно не пов'язаний з іншими свинячими вірусами [85].

Коронавіруси великої рогатої худоби

BCoV, за серологічними даними, є поширеним вірусом у всьому світі. BCoV викликає як респіраторну, так і кишкову форми хвороби, включаючи діарею телят, зимову дизентерію у дорослих і респіраторні інфекції великої рогатої худоби різного віку, в тому числі з лихоманкою. Віруси, виділені від великої рогатої худоби або з респіраторною, або з кишковою хворобою, антигенно схожі. Епідеміологічні дослідження показують, що сироваткові антитіла корелюють з імунітетом. У даний час відсутні вакцини для запобігання захворювання, пов'язаного з BCoV [75].

Пташиний коронавірус

IBV викликає сильно заразне захворювання у курчат; поширюється аерогенно, отже, має значне економічне значення для птахівництва. IBV, який реплікується в тканинах верхніх дихальних шляхів за інфекції бронхів і важкому захворюванню у молодняку, також був виявлений у фазанів і індиків. Деякі штами IBV викликають більш системні інфекції, реплікуються в інших тканинах, включаючи нирки (викликають нефрит), яйцепроводи (призводить до зниження виробництва яєць) і кишечник [75]. Хоча кури всіх віків є сприйнятливими, пташенята демонструють більш важкі респіраторні ознаки і значно вищу смертність, ніж старша птиця. Хоча механізми захисту від IBV-індукованого захворювання є не повністю ясними, вважається, що високі рівні антитіл запобігають поширенню вірусу з дихальних шляхів в інші органи. Показано, що материнські антитіла також захищають від інфекції IBV протягом перших 2 тижнів життя [75].

Мишачий коронавірус

Існує багато штамів мишачого коронавірусу, або MHV, які демонструють різний тропізм і рівні вірулентності. MHV, який часто вивчався як прототип коронавірусу, являє собою групу високо пов'язаних штамів, що викликають різні хвороби, такі як гепатити, кишкові й респіраторні захворювання, а також

енцефаліт і хронічну демієлінізацію. Зазвичай лабораторними штамми заражають, головним чином, печінку і головний мозок і тим самим забезпечують тваринні моделі енцефаліту і гепатиту, а також імуноопосередковану демієлінізуючу хворобу, яка розвивається пізніше після інфекції, досягаючи піку приблизно через 1 місяць після інфекції. MNV-інфекція вважається однією з кращих тваринних моделей для дослідження демієлінізуючих захворювань, таких як розсіяний склероз. Інші штами викликають кишкову хворобу, легко поширюються орально-фекальним шляхом в колоніях тварин і є особливою небезпекою для імунодефіцитних тварин. Але патогенез інфекції MNV наразі широко досліджений, а також отримані результати імунної відповіді господаря. Зрозумілим є те, що рівень вірулентності й тропізм штамів MNV є результатом взаємодії вірусного геному та імунної відповіді господаря [85].

Коронавіруси котів

FCoV дуже поширений у розплідниках, де до 80% тварин є серопозитивними, а в домашніх господарствах інфіковано від 10 до 50% кішок [53]. Історично, два генотипи FCoV були виділені методами *in vitro* в реакції нейтралізації вірусів, використовуючи або типові специфічні сироватки котячих, або моноклональні антитіла, вирощені проти білка S [53]. Протягом багатьох років FCoVs були класифіковані на різні біотики на основі їх патобіології. Авірулентні штами, які зазвичай індукують легкі або субклінічні симптоми, називають котячими кишковими коронавірусами (FECV) [53, 75]. Вірулентні штами викликають інфекційний перитоніт котячих і називаються котячими вірусами інфекційного перитоніту (FIPV). Котячий кишковий коронавірус, який, зазвичай, зустрічається в котячій спільноті, де багато котів в стані безсимптомного носійства, спричиняє серологічну конверсію. FIPV, менш поширений варіант FCoV, має здатність реплікуватися в макрофагах, викликаючи важкі і летальні захворювання [75]. FIPV реплікується спочатку в фарингіальних респіраторних або кишкових епітеліальних клітинах.

Інфікування макрофагів призводить потім до віремії та системного поширення вірусу, включаючи запалення черевної і грудної порожнин, а також іноді викликає очні та неврологічні розлади. Ускладнення інфекції FIPV включає імунно-опосередковану патологію [85]. Обидва кошачі генотипи можуть бути відповідальними за легкі кишкові або FIP захворювання. FIP залишається рідкісним явищем, і лише в незначній кількості котів, інфікованих FCoV (до 10%), розвивається хвороба. Виявлено дві форми FIP: волога/виразна форма з накопиченням характерної в'язкої жовтої рідини в порожнинах тіла і суха/невиразна форма з піогранульоматозними ураженнями, що охоплюють декілька органів. Обидві форми є прогресивними і, зрештою, смертельними [53]. Дослідження в генетичних аналізах показали, що FCoVs типу II походять від подвійної рекомбінації між FCoV і CCoV типу I, в результаті чого геном складається з послідовностей FCoV, але з геном S і його сусідніми послідовностями, що походять від CCoV. У польових умовах переважає серотип I FCoV, що викликає від 80% до 95% інфекцій. Проте, більшість досліджень були проведені з типом II, який легко розмножується в культурах клітин [53].

Коронавіруси собак

Коронавірус собак (CCoV) є причиною спорадичних спалахів ентериту в собак [68]. Загалом CCoV визнається етіологічним агентом самообмежених інфекцій тонкої кишки, що може призводити до помірного гастроентериту [22, 54]. Легке захворювання або безсимптомне носійство, ймовірно, в більшості випадків є звичайними наслідками інфекції. Коронавірусний ентерит собак (CCoV) є поширеною інфекцією, як правило, в молодих собак, особливо тих, що перебувають у великих групах, такі як псарні, притулки і розплідники [10, 20, 54, 65, 76, 79]. Однак кілька років тому був виділений сильно вірулентний штам (panotropic CCoV), який спричинив спалах смертельних, системних захворювань в цуценят. Цей штам демонстрував деякі генетичні зміни відносно існуючих штамів, що циркулюють в популяції собак [22]. За визначенням [53],

котячі й собачі коронавіруси є загальними збудниками в котів і собак, які здатні викликати фатальні інфекції, такі, як інфекційний перитоніт в котів (FIP) і пантропну коронавірусну інфекцію в собак. У собак виявлено коронавіруси роду *Alphacoronavirus* і респіраторний коронавірус роду *Betacoronavirus* [81]. Собачий коронавірус, що входить до складу роду *Alphacoronavirus* родини *Coronaviridae*, є оболонковим, одноланцюговим позитивним РНК вірусом. Повідомлялося про два різних генотипи, а саме: CCoV-I і CCoV-II, причому CCoV-II поділяється на два підтипи, CCoV-IIa і CCoV-IIb, на основі генетичної спорідненості до вірусу трансмісивного гастроентериту (TGEV) свиней. Хоча вірус, зазвичай, відповідає за помірний гастроентерит, пантропний варіант CCoV-IIa, штам CB/05, був пов'язаний з системним смертельним захворюванням у молодих собак, і подібні вірулентні штами були виявлені в декількох країнах [15, 24, 91]. CCoVs, як і інші CoVs, демонструють відносно високу частоту мутацій, тому в останні десятиліття були описані відмінні штами. У одному з перших спостережень було показано, що хоча більшість послідовностей CCoV є FCoV-подібними, N-кінець гена S CCoV штаму UCD-1 виявився більш спорідненим з TGEV. Але на той час були визначені лише часткові послідовності S-генів, що перешкоджало повній характеристиці геному. Нові штами CCoV були суворо пов'язані з TGEV в N-кінцевому домені шипу білка, натомість решта геному мало більш високу генетичну спорідненість з ізолятами CCoV типу 2 [73]. У Австралії в 2001 році було повідомлення про випадок смертельного гастроентериту в племінних цуценят з послідуною ідентифікацією нового CCoV штаму UWSMN-1 [73]. Аналіз послідовності фрагментів S і полімеразних генів підтвердив, що австралійський ізолят відрізнявся від класичних штамів CCoV і FCoV, було встановлено, що UWSMN-1 мав 21 неповторні ділянки, а також було 112 ділянок, де штам відрізнявся від, щонайменше, одного з проаналізованих штамів. Ці відмінності, які випадково чередуються, ймовірно, не є результатом рекомбінацій між FCoV і CCoVs, як було б зазначено, якби ген S мав спільні блоки гомології з будь-якими FCoV або CCoV S генами. Швидше за все, UWSMN-1 є, мабуть,

дивергентним через поступове накопичення мутацій по всьому геному, що може відображати його ізольовану еволюцію в Австралії [73]. У 2002 році у Великій Британії стався епізоотичний спалах діареї в розпліднику біглів. Було виділено і описано новий CCoV, штам BGF10. У вірусу виявилася дуже дивергентна область у аміно-кінцевому домені М-білка і довгий неструктурний білок 3b з 250 амінокислот, пов'язаний з вірулентністю в інших CoVs [73]. V. Zarrulli і співав. (2008) провели імуногістохімічну ідентифікацію вірусу й вперше описали морфологічні зміни, пов'язані з пантропним типом II коронавірусу, який виявився причиною смертельної інфекції в собаки породи пекінес 53-денного віку [90]. У 2005 році в Італії була описана смертельна хвороба цуценят, а з усіх досліджених тканин, крім головного мозку, виділено патогенний варіант CCoV-II, штам CB/05, який порівняно з авірулентними CCoVs. Цікаво, що послідовність 3'-кінця геному пантропного штаму CCoV показала високу ступінь ідентичності амінокислот з CCoV-II, за винятком S-білка, який проявляв найвищий ступінь ідентичності до FCoV-II штаму 79-1683 [24, 53, 73]. Згодом, з'явилося перше повідомлення про смертність, пов'язану тільки з пантропним собачим коронавірусом за межами Італії, а саме у Франції та Бельгії в 2008-2009 рр.. У більшості випадків це було одночасно з собачим парвовірусом 2с. Але один з спалахів смертельної гострої системної хвороби був пов'язаний лише з пантропним коронавірусом [91]. Пізніше, N. Decaro і співав. (2012) повідомили про генетичну і біологічну характеристики нового пантропного собачого коронавірусу (CCoV), штаму 450/07, який став причиною смерті карликового пінчера 60-денного віку. Після експериментального зараження новим пантропним ізолятом, в більшості інфікованих собак спостерігали діарею і гостру лімфопенію. Значні пошкодження і гістологічні зміни в основному спостерігали в кишечнику і лімфоїдних тканинах, хоча в деяких тварин виявили також виразні зміни і в паренхіматозних органах [21].

Іншим прикладом очевидної еволюції собачих коронавірусів, внаслідок накопичення точкових мутацій, невеликих вставок і делецій в кодуючих і не кодуючих областях геному, є порівняно недавня ідентифікація в зразках

тканин, зібраних з респіраторного тракту хворих собак нового коронавірусу, собачого респіраторного коронавірусу CRCoV. Під час обстеження у розпліднику у Великій Британії, метою якого було встановлення причини інфекційного респіраторного захворювання в собак, у трахеальних і легневих зразках собак з помірними клінічними симптомами був виділений CRCoV [73]. Вірус продемонстрував тісний зв'язок з полімеразою та S-генами бетакоронавірусу, з найвищою ідентичністю амінокислот з відповідними білками BCoV і виявився лише віддалено пов'язаним з кишковими CCoV. За результатом порівняння послідовностей кДНК-полімерази, в аналізованих 251 послідовностях, ідентичність з BCoV становила 98,8%, а з геном полімерази HCoV 98,4%, тоді як з CCoV штаму 1–71 лише 68,5%. Більш того, було продемонстровано в геномі CRCoV присутність HE-гена, який є характерним для білку членів бетакоронавірусів [34, 35]. Хоча респіраторний коронавірус собак (CRCoV) є важливим респіраторним патогеном, який поширений у багатьох країнах, до теперішнього часу була отримана тільки одна повна послідовність геному CRCoV (штам K37 з Південної Кореї) [57]. Масштабний геномний аналіз і рекомбінація рідко проводилися, через невелику кількість зразків і обмежену геномну характеристику. [57] повідомили про унікальний штам CRCoV, позначений, як штам BJ232, отриманий від CRCoV-позитивної собаки з легкою респіраторною інфекцією. Філогенетичний аналіз, заснований на повному геномі всіх доступних коронавірусів, показав, що штам BJ232 CRCoV найбільш тісно пов'язаний з людським коронавірусом OC43 (HCoV-OC43) і BCoV [57]. Отже, еволюція бетакоронавірусів тісно пов'язана, тому було висловлено припущення, що вони мають спільного недалекого предка. CRCoV може також мати цього предка або, можливо, походить від передачі BCoV собакам. Для того, щоб остаточно відповісти на запитання, чи з'явився CRCoV лише нещодавно, необхідно перевірити велику кількість архівних матеріалів, вважає [73]. Крім того, для проведення філогенетичних досліджень, які можуть пролити світло на їх походження, необхідно більше інформації щодо послідовностей штамів CRCoV, зазначає автор.

Патогенез коронавірусної інфекції

В умовах *in vivo* основними клітинами-мішенями для коронавірусів є епітеліальні клітини та макрофаги, що мають на своїй поверхні спеціальні рецептори, які розпізнає та з якими взаємодіє поверхневий S-білок вірусу [1].

S. R. Weiss і S. Navas-Martin (2005) у своїй роботі наголошують, що використання рекомбінантних коронавірусів, включаючи MHV, TGEV і IBV, остаточно продемонструвало, що шип є основним фактором, що визначає тропізм і патогенність. У випадку TGEV, заміна гену шипу ослабленого респіраторного штаму TGEV на ген шипу вірулентного ентерогенного штаму надає вірусу ентеротропність [85]. Але дослідження химерних рекомбінантних вірусів A59/JHM продемонстрували, що інші гени, крім шипу, грають важливу роль у визначенні тропізму. Таким чином, білок шипу є визначальним фактором тропізму, отже, впливає на патогенез; однак, не тільки шип є вирішальним фактором патогенезу, і, як свідчать дані, інші вірусні структурні гени також різко впливають на патогенез [85].

Життєвий цикл коронавірусу собак був істотно вивчений у лінії клітинної фібросаркоми собак (клітини A-72). Інфекція призвела до апоптозу, який може бути причиною патології, індукованої CCoV інфекцією [53]. Відомо, що кишковий CCoV, як і FECV, інфікують ентероцити, тоді як клітинний тропізм пантропного коронавірусу залишається неясним. У результаті проведеної імуногістохімії тканин собак які одужали, було виявлено коронавірусні антигени в макрофагах різних органів, що нагадує FIP-інфекцію котів [90]. Моноцити крові можуть також підтримувати реплікацію вірусу, про що говорить наявність вірусної РНК в лейкоцитах крові [20]. У даний час, експерименти на ізольованих моноцитах крові або макрофагах кісткового мозку, такі як описані у випадку FIPV, не проводилися. Такі дослідження можуть бути важливими в майбутньому для визначення ролі макрофагів у патобіології пантропного коронавірусу. Нарешті, інфекцію незрілих лімфоцитів

не можна виключити, оскільки в тимусі були виявлені високі рівні РНК, що, можливо, пояснює сильне виснаження популяції клітин CD4 + [53].

Масштаби природного захворювання, індукованого собачим коронавірусом, є недостатньо зрозумілими, оскільки патогенез CCoV ще не достатньо визначений. Раніше повідомлялося, що інфекція була пов'язана з помірним або важким гастроентеритом, але зараз з'ясовується, що CCoV є переважно легким або субклінічним захворюванням, з низькими показниками смертності. За великим рахунком, при аналізі послідовності генів М- і S-білків CCoV, встановлена одночасна присутність двох генотипів CCoV у фекаліях цуценят. Значимість цієї знахідки неясна, оскільки важко зрозуміти, чому два генотипи CCoV були присутніми в собак одночасно, зазначає [68].

CCoV є кислотостійким, тому без змін проходить через шлунок. Віремія і генералізована інфекція не спостерігаються. Поверхневий епітелій тонкого кишечника є основною мішенню CCoV, натомість товстий кишечник є стійким до інфекції. Через 2 дні після орального зараження, CCoV можна виявити в цитоплазмі зрілих епітеліальних клітин ворсинок верхніх двох третин дванадцятипалої кишки, на відміну від собачого парвовірусу типу 2 (CPV-2), який знищує епітелій кишкових крипт [54, 68]. У той же час, невеликі кількості вірусу можуть бути виділені з мезентеріальних лімфатичних вузлів, а іноді, з печінки й селезінки. У цю фазу вміст вірусу в фекаліях дуже високий [68]. У відповідь на втрату війок ентероцитів спостерігається підвищення мітотичної активності епітелію крипт і збільшення пулу незрілих ентероцитів. Втрата війок зрілих ентероцитів викликає атрофію кишкових ворсинок і, як наслідок, послаблення збереження цілісності кишкового бар'єру [54]. Після четвертого дня інфікування в тонкому кишечнику зазвичай виявляється неоднорідний розподіл інфікованих ворсинок [68]. Разом ці зміни в морфології тонкого відділу кишечника призводять до втрати нормальної травної і абсорбційної функцій, а також клінічних ознак діареї і дегідратації в хворих собак [54, 68]. У новонароджених собак вірус реплікується, в першу чергу, в ентероцитах на верхівках ворсинок тонкої кишки, спричинюючи літичну інфекцію з

подальшою десквамацією і вкороченням ворсинок, що призводить до діареї через 18–72 год після інфекції, яка триває кілька днів. Продукція місцевих IgA обмежує поширення вірусу в кишечнику і затримує прогресування інфекції [68, 73]. Відновлення кишкових ворсинок відбувається в дванадцятипалій кишці приблизно на сьомий день після інфекції і, незабаром, у всій тонкій кишці. З прогресуванням одужання зменшується вивільнення вірусу в фекаліях [68].

У експериментальному дослідженні N. Decaro і співавт. (2010) продемонстрували, що штам CB/05 CCoV-II здатний інфікувати собак, серопозитивних до кишкових CCoVs та індукувати клінічні ознаки незалежно від дози вірусу, що вводилася собакам. У інфікованих собак спостерігали лімфопенію, а вірусна РНК була виявлена в тимусі, селезінці й лімфатичних вузлах деяких собак, демонструючи лімфотропізм нового CCoV-II штаму CB/05 [26]. Інфекція штамом CB/05 показала, що результат хвороби залежить від віку на момент інфекції. Цуценята старші 6-ти місяців можуть одужати, тоді як у молодших цуценят (2-3 місяці) розвиваються найбільш тяжкі симптоми. Лімфопенія – одна з основних особливостей CCoV пантропної інфекції, як за природних, так і експериментальних інфекцій. Хоча протягом першого тижня після інфікування спостерігається тимчасове зменшення популяцій Т і В-клітин, популяція CD4⁺Т-клітин залишається виснаженою протягом 30 днів після інфекції, що може викликати дисфункцію імунної системи і сприяти опортуністичним інфекціям [53]. Таким чином, собаки серопозитивні до кишкових CCoVs, є сприйнятливими до пантропних вірусів, але клінічні ознаки є помірними порівняно з такими у серонегативних собак, ймовірно, внаслідок часткового перехресного захисту, індукованого антитілами проти кишкового CCoV [26].

Паралельно проводилися дослідження щодо патогенезу SARS-CoV-інфекції людини. Широко вважається, що SARS є вірусною пневмонією. Проте, в пацієнтів з SARS можуть також проявлятися гастроінтестинальні симптоми, а також атрофія селезінки і лімфаденопатія. Діарея є дуже частим явищем у пацієнтів з SARS (від 30 до 40% пацієнтів). SARS-CoV реплікується в

ентероцитах з мінімальним порушенням архітектури кишечника. Відсутність запалення кишечника було припущено як результат підвищеної регуляції трансформаційного фактора росту β і протиапоптозної клітинної реакції господаря в епітеліоцитах кишечника. Недавні дослідження, зроблені на основі автопсій пацієнтів з атиповою пневмонією, показали, що SARS є системним захворюванням з широко розповсюдженою позалегеневою дисемінацією, що призводить до виділення вірусу з респіраторним секретом, випорожненням, сечею і, навіть, потом [85].

SARS-CoV-інфекція макрофагів *in vitro* призводить до ініціації вірусної реплікації і синтезу вірусного білка, але ця реплікація є неефективною, і вірусні частинки не продукуються [85]. Також було повідомлено, що SARS-CoV реплікується в моноклеарних клітинах периферичної крові (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) пацієнтів з SARS. Аналіз експресії генів в PBMCs пацієнтів з SARS з використанням платформи мікрочіпів, що включає більше 8000 послідовностей генів, свідчить про те, що реакція пацієнтів з SARS, як виявляється, не стільки специфічна імунна відповідь на вірусну інфекцію, скільки переважно природна запальна реакція. Автори аналізу не виявили суттєвого підвищення регулювання основного комплексу гістосумісності генів I класу або основних цитокінів, включаючи IFN (IFN- α , IFN- β і IFN- γ), або генів, що залучені до комплемент-опосередкованого цитолізу. Вони дійшли висновку, що імунна відповідь проти SARS-CoV може відрізнятися від імунної відповіді за інших вірусних інфекцій або що вірус може використовувати незвичайну стратегію ухилення від імунної системи господаря, спричиняючи патогенез і смертність [85]. Саме лімфопенія і збільшення вірусного навантаження в перші 10 днів хвороби свідчать про ухилення від імунітету SARS-CoV. Є повідомлення про відсутність IFN- β -відповіді в інфікованих SARS-CoV клітинах *in vitro*, з використанням первинних дендритних клітин людини мієлоїдного ряду, а також епітеліальної клітинної лінії 293 [85]. Отже, механізм лімфопенії залишається неясним. Через відсутність експресії ACE2 в Т- і В-клітинних лімфоцитах, малоімовірно, що лімфопенія, індукована SARS-

CoV, може бути викликана прямою вірусною інфекцією. Було висловлено припущення, що швидше апоптоз неінфікованих лімфоцитів може призвести до гострої лімфопенії, що спостерігається у пацієнтів з SARS [85].

