

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta tropického zemědělství



**Fakulta tropického
zemědělství**

Infekce zajícovců koronavirem SARS-CoV-2 a dalšími
koronaviry

Bakalářská práce

Praha 2024

Vypracovala:

Helena Adamová

Vedoucí práce:

RNDr. Jiří Černý, Ph.D.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Helena Adamová

Tropické zemědělství

Název práce

Infekce zajícův koronavirem SARS-CoV-2 a dalšími koronaviry

Název anglicky

SARS-CoV-2 and other coronaviruses of lagomorphs

Cíle práce

V průběhu současné pandemie onemocnění COVID-19 způsobeného betakoronavirem SARS-CoV-2 se ukázalo, že tento virus je schopen krom lidí infikovat i velké množství dalších savců. Mezi možné hostitele SARS-CoV-2 patří i zajícovci (Lagomorpha). U králíků (*Oryctolagus cuniculus*) byla infekce navozena laboratorně. Přirozená infekce ale zatím pozorována nebyla, podobně jako u zajíců. Kromě SARS-CoV-2 se zajícovci mohou nakazit i jinými koronaviry.

Cílem této práce je vypracovat literární rešerši na téma koronavirových infekcí u králíků a otestovat vybrané vzorky zajícův na přítomnost koronavirus SARS-CoV-2.

Metodika

Bakalářská práce je součástí širšího výzkumu zaměřeného na infekce SARS-CoV-2 u zvířat. Její součástí je otestování sebraných vzorků sér zajíců a případně i dalších zajícův na přítomnost protilátek proti koronaviru SARS-CoV-2 za využití metody ELISA. V průběhu práce bude pak testována metodika, kdy je místo specifické sekundární protilátky detekující zaječí imunoglobuliny využit protein A, který má širší specificitu.

Doporučený rozsah práce

30 normostran

Klíčová slova

SARS-CoV-2, COVID-19, zajícovci, koronaviry

Doporučené zdroje informací

Angela M Bosco-Lauth, Audrey Walker, Lauren Guilbert, Stephanie Porter, Airn Hartwig, Emma McVicker, Helle Bielefeldt-Ohmann, Richard A Bowen: Susceptibility of livestock to SARS-CoV-2 infection. *Emerg Microbes Infect.* 2021 Dec;10(1):2199-2201. doi: 10.1080/22221751.2021.2003724.

Małgorzata Pomorska-Mól, Hanna Turlewicz-Podbielska, Maciej Gogulski, Jakub J Ruszkowski, Magdalena Kubiak, Anna Kuriga, Przemysław Barket, Marek Postrzech: A cross-sectional retrospective study of SARS-CoV-2 seroprevalence in domestic cats, dogs and rabbits in Poland. *BMC Vet Res.* 2021 Oct 7;17(1):322. doi: 10.1186/s12917-021-03033-2.

Silvia Preziuso: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Exhibits High Predicted Binding Affinity to ACE2 from Lagomorphs (Rabbits and Pikas). *Animals (Basel).* 2020 Aug 20;10(9):1460. doi: 10.3390/ani10091460.

Předběžný termín obhajoby

LS 2023/24 – FTZ

Vedoucí práce

RNDr. Jiří Černý, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra chovu zvířat a potravinářství v tropech

Elektronicky schváleno dne 16. 1. 2024

Mgr. Barbora Černá Bolfíková, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 25. 1. 2024

prof. dr. ir. Patrick Van Damme

Děkan

V Praze dne 30. 01. 2024

Prohlášení

Čestně prohlašuji, že jsem tuto práci na téma Infekce zajícovců koronavirem SARS-CoV-2 a dalšími koronaviry vypracovala samostatně, veškerý text je v práci původní a originální a všechny použité literární prameny jsem podle pravidel Citační normy FTZ řádně uvedla v referencích.

V Praze dne 17.4.2024

Helena Adamová

Poděkování

Ráda bych využila této příležitosti k poděkování především svému vedoucímu práce, RNDr. Jiřímu Černému, Ph.D., za jeho nepostradatelnou pomoc, cenné rady a vstřícný a neobyčejně přátelský přístup, kterým mě doprovázel během psaní práce. Také bych ráda poděkovala Ing. Silvii Neradilové, Ph.D., Ing. Vladimíru Faladovi, Adamu Machalovi a mysliveckým spolkům M.S. Doubrava Kladeruby-Němetice, M.S. Skrbeň, M.S. Mezihájí Kněžice, M.S. Hubertus Miroslav, M.S. Artemis Mikulov a M.S. Šlapanice u Brna, kteří mi poskytli vzorky k testování. Veliký dík patří také Jigneshovi Italiya, MVScDr, za pomoc při testování vzorků, a kolegům z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně, kteří ověřili výsledky mého testování. Na závěr bych ráda poděkovala také mé rodině a přátelům, kteří mi byli během studia oporou.

Tato práce byla podpořena Interní grantovou agenturou (IGA) FTZ ČZU, z grantu IGA20233104.

Abstrakt

Infekce zajícův koronavirem SARS-CoV-2 a dalšími koronaviry

Nedávno objevený koronavirus těžkého akutního respiračního syndromu 2 (SARS-CoV-2) je vysoce přenosný a patogenní virus, který v posledních letech zapříčinil pandemii respiračního onemocnění COVID-19. Výzkumy ukázaly, že má tento virus zoonotický charakter a je schopen infikovat kromě člověka také velké množství hospodářsky, ale i chovatelsky významných zvířat. Potenciální hostitelský rezervoár SARS-CoV-2 mohou představovat i zajícovci (Lagomorpha). Jak u králíků (*Oryctolagus cuniculus*), tak i u zajíců (*Lepus europaeus*) a pišťuch (*Ochotona princeps*), byla prokázána schopnost viru navázat se na jejich ACE2, který představuje hlavní cílový receptor viru. U králíků byla kromě laboratorně indukované infekce rovněž zaznamenána infekce přirozená. U ostatních zajícův infekce pozorována nebyla. Kromě SARS-CoV-2 existují další druhy koronavirů, které přirozeně infikují zajícovce. Cílem této práce bylo shrnout základní poznatky o koronavirech, charakterizovat konkrétní zástupce koronavirů, které infikují zajícovce a popsat infekci zajícův koronavirem SARS-CoV-2