Вплив змішаної інфекції на завершення хвороби лишається незрозумілим, оскільки рівень смертності й тривалість діареї, як виявилось, не залежать від цих факторів, вважають [40]. А за даними [18], серед 25 CCoV-позитивних цуценят п'ятеро мали смертельний результат, при чому всі, крім одного, були з випадками змішаної інфекції. За даними [68, 73], лабораторні експерименти, а також дані польових спостережень показують, що одночасне поєднання інфекцій CCoV і CPV2 є особливо важким, але CCoVs також можуть посилити тяжкість послідовного інфікування CPV2. За даними автора, після розтину трупів собак був ізольований CCoV, який посилював тяжкість більш тривалої CPV2 інфекції. У даному випадку, CCoV було виявлено в цуценят одного приплоду, які померли з ознаками важкого геморагічного ентериту через 15 днів після зараження CPV-2b [68].

Отже, фактори, що регулюють перебіг природних захворювань, викликаних кишковими CCoVs, недостатньо вивчені. CCoVs є відповідальними за ентерит у собак, а ознаки інфекції можуть змінюватися від легких до помірних, але є більш важкими в молодих цуценят або в поєднанні з іншими патогенами [73]. Усі наведені дані викликають ряд питань і більш глибоких досліджень патобіології CCoVs типу 1 та 2. Безуспішне виділення CCoV типу 1 *in vitro* [73] ускладнює отримання ключової інформації щодо патогенетичної ролі CCoV типу 1 в собак і перешкоджає достовірній оцінці імунологічних характеристик цього нового генотипу, зазначає автор.

Епізоотологічна характеристика коронавірусної інфекції собак

Незважаючи на те, що смертельні інфекції не є характерними, якщо вони не поєднуються з іншими інфекціями або з перенаселеністю та антисанітарними умовами, CCoV сам може бути визначальним збудником, відповідальним за епізоотії [73]. На думку А. Pratelli (2005), CCoV інфекція є ензоотичною в усьому світі, адже присутність вірусу була продемонстрована в Європі, Сполучених Штатах, Таїланді й Австралії [68]. Серологічні дослідження проведені в деяких країнах демонструють, що показники поширеності коливаються від 0 до 80%; за даними проведеного масштабного дослідження, 45% серопозитивних випадків були зареєстровані в здорових собак, в порівнянні з 61% собак з діареєю. Але на ріст поширеності впливає і кількість досліджуваних собак; зазвичай, більш високі показники спостерігаються в ендемічно заражених розплідниках, а не в домашніх чи лабораторних собак [68]. Усі дослідники зазначають, що коронавірусний ентерит собак є поширеною інфекцією, як правило, в молодих собак, особливо тих, що перебувають у великих групах, такі як псарні, притулки і розплідники [10, 20, 54, 65, 76, 79].

За повідомленням Десаго Н. й співав. (2011), в Західній Європі було проведено епідеміологічне дослідження парвовірусної (CPV) і коронавірусної (CCoV) інфекцій собак. Використовуючи молекулярні аналізи для виявлення й характеристики вірусів, було встановлено, що CPV і CCoV значно поширені в європейських популяціях собак, як поодиноці, так і при змішаних інфекціях [16, 31, 91]. Також ко-інфекції CCoV і CPV-2 були задокументовані в популяціях собак в Японії [78].

За виключенням Великобританії, CCoV-I був ідентифікований в усіх європейських країнах, що брали участь в дослідженні, хоча і з меншим рівнем поширеності, ніж CCoV-II [31]. Натомість, за даними [81] в Японії, протягом 2011-2014 рр., у зразках фекалій собак, інфікованих CCoV були виявлені CCoV-I у 88,9%, CCoV-II – у 7,4% відповідно. Було показано, що в собак, інфікованих

ССоV, рівень інфекції ССоV-I був дуже високим, і собаки, інфіковані ССоV-I були в Японії, принаймні, з 1998 року. Хоча ССоV наразі є важливим патогеном, у В'єтнамі інформація щодо ССоV інфекції взагалі була відсутня. Перший опис ССоV інфекції серед в'єтнамських собак було проведено в дослідженні Nguyen D. і співав. (2017), які показали, що у В'єтнамі серед домашніх собак циркулюють обидва субгенотипи (ССоV-IIa і ССоV-IIb), але не ССоV-I. Результати RT-PCR також підтвердили, що ССоV-IIb є основним генотипом [63].

У ряді досліджень були задокументовані ко-інфекції штамів ССоV-I та ССоV-II [18, 22, 78]. Неочікувано, але 36,9% - 76,8% собак з діареєю були одночасно інфіковані обома типами ССоV, як I так і II, зазначено в роботах [28, 78]. А. Pratelli (2011) також повідомляла, що біомолекулярний аналіз зразків фекалій, зібраних від інфікованих собак в Італії, показав значну поширеність інфекції ССоVs, яка часто характеризується появою обох генотипів одночасно [73]. ССоVs типу 1 і 2 виявилися поширеними в австралійському притулку для тварин, причому превалював ССоV-I [15]. А за даними V. Ntafis і співав. (2013), у 47% позитивних зразків було виявлено більше одного генотипу/підтипу ССоV, в тому числі, вперше було виявлено потрійні інфекції ССоV-I / ССоV-IIa / ССоV-IIb [65]. Загалом в Греції в період 2007-2009 роки від собак з діареєю з розплідників, зоомагазинів і ветеринарних клінік різних регіонів країни було зібрано 206 зразків фекалій. З використанням RT-PCR і RT-PCR в режимі реального часу ССоV був виявлений у 65,1% собак, частіше їх виявляли в тварин молодше 3 місяців і в тварин, що знаходяться в групах [65].

У Франції та Бельгії в період 2008 -2009 роки вперше було повідомлено про п'ять спалахів смертельної системної хвороби [91]. Перший і другий спалахи спостерігалися серед мініатюрних пінчерів у розпліднику Bourg Fidèle (Франція). Третій і четвертий спалахи сталися в зоомагазині в Перувельсі (Бельгія). П'ятий спалах стався в Ауденбурзі (Бельгія). Під час спалахів з першого до четвертого були підтверджені інфекції CPV 2c та ССоV-I або II. Високий рівень геному CPV 2c було виявлено у фекаліях (від 1.99×10^{10} до

4.31×10^{11} ДНК копій/мг), крім того, органи загиблих цуценят були позитивними на ССoV-II (від 4.65×10^4 до 4.01×10^9 РНК копій/мг). Під час другого спалаху, в цуценят виявили зараження ССoV-I (від 6.36×10^7 до 3.22×10^9 РНК копій/мг у тканинах кишечника, селезінці й легенях) та CPV 2с. У одного з цуценят позитивним на ССoV був також головний мозок, а в іншого ССoV був виявлений у зразку з нирки. П'ятий спалах був особливо цікавим, оскільки був спричинений моноінфекцією ССoV-II, що призвела до смерті одного з уражених цуценят. Вірус був виявлений в усіх досліджених тканинах (кишечнику, селезінці, печінці та легенях) [91]. Отже, це стало другим повідомленням щодо смертельної пансистемної хвороби в собак, викликаной виключно ССoV-II інфекцією. Клінічні ознаки та патологія органів були подібні до тих, що спостерігалися під час італійського спалаху з пантропним варіантом ССoV-II [15]. У більшості з повідомлених випадків ветеринари підозрювали інфікування CPV-2. Хоча судоми можуть бути присутніми у випадку виключно CPV-2 інфекції, вони також систематично спостерігаються за асоціацій з пантропними ССoV інфекціями, як під час поєднаної інфекції з CPV-2, так і моно-ССoV інфекціями [91]. Таким чином, пантропна ССoV інфекція, очевидно, є новою хворобою в європейських країнах, за винятком Італії, що свідчить про подальше її поширення [91]. Циркуляція високочутливих штамів ССoV-I та ССoV-IIb, а також виявлення відмінного штаму ССoV-IIa викликає занепокоєність в дослідників з приводу важливості цих нових штамів, як первинних збудників діарейних синдромів діагностованих в собак [65]. Поширеність собачого пантропного коронавірусу наразі невідома, тому необхідні подальші епідеміологічні дослідження для визначення його розподілу в популяціях собак, наголошує [53].

Згідно з серопозитивними (показано як природна інфекція, оскільки використовувалися невакциновані вуличні собаки) і антиген-позитивними результатами дослідження, Авсі О. й співав. (2016) зробили висновок, що в турецьких вуличних собак ССoV інфекція є значно поширеною, і може бути віднесена до одного з важливих вірусних патогенів собачих. Усі тварини, які

належали власникам, за результатами дослідження, були антиген-негативними. Серопозитивність на CCoV була виявлена в 46 (24,46%) з 188 собак непрямим методом ELISA, в той час як тільки один лейкоцитарний зразок (0,53%) був виявлений як антиген-позитивний ІФ [13].

У дослідженні Costa E.M. й співав. (2014) було протестовано 250 зразків фекалій, зібраних протягом 2006-2012 рр. і вперше надана молекулярна характеристика штамів CCoV-I, IIa і IIb, що циркулюють в цуценят з діареєю в Бразилії. Використовуючи RT-PCR для часткового посилення М гена, РНК CCoV була виявлена в 30 зразках. Аналіз послідовності М-протеїна згрупував вісім штамів CCoV-I і 19 штамів з прототипом CCoV-II. У 17/25 зразків виявлено одиничні інфекції: шість CCoV-I, дев'ять CCoV-IIa і два CCoV-IIb. Вісім зразків були позитивними для більш ніж одного генотипу/підтипу наступним чином: сім CCoV-I / IIa і один CCoV-I / IIb. Аналіз послідовності показав, що штами CCoV-I і IIa мають високу генетичну схожість один з одним та з прототипами [18].

За даними [84], CCoV інфекція є провідною причиною діареї в популяції собак у Китаї. Раніше Wang та співавт. (2006) повідомляли, що інфекції CCoV-II дуже поширені в популяції домашніх собак, лисиць і єнотовидних собак в Китаї. Були повідомлення Gao й співавт. (2009) про ізоляцію й ідентифікацію штамів CCoV від гігантських панд в Китаї. Проте інформація щодо епідеміології CCoVs в Китаї за останні п'ять років не доступна, зазначають [84].

Щоб простежити еволюцію собачого коронавірусу (CCoV) на північному сході Китаю, авторами було досліджено 201 зразок фекалій собак з діареєю з використанням RT-PCRs. RT-PCRs показала, що 28,36% (57/201) зразків були позитивними на CCoV; з 57 позитивних зразків, CCoV-I і CCoV-II виявлені у 15,79% (9/57) і 84,21% (48/57), відповідно [84]. Дані авторів свідчать про значну напруженість штамів CCoV-I, CCoV-IIa і CCoV-IIb, які спільно циркулюють в собак з діареєю на північному сході Китаю, також дослідники спостерігали високі темпи асоційованої інфекції з CaKV (33,33%) і CPV-2 (31,58%), і високу поширеність і генетичне різноманіття штамів CCoV-II. За результатами

дослідження саме ССоV-II, що становить 84,21% з 57 позитивних зразків, був переважним типом ССоV на північному сході Китаю, що відповідає більшості повідомлень [84].

Отже, в сучасних літературних джерелах є численні повідомлення з різних регіонів світу щодо виявлення ССоV-позитивних зразків фекалій: 43,75% в Китаї [84], 32,83% в Кореї [48], 50,46% в Японії [78], 54,39% в Албанії [16], 12% в Бразилії [18], 61,1% в Греції [65], 51,3% в Італії, 80% в Бельгії, 60% в Нідерландах, 38,09% в Німеччині, 12,5% у Великобританії, 36,17% в Іспанії і 11,54% у Франції [31]. Наведені вище дані чітко демонструють, що прояви коронавірусної інфекції різняться в різних географічних регіонах. Також поширеність ССоV в собак з діареєю значно відрізняється за статусом імунізації, сезонами і віковими групами [84].

Щодо поширеності ССоV інфекції в масштабах України інформація відсутня, є лише окремі повідомлення стосовно ситуації в окремих містах [9, 10]; щодо розподілу різних генотипів/патотипів в популяціях собак, тим паче. М. Радзиховським (2016) було проведено моніторингові дослідження проб, отриманих від собак з кишковими проблемами та ознаками діареї, що обслуговувались в ветеринарних клініках Житомира та Києва за період з 2007 по 2015 роки. Представлені дані свідчать, що найрозповсюдженішим ентеровірусом за 2007 – 2015 роки був парвовірус, 1237 (51,6 %) позитивних проб з 2396 досліджуваних. Стосовно інформації щодо корона– та ротавірусу, дослідження даного напрямку проводились в період з 2010 по 2015 роки. При діагностиці корона– та ротавірусного ентериту було досліджено 535 та 371 проб тварин і виявлено 99 (18,5 %) та 87 (23,5 %) позитивно реагуючих [9]. Отже, проведені М. Радзиховським (2016) дослідження показали, що за останні роки коронавірусний ентерит став неодмінною складовою етіологічного спектру хвороб з ураженням шлунково-кишкового тракту. Результати дослідження свідчать про значну розповсюдженість даної хвороби особливо за 2014 та 2015 роки (рис. 5). Таким чином, динаміка виявлення собак з коронавірусним ентеритом на території таких міст як Київ та Житомир, в

певній мірі співпадають з науковими публікаціями закордонних авторів, про розповсюдженість даного ентеровірусу в світі [8].

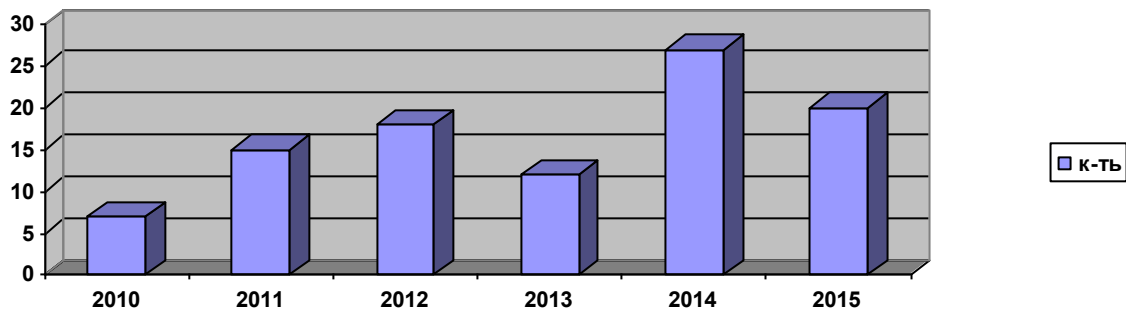


Рис. 5. Динаміка захворюваності собак коронавірусним ентеритом за 2010 – 2015 рр.

У дослідженнях Такапо Т. et al. (2016) не було виявлено кореляції між ССоV інфекцією і віком, статтю або породою собак, але коли собаки обмежувалися симптомами діареї, рівень інфекції був вище в собак молодше одного року, про що також повідомляли [78]. Таким чином, в собак молодше одного року, інфікованих ССоV, швидше за все, розвинеться діарея, тоді як у віці одного року або в старших собак навряд чи. Однак, зв'язок між ССоV інфекцією в собак і віком має бути всебічно оцінений на предмет наявності або відсутності змішаної інфекції з іншими патогенами, імунного стану і середовища, в якому утримуються собаки [81]. Усі зразки були отримані від домашніх собак, але не відомо, чи утримувалися вони окремо або в групі. Крім того, враховуючи наявність кішок, інфікованих ССоV-подібним вірусом, в дослідженні також необхідно враховувати утримання собак разом з котями, зауважує автор. Під час дослідження ССоV-позитивних зразків Х. Wang і співав. (2016) прослідковували чіткі відмінності між сезонами, а також між віком [84]. Висока поширеність ССоV у фекаліях собак з діареєю у віці 2-4 місяці була частково підтверджена в інших дослідженнях [16, 18]. М. Радзиховським (2016) було встановлено, що найбільшу схильність до коронавірусного ентериту відмічали в групі собак від 5 до 8 місяців. Дещо рідше діагностували ентеровірус в групі від 8 до 12 місяців (рис. 6). Аналізу піддавали собак з кишковими проблемами та ознаками діареї, що

обслуговувались у ветеринарних клініках Житомира та Києва за період з 2010 по 2015 роки. За визначений проміжок часу в ході проведення експерименту було відібрано від 535 собак проби для дослідження. Дані тварини мали клінічні ознаки типові для ентеритів вірусної етіології. З досліджуваних проб позитивно реагували 99 собак, а 436 були негативними до коронавірусу [8].

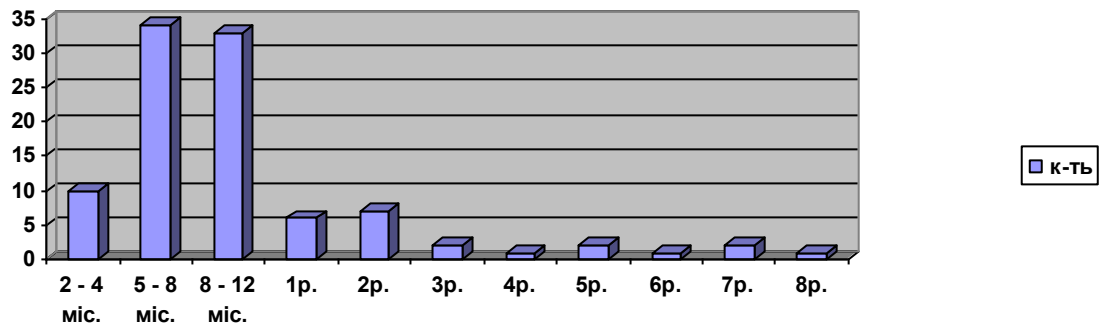


Рис. 6. Результати досліджень вікової схильності до захворювання на коронавірусний ентерит.

А. Pratelli (2005) зазначає, що собаки будь-якого віку є схильними до CCoV, але розвиток клінічно вираженої інфекції більше спостерігається в молодих цуценят [68]. У дослідженні сезонності захворювання Х. Wang і співав. (2016), високий позитивний рівень (56,14%) CCoV був виявлений з жовтня по грудень, що може бути пов'язано з сезонними коливаннями на північному сході Китаю, відмічають автори [84]. Дані наведені М. Радзиховським (2016) свідчать про те, що пік захворюваності відмічається у весняно-літній період. Водночас було відмічено, що дане захворювання реєструється впродовж року практично у рівних співвідношеннях (рис. 7) [8].

За результатами досліджень Авсі О. й співав. (2016), не було статистичної значимості при визначенні CCoV антигену між суками (31/67) і кобелями (15/65), тоді як наявність CCoV антигену у вуличних собак (46/111) була вищою ($P < 0,05$), ніж в домашніх собак (0 / 31) [13]. Значним аспектом вивчення епізоотичного процесу є породна схильність до інфекційного захворювання.

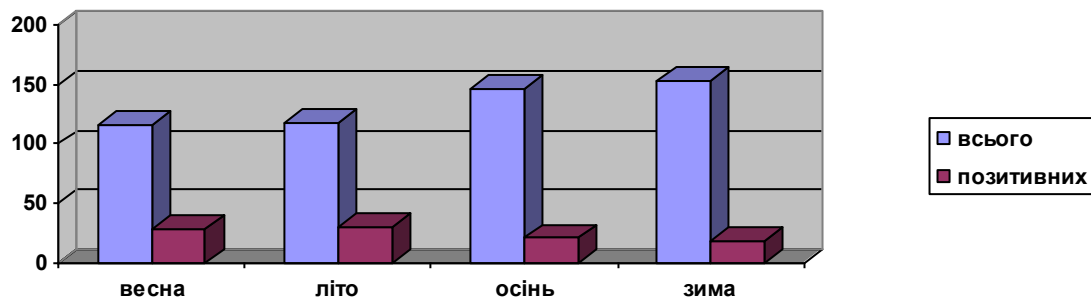


Рис. 7. Результати досліджень сезонної схильності до захворювання на коронавірусний ентерит.

Під час досліджень М. Радзиховським (2016) була проаналізована чутливість до коронавірусного ентериту у собак 49 порід, що обслуговувались в ветеринарних клініках Києва та Житомира. За результатами дослідження було встановлено, що найбільш часто хворіли собаки таких порід, як ротвейлер, джек рассел тер'єр та бігль. Меншу чутливість до коронавірусу проявляли чихуахуа, той тер'єр та боксер. Відносно стійкими породами виявились французький бульдог та лабрадор. Також було з'ясовано, що метиси виявляли схильність до коронавірусу, незважаючи на існуючу теорію про значну резистентність таких порід собак [8].

Природним шляхом передачі коронавірусу є фекально-оральний, а вірус у фекаліях є основним джерелом інфекції [73], однак, неясно, чи може відбуватися передача іншими шляхами, включаючи повітряно-крапельний [54]. Заражені собаки, як правило, виділяють SCoV з фекаліями протягом 6-9 днів, але, як показано, інфіковані собаки можуть виділяти вірус до 6 місяців після припинення клінічних ознак [68, 73].

Клінічні ознаки коронавірусної інфекції собак

ССоV загалом вважається легким, але дуже заразним ентеритом молодих собак, найчастіше до 12-тижневого віку. У деяких випадках ССоV інфекція може бути фатальною, особливо в цуценят, інфікованих іншими патогенами, такими як парвовірус. Отже, діапазон клінічних ознак від рідкого стулу, втрати апетиту до важкої водянистої діареї, зневоднення з високою захворюваністю і інколи смертністю, що в основному визначається віком на момент виникнення інфекції, типом виявлених патогенів і ступенем колострального імунітету [54, 73].

Інкубаційний період короткий. Блювота й діарея можуть спостерігатися через 1-3 дні після зараження, а коли з'являються клінічні ознаки, вірус швидко поширюється. Вірус є високо контагіозним і часто може викликати клінічні ознаки в деяких собак, але при цьому хвороба не спостерігається в інших контактних тварин. Фекалії можуть бути слизовими або водянистим, іноді з домішкою крові і з неприємним запахом. Цуценята стають зневодненими, з ознаками депресії і анорексії, навіть якщо інфузійна терапія починається рано. Зазвичай підвищення температури тіла відсутнє, але в ряді випадків спостерігається. На відміну від CPV-2 інфекції лейкопенія не спостерігається, зазначає [68]. Блювота також є набагато менш серйозною, ніж при зараженні CPV-2, зазвичай закінчується після першого дня захворювання, але діарея зберігається кілька днів, навіть 3-4 тижні. Вторинні бактеріальні, паразитарні інфекції або інші вірусні, такі як CPV2 або ротавіруси, можуть посилювати і продовжувати захворювання. Однак собаки зазвичай одужують спонтанно протягом тижня, але хвороба може тривати 2 тижні або довше. Смертність від ССоV інфекції, як правило, дуже низька, однак є повідомлення про смертність в деяких розплідниках, особливо цуценят [68].

За результатами дослідження М. Радзиховського (2017) за 2014–2016 рр. було виявлено, з характерними клінічними ознаками хвороби, та підтверджено одним із методів: експрес-тест або лабораторно – шляхом ПЛР або ІФА і

виявлення антигену, діагноз на коронавірусний ентерит у 10 собак. Встановлено, що температура тіла хворих тварин була в межах норми – $38,9 \pm 0,05^\circ\text{C}$. У собак були відібрані зразки крові для морфологічних і біохімічних досліджень. У хворих собак відзначали зниження кількості еритроцитів. Причиною цього, ймовірно, був інфекційний агент у крові хворих, що викликав гемоліз червоних кров'яних клітин (табл. 2).

Таблиця 2.

Морфологічні показники крові собак інфікованих збудником коронавірусного ентериту, $M \pm m$, $n = 10$

Показники		Одиниці виміру	Норма	Хворі собаки
Еритроцити		Т/л	5,5–8,5	$5,20 \pm 1,34$
Гематокритна величина		%	37–55	$35,2 \pm 5,4$
Тромбоцити		Г/л	150 - 500	$343,6 \pm 134,04$
Лейкоцити		Г/л	8,5–10,5	$4,606 \pm 0,98$
нейтрофіли	П.	%	1 - 6	$1,66 \pm 1,44$
	С.	%	40 - 71	$73,6 \pm 5,77$
Еозинофіли		%	2–9	$3,0 \pm 0,81$
Моноцити		%	1–5	$1,75 \pm 0,95$
Лімфоцити		%	21–40	$18,4 \pm 4,22$
ШОЕ		мм/год.	2,0–5,0	$7 \pm 1,41$

Гематокритна величина у інфікованих тварин була дещо нижче норми, що відповідало стану собак у яких відмічали дегідратацію внаслідок проносу. У хворих собак відмічали виражену лейкоцитопенію. Цей факт пов'язаний з тим, що вірус розмножується швидким діленням в клітинах кісткового мозку, а саме – лейкоцитах. Частка еозинофілів і моноцитів в межах норми. Відмічали зниження лімфоцитів, що є характерним для гострих інфекційних процесів. Також відмічено зсув лейкоцитарної формули вправо за рахунок підвищенням кількості сегментованих ядерних форм нейтрофілів.

Концентрація гемоглобіну, вміст кальцію, фосфору, глюкози, сечовини й креатиніну в хворих тварин не виходили за межі фізіологічних коливань (табл. 3).

Таблиця 3.

Біохімічні показники у собак інфікованих коронавірусним ентеритом, $M \pm m$, n = 10

Показники	Одиниці виміру	Норма	Хворі собаки
Глюкоза	ммоль/л	3,4 - 6	$3,39 \pm 0,57$
Білірубін загальний	мг/л	0 - 5	$1 \pm 0,28$
Калій	ммоль/л	4 - 5,6	$2,435 \pm 0,44$
Кальцій	ммоль/л	1,87 - 2,8	$2,52 \pm 0,056$
Фосфор	ммоль/л	0,68 - 2	$1,45 \pm 0,07$
Магній	ммоль/л	0,8 - 1	$0,8 \pm 0,14$
Лужна фосфатаза	од/л	10 - 150	$310,8 \pm 63,35$
Нв (гемоглобін)	г/л	120 – 180	$131,04 \pm 27,15$
Загальний білок	г/л	51 - 78	$39,55 \pm 12,37$
АсАТ	од/л	5 - 55	$26,7 \pm 6,08$
АлАТ	од/л	9 - 75	$36,75 \pm 6,43$
Сечовина	ммоль/л	3,5 - 9,2	$4,205 \pm 0,41$
Креатинін	мкмоль/л	26 - 120	$48,8 \pm 27,15$

Водночас, слід відзначити, що вміст глюкози та креатиніну у хворих на коронавірусний ентерит собак є нестабільним показником. Проте середнє значення було в межах норми. Вміст загального білка, за коронавірусного ентериту в собак знижувався, оскільки у хворих собак відмічали зниження апетиту. Білок до організму надходив у недостатній кількості та враховуючи ураження кишечника, практично не всмоктувався в ньому. Гіпопротеїнемія відображає процеси ураження печінки, оскільки більшість його фракцій синтезується гепатоцитами. Проведені комплексні дослідження вказали, що в собак, хворих на коронавірусний ентерит, характерними є зміни морфологічного та біохімічного складу крові. Таким чином, коронавірусний

ентерит у собак характеризується зменшенням кількості лейкоцитів на 46%, еритроцитів на 5% і лімфоцитів на 13% та зменшенням гематокритної величини на 5 % нижче мінімальної межі норми. За коронавірусного ентериту у собак вражається печінка, про що свідчить зменшення рівня загального білка на 23% порівняно з мінімальними значеннями норми. Захворювання характеризується гіперактивністю лужної фосфатази в двічі у порівнянні із максимальними значеннями нормативу. Зміни біохімічних показників не є неспецифічними, проте, відображають глибину патологічних процесів, які ускладнюють перебіг коронавірусного ентериту. Одержані результати співпадають з даними літератури і показали, що в інфекційний процес втягується печінка [7].

В останні роки збільшується число повідомлень про інфекції в цуценят сильно вірулентними CCoV без наявних ко-інфекцій [15, 36, 37, 61, 66, 90, 91]. У випадку "пантропних" вірусів CCoV-IIa інфекція призводить до фатальної поліорганної хвороби, що має різні клінічні ознаки, подібні до парвовірусної інфекції собак, включаючи гіпертермію, геморагічний гастроентерит, неврологічні ознаки й лімфопенію. Найбільш послідовною клінічною ознакою пантропного CCoV-IIa є лейкопенія [23]. S. Le Poder (2011) у своїй роботі також наголошує, що лімфопенія – одна з основних особливостей CCoV пантропної інфекції, причому як за природних, так і експериментальних інфекцій [53].

Патоморфологія коронавірусної інфекції собак

За даними [68], морфологічно, пошкодження в собак, заражених CCoV, обмежені кишечником і мезентеріальними лімфатичними вузлами, в яких знаходять розширення і збільшення кишкових петель, заповнених фекальними масами і набряклі мезентеріальні лімфовузли. Така макроскопічна картина, описана в літературних джерелах, характеризує коронавірусний ентерит, спричинений CCoV-I. Мікроскопічно пошкодження характеризуються атрофією і злиттям кишкових ворсинок, розширенням крипт, збільшенням проникливості власної пластинки слизової оболонки з сплюсненням епітеліальних клітин і вивільненням келихоподібних клітин [68]. Інфіковані війчасті ентероцити зазнають дегенерації, що характеризується їх вкороченням, деформацією і втратою мікроворсинок війчастої облямівки, що призводить до злушення некротизованих клітин у просвіт [54].

V. Zappulli і співав. (2008) вперше повідомили опис морфологічних змін, пов'язаних з пантропним типом II коронавірусу, який виявився причиною смеральної інфекції в собаки породи пекінес 53-денного віку. Дослідниками проведено опис патологічних змін та імуногістохімічна ідентифікація з використанням моноклональних антитіл собачого коронавірусу. Ураження внутрішніх органів включали розливу фібринозно-гнійну бронхопневмонію, множинні ниркові кортикальні інфаркти, поєднання важкого ступеня централобулярного ожиріння печінки з незначними ділянками некрозів, а також множинні фокуси геморагій з лімфоїдним виснаженням селезінки. Помірний хронічний дифузний ентерит був пов'язаний з інвазією дорослими аскаридами. Ідентифікація типу I і типу II коронавірусу в даному випадку була раніше підтверджена ПЛР зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (RT-PCR) при аналізі вмісту кишечника, в той час як тільки тип II коронавірусу був виявлений у вісцеральних органах [90].

Пізніше A. Zicola і співав. (2012) були проведені патоморфологічне та вірусологічне дослідження під час спалахів пантропної коронавірусної інфекції

у Франції та Бельгії. Дослідники під час розтину відбирали кишечник, селезінку, печінку, легені та мозок і аналізували за допомогою ПЛР. Також проводили гістопатологічне дослідження. Посмертно було виявлено ряд змін в кишечнику і деяких органах. Уміст шлунково-кишкового тракту, як правило, був скудним, слизовим і жовто-коричневим. Макроскопічні зміни, у випадку гострого від легкого до помірного ентериту, як правило, обмежувалися тонкою кишкою. Уражені ділянки стінки кишечника були від рожевого до червоного кольору, іноді мали злегка суху і шорстку поверхню з петехіями. Регіональні мезентеріальні лімфатичні вузли були збільшені (1,5 – 2 - кратно); деякі з них були у вигляді агломератів і мали петехії або більш великі геморагії. У одного цуценя виявили виразки шлунка, пов'язані з меленою. У іншого виявили венозний інфаркт вторинного сегмента інвагінації. У багатьох цуценят (11/15) виявлено ознаки від легкого до важкого гепатозу. Селезінка незначно збільшена і ущільнена. У деяких тварин виявлено набряк легень [91].

У випадку пантропної інфекції гістопатологічне дослідження А. Zicola і співав. (2012) показало, що ворсинки кишечника вкорочуються і часто злипаються. Пошкодження в'їчастого епітелію авторами не були інтерпретовані через автоліз. Численні крипти були розширені й містили дегенеровані і некротизовані клітини, особливо в ділянці основи. Підгострий ентерит характеризувався помірною інфільтрацією моноклеарними запальними клітинами власної пластинки. Лімфоїдна тканина була набрякла, а в деяких вузлах спостерігалось виснаження лімфоїдних клітин, у той час як лімфоїдна гіперплазія не спостерігалася. Спостерігалися від легких до важких дегенеративні зміни гепатоцитів; цитоплазма була прозорою, містила мікровакуоли і була негативною в реакції Шиффа (що підтверджує гепатоцелюлярний мікроезистемний стеатоз). Виявляли набряк легень. У п'яти собак спостерігалася підгостра інтерстиціальна пневмонія від мультифокальної до дифузної і альвеолярний набряк [91].

У більшості досліджень пантропного СCoV-2 повідомляється про виявлення вірусної РНК в різних тканинах, включаючи легені, лімфатичні

вузли, печінку, селезінку, нирки, сечовий міхур і головний мозок. Докази реплікації пантропних вірусів за межами шлунково-кишкового тракту базувалися на виявленні антигену SCoV шляхом імуногістохімічного фарбування легеневої тканини, відібраної від хворої собаки зазначають [15], також є повідомлення про виділення вірусу з різних вісцеральних органів [15, 23]. Хоча ізоляція вірусу часто є безуспішною, навіть в тканинах з найвищими рівнями вірусних РНК [23, 66]. Генетичні маркери для пантропного SCoV-IIa зараз відсутні. TGEV-подібний SCoV-IIb також був пов'язаний з системним поширенням, але тільки у випадках спільної інфекції з собачим парвовірусом. Деякі ознаки системної інфекції, подібні до гострого респіраторного синдрому (SARS) в людей та інфекційного перитоніту котів (FIP), були задокументовані у випадку системних фатальних інфекцій SCoV-II, включаючи пошкодження легневих альвеол, утворення фібринозного ексудату й макрофагальної реакції [90]. Незважаючи на подібність між цими вірусами і частими субклінічними інфекціями, зрозуміло, що системний і фатальний FIP є набагато більш поширеною FCoV інфекцією в котів ніж SCoV інфекція в собак [54].

Результати власних досліджень

Протягом 2014-2018 років нами було проведено декілька досліджень щодо вивчення морфологічних особливостей спонтанної коронавірусної інфекції в собак. Загалом, було проведено розтин 12-ти трупів загинув з діарейним синдромом собак різних порід і статей віком від 2-х до 6-ти місяців і патогістологічне дослідження відібраних зразків органів. Наявність коронавірусу, без інших асоціантів, в даних випадках була раніше підтверджена ПЛР при аналізі фекальних зразків. За анамнестичними даними в тварин спостерігали виражену клініку порушень роботи травної системи інфекційної природи (діарея, блювота, відсутність апетиту, підвищення температури тіла).

Для експериментального відтворення коронавірусного ентериту в собак з метою вивчення біологічних властивостей і накопичення вірусної біомаси для дослідів був використаний власне отриманий польовий штам коронавірусу

собак культивованих на гетерологічних культурах клітин. Отриманий культуральний коронавірусний антиген був наданий для процесу депонування в Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, де пройшов процес реєстрації наказ № 66 від 17.12.2018 під назвою «Nik». У процесі виділення і накопичення культурального вірусного антигену отриману вірус-суспензію для підтвердження перебування в ній дослідного вірусу було піддано лабораторній діагностиці у ПЛР. У результаті було встановлено, що польовий штам отриманий від хворої собаки (*in vivo*) і накопичений в культурах клітин (*in vitro*) не надав діагностичної можливості для виявлення коронавірусу. Враховуючи вище сказане, були поставлені біопроби на чутливих тваринах для підтвердження або спростування наявності в культуральній масі вірусного антигену та його активності по відношенню до піддослідних тварин. Найкращим біологічним об'єктом для відтворення коронавірусної інфекції в собак є цуценята, як найбільш чутлива і менш імуногенно захищена вікова група. Для експериментального відтворення коронавірусної інфекції були відібрані 13 цуценят метисів лабрадора з безпородною 45-ти денного віку. На момент початку роботи тварини були у задовільному стані без будь яких ознак захворювання чи патології. Для виключення впливу на дослід паразитарного агента на 21 та 34 день від народження собак проводили дегельмінтизацію за допомогою мало токсичного антигельмінтика Пірантела у вигляді суспензії.

У 45 денному віці, вагою ~3 кг цуценят відлучили від суки і розділили на три групи, перша – заражали культуральним коронавірусом, друга – контрольна для виявлення спонтанного виникнення хвороби на випадок інфікування до початку експерименту.

Для зараження використовували виділений та підтверджений в ПЛР польовий коронавірус отриманий від загиблої собаки. Інфікований біологічний матеріал культивували на гетерологічних культурах клітин, а саме перещеплювальній лінії культур клітин СПЕВ (нирки ембріона свині), ВНК-21 (нирки сирійського хом'яка), РК-13 (нирки кроля). В експерименті

використовували культуральний вірусний ізолят, що мав 90 – 100%-ий прояв ЦПД впродовж 10 діб. Вірусовмісний культуральний ізолят заморожували при мінус 24⁰С. Перед використанням розморожували при кімнатній температурі. Для експериментального відтворення та коронавірусної інфекції було проведено інфікування дослідних тварин *per os* один раз на добу в дозі 5 мл/кг. Перші загальні симптоми коронавірусної інфекції спостерігали на 6-7 день, а початок специфічних клінічних ознак виявляли на 8-9 день. У цей день провели діагностику ІХА використовуючи тест системи *VetExpert* на наявність антигену.

У собак інфікованих коронавірусом, спостерігали кашоподібні фекалії, тьмяність шерстного покриву блідість з сіруватим відтінком слизової оболонки кон'юнктиви. Тварини мали гарний апетит, але при цьому майже не набирали вагу, можливо, за рахунок частих актів дефекації. Отримавши позитивний результат була проведена активна евтаназія, для якої використовували внутрішньовенне введення Тіопенат (діюча речовина - тіопентал натрію в дозі 60 мг на 1 кг маси тіла (в 1 г порошка якого міститься тіопентал натрію — 950 мг) в дозі), що забезпечує швидке безболісне настання смерті відповідно до Європейської Конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

Патологоанатомічний розтин трупів тварин проводили методом неповної евісцерації в загальноприйнятій послідовності. Спочатку проводили зовнішній огляд трупа, звертаючи увагу на його загальний стан (вгодованість, пропорційність розвитку окремих частин тіла тощо), шкіру, її похідні, стан видимих слизових оболонок, зовнішніх отворів тіла, характер виділень за їх наявності і зовнішніх органів чуття. Після цього проводили розтин на секційному столі в спинному положенні.

Під час проведення патологоанатомічного розтину від кожного трупа тварини для патогістологічного дослідження відбирали шматочки органів травної системи з ділянок патологічних вогнищ, а також макроскопічно незмінених ділянок, а також з інших органів і тканин.

Відібраний матеріал негайно фіксували в 10%-му водному нейтральному розчині формаліну протягом 5 – 7 діб. Після цього шматочки 24 години промивали в проточній водопровідній воді для видалення надлишку фіксатора, надалі проводили зневоднення в серії етанолів зростаючої міцності (60⁰, 70⁰, 80⁰, 96⁰, 100⁰), витримуючи в кожній порції по 24 години. Зневоднені шматочки через хлороформ заливали в парафін. Серійні зрізи товщиною 5 – 8 мкм. одержували за допомогою санного мікротому.

Для дослідження загальної гістологічної будови органів і тканин зрізи фарбували гематоксиліном й еозином за стандартними прописами. Після чого проводили їх мікроскопію і фотографування за допомогою світлового мікроскопу MC 100LED (Micros Austria) з'єднаного фотонасадкою NDPL – 1(2x) з цифровою фотокамерою Canon EOS 550 D, з'єднаних з комп'ютером при збільшеннях від 70 до 1000.

При зовнішньому огляді трупів загиблих тварин відмічали, що шкіра була суха й не еластична, видимі слизові оболонки бліді, сухі й не блискучі. Усі тварини з ознаками виснаження, як результату дегідратації і діареї (рис. 8; рис. 9), інші зміни при зовнішньому огляді не реєструвалися [5, 6].



Рис. 8. Наявність ознак діареї в цуценя породи чихуахуа віком 2,5 міс., яке загинуло від коронавірусного ентериту через 5 діб після появи клінічної картини та інфузійної терапії



Рис. 9. Наявність ознак дегідратації і виснаження (сухість шкіри, майже повна відсутність підшкірної клітковини) в цуценя породи чихуахуа віком 2,5 міс.

При дослідженні органів черевної порожнини в першу чергу звертали на себе увагу значно збільшені регіонарні, а саме мезентеріальні лімфатичні вузли, гіперемія судин і геморагії в серозній оболонці кишечника (рис. 10). Крововиливи набували смугастого характеру або виявлялися у вигляді плям (рис. 11) [5]. Збільшені лімфатичні вузли мали рожево-червоне забарвлення, як ззовні, так і на розрізі паренхіми, остання була соковита [5].

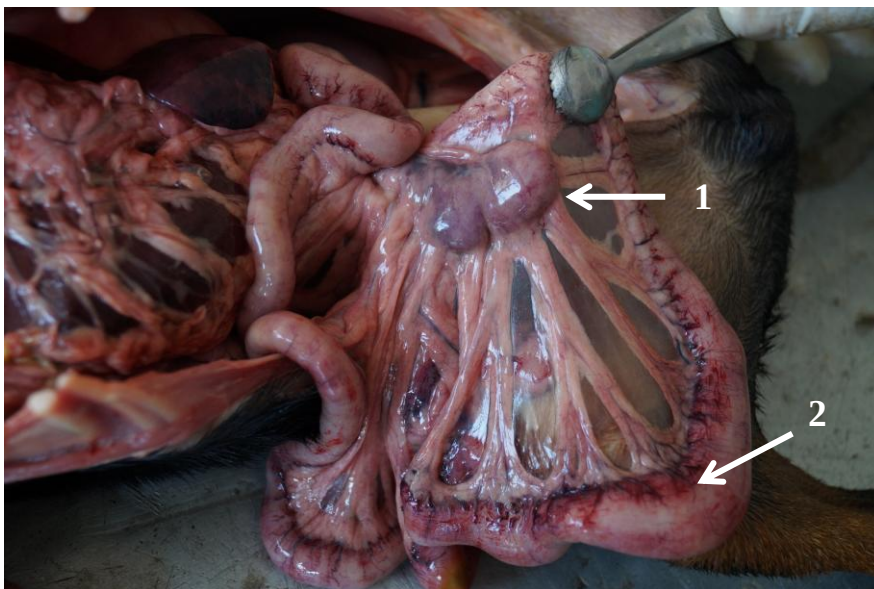


Рис. 10. Макроскопічна картина органів черевної порожнини за коронавірусного ентериту в цуценя породи цвергпінчер віком 4 міс.: 1- гіперплазія і серозно-геморагічний брижовий лімфаденіт; 2 - гіперемія судин серозної оболонки тонкого відділу кишечника.



Рис. 11. Множинні плямисті геморагії в серозній оболонці тонкого відділу кишечника за коронавірусного ентериту в цуценя породи маламут віком 6 міс.

Гістологічно в лімфатичних вузлах виявляли гіперплазію лімфоїдних вузликів внаслідок активної проліферації ретикулоцитів і клітин лімфоїдного ряду. З часом в центрах гіперплазованих лімфоїдних вузликів, гіперпластичні процеси змінювались на некробіотичні; результатом некрозу ретикулоцитів і лімфоцитів було їх спустошення. Імуноморфологічні процеси також демонструвалися плазматизацією вказаних лімфоїдних утворень. Також спостерігали ознаки серозно-геморагічного запалення у вигляді серозного просочення паренхіми лімфовузлів і виходом формених елементів крові з серозним ексудатом [4].

Уміст тонкого відділу кишечника, зокрема порожньої і клубової кишок, мав вигляд мутної сіро-рожевої рідини. Дванадцятипала кишка в усіх випадках була майже порожньою. На розрізі стінка тонкого відділу кишечника була набрякла, драглиста (рис. 12). Поверхня слизової оболонки порожньої і клубової кишок в частині випадків (2/12), вкрита великою кількістю рідкого мутного слизу, під яким часто виявляли дрібні плямисті геморагії (рис. 13). У решта випадків (10/12) слизова оболонка, як порожньої так і клубової кишок була вкрита висівкоподібними сіро-жовтими плівками, які не знімаються ножом (рис. 14).



Рис. 12. Макроскопічна картина серозно-катарального ентериту за коронавірусної інфекції в цуценя породи маламут віком 6 міс.

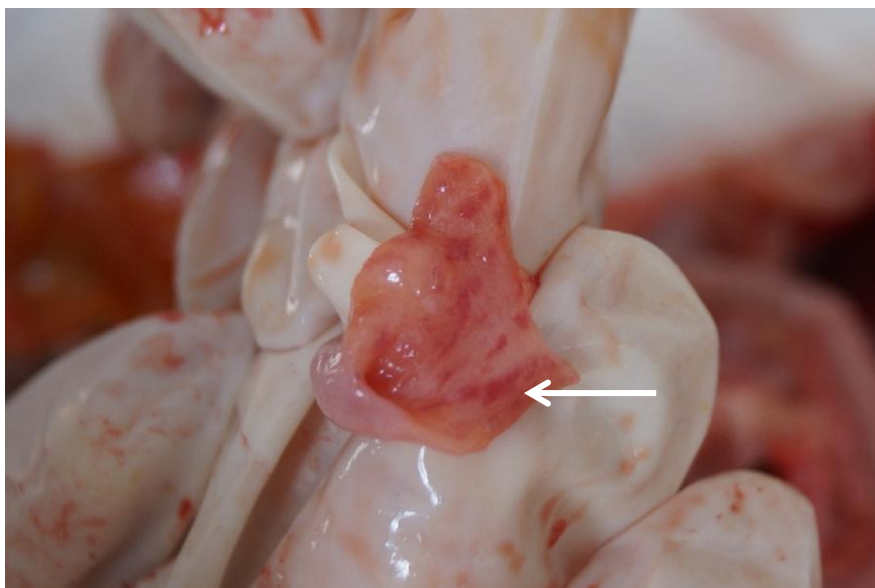


Рис. 13. Плямисті геморагії в слизовій оболонці порожньої кишки за коронавірусного ентериту в цуценя породи чихуахуа віком 2,5 міс. (стрілка)

Мікроскопічно в порожній і клубовій кишках спостерігали ознаки запальної гіперемії судин серозної оболонки і підслизової основи, а також її набряк внаслідок серозного просочення. Навколо гіперемійованих судин, як в серозній оболонці, так і підслизової основи, часто виявляли скупчення еритроцитів, які й утворювали смугасті й плямисті геморагії.

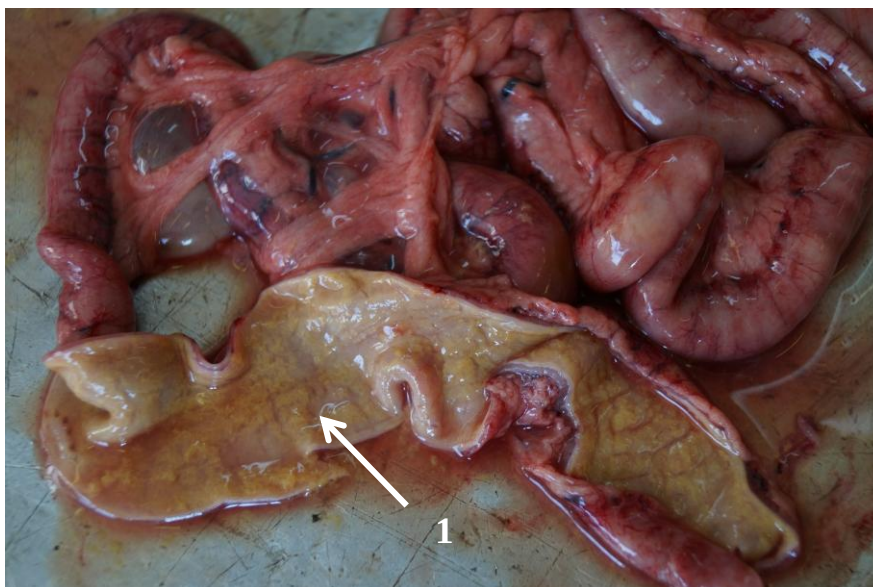


Рис. 14. Макроскопічна картина серозно-фібринозного ентериту в цуценя породи цвергпінчер віком 4 міс: 1- нашарування фібринозного ексудату.

У дистальній частині порожньої кишки спостерігали помірне збільшення лімфоїдних утворень кишкової стінки (одиноких і скупчених лімфоїдних вузликів) за рахунок проліферації ретикулоцитів і скупчення великої кількості лімфоцитів з численними мітозами, що надавало вузликам округлий вигляд і інтенсивне зафарбовування гематоксиліном. Отже, в лімфоїдних вузликах підслизової основи на ранніх стадіях хвороби спостерігали їх гіперплазію. Надалі гіперпластичні процеси змінювались некробіотичними. Як і в брижових лімфатичних вузлах, в лімфоїдних вузликах підслизової основи спостерігали некроз ретикулоцитів і лімфоїдних клітин у вигляді дрібнозернистого розпаду, внаслідок чого лімфоїдні вузлики ставали спустошеними. У власне слизовій оболонці інтенсивні патологічні зміни локалізувались переважно в ділянці верхівок ворсинок. При гістологічному дослідженні на ранній стадії захворювання виявляли помітну активізацію мітозів епітеліоцитів. Але в більшості випадків тривалість хвороби в діапазоні 5-7 діб морфологічно проявлялася ознаками некробіозу і некрозу з подальшою десквамацією уражених ентероцитів. У більшості випадків (10/12) на поверхні слизової оболонки виявляли випотівання фібринозного ексудату, який разом з десквамованими клітинами епітелію вкривав ворсинки у вигляді глибок і

конгломератів (рис. 15). У решта випадків (2/12) виявили в порожній і в клубовій кишках морфологічні ознаки характерні для серозного катару. У цих випадках спостерігали десквамацію і відшарування некротизованого епітелію в просвіт кишечника (рис. 16).

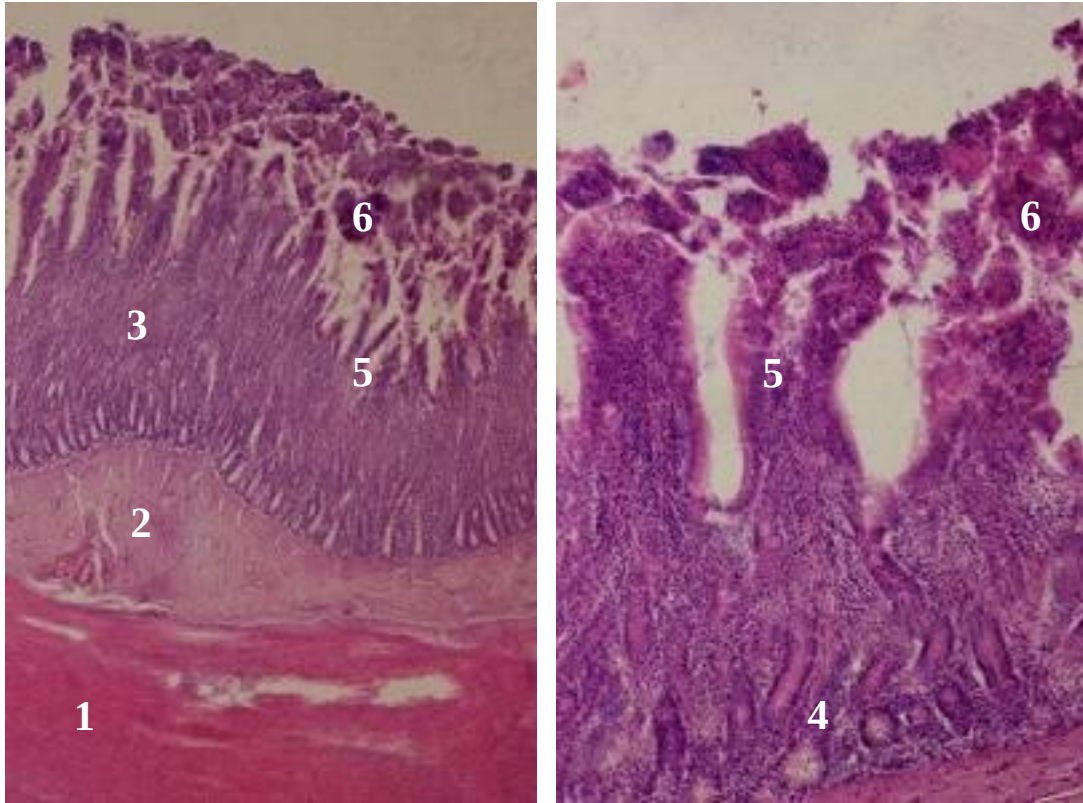


Рис. 15. Гістопатологічна картина серозно-фібринозного ентериту:

1 – м'язова оболонка порожньої кишки; 2 – підслизова основа; 3 – власне слизова оболонка; 4 – ділянка крипт; 5 – атрофія, злипання і деформація ворсинок слизової оболонки; 6 – конгломерати десквамованого епітелію з фібринозним ексудатом. Гематоксилін й еозин $\times 100$; $\times 200$.

У епітеліоцитах спостерігали каріопікноз, каріорексис, а також ознаки цитолізу. Але ступінь виразності вказаних патологічних змін в різних ділянках порожньої і клубової кишок набував значного діапазону, навіть в межах поряд розташованих ентероцитів. Пікнотичні ядра значно зменшені й більш інтенсивно фарбуються гематоксиліном, у випадках каріорексису спостерігали фрагментацію ядер; глибини різних розмірів і форми більш-менш щільно лежать в цитоплазмі в ділянці локації ядра. Внаслідок коагуляції білкових компонентів цитоплазма вогнищево ущільнюється, такі ділянки більше сприймають еозин, отже стають більш гомогенними й оксифільними.

У ділянках більш глибоких деструктивних змін спостерігали десквамацію епітелію в просвіт кишки цілими пластами і дрібнозернисті безструктурні некротичні маси.

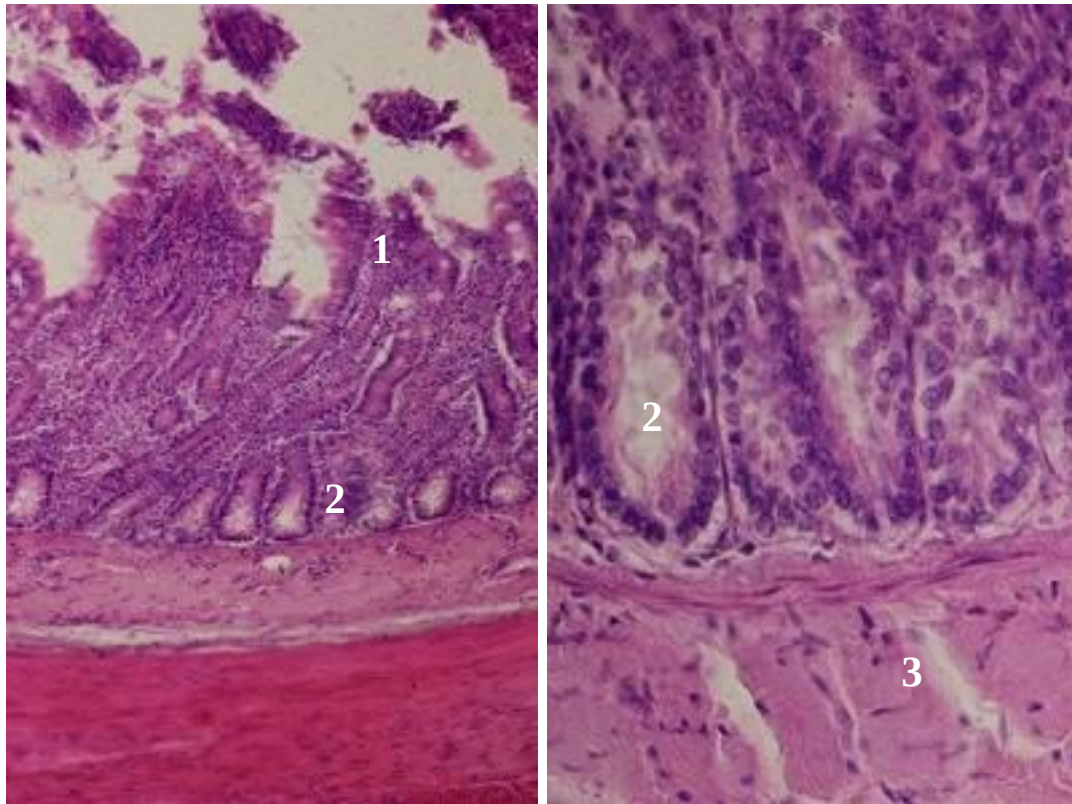


Рис. 16. Гістопатологічна картина серозного катару за коронавірусного ентериту: 1 – некроз і десквамація ураженого зрілого епітелію ворсинок; 2) збережена структура і епітелій крипт слизової оболонки; 3) набряк підслизової основи. Гематоксилін й еозин $\times 200$; $\times 300$.

Некроз і втрата епітелію ворсинок тонкого відділу кишечника супроводжувалися їх атрофією, деформацією, вкороченням і десквамацією інфікованих вірусом війчастих ентероцитів в просвіт. Разом з порушенням секреції келихоподібних клітин такі зміни призводять до руйнування захисного бар'єру в тонкому відділі кишечника, що разом з порушенням секреції травних залоз (печінки і підшлункової залози) і моторики кишечника веде до активації умовно-патогенної мікрофлори, про що, ймовірно, свідчило помітне погіршення загального стану хворих тварин [4]. Поряд з виразними альтеративними змінами в епітелії часто виявляли чітко виражені процеси регенерації, переважно в ділянках крипт. На відміну від ворсинок слизової

оболонки, в криптах суттєвих гістологічних змін майже не виявляли. Деякі ентероцити крипт мали ознаки дистрофічних змін, але структура, як самих крипт, так і гермінативного епітелію була збережена (див. рис. 16). Наявність чітких ознак альтеративного компоненту запальної реакції саме в епітелії слизової оболонки тонкого відділу кишечника, а також можливе виявлення тілець-включень в епітеліоцитах можуть бути морфологічними критеріями гострого вірусного ентериту. Принциповим клінічним підтвердженням саме такого патоморфологічного заключення є діарея в анамнезі. Діарейний синдром, є одним з головних клінічних проявів і ключовою ланкою патогенезу інфекції, оскільки обумовлений репродукцією вірусу в ентероцитах і розвитком, в даному випадку, серозного або серозно-фібринозного ентериту з втратою зрілого епітелію і порушенням процесів абсорбції.

Достатньо закономірно, на тлі гострого вірусного ентериту були виявлені патоморфологічні зміни в печінці. Печінка в усіх випадках була помірно збільшена, пружна, із заокругленими краями, темно-вишнева, з поверхні розрізу виділялася темно-червона кров, що є морфологічними ознаками пасивної венозної гіперемії (рис. 17).

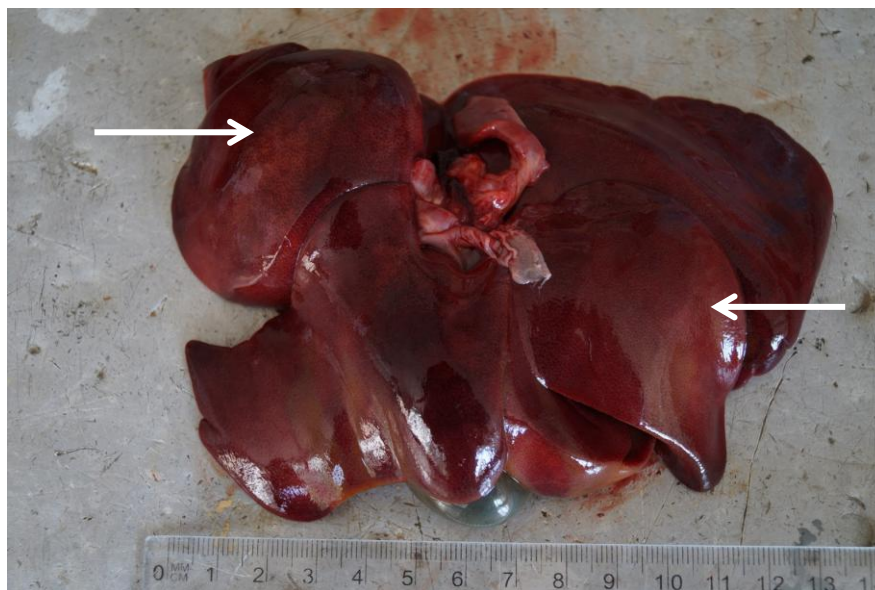


Рис. 17. Макроскопічні ознаки характерні для венозної гіперемії і дистрофічних процесів (стрілки вказують на глинистий колір) у паренхімі печінки за коронавірусного ентериту в цуценя породи цвергпінчер віком 4 міс.

На тлі темно-вишневого забарвлення виявляли осередки сірого й глинистого відтінків, що може вказувати на наявність дистрофічних процесів у паренхімі органу [5].

При мікроскопічному дослідженні відмічали розлади кровообігу у вигляді розширення і переповнення кров'ю синусоїдних капілярів, особливо в центрі часточок, з подальшим помірним набряком у просторах Діссе, дисконкомплексацию балкової структури гепатоцитів, дистрофічні і, рідше, некротичні процеси в гепатоцитах (рис. 18). Деструктивні зміни частіше мали центролобулярну локалізацію. Було підтверджено зернисту дистрофію гепатоцитів, яка морфологічно проявлялася набуханням клітин, зникненням прозорості цитоплазми. У таких ділянках цитоплазма гепатоцитів набувала оксифільних властивостей і ставала дрібнозернистою або пінистою в результаті коагуляції білкових молекул [4, 5].

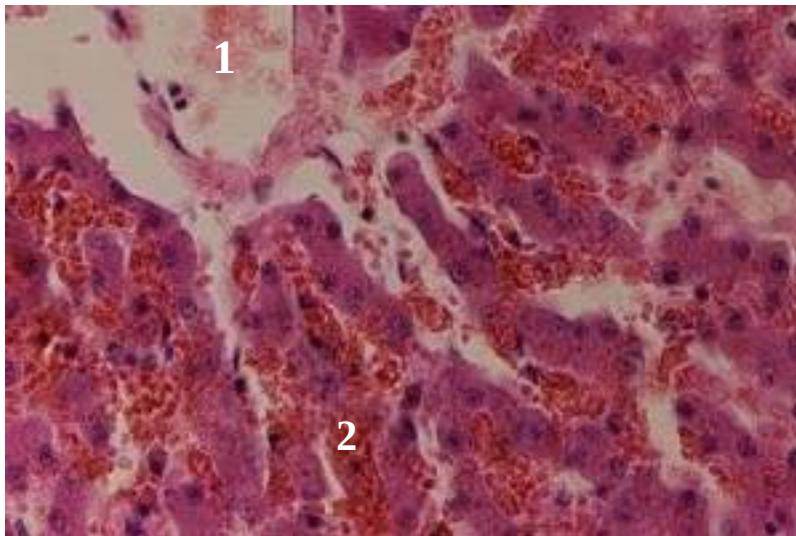


Рис. 18. Гістопатологічна картина пасивної венозної гіперемії печінки: 1 – просвіт центральної вени; 2) розширення і переповнення кров'ю синусоїдних капілярів між пластинками гепатоцитів. Гематоксилін й еозин $\times 300$.

Також виявляли невеликі ділянки вакуолізації цитоплазми гепатоцитів. З розвитком в таких дегенеративно змінених ділянках некробіотичних процесів, в гепатоцитах виявляли ознаки каріолізису й цитолізису; гепатоцити не диференціюються, лишаються тільки дрібні оксифільні фокуси дрібнозернистого клітинного детриту (рис. 19).

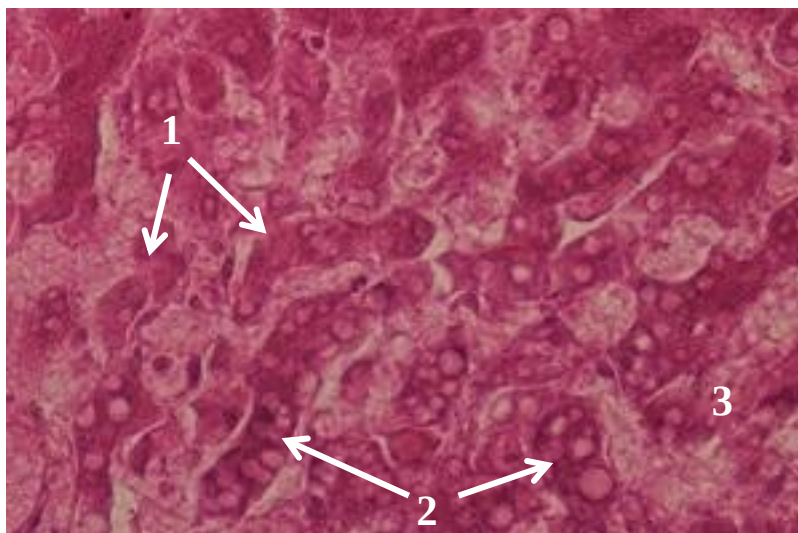


Рис. 19. Гістопатологічна картина паренхіми печінки за коронавірусного ентериту: 1 – зерниста дистрофія і некроз гепатоцитів; 2) вакуолізація і некроз гепатоцитів; 3) – клітинний детрит. Гематоксилін й еозин $\times 300$.

Натомість, на периферії таких фокусів виявлялися окремі гіперхромні багатоядерні гепатоцити, що свідчить про деяку регенераторну активність. Загалом, такі зміни в печінці, звичайно, не розглядаються як специфічні, а лише доповнюють критерії, які складають морфологічний субстрат коронавірусного ентериту.

Аналогічні зміни, також достатньо закономірно були виявлені в підшлунковій залозі (рис. 20).



Рис. 20. Макроскопічна картина серозно-запального набряку підшлункової залози (1) за коронавірусного ентериту в цуценя породи маламут віком 6 міс.

У більшості випадків (9/12) були виявлені морфологічні ознаки серозно-запального набряку. Орган був сіро-рожевого кольору, помірно збільшений, набряклий, внаслідок чого часточковість будови чітко виражена. Мікроскопічно в клітинах епітелію кінцевих секреторних відділів і вивідних проток виявляли дистрофічні процеси, часто з переходом у некротичні, а також спостерігали ознаки порушення кровообігу у вигляді повнокрів'я судин і набряку часточок залози.

Нирки набували темно-вишневого кольору. На розрізі границя між кірковою і мозковою речовинами була згладжена, поверхня розрізу мала підвищену вологість (рис. 21) [5].

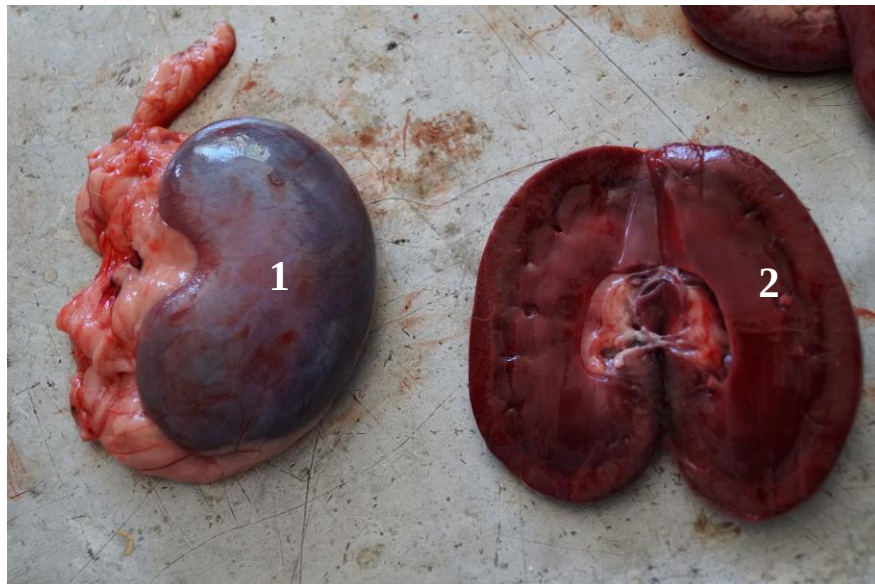


Рис. 21. Макроскопічна картина венозної гіперемії нирок за коронавірусного ентериту в цуценя породи маламут віком 6 міс.: 1 – синюшний колір; 2 – темно-вишневий колір і відсутність межі між кірковою і мозковою речовинами на розрізі паренхіми

Гістологічним дослідженням також виявлено морфологічні зміни, в першу чергу епітелію звивистих каналців дистрофічного характеру, рідше некротичного. Уражений епітелій масово десквамується в просвіт каналців, внаслідок чого просвіт щільно забитий клітинним детритом і гомогенними оксифільними білковими зернами (рис. 22). Під капсулою поодинокі клубочки виявляли серозну рідину з домішкою десквамованих клітин нефротелію. Оскільки явних ознак гломерулонефриту не виявляли, такі зміни

можна ідентифікувати як вірусну тубулопатію, точніше тубулонефроз, що, ймовірно, визначається тропністю вірусу до епітеліальних клітин. Також мікроскопічно були виявлені, відповідно до описаних макроскопічних змін, морфологічні ознаки пасивної венозної гіперемії у вигляді розширення і переповнення кров'ю судин.

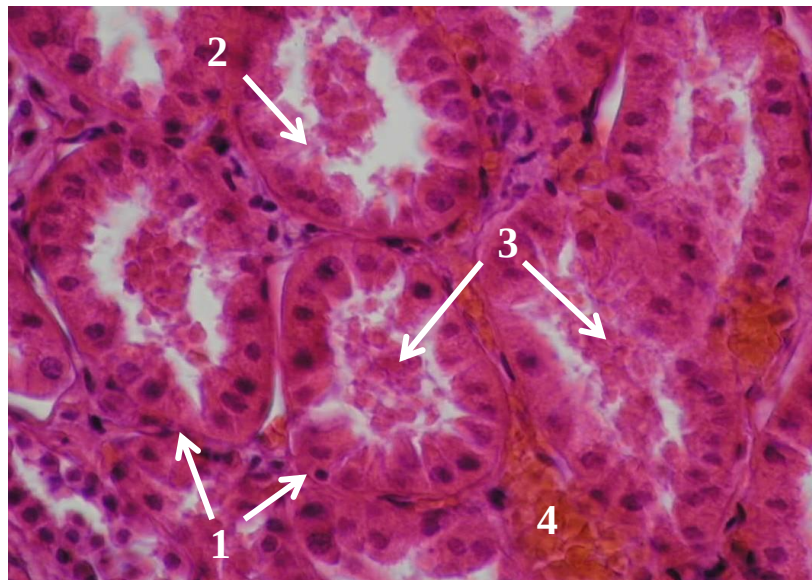


Рис. 22. Гістопатологічна картина дегенеративних змін епітелію звивистих каналців нирки за коронавірусного ентериту в цуценя породи маламут віком 6 міс.: 1 – звивисті каналці нирки; 2 – десквамація епітелію в просвіт каналців; 3 – клітинний детрит і оксифільні білкові зерна в просвіті каналців; 4 – розширена вена. Гематоксилін й еозин $\times 400$.

Значну увагу привернули зміни в селезінці, які ми спостерігали майже в усіх досліджених випадках (10/12). У паренхімі селезінки було виявлено множинні осередки у вигляді плям темно-червоного, майже чорного кольору. Такі плями мали різні розміри від дрібних до таких, що займали 1/3 органу (рис. 23; 24; 25). Такі морфологічні зміни є характерними для крововиливів та ділянок інфарктів на фоні геморагій. Селезінка при цьому була помірно збільшена, дещо в'ялої консистенції, краї при цьому були загостреними. Структура органу мала достатньо виражену зернистість, яка особливо чітко проявлялася на розрізі паренхіми.



Рис. 23. Геморагічні інфаркти (1) і множинні дрібні геморагії (2) за коронавірусного ентериту в цуценя породи цвергпінчер віком 4 міс.



Рис. 24. Геморагічні інфаркти і множинні дрібні геморагії за коронавірусного ентериту в цуценя породи чихуахуа віком 2,5 міс.



Рис. 25. Геморагічний інфаркт (1) і множинні дрібні геморагії (2) за коронавірусного ентериту в цуценя породи маламут віком 6 міс.

Мікроскопічно, в червоній пульпі селезінки знаходили множинні фокуси геморагій різних розмірів і поодинокі геморагічні інфаркти, які були визначені макроскопічно. Геморагічні інфаркти, на відміну від крововиливів, являли собою дрібнозернисту безструктурну масу, мали більш чіткі контури і характерну трикутну форму. Виразну зернисту структуру, яку ми спостерігали макроскопічно, органу надавали гіперплазовані, внаслідок проліферації клітин лімфоїдного ряду, лімфоїдні вузлики (рис. 26).

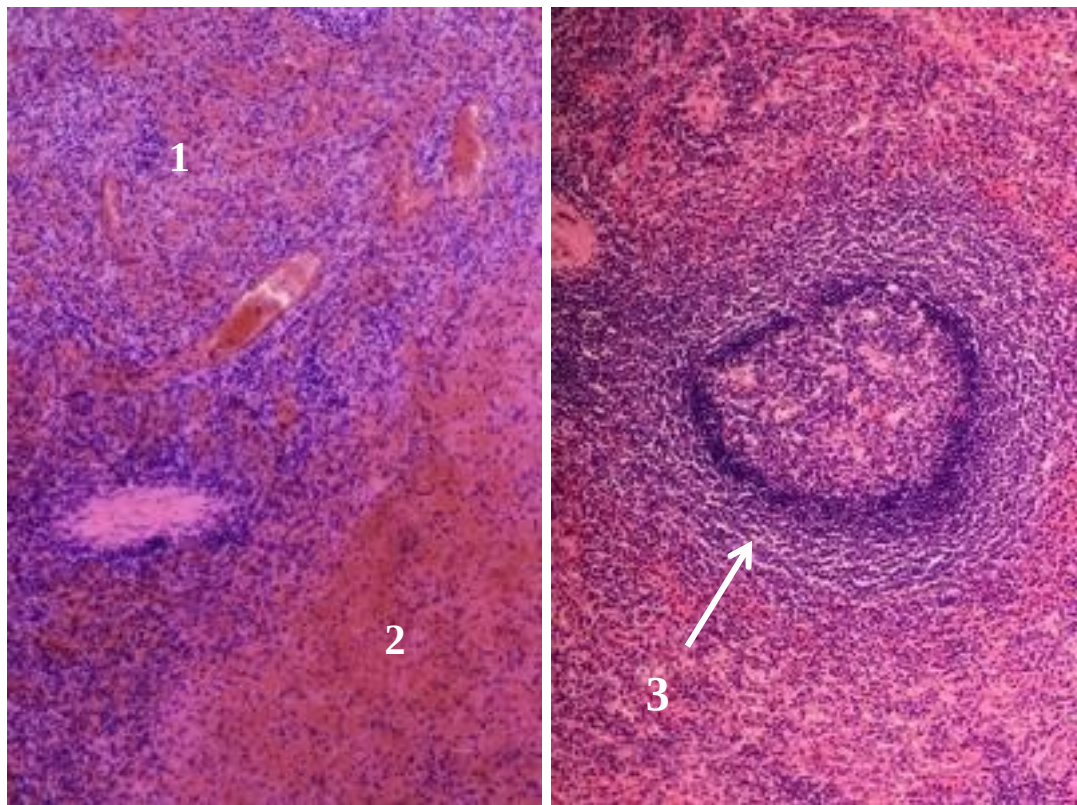


Рис. 26. Гістопатологічна картина селезінки за коронавірусного ентериту: 1 – червона пульпа селезінки; 2) ділянка геморагічного інфаркту; 3) гіперплазія лімфоїдного вузлика селезінки. Гематоксилін й еозин $\times 100$; $\times 200$.

Серце в усіх випадках було з виразною дилатацією правого шлуночка, внаслідок чого відбувалося помірне візуальне збільшення його розмірів і зміна форми до більш округлої за рахунок зміщенням верхівки серця вліво. Кровоносні судини серця були розширені, переповнені кров'ю (рис. 27). Колір міокарду, як правило, рожевий з ділянками сірого відтінку.

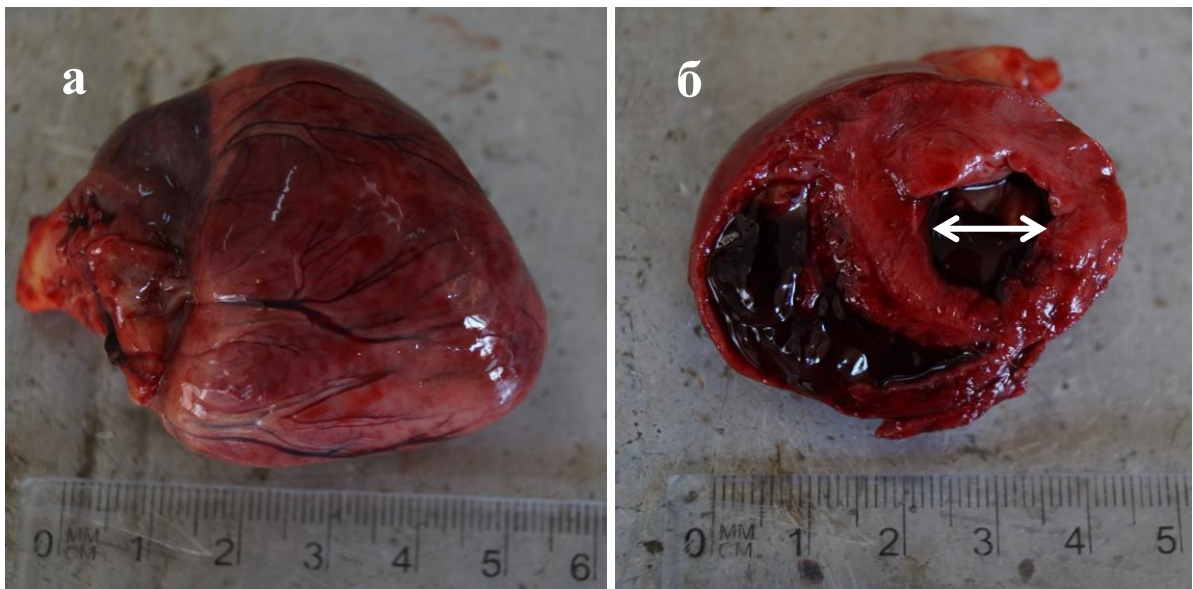


Рис. 27. Макроскопічна картина дилатації правого шлуночка серця (а) і концентричної гіпертрофії лівого шлуночка (б) за коронавірусного ентериту в цуценя породи маламут віком 6 міс.

Легені в усіх випадках мали більш-менш рівномірне рожеве забарвлення, тістувату консистенцію. На розрізі паренхіми при натисканні, як і в просвіті трахеї і бронхів, виділяється значна кількість рожевої пінистої рідини. Виявлені морфологічні ознаки є характерними для набряку легень (рис. 28).

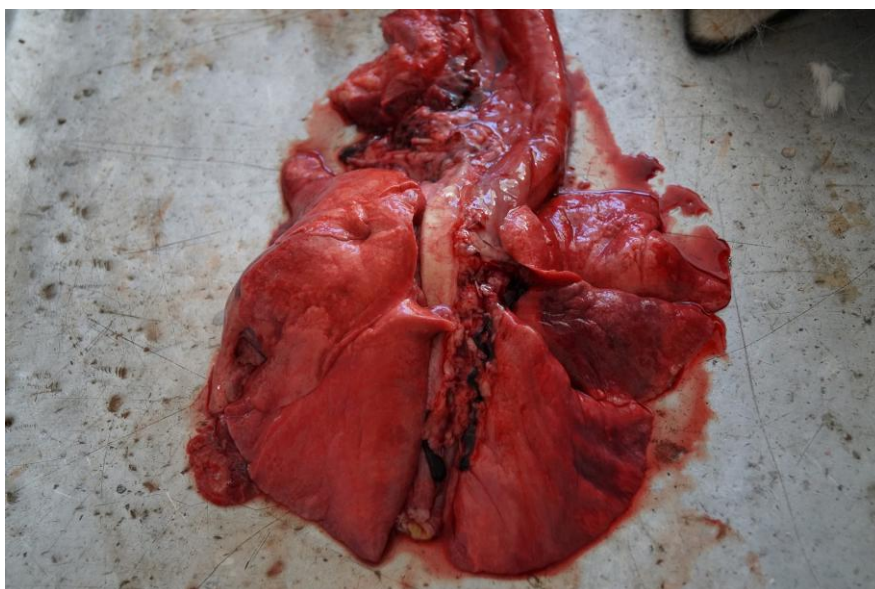


Рис. 28. Макроскопічна картина набряку легень в цуценя породи маламут віком 6 міс. за коронавірусного ентериту

Таким чином, морфологічними проявами коронавірусної інфекції в собак, які ми спостерігали були: наявність ексудативного запалення в тонкому відділі кишечника у вигляді серозного або серозно-фібринозного ентериту; гіперплазія і серозно-геморагічний лімфаденіт брижових лімфовузлів; гіперплазія одиноких і скупчених лімфоїдних вузликів слизової оболонки тонкого відділу кишечника; множинні фокуси геморагій і геморагічні інфаркти в паренхімі селезінки; гіперплазія лімфоїдних вузликів селезінки; геморагії в серозній оболонці тонкого відділу кишечника; пасивна венозна гіперемія печінки і нирок; дистрофічні процеси в паренхімі печінки й нирок; дилатація правого шлуночка серця; набряк легень; кахексія і дегідратація організму [4, 5, 6].

Експериментальне відтворення коронавірусного ентериту в собак

При проведенні розтину трупів цуценят, експериментально інфікованих ізолятом коронавірусу, культивованим в гетерологічній культурі клітин, було встановлено, що макроскопічні зміни в усіх випадках були майже однаковими, хоча й мали незначні відмінності в ступені їх прояву.

Слід зазначити, що під час проведення патологоанатомічного розтину, при дослідженні травної системи в шлунку і товстій кишці при будь-які видимі зміни не реєструвались. Основні макроскопічні зміни виявляли в тонкому відділі кишечника, печінці й підшлунковій залозі.

Кровоносні судини брижі були добре оконтуровані внаслідок їх розширення і переповнення кров'ю. Брижові лімфатичні вузли були збільшені, мали сіре або сіро-рожеве забарвлення, капсула їх напружена, на розрізі паренхіма добре зволожена й блискуча і мала також сіро-рожеве забарвлення. Такі макроскопічні зміни є характерними для серозного лімфаденіту (рис. 29). Серозна оболонка стінки тонкого відділу кишечника майже по всій довжині була помірно гіперемійована, але, на відміну від спонтанного захворювання, геморагії в серозній оболонці не виявляли (див. рис. 29). Майже по всій довжині тонкого відділу кишечника слизова оболонка була вкрита густим білим слизом, схожим на рисовий відвар (рис. 30). Після видалення слизу в слизовій оболонці дванадцятипалої, порожньої і клубової кишок виявляли запальну

гіперемію і її набряк. Поверхня слизової оболонки була більш-менш дифузно почервоніла, тьмяна, на поперечному розрізі стінки помірно потовщена і драглиста.

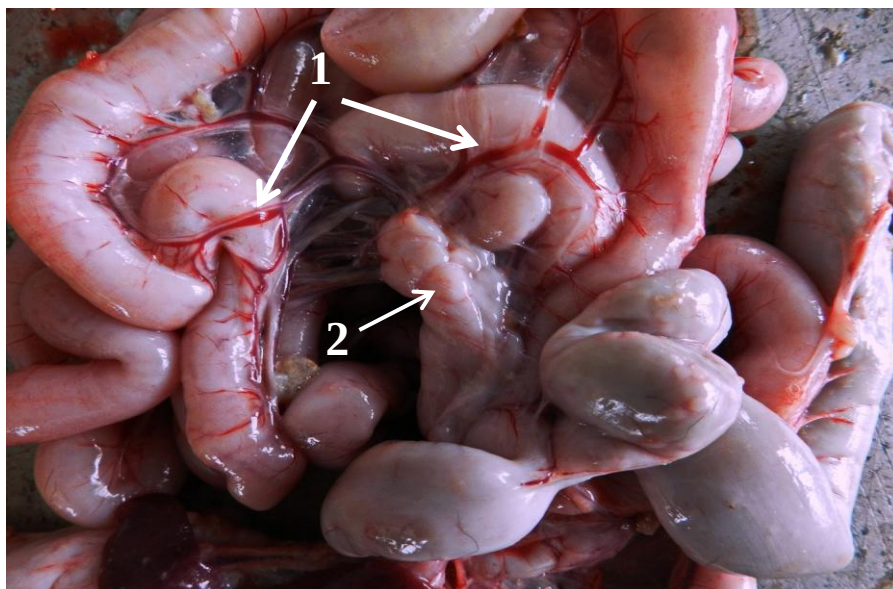


Рис. 29. Макроскопічна картина органів черевної порожнини за експериментального коронавірусного ентериту: 1 – розширені, переповнені кров'ю кровоносні судини брижі тонкої кишки; 2 - серозний брижовий лімфаденіт.

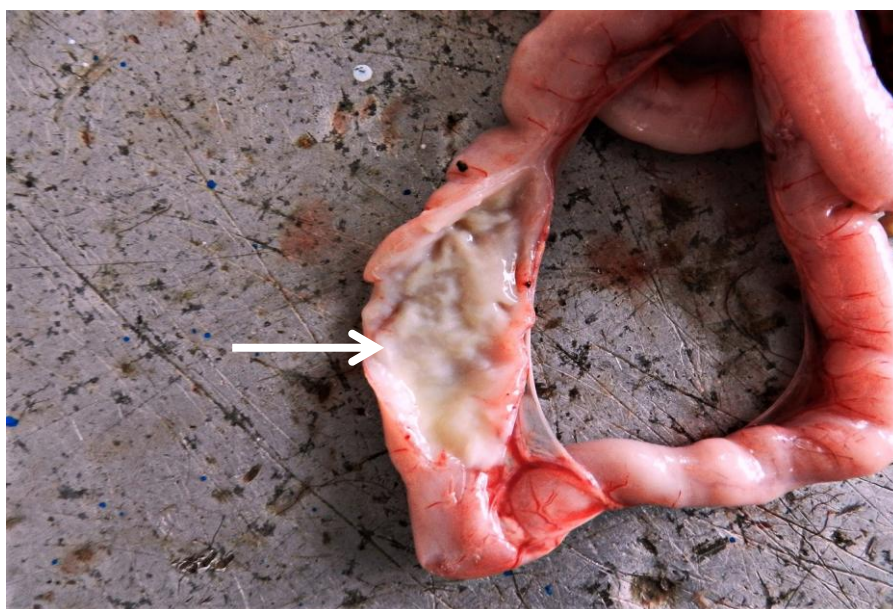


Рис. 30. Макроскопічна картина гострого серозного катару за експериментального коронавірусного ентериту: поверхня слизової оболонки порожньої кишки вкрита густим білим слизом, схожим на рисовий відвар (стрілка).

Печінка була помірно збільшена, нерівномірно темно-червоного кольору, з поверхні розрізу виділялася темно-червона кров (рис. 31). Підшлункова залоза в усіх випадках була гіперемійована й виразно набрякла, внаслідок чого часточковість її будови була добре виражена (рис. 32).



Рис. 31. Макроскопічні ознаки характерні для венозної гіперемії печінки за експериментального коронавірусного ентериту.

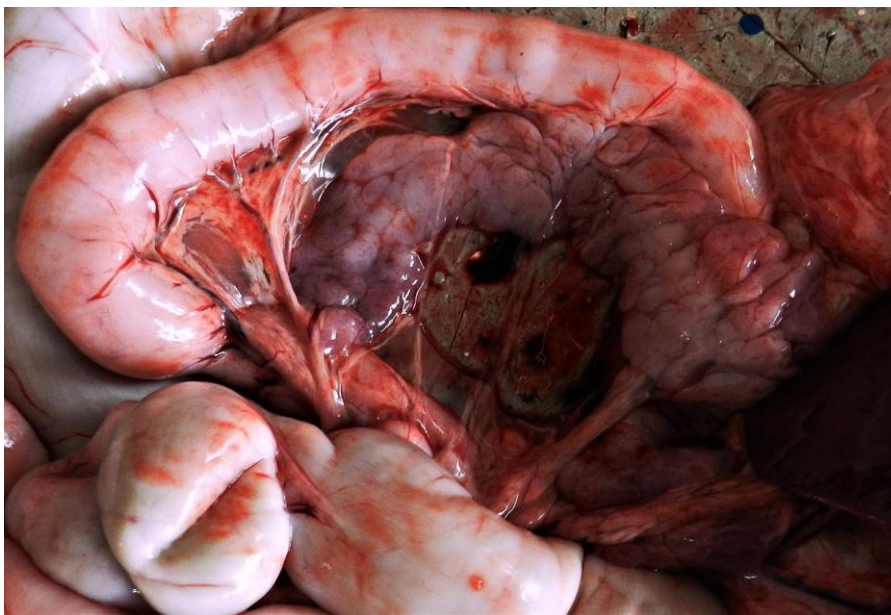


Рис. 31. Макроскопічні ознаки характерні для серозно-запального набряку підшлункової залози за експериментального коронавірусного ентериту.

Нирки мали нерівномірний червоно-коричневий колір. На розрізі межа між кірковою й мозковою речовинами була досить виразна. Селезінка в усіх досліджених випадках, на відміну від спонтанного захворювання, видимих змін не мала. Тимус був в'ялий, набряклий, нерівномірно гіперемійований. Серце мало округлу форму за рахунок виразної дилатації правого шлуночка. Серцевий м'яз був в'ялий, нерівномірно забарвлений – з ділянками сіруватого кольору, його кровоносні судини були виразно розширені, переповнені кров'ю. Легені мали тістувату консистенцію, рівномірне рожеве забарвлення. З поверхні розрізу виділялась піниста рідина червонуватого кольору. Така ж рідина знаходилась у просвітах трахеї і великих бронхів. Судини оболонки головного мозку були виразно розширені, переповнені кров'ю. В інших органах і тканинах макроскопічні зміни нами не були виявлені. Зміни знайдені при гістологічному дослідженні органів і тканин набували характер практично схожий із змінами за спонтанного захворювання, різним був лише ступінь їх прояву, що залежить, ймовірно, від реактивності макроорганізму, а також структурних і функціональних особливостей органів і тканин. Крім того, розвивалися неспецифічні загальнопатологічні процеси такі, як розлади кровообігу з підвищенням проникливості судинної стінки, дистрофічні й некротичні процеси в паренхіматозних органах.

Підсумовуючи результати проведених нами досліджень, можна зробити висновок, що вирішальними морфологічними критеріями, як за природного захворювання так і в експерименті, були зміни альтеративного і запального характеру в тонкому відділі кишечника і пов'язані з ними запальні й реактивні зміни регіонарних лімфоїдних органів. У нашому дослідженні за спонтанного захворювання було зафіксовано різного ступеня і характеру морфологічні зміни в серозній і слизовій оболонках тонкого відділу кишечника, зокрема в порожній і клубовій кишках і в брижових лімфатичних вузлах. Що співпадає з результатами інших дослідників, які в своїх роботах зазначали, що морфологічно, пошкодження в собак, заражених ССoV, обмежені кишечником і мезентеріальними лімфатичними вузлами, в яких знаходять розширення і

збільшення кишкових петель, заповнених фекальними масами і набряклі мезентеріальні лімфовузли [68]. За даними літератури, така макроскопічна картина характеризує коронавірусний ентерит, спричинений SCoV-I. У роботі [21] також зазначено, що після експериментального зараження пантропним ізолятом, в більшості інфікованих собак значні пошкодження і гістологічні зміни в основному спостерігали в кишечнику і лімфоїдних тканинах, хоча в деяких тварин автори виявили також виразні зміни і в паренхіматозних органах.

Виявлені нами в порожній і клубовій кишках гістологічні зміни в частині випадків є морфологічним проявом серозного катару і, в інших випадках, – серозно-фібринозної форми ексудативного запалення. Найбільш виразні зміни в тонкому відділі кишечника зумовлені, насамперед, розмноженням тут збудника інфекції. Адже поверхневий епітелій тонкого кишечника є основною мішенню SCoV, натомість товстий кишечник є стійким до інфекції. Через 2 дні після орального зараження, SCoV можна виявити в цитоплазмі зрілих епітеліальних клітин ворсинок верхніх двох третин дванадцятипалої кишки, на відміну від собачого парвовірусу типу 2 (CPV-2), який знищує епітелій кишкових крипт [54, 68]. У нашому дослідженні також, на відміну від ворсинок слизової оболонки, в криптах суттєвих гістологічних змін майже не виявляли. Деякі ентероцити крипт мали ознаки дистрофічних змін, але структура, як самих крипт, так і гермінативного епітелію була збережена.

Інфіковані війчасті ентероцити зазнають дегенерації, що характеризується їх вкороченням, деформацією і втратою мікроворсинок війчастої облямівки, що призводить до злушення некротизованих клітин у просвіт. Втрата війок зрілих ентероцитів викликає атрофію кишкових ворсинок і, як наслідок, послаблення збереження цілісності кишкового бар'єру [54]. Таким чином, некроз і втрата епітелію ворсинок тонкого відділу кишечника та ймовірне порушення секреції келихоподібних клітин призводить до руйнування захисного бар'єру в тонкому відділі кишечника, що разом з порушенням секреції травних залоз (печінки і підшлункової залози) і моторики

кишечника може призвести до активації умовно-патогенної мікрофлори з подальшим ускладненням вірусної інфекції.

У відповідь на втрату війок ентероцитів спостерігається підвищення мітотичної активності епітелію крипт і збільшення пулу незрілих ентероцитів [54]. При гістологічному дослідженні на ранній стадії захворювання, поряд з виразними альтеративними змінами в епітелії, ми також виявляли помітну активізацію мітозів ентероцитів; чітко виражені процеси регенерації локалізувалися в ділянках крипт. Разом ці зміни в морфології тонкого відділу кишечника призводять до втрати нормальної травної і абсорбційної функцій, а також клінічних ознак діареї і дегідратації в хворих собак [54].

Крім того в усіх досліджених випадках загибелі собак нами були виявлені суттєві зміни в селезінці. У нашому дослідженні в селезінці була виявлена гіперплазія лімфоїдних вузликів, яка можливо пов'язана з імунним статусом тварин або станом резистентності саме на момент хвороби в загинувших тварин. Крім того, в усіх випадках в паренхімі селезінки нами були виявлені геморагічні інфаркти від дрібних до таких, що займали 1/3 органу. Але в умовах експерименту лімфоїдна тканина селезінки, на відміну від природного захворювання, реакції не показала, ймовірно, в результаті того, що отриманий нами ізолят коронавірусу, культивованого в гетерологічній культурі клітин, відрізнявся за своїми властивостями від штаму коронавірусу в природно заражених собак. Яким саме генотипом SCoV-I, SCoV-II або обома генотипами одночасно були інфіковані тварини нам не відомо, оскільки генотип-специфічний аналіз для виявлення та вимірювання вірусних навантажень у фекальних зразках природно або експериментально інфікованих собак ми не проводили. У літературних джерелах інформації щодо поширеності на території України нових генотипів (SCoV типу I), біотипів (пантропний SCoV) й інших варіантів (собачий респіраторний коронавірус), нами не знайдено. Є лише нечисленні повідомлення [9] про коронавірусні ентерити. Тим не менш, відомо, що SCoV є ензоотичним у всьому світові, оскільки присутність вірусу була показана як в Європі, так і в Сполучених Штатах, Таїланді й Австралії

[68]. Серологічні дослідження в деяких країнах показують поширеність від 0 до 80% [68]. Таким чином, ймовірно, можна припускати схожу ситуацію і в популяції собак України.

Схожі морфологічні зміни у вигляді множинних фокусів геморагій з лімфоїдним виснаженням селезінки були описані V. Zappulli і співав. (2008), але вони теж були пов'язані з пантропним типом II коронавірусу, який виявився причиною смертельної інфекції в собаки [90]. Крім того, ураження внутрішніх органів включали розливу фібринозно-гнійну бронхопневмонію, множинні ниркові кортикальні інфаркти, поєднання важкого ступеня централобулярного ожиріння печінки з незначними ділянками некрозів [90]. У нашому дослідженні зміни виявлені в печінці й підшлунковій залозі, як за спонтанної, так і експериментальної інфекції були більш-менш подібними, оскільки з'являються як результат розвитку основного патологічного процесу в кишечнику, з яким вони пов'язані структурно і функціонально. Морфологічні зміни в інших паренхіматозних органах, таких як серце, легені, нирки також були аналогічними за спонтанного й експериментального зараження, оскільки виникають як ускладнення основного захворювання і пов'язані з такими загальнопатологічними процесами, як порушення кровообігу, дистрофії та некрози.

Діагностика коронавірусних захворювань

Методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій мають свою специфіку, враховуючи особливості біології вірусів. Для лабораторної діагностики вірусних інфекцій застосовують три основні методичні підходи: вірусологічний, серологічний, молекулярно-біологічний [10].

Клінічні ознаки, пов'язані з кишковими SCoVs, найчастіше важко диференціювати від тих, що пов'язані з іншими ентеропатогенами, такими як CPV-2, ротавірус або аденовірус собак [73]. Важливо виключити інші причини блювоти і діареї, такі як CPV-2, кишкові бактерії, паразити, отруєння і неінфекційні причини діареї. Остаточна діагностика SCoV може бути утруднена внаслідок можливого поєднання з респіраторними, кишковими й генералізованими інфекціями, викликаними іншими вірусними, бактеріальними і паразитарними агентами [13, 54], тому, як і при інших кишкових інфекціях, діагноз вимагає лабораторного підтвердження [68]. Виділення та ідентифікація коронавірусів – це довготривалий процес, який може викликати значні труднощі [1]. Комерційні діагностичні лабораторії, безумовно, можуть виявляти SCoV, але лише в невеликій частині випадків ентериту, де єдиним діагностичним критерієм була ізоляція вірусів [68]. Методи діагностики, що використовуються для виявлення SCoVs у зразках фекалій, включають електронну мікроскопію (ЕМ), виділення вірусу в культурі клітин і біомолекулярний аналіз [68]. ЕМ дослідження негативно пофарбованих фекальних суспензій та імунна електронна мікроскопія є швидкими процедурами з виявлення коронавірусу і, вважається, є цінними діагностичними засобами [73]. Проте, частота захворювання на SCoV, ймовірно, була переоцінена діагностичними лабораторіями, які застосували ЕМ як основний метод діагностики. Імуноелектронна мікроскопія з специфічною імунною сироваткою дозволяє підтвердити ЕМ діагностику, але вимагає спеціалізованих лабораторій і кваліфікованих фахівців, наголошує [54]. Отже, вірус може бути ідентифікований шляхом візуалізації вірусних частинок у

зразках фекалій після фарбування й дослідження за допомогою електронної мікроскопії, однак це, зазвичай, не є доступним діагностичним інструментом [54]. Крім того, загальна присутність коронавірусподібних частинок в кишковому вмісті, які часто нагадують коронавіруси, завдає труднощі в діагностиці CCoV методом ЕМ і вимагає підтвердження іншими тестами зауважує [68]. Виділення вірусу є методикою, найбільш вживаною в діагностиці інфекції CCoVs, але більш складною, трудомісткою і менш чутливою, ніж інші методи, зазначає автор. CCoV-II дає ріст на кількох клітинних лініях собачого і котячого походження, а ідентифікація ізоляту вимагає нейтралізації цитопатичних ефектів та/або імунофлуоресцентного тесту з еталонною сироваткою або моноклональними антитілами [73]. І знову ж таки, ізолювати можна CCoV-II, але не CCoV-I [54]. Неможливість ізолювати CCoV-I в культурі клітин призводить до змін при виявленні багатьох форм ентеритів, викликаних цим вірусом, тому частота захворювання CCoV-I, ймовірно, недооцінюється. Такі труднощі і обмеження перешкоджають достовірній оцінці імунологічних характеристик цього нового генотипу і заважають отриманню ключової інформації щодо його патогенетичної ролі в собак, відмічає [73].

У медичній практиці, для постановки етіологічного діагнозу найчастіше застосовують різноманітні серологічні реакції або тести. Серед них – імуноферментний аналіз (ІФА) для визначення антитіл класів IgM та IgG у плазмі або у сироватці крові, реакція імунофлуоресценції (прямий і непрямий варіанти) для визначення антитіл класу IgM у плазмі крові пацієнтів у перші 10 днів хвороби. Серологічні дослідження здійснюють у парних сироватках крові у РН, реакції зв'язування комплементу (РЗК), реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) [1]. У ветеринарній медицині з метою виявлення генотипів CCoV також широко використовуються різні серологічні (непряма ELISA, мікронейтралізація) і вірусологічні (пряма ELISA, культура клітин, пряма імунофлуоресценція) методи діагностики [3, 15, 18, 32, 47, 53]. Але серологічні тести мають обмежене застосування, так як вони можуть

підтвердити тільки наявність ССoV, але не здатні розрізнити ССoV серотипи чи генотипи [54]. Виявлення ССoV антитіл можна виконувати тестуванням на віруснейтралізацію (VN) і ELISA. Але було продемонстровано, що тест VN може виявитися невдалим при виявленні антитіл в деяких позитивних сироватках, що дає оманливу інформацію про епідеміологічні особливості інфекції. ELISA виявився більш чутливим, ніж тест VN, проте антиген, одержаний з ССoV-інфікованих клітин, може призвести до змінних результатів через відмінності при підготовці антигену. Деякі дослідники продемонстрували, що антитіла проти М-протеїну постійно виявляються в сироватці собак після інфекції ССoV. На підставі цих результатів, тест ELISA був розроблений з рекомбінантним М-протеїном (rMP) ССoV-II. Тест був оцінений і може служити альтернативним діагностичним методом для виявлення антитіл [68].

Для виявлення геномної РНК вдаються до молекулярно-генетичних методів дослідження [3]. За останні десятиліття було розроблено кілька методів на основі ПЛР для виявлення РНК ССoV у фекаліях собак, що дозволяє подолати обмеження в ізоляції вірусу. ПЛР була визначена як золотий стандарт, через поліпшення як чутливості, так і специфічності порівняно зі звичайними методами. Але, жодна з розроблених ПЛР не була призначена для кількісного визначення. Більш того, звичайна ПЛР має певний ризик контамінації внаслідок маніпуляцій після ПЛР і другого етапу ампліфікації у вмонтованих системах ПЛР, особливо коли потрібна висока пропускна здатність зразків [73]. Звичайна ПЛР дозволяє достовірно виявляти альфакороноавіруси, а більш специфічні тести ПЛР можуть бути використані для подальшої характеристики в певних серотипах чи генотипах; однак, через високу мінливість генома ССoV, нові варіанти можуть бути не виявлені, зауважує [54]. Найчастіше застосовують полімеразно-ланцюгову реакцію із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) в моно- або мультиплексному форматі [1, 30, 40]. Decaro et al. (2004) розробили флуорогенну RT-PCR у реальному часі – простий, швидкий і відтворюваний метод для виявлення і кількісного визначення РНК ССoV у фекаліях

інфікованих собак, заснований на технології TaqMan [30]. У порівнянні зі звичайною RT-PCR, флуорогенний аналіз являє собою замкнуту систему, в якій камера ніколи не відкривається після ампліфікації, виключаючи можливість перехресної контамінації. Основна перевага системи флуорогенних барвників полягає у кількісному визначенні РНК ССoV у зразках фекалій з високим ступенем відтворюваності й точності порівняно з кількісними методами ПЛР на основі гелю [73]. Пізніше, Decaro et al. (2005) були розроблені два генотип-специфічні флуорогенні RT-PCR методи для виявлення, розпізнання і кількісного визначення РНК ССoV-I і ССoV-II у фекаліях собак з діареєю. Метод показав високу специфічність, чутливість і відтворюваність, що дозволяє точно визначити кількість РНК ССoVs в лінійному діапазоні близько восьми порядків, від 10^1 до 10^8 копій стандартної РНК. Таким чином, генотип-специфічний флуорогенний аналіз може бути корисним для виявлення та вимірювання вірусних навантажень у фекальних зразках собак, природно або експериментально інфікованих ССoV-I, ССoV-II або обома генотипами [19].

Beth N. Licitra й співав (2014) зазначають, що остаточним тестом все ж таки є посмертна ідентифікація вірусного антигену за допомогою імунофлюоресценції або імуногістохімічного фарбування зрізів тканин (рис. 33) [54]. Стосовно посмертної діагностики, значення ізоляції вірусів, порівняно з висівом бактерій, звичайно є набагато меншим. Широке використання вірусологічних методів діагностики часто є невиправданим за більшості інфекцій. Натомість, часто можна виділити віруси, зокрема ті ж ентеровіруси, за відсутності будь-яких суттєвих морфологічних проявів інфекції в органах і тканинах, які досліджуються. Отже, більш доречно використовувати звичайні методи, які базуються на виявленні антигену вірусу, але з урахуванням того, що антиген можливо виявити лише на певних стадіях хвороби, коли його кількість є максимальною. Щодо серологічного методу з визначенням рівня антитіл, вважається, що він є достатньо інформативним, тим більше, що для постановки реакцій зв'язування комплементу і непрямой гемаглютинації можна використовувати кров, цереброспінальну рідину, навколоплідні води тощо.

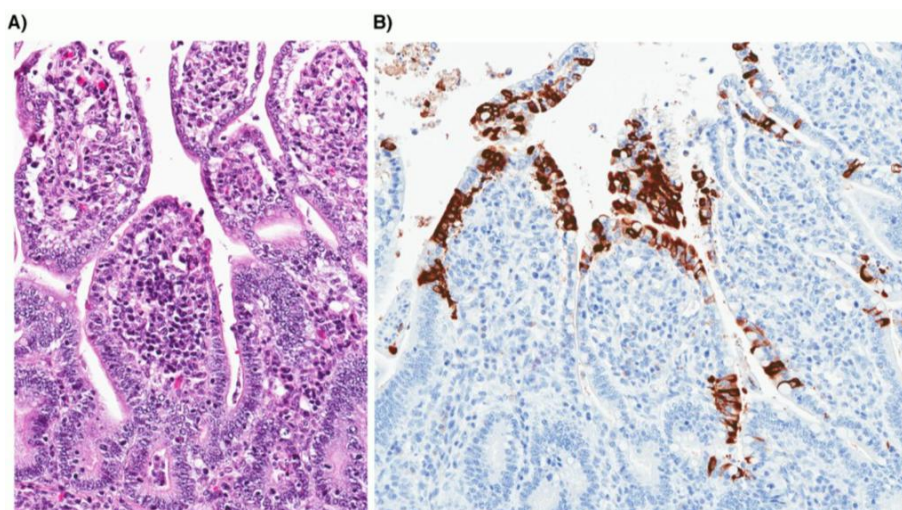


Рис. 33. Мікрофотографії тонкої кишки двотижневого щеня з типовими ураженнями SCoV інфекції. (А) Тяжка атрофія ворсинок кишечника з ослабленими низькими кубічними і плоскоклітинними ентероцитами (гематоксилін й еозин; $\times 20$). (В) Коронавірусний антиген присутній в цитоплазмі інфікованих ентероцитів ворсинок (імуногістохімія; $20\times$). Beth N. Licitra, Gerald E. Duhamel, Gary R. Whittaker. *Viruses*, 2014; doi:10.3390/v6083363

Таким чином, при проведенні посмертної діагностики, особливо у разі співставлення результатів з гістологічним та імуноферментним дослідженнями, можливо встановити навіть тривалість хвороби. Гістологічне дослідження дає змогу визначити відповідні структурні зміни в ядрі та цитоплазмі інфікованих вірусом клітин, які часто є досить характерними для деяких вірусних інфекцій. Крім того, важливим діагностичним маркером присутності вірусу є наявність в інфікованих клітинах оксифільних або базофільних вірусних включень. Отже, завдяки особливостям вірусної структурної організації, стає можливим виявлення характерних типових змін в клітинах за будь-яких вірусних інфекцій. Але патоморфологічна діагностика не буде повною без урахування загальної картини морфологічних змін, обумовлених як безпосередньою дією збудника, так і реакцією макроорганізму. Тому важливим є виявлення змін, які складають морфологічний субстрат інфекції, в тому числі вірусної, зокрема, наявність вогнищевих лімфоплазматичних інфільтратів в стромі органів, насамперед навколо судин, проліферація клітин мезенхіми за тривалого перебігу хвороби або у випадку повторного розвитку тощо.

Імунітет і профілактика

За даними медичних фахівців, в даний час вакцинопрофілактика проти коронавірусних інфекцій (включаючи особливо небезпечні ТГРС і БВРС) не розроблена [1].

Натомість, у ветеринарії є призначені для запобігання зараженню CCoV комерційно доступні різні інактивовані і модифіковані живі вірусні вакцини. Сучасні вакцини безпечні, але надають лише неповний захист, оскільки вони зменшують, але не усувають реплікацію CCoV в кишковому тракті. Оскільки ці вакцини, швидше за все, базуються на класичних вірусах CCoV-IIa, захист від штамів CCoV-I є малоімовірним, крім того, захист від штамів варіанта типу II є невизначеним [54]. А в експериментальному дослідженні Decaro et al. (2010) показано, що штам CCoV типу 2 CB/05 здатний інфікувати собак, серопозитивних до кишкового CCoV і індукувати клінічні ознаки незалежно від дози вірусу. Отже, дослідження надало докази того, що імунітет, індукований природним впливом кишкових CCoVs, повністю не здатен захистити проти штаму CB/05 CCoV-II. Цей важливий висновок підкреслює той факт, що вакциновані собаки з кишковим CCoV, можуть одержати субклінічні інфекції, подібні до CCoV-II штаму CB/05, що призводять до лімфопенії і чутливості до асоційованих патогенів та/або більш ускладненого захворювання, індукованого парвовірусом собак [26]. Decaro N. et al. (2009) у шлунково-кишковому тракті й внутрішніх органах цуценят, які померли від гострого гастроентериту, було виявлено CCoVs з можливою подвійною рекомбінацією через частковий обмін S-гену з TGEV [29]. Отже, відповідні антигенні відмінності, що спостерігаються між еталонними CCoV-II і рекомбінантними TGEV-подібними CCoVs, можуть мати значення для профілактичних заходів, оскільки собаки, яким вводяться класичні CCoV вакцини, можуть бути чутливі до інфекції, викликаній рекомбінантним вірусом [73].

Хоча вартість CCoV вакцин суперечлива, інактивовані CCoV вакцини були ліцензовані в США. Експерименти продемонстрували обмежений захист

через 3 тижні після вакцинації від клінічного захворювання, але не від інфекції. Загалом, результати дослідження підтвердили низьку ефективність інактивованої вакцини в скороченні виділення вірусу в фекаліях після зараження CCoV. Чи забезпечують інактивовані вакцини адекватний імунітет в польових умовах, все ще є суперечливим питанням. Для запобігання інфікування важливі інтралюмінальні антитіла (імунітет слизової оболонки), тому що сироваткові антитіла від інфекції не захищають, зазначав [68].

Модифікована жива (ML) CCoV вакцина, ліцензована в США в 1983 році, була швидко вилучена через високий рівень (приблизно 5%) серйозних реакцій, особливо коли використовувалась в комбінації з CDV і CPV-2 вакцинами. Побічні реакції склалися в основному з неврологічних ознак і подальшої загибелі, проте деякі собаки мали генералізоване захворювання ("панкреатит-менінгіт-синдром"), затримку росту в цуценят або раптову смерть. З іншого боку, ML-вакцина, розроблена компанією в Каліфорнії (США), як стверджувалося, була безпечною і ефективною в польових умовах. Однак цей штаб був ліцензований для використання в собак іншою компанією в 1994 році, а післявакцинальні реакції відбулися протягом декількох тижнів після введення комбінованої CCoV-CPV-CDV вакцини [68].

Нещодавно безпеку й ефективність ML CCoV вакцини оцінювали в трьох групах собак: дві групи були щеплені внутрішньом'язово й ороназально, відповідно, а їх реакції порівнювали з третьою групою невакцинованих контрольних собак. Після зараження жодна з вакцинованих собак не мала клінічних ознак. Проте собаки, які були заражені внутрішньом'язово, а також контрольні собаки, виділяли вірус в середньому на протязі 10 і 23 днів, відповідно. Натомість, виділення вірусу не спостерігалось в собак, вакцинованих ороназально. Навіть незважаючи на те, що імунні механізми захисту від CCoV інфекції залишаються неясними, за допомогою тесту ELISA спостерігали зв'язок між рівнями фекальних IgA до CCoV і ступенем захисту від зараження вірусом. Результати демонструють залежність між кишковими антитілами IgA і захистом собак від інфекції. Зважаючи на те, що IgAs проти

ССоV відіграє фундаментальну захисну роль, важливо оцінити вакцини як щодо їх типу (ML чи інактивована), так і шлях інокуляції [68].

Результати досліджень R. L. Graham і співав (2018) показали, що адаптація до вірулентності CoV відрізняється у молодих і старих тварин, особливо у поєднанні з варіаціями вірусних патогенних детермінант. Хоча імунне старіння може підвищити вірулентність вірусу, дані авторів підтверджують нову гіпотезу, що вірулентні зоонозні коронавіруси швидше можуть з'являтися після пасажу *in vivo*, де існують численні еволюційні шляхи, які можуть програмувати вірулентність вірусу, особливо у літніх [42]. Імунна система у старих тварин реагує по-різному і, зазвичай сильніше, на мікробний виклик, причому імунна відповідь відхилена в бік виражених природних імунних ефектів і дефектів адаптивного імунітету. Проте, стосовно CoV інфекції, ця підвищена імунна відповідь, представлена в контексті додаткової делеції ORF, може служити важелем вірулентності, утримуючи рівновагу між основним імунологічним розпізнаванням і важким захворюванням, можливо, через дефекти в поширенні й витривалості. Ці потенційні наслідки на імунітет господаря стверджують, що стабільний кандидат для розробки вакцини повинен враховувати потенціал для змін у додаткових ORFs [42].

Тому живі атенуйовані вакцини залишаються ключовими гравцями у глобальному зниженні тяжкості перебігу захворювань, пов'язаних з вірусними інфекціями в людей, в тваринництві і в тварин-компаньйонів. Історично і одночасно з успіхом використовувалися живі ослаблені вакцини для боротьби з спалахами кору, епідемічного паротиту, краснухи, поліомієліту, жовтої лихоманки та вірусної віспи. Проте, живі аттенуйовані вакцини також пов'язані з ризиком реверсії через мутаційні або рекомбінаційні процеси, які можуть викликати небезпечні спалахи у невакцинованих популяціях, включаючи тварин [42], значною мірою тому, що стабільність ослаблення не може бути чітко визначена або забезпечена. Наприклад, у 2012 році в Китаї з'явилися високопатогенні штами вірусу епідемічної діареї свиней (PEDV), що спровокували існуючі вакцини шляхом рекомбінації РНК між штамами дикого

типу і живим аттенуйованим PEDV і між штамами вірусу пташиного інфекційного бронхіту (IBV), викликав тим самим появу нових спалахів, зазначили автори. Таким чином, необхідні заходи щодо стабілізації живих ослаблених вакцин проти реверсії, особливо для таких вірусів, як CoVs, які використовують рекомбінацію як нормальну особливість реплікаційного циклу, оскільки випадкові рекомбінації в контексті ко-інфекції можуть ненавмисно ввести алелі з підвищеною вірулентністю в ослаблений геном вакцини з важко передбачуваними наслідками [42]. Авторами й деякими групами дослідників, вже розроблені нові стратегії регулювання і контролю, які послаблюють патогенез РНК вірусу, а також у випадку CoVs – розвитку мутантів, що запобігає поверненню відновлення вірулентності [42].

Зважаючи на те, що CCoV в фекаліях природно інфікованих цуценят виділяється дуже довго, ефективна імунізація їх проти CCoV є основою для контролю зараження вірусом в популяції собак, особливо в притулках для тварин. Тим не менш, 2003 року робоча група з рекомендації вакцинації Vaccine Guidelines Task Force ААНА не рекомендувала використовувати доступні, на той час, CCoV вакцини, повідомляє [68].

За повідомленням [84], в даний час більшість собак на північному сході Китаю вакцинують проти CPV-2, *canine distemper virus*, *canine parainfluenza virus*, *canine adenovirus type 1*, *canine adenovirus type 2*. За даними авторів, з 57 CCoV-позитивних зразків імунізовані та неімунізовані тварини становили 43,86% і 36,84%, відповідно. Цей результат продемонстрував, що на північному сході Китаю, зокрема, вакцинація проти інших собачих вірусів не впливає на CCoV інфекції в популяції собак. Враховуючи високі показники поширеності та ко-інфекції CCoV, автори вважають необхідною імунізацію проти CCoV в популяції собак на північному сході Китаю, незважаючи на суперечливість щодо забезпечення CCoV вакцинами адекватного імунітету [68, 69, 72].

О. Авсі й співав (2016) також вважають, що вакцинація проти CCoV може бути найбільш корисною в програмі профілактики CCoV інфекції [13]. У Японії для запобігання CCoV-II інфекції собаки також вакцинуються. У дослідженні

Takano T. et. al (2016) не було виявлено кореляції між титрами антитіл проти FCoV-I і CCoV-II у цуценят, які отримували вакцину CCoV-II, що свідчить про те, що нейтралізація анти-FCoV-I антитіл у зразках сироватки собак у відповідь на CCoV-II інфекцію не відбувалась, отже, інфекції CCoV-I не можливо запобігти звичайною вакциною CCoV-II [81]. Виходячи з цих фактів і результатів дослідження, потрібна розробка вакцини, здатної запобігти інфекції CCoV-I, наголошують автори.

З продовженням ідентифікації зоонозних популяцій CoV, які генетично схожі з смертельним людським і тваринним CoV, часто з лише декількома відсотками відмінностей між зоонозними і летальними людськими послідовностями багато дослідників, підкреслюють необхідність швидкої імплементації універсальної послаблюючої платформи для розробки живої атенуваної CoV вакцини [42].

Єдиним способом забезпечення профілактики захворювання є уникнення контакту з інфікованими собаками і їх екскрементами, вважає [68]. Переміщення, антисанітарні умови, стрес під час тренувань й інші екологічні умови сприяють розвитку клінічної хвороби. Ентерокоронавіруси помірно стійкі до кислот і тепла, але значно меншою мірою, ніж парвовіруси. CCoV інактивується більшістю бактерицидних агентів, ефективними проти інших оболонкових вірусів. Дезінфекція розплідників і обладнання 3% розчином гіпохлориту дуже ефективна при знищенні CCoV, але не перешкоджає передачі збудника між собаками. CCoV є високо контагіозним; як тільки вірус встановлено в розпліднику, поширення інфекції вже складно контролювати. Собаки, які одужали, імунні до реінфекції, але тривалість імунітету невідома [68]. Цуценята стають імунними до інфекції після одужання; однак, титри антитіл в сироватці можуть бути низькими. Місцевий імунітет, опосередкований кишковим IgA, вважається важливим для захисту від CCoV-інфекції. Рівень материнських антитіл в собак з постраждалих розплідників, як правило, низький, а в новонароджених щенят титри присутні лише 4 - 5 тижнів, зауважує автор.

Заклучення

Винаходи та досягнення в технології ампліфікації нуклеїнових кислот, автоматизація ДНК послідовностей та біоінформаційні інструменти за останні десятиліття зробили революцію в характеристиці та класифікації всіх видів інфекційних агентів [87], в тому числі й коронавірусів.

Коронавіруси є захоплюючою групою вірусів, які забезпечують тваринні моделі патогенезу, особливі молекулярні механізми транскрипції та рекомбінації, а також появу нових патогенів [85]. Коронавіруси характеризуються значною здатністю до генетичних змін, що дозволяє їм адаптуватися до нових господарів і екологічних ніш, іноді викликаючи зоонозні спалахи з катастрофічними наслідками, подібними епідемії SARS 2003 року [53]. Виникнення SARS та ідентифікація коронавірусу як етіологічного агента захворювання було несподіваним в спільноті коронавірусів, оскільки це був перший безумовний зв'язок коронавірусу з важким захворюванням у людей. Ідентифікація NL63 і HKU1 надає приклади інших, щойно описаних, коронавірусів людини [85]. Беручи всі дані разом, можна стверджувати, що жодна з використаних тваринних моделей (миші, хом'яки, нелюдські примати або тхорі) наразі не відтворює індуковане SARS-CoV захворювання, що спостерігається у людей. Респіраторні тракти цих тварин можуть бути експериментально інфіковані SARS-CoV; проте інфекції залишаються субклінічними, а патологічні дані не узгоджуються з хворобою людини. Отже, тваринні моделі для вивчення патогенезу SARS потребують подальшого розвитку. Одним з напрямків, які вимагають додаткового дослідження, є подальша адаптація SARS-CoV до різних видів тварин. Ця адаптація, ймовірно, призведе до появи більш патогенних варіантів SARS у конкретного господаря. Варіанти вірусу грипу і вірусу Ебола, які є патогенними для мишей, були відібрані шляхом серійного пасажу в цих тварин. Досвід застосування інших коронавірусів, таких як MHV, свідчить про те, що адаптація відбувається саме шляхом серійного пасажу. Слід підкреслити, що ці тварини (зокрема, миші та

макаки) в даний час використовуються для дослідження вакцин. Однак наше розуміння патогенезу атипової пневмонії буде ускладнене до тих пір, поки не будуть розроблені тваринні моделі, в яких клінічне захворювання і патологічні дані імітуватимуть захворювання людини на SARS [85].

Після першої ідентифікації CCoV в 1971 р., захворювання, викликане собачим коронавірусом, не було досліджено на достатньому рівні, тому роль вірусу в кишкових захворюваннях собак, не була чітко встановлена. Тільки після виникнення в 2002 р. атипової пневмонії в людини нова увага була сфокусована на коронавірусах. Унаслідок відносно високої частоти мутацій РНК-позитивних вірусів, CCoV еволюціонували і з розвитком, протягом останніх десятиліть, біомолекулярних методів, були виявлені нові вірусні штами, серотипи і підтипи в інфікованих собак. Враховуючи значну поширеність CCoV інфекції в популяціях собак, було проведено ряд досліджень, присвячених епідеміологічній значимості цих вірусів і підкреслено необхідність подальшого вивчення біології CCoVs і їх ролі в патогенезі інфекцій [73].

Після SARS епідемії спостерігається помітне збільшення кількості виявлених коронавірусів і секвенування коронавірусних геномів. Це збільшення кількості видів коронавірусів і геномів, всеосяжна і зручна база даних для ефективного пошуку послідовностей, а також удосконалені біоінформативні інструменти дозволили нам виконувати значущі геномні, філогенетичні, еволюційні швидкості і відмінності, рекомбінації та інші біоінформативні аналізи щодо родини *Coronaviridae* [87]. Дані, зібрані протягом багатьох років досліджень коронавірусів тварин, дозволили дуже швидко ідентифікувати SARS-CoV, а також секвенування його геному. Дуже швидкий розвиток системи зворотної генетики для SARS-CoV базувався на попередніх системах для інших коронавірусів; що дозволяє розчленовувати ролі окремих генів при інфекції. Знання того, що численні вірусні гени сприяють патогенезу і, зокрема, типу імунної відповіді, говорить нам, що

незначні зміни в послідовності можуть мати великий вплив на патогенний фенотип [85].

Коронавіруси демонструють унікальні молекулярні механізми транскрипції та рекомбінації [53]. Рекомбінація РНК була розвинена як потужний генетичний інструмент для введення бажаних РНК-послідовностей у геноми CoV, і виявила себе як важливий механізм у природній еволюції CoVs. Наприклад, нові штами IBV у пташиних зграях є результатом природної рекомбінації між різними польовими штамми. FCoV типу 2 виникли внаслідок рекомбінацій між FCoV типу 1, повністю котячим і CCoV, результатом чого є геном FCoV, що містить ген шипу і частину суміжного гена від CCoV [72]. Рекомбінація може відігравати певну роль в еволюції різних видів коронавірусу, а також може пояснити отримання HE-гена з мРНК вірусу грипу С – предка бетакоронавірусів [73]. S-білок PEDV займає проміжне положення між HCoV 229E і TGEV, в той час як S-білок PRCoV дуже пов'язаний з TGEV, але має велику делецію в N-кінці (більше 200 амінокислот), що може пояснити зміни в патобіології вірусу [73]. SARS з'явився в Китаї в листопаді 2002 року, як хвороба людини пов'язана з пневмонією. Етіологічним агентом SARS виявився вірус тварин, який перетнувся з людьми. Існування делеції 29-nt послідовності в геномі CoV диких ссавців підтверджує адаптацію цього нового вірусу до людини [73]. Як наслідок відносно високої частоти мутацій, РНК-віруси мають потенціал швидко пристосуватися до певних негативних для них впливів, зокрема, таких як імунна система. Рекомбінації, що впливають на CCoV, могли б прояснити еволюційні процеси, що призводять до проліферації нових вірусних штамів, серотипів і підтипів, як це сталося з SARS-CoV і штамом CB/05 CCoV типу 2. Незважаючи на різні дослідження CCoVs, існує багато аспектів, які ще потрібно уточнити: значення одночасного зараження CCoV типу 1 і типу 2, реальну патогенетичну роль цих двох вірусів, імунна відповідь проти CCoV типу 1 і типу 2, а також оцінку розподілу CB/05-подібних CCoV типу 2 серед популяцій собак [73].

Одне з найбільш важливих знань, отриманих за останні роки, полягає в тому, що коронавіруси перетнули і, ймовірно, продовжуватимуть перетинатися між видами, тим самим викликаючи появу хвороб у нових видів-господарів, як це було у випадку епідемії SARS в 2003 році. Коронавіруси в тварин-компаньонів були описані задовго до появи SARS-CoV. Вони ілюструють характерні риси коронавірусів, такі як: наявність різних біотипів і генотипів у межах кожного виду, вирішальна роль додаткових білків у вірулентності й можливість міжвидової передачі [53]. FCoV та CCoV є загальними патогенами, які легко еволюціонують. Тому необхідно проводити постійний епідеміологічний нагляд за цими вірусами, щоб якомога раніше виявляти появу нових варіантів, які можуть мати підвищену патогенність та/або новий діапазон господарів. Знання, накопичені щодо FCoV та CCoV, узагальнені в роботі [53], зробили істотний внесок у розуміння генетичної еволюції та патобіології коронавірусів. Спостереження що, шипи білку і додаткові білки впливають на патогенез і діапазон господарів, значно сприяли молекулярному дослідженню SARS-CoV. Наступна головна мета - визначити молекулярні детермінанти вірулентності й тропізму. Прогрес у цих галузях вимагатиме кращого розуміння взаємодій між протеїнами вірусними та хазяїна, і наскільки вони коронавірус – і орган-специфічні. У цьому контексті дослідження FCoV та CCoV, як представників родини *Coronaviridae*, знову будуть корисними [53].

Джерелом більшості нових інфекційних захворювань є дика природа, що підкреслює важливість розробки широко застосовуваних стратегій щодо створення вакцин призначених для родин вірусів, які перебувають у великих зоонозних спільнотах [42]. Отже, живі атенуйовані вакцини, які можуть викликати збалансовану природну і адаптивну, часто протягом усього життя, захисну імунну відповідь, включаючи лактогенний імунітет, є ідеальними основами для розробки вакцин для людей і тварин [42], які можуть бути швидко і широко впроваджені. Досвід розробки коронавірусних вакцин також сприятиме розвитку вакцин для атипової пневмонії. Майбутні напрямки досліджень SARS-CoV включають подальше розуміння механізмів реплікації;

з'ясування молекулярних детермінант вірулентності, тропізму та імунної відповіді з урахуванням можливої ролі групо-специфічних білків; розробку стратегій вакцин і противірусних терапій для вірусів тварин і людини; і, швидше за все, виділення і характеристику нових патогенних коронавірусів людини [85].

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Дзюблик І. В. Коронавіруси людини та захворювання органів дихання / І. В. Дзюблик, О.В. Обертинська // Здоров'я суспільства. – 2015. – № 1-2. – С. 39-47.
2. Дуда О.К. Коронавірусні інфекції: загроза з Близького Сходу, спричинена MERS-CoV? / О.К. Дуда, Л.П. Коцюбайло // Здоров'я України. – 2015. – № 17 (366). – С. 57 – 58.
3. Диагностика кишечных инфекций собак методами ПЦР и ИФА
Джерело : <http://www.vetlab.com.ua/ua/articles/16.html>
4. Лісова В.В. Гістологічні зміни в собак за коронавірусної інфекції / В.В. Лісова, О. Дубіненко // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. – Львів. – 2017. – Т. 19. – № 78. – С. 154–157.
5. Лісова В.В. Патоморфологічна діагностика ентеритів вірусної етіології в собак / В.В. Лісова, М.Л. Радзиховський // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. – Львів. – 2018. – Т. 20. – № 83. – С. 299 – 303.
6. Лісова В.В. Патоморфологічна характеристика коронавірусної інфекції в собак / В.В. Лісова, О. Дубіненко // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. – Львів. – 2017. – Т. 19. – № 77. – С. 7–10.
7. Радзиховський М.Л. Гематологічні та біохімічні показники крові собак уражених коронавірусним ентеритом / М.Л. Радзиховський // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. – Львів. – 2017. – Т. 19. – № 77. – С. 170– 173.
8. Радзиховський М. Л. Епізоотологічні особливості коронавірусного ентериту собак [Електронний ресурс] – Режим доступу : <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/veterenarna/article/view/7468/7212>
9. Радзиховський М.Л. Моніторинг ентеритів вірусної етіології у собак / М.Л. Радзиховський // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. – Львів. – 2016. – Т. 18. – № 1 (65). – Ч. 1. – С. 138– 142.

10. Ящук О.В. Моніторинг розповсюдження вірусів серед домашніх котів і собак у м. Дніпропетровськ / О.В. Ящук, Н.В. Черевач, А.І. Вінніков // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина. – 2014. – 5(1). – С. 23-27.
11. Ahmad Z. Middle east respiratory syndrome-coronavirus (mers-cov) in india and abroad / Z. Ahmad, K. Singh, J. Akhtar et al. // International J of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2017. – Vol. 8(11). – P. 4496-4512. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.8(11).4496-12 Режим доступу: https://www.researchgate.net/publication/321705793_MIDDLE_EAST_RESPIRATORY_SYNDROME-CORONAVIRUS_MERS-CoV_IN_INDIA_AND_ABROAD
12. Alfano F. Identification of Pantropic Canine Coronavirus in a Wolf (*Canis lupus italicus*) in Italy / F. Alfano, G. Dowgier, M. P. Valentino et al. // Journal of Wildlife Diseases. – 2018. doi.org/10.7589/2018-07-182. Режим доступу : <http://www.jwildlifedis.org/doi/pdf/10.7589/2018-07-182>
13. Avci O. Canine coronavirus infection in dogs in Turkey: Virologicaland serological evidence / O. Avci, O. Bulut, O. Yapici, S. Hasircioglu, A. Simsek / Indian J. Anim. Res. – 2016. – 50 (4), P. 565-568. Режим доступу : https://www.researchgate.net/publication/305783084_Canine_coronavirus_infection_in_dogs_in_Turkey_Virologicaland_serological_evidence
14. Benetka V. M gene analysis of atypical strains of feline and canine coronavirus circulating in an Austrian animal shelter /V. Benetka, J. Kolodziejek, K. Walk, M. Rennhofer, K. Möstl // Vet. Rec. – 2006. – 159. – P. 170–174.
15. Buonavoglia C. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs / Buonavoglia C., Decaro N., Martella V., Elia G., Campolo M. et al. // Emerg. Infect. Dis. – 2006. – 12. – P. 492–494.
16. Cavalli A. Detection and genetic characterization of Canine parvovirus and Canine coronavirus strains circulating in district of Tirana in Albania / A. Cavalli, C. Desario, I. Kusi et al. // J Vet Diagn Invest. – 2014. – 26(4). – 563–566. Режим доступу : <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1040638714538965>
17. Cavanagh D. Coronaviruses from pheasants (Phasianus colchicus) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis

virus) and turkeys / D. Cavanagh , K. Mawditt , D. de B. Welchman , P. Britton & R. E. Gough // Avian Pathology. – 2002. – 31:1. – P. 81-93. DOI: 10.1080/03079450120106651. Режим доступа :

<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/03079450120106651>

18. Costa E.M. Molecular characterization of canine coronavirus strains circulating in Brazil / Costa E.M., de Castro T.X., Bottino Fde O., Garcia Rde C. // Vet Microbiol. – 2014. – 168. – P. 8–15. Режим доступа : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113513004756>

19. Decaro N. Genotype-specific fluorogenic RT-PCR assays for the detection and quantitation of canine coronavirus type I and type II RNA in faecal samples of dogs / N. Decaro, V. Martella, D. Ricci et al. // J. Virol. Methods. – 2005. – V. 130. – 1-2. – P. 72–78.

20. Decaro N. An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology / N. Decaro, C. Buonavoglia // Vet Microbiol. – 2008. – V. 10. – 132(3-4). – P. 221-234.

21. Decaro N. A pantropic canine coronavirus genetically related to the prototype isolate CB/05 / Nicola Decaro, Viviana Mari, Marcela von Reitzenstein et al. // Vet Microbiol. – 2012. – V. 159. – 1-2. – P. 239-244.

22. Decaro N. Canine Coronavirus: Not Only an Enteric Pathogen / Nicola Decaro, Canio Buonavoglia // Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. – 2011. – V. 41. – 6. – P. 1121-1132. Режим доступа : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195561611001379>

23. Decaro N. European surveillance for pantropic canine coronavirus / Decaro N, Cordonnier N, Demeter Z, Egberink H, Elia G, Grellet A, et al. // J Clin Microbiol. – 2013. – 51. – P. 83–88; doi:10.1128/JCM.02466-12. Режим доступа : <http://jcm.asm.org/content/51/1/83.full>

24. Decaro N. Full-Genome Sequence of Pantropic Canine Coronavirus / N. Decaro, V. Mari, G. Dowgier, G. Elia, G. Lanave, M. L. Colaianni, and C. Buonavoglia // Genome Announc. – 2015. – 3(3): e00401-15.

doi: 10.1128/genomeA.00401-15. Режим доступа :
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4424302/>

25. Decaro N. Full-length genome analysis of canine coronavirus type I / N. Decaro, V. Mari, G. Elia, G. Lanave, G. Dowgier et al. // *Virus Res.* – 2015. – 210. – P.100–105. Режим доступа :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170215300228>

26. Decaro N. Immunity after natural exposure to enteric canine coronavirus does not provide complete protection against infection with the new pantropic CB/05 strain / N. Decaro, G. Elia, V. Martella, M. Campolo, V. Mari et al. // *Vaccine.* – 2010. – 28. – P. 724–729. Режим доступа :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X09016077?via%3Dihub>

27. Decaro N. Molecular characterisation of the virulent canine coronavirus CB/05 strain / N. Decaro, V. Martella, G. Elia, M. Campolo, C. Desario et al. // *Virus Res.* – 2007. – 125. – P. 54–60. doi:10.1016/j.virusres.2006.12.006.

28. Decaro N. Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe / N. Decaro, V. Mari, G. Elia, D.D. Addie, M. Camero et al. // *Emerg Infect Dis.* – 2010. – 16. – P. 41–47. Режим доступа : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2874359/>

29. Decaro N. Recombinant canine coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus of Swine are circulating in dogs / N. Decaro, V. Mari, M. Campolo, A. Lorusso, M. Camero et al. // *J. Virol.* – 2009. – 83. – P. 1532–1537.

30. Decaro N. Quantitation of canine coronavirus RNA in the faeces of dogs by TaqMan RT-PCR / N. Decaro, A. Pratelli, M. Campolo et al. // *J. Virol. Methods.* – 2004. – 119. – P. 145–150.

31. Decaro N. Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs / N. Decaro, C. Desario, M. Billi et al. // *Vet J.* – 2011. – 187. – P. 195–199. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.10.027

32. Ellis J. Seroepidemiology of respiratory (group 2) canine coronavirus, canine parainfluenza virus, and Bordetella - bronchiseptica infections in urban dogs in a humane shelter and in rural dogs in small communities / J. Ellis, E. Anseeuw, S. Gow, H. Bryan, A. Salb et al. // *Can. Vet. J.* – 2011. – 52. – P. 861-68.

33. Erles K. Canine Respiratory Coronavirus: An Emerging Pathogen in the Canine Infectious Respiratory Disease Complex / K. Erles, J. Brownlie // *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. – 2008. – 38 (4). – P. 815-825.

34. Erles K. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease / K. Erles, C. Toomey, H.W. Brooks, J. Brownlie // *Virology*. – 2003. – 310. – P. 216–223.

35. Erles K. Isolation and sequence analysis of canine respiratory coronavirus / K. Erles, K.B. Shiu, J. Brownlie // *Virus Res*. – 2007. – 124. – P. 78–87.

36. Escutenaire S. Characterization of divergent and atypical canine coronaviruses from Sweden / S. Escutenaire, M. Isaksson, L.H. Renstrom, B. Klingeborn, C. Buonavoglia et al. // *Arch. Virol.* – 2007. – 152. – P. 1507–1514.
Режим доступа : <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-007-0986-1>

37. Evermann J. Canine coronavirus-associated puppy mortality without evidence of concurrent canine parvovirus infection / J. Evermann, J.R. Abbott, S. Han // *J. Vet. Diagn. Investig.* – 2005. – 17. – P. 610–614. Режим доступа : <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/104063870501700618>

38. Forni D. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes / D. Forni, R. Cagliani, M. Clerici, M. Sironi // *Trends in microbiology*. – 2017. – 25 (1) . – P. 35-48. Режим доступа : [http://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(16\)30133-0](http://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(16)30133-0)

39. Fouchier Ron A. M. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans / Ron A. M. Fouchier, Nico G. Hartwig, Theo M. Bestebroer et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – 101. – P. 6212-6216. doi.org/10.1073/pnas.0400762101

40. Gizzi A.B.R. Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel / A.B.R. Gizzi, S.T. Oliveira, C.M. Leutenegger et al. // *BMC Veterinary research*. – 2014. – № 6. – P. 81–90. Режим доступа : <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-10-23>

41. Godsall S.A. Epidemiology of canine parvovirus and coronavirus in dogs presented with severe diarrhoea to PDSA / Godsall SA, Clegg SR, Stavisky JH // Pet Aid hospitals. Vet Rec. – 2010. – 167. – P. 196–201, doi: 10.1136/vr.c3095.

42. Graham R. L. Evaluation of a recombination-resistant coronavirus as a broadly applicable, rapidly implementable vaccine platform / R. L. Graham, D. J. Deming, M. E. Deming, B. L. Yount, R. S. Baric // Communications Biology. – 2018. – V. 1. – Article number: 179. Режим доступа : <https://www.nature.com/articles/s42003-018-0175-7>

43. Graham R. L. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission / R. L. Graham, R. S. Baric // J Virol. – 2010. – 84. – P. 3134–3146. Режим доступа : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2838128/>

44. Guan Y. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China / Y. Guan, B. J. Zheng, Y. Q. He X. L. Liu, Z. X. Zhuang et al. // Science. – 2003. – V. 302. – 5643. – P. 276-278. DOI: 10.1126/science.1087139 Режим доступа : <http://science.sciencemag.org/content/sci/302/5643/276.full.pdf>

45. Haijema B. J. Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis / B. J. Haijema, H. Volders, P. J. M. Rottier // J. Virol. – 2004. – 78. – P. 3863-3871. DOI: 10.1128/JVI.78.8.3863-3871.2004 Режим доступа : <https://jvi.asm.org/content/jvi/78/8/3863.full.pdf>

46. Hogue, B.G.; Machamer, C.E. Coronavirus Structural Proteins and Virus Assembly. In *Nidoviruses*; Perlman, S., Gallagher, T., Snijder, E.J., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2008. – P. 179–200.

47. Huxsoll D.L. The prevalence of a group 2 coronavirus in dogs in Japan / D.L. Huxsoll, T. Kaneshima, T. Hohdatsu, K. Satoh, T. Takano et al. // J. Vet. Med. Sci. – 2006. – 68. – P. 21-25.

48. Jeoung S.Y. M gene analysis of canine coronavirus strains detected in Korea / S.Y Jeoung, S.Y Ann, H.T Kim, D. Kim // J Vet Sci. – 2014. – 15. – P. 495–502. Режим доступа : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4269591/>

49. Jonassen C. M. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columbia livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*) / C. M. Jonassen, T. Kofstad, I. L. Larsen, A. Lovland, K. Handeland, A. Follestad, A. Lillehaug // J. Gen. Virol. – 2005. – 86. – P. 1597-1607. doi: 10.1099/vir.0.80927-0

50. Karesh W. B. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories / W. B. Karesh, A. Dobson, J. O. Lloyd-Smith et al. // Lancet, 2012. – V. 380. – P. 1936–1945. Режим доступа : [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(12\)61678-X/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(12)61678-X/fulltext)

51. Kuo L. The Small Envelope Protein E Is Not Essential for Murine Coronavirus Replication / L. Kuo, P. S. Masters // J. Virol. 2003. – 77. – P. 4597-4608. DOI: 10.1128/JVI.77.8.4597-4608.2003 Режим доступа : <https://jvi.asm.org/content/jvi/77/8/4597.full.pdf>

52. Le Poder Sophie. Infection of cats with atypical feline coronaviruses harbouring a truncated form of the canine type I non-structural ORF3 gene / Sophie Le Poder, Anne-Laure Pham-Hung d’Alexandry d’Orangiani, Lidia Duarte et al. // Infection, Genetics and Evolution. – 2013. – V. 20. – P. 488-494. Режим доступа : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134813003651>

53. Le Poder S. Feline and canine coronaviruses: common genetic and pathobiological features / S. Le Poder // Adv Virol. – 2011. – Article ID 609465, 11 pages. Режим доступа : <http://dx.doi.org/10.1155/2011/609465>

54. Licitra Beth N. Canine Enteric Coronaviruses: Emerging Viral Pathogens with Distinct Recombinant Spike Proteins / Beth N. Licitra , Gerald E. Duhamel, Gary R. Whittaker // Viruses. – 2014. – 6(8). – P. 3363-3376; doi:10.3390/v6083363 Режим доступа : <http://www.mdpi.com/1999-4915/6/8/3363/htm>

55. Lipkin W. Ian. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Recombination and the Evolution of Science and Public Health in China / W. Ian Lipkin // mBio. – 2015. – Vol. 6 (5). – e01381-15 Режим доступа : https://www.researchgate.net/publication/281635925_Middle_East_Respiratory_Syn_drome_Coronavirus_Recombination_and_the_Evolution_of_Science_and_Public_He_alth_in_China

56. Lorusso A. Gain, preservation and loss of a group 1a coronavirus accessory glycoprotein /A. Lorusso, N. Decaro, P. Schellen, P.J.M. Rottier, C. Buonavoglia et al. // J. Virol. – 2008. – 82. – P. 10312–10317. Режим доступа : <http://jvi.asm.org/content/82/20/10312>

57. Lu S . Discovery of a novel canine respiratory coronavirus support genetic recombination among betacoronavirus1/ S. Lu, Y. Wang, Y. Chen at al. // Virus Research, 2017. – 237. – P. 7-13. DOI: 10.1016/j.virusres.2017.05.006.

58. Mackay I. M. MERS coronavirus: Diagnostics, epidemiology and transmission / I. M. Mackay, K. E. Arden // Virology Journal. – 2015. – 12. – P. 222. DOI: 10.1186/s12985-015-0439-5 Режим доступа : https://www.researchgate.net/publication/287966093_MERS_coronavirus_Diagnosti_cs_epidemiology_and_transmission

59. Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China / Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium // Science. – 2004. – 303. – P. 1666-1669.

60. Masters P.S. The molecular biology of coronaviruses / P.S. Masters // Adv Virus Res. – 2006. – 66. – P. 193–292. Режим доступа : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065352706660053?via%3Dihub>

61. Naylor M.J. Canine coronavirus in Australian dogs / M.J. Naylor, R.P. Monckton, P.R. Lehrbach, E.M. Deane // Aust. Vet. J. – 2001. – 79. – P. 116–119. Режим доступа : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11256282>

62. Nichols Hannah. MERS-CoV: What you need to know / Hannah Nichols // Режим доступа : <https://www.medicalnewstoday.com/articles/262538.php>

63. Nguyen D. Characterization of canine coronavirus spread among domestic dogs in Vietnam / D. Nguyen, Y. Terada, S. Minami et al. // J Vet Med Sci, 2017. – 79(2). – P. 343–349. doi: 10.1292/jvms.16-0538. Режим доступа : https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/79/2/79_16-0538/_pdf/-char/en
64. Nordqvist C. Coronaviruses: Symptoms, Treatments and Variants / C. Nordqvist // Режим доступа : <https://www.medicalnewstoday.com/articles/256521.php>
65. Ntafis V. Canine coronavirus, Greece. Molecular analysis and genetic diversity characterization / V. Ntafis, V. Mari, N. Decaro et al. // Infect Genet Evol. – 2013. – V. 16. – P. 129-136.
66. Ntafis V. Isolation, tissue distribution and molecular characterization of two recombinant canine coronavirus strains / V. Ntafis, V. Mari, N. Decaro et al. // Vet. Microbiol. – 2011. – 151. – P. 238–244. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.03.008.
67. Pinto LD. Characterization of pantropic canine coronavirus from Brazil / LD. Pinto, IN. Barros, RF. Budaszewski et al. // Vet J. – 2014. – 202. – P. 659–662. doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.006
68. Pratelli A. Canine Coronavirus Infection / A. Pratelli // In: Recent Advances in Canine Infectious Diseases, Carmichael L. (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY; Режим доступа: http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/pratelli/chapter.asp?LA=1
69. Pratelli A. Efficacy of an inactivated canine coronavirus vaccine in pups / Pratelli A, Tinelli A, Decaro N, Cirone F, Elia G. et al. // New Microbiol. – 2003. – 26. – P. 151–155. Режим доступа : <http://europemc.org/abstract/med/12737196>
70. Pratelli A. Identification of coronaviruses in dogs that segregate separately from the canine coronavirus genotype / A. Pratelli, V. Martella, M. Pistello, G. Elia, N. Decaro et al. // J. Virol. Methods. – 2003a. – 107. – P. 213–222. Режим доступа : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016609340200246X>
71. Pratelli A. Genetic diversity of a canine coronavirus detected in pups with diarrhoea in Italy / A. Pratelli, V. Martella, N. Decaro, A. Tinelli, M. Camero, et al. //

J. Virol. Methods. – 2003b. – 110. – P. 9–17 Режим доступа : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093403000818>

72. Pratelli A. Safety and efficacy of a modified-live canine coronavirus vaccine in dogs / Pratelli A, Tinelli A, Decaro N. et al. // Vet Microbiol. – 2004. – 99. – P. 43–49. Режим доступа : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811350300381X>

73. Pratelli A. The Evolutionary Processes of Canine Coronaviruses / A. Pratelli // Advances in Virology. – Vol. 2011. – Article ID 562831, 10 pages. doi.org/10.1155/2011/562831. Режим доступа : <https://www.hindawi.com/journals/av/2011/562831/>

74. Priestnall S.L. New and emerging pathogens in canine infectious respiratory disease / S.L. Priestnall, J.A. Mitchell, C.A. Walker, K. Erles, J. Brownlie // Vet. Pathol. – 2014. – 51. – P. 492-504.

75. Saif L. J. Animal coronaviruses: what can they teach us about the severe acute respiratory syndrome? / L. J. Saif // Rev. Sci. Technol. – 2004. – V. 23. – P. 643-660. Режим доступа: <https://pdfs.semanticscholar.org/0a6d/2d51211b4ab745f0af000920a700cecbf820.pdf>

76. Schulz B.S. Comparison of the prevalence of enteric viruses in healthy dogs and those with acute haemorrhagic diarrhoea by electron microscopy / B.S. Schulz, C. Strauch, R.S. Mueller, W. Eichhorn, K. Hartmann // J. Small Anim. Pract. – 2008. – 49. – P. 84–88.

77. Slingenbergh, J.I. Ecological sources of zoonotic diseases / J.I. Slingenbergh, M. Gilbert, K.I. de Balogh, W. Wint // Rev. Sci. Tech. – 2004. – 23. – P. 467-484.

78. Soma T. Detection and genotyping of canine coronavirus RNA in diarrheic dogs in Japan / T. Soma, T. Ohinata, H. Ishii et al. // Res Vet Sci. – 2011. – 90. – P. 205–207.

79. Stavisky J. Cross sectional and longitudinal surveys of canine enteric coronavirus infection in kennelled dogs: a molecular marker for biosecurity / J.

Stavisky, G. Pinchbeck, RM. Gaskell et al. // Infect Genet Evol. – 2012. – 12. – P. 1419–1426.

80. Su S. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses / S. Su, G. Wong, W. Shi, J. Liu, A. C.K. Lai et al. // Trends in microbiology. – 2016. – 24 (6). – P. 490-502. Режим доступа: [http://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(16\)00071-8](http://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(16)00071-8)

81. Takano T. Prevalence of canine coronavirus (CCoV) in dog in Japan: detection of CCoV RNA and retrospective serological analysis / T. Takano, S. Yamashita, M. Murata-Ohkubo, K. Satoh, T. Doki and T. Hohdatsu // J Vet Med Sci. – 2016. – 78(2). – P. 341–345. doi: 10.1292/jvms.15-0347. Режим доступа : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4785132/>

82. Tekes G. Feline Coronaviruses: Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis / G. Tekes, H.J.Thiel // Advances in Virus Research. – 2016. – V. 96. – P. 193-218.

83. Terada Y. Emergence of Pathogenic Coronaviruses in Cats by Homologous Recombination between Feline and Canine Coronaviruses / Y. Terada, N. Matsui, K. Noguchi et al. // PLoS ONE. – 2014. – 9(9): e106534. Режим доступа : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106534>

84. Wang X. Co-Circulation of Canine Coronavirus I and IIa/b with High Prevalence and Genetic Diversity in Heilongjiang Province, Northeast China / X. Wang, C. Li, D. Guo et al. // PLoS One. – 2016. Режим доступа : <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0146975>

85. Weiss Susan R. Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus / Susan R. Weiss, Sonia Navas-Martin // Microbiol Mol Biol Rev. – 2005. – 69(4). – P. 635–664. doi: 10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005. Режим доступа : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1306801/>

86. Woo P. C. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia / P.C. Woo, S. K.

Lau, C. M. Chu at all. // J. Virol. – 2005. – 79. – P. 884-895. doi : 10.1128/JVI.79.2.884-895.2005

87. Woo P. C . Coronavirus genomics and bioinformatics analysis / P.C. Woo, Y. Huang, S.K. Lau, K.Y. Yuen // Viruses. – 2010. – 2(8). – P. 1804–1820. doi: 10.3390/v2081803. Режим доступа : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3185738/>

88. Yachi A. Survey of dogs in Japan for group 2 canine coronavirus infection / A. Yachi, M. Mochizuki // Journal of Clinical Microbiology. – 2006. – 44. – 7. – P. 2615–2618.

89. Zaki Ali M. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia / Ali M. Zaki, Sander van Boheemen, Theo M. Bestebroer, Albert D.M.E. Osterhaus and Ron A.M. Fouchier // N Engl J Med. – 2012. – 367. – P. 1814-1820. Режим доступа : <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1211721>

90. Zappulli V. Systemic fatal type II coronavirus infection in a dog: Pathological findings and immunohistochemistry / V. Zappulli, D. Caliarì, L. Cavicchioli et al. // Research in Veterinary Science. – 2008. – V. 84. – 2. – P. 278-282.

91. Zicola A. Fatal outbreaks in dogs associated with pantropic canine coronavirus in France and Belgium / A. Zicola, S. Jolly, E. Mathijs, D. Ziant, N. Decaro et al. // J. Small Anim. Pract. – 2012. – 53. – P. 297–300. doi: 10.1111/j.1748-5827.2011.01178.x Режим доступа : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.2011.01178.x/pdf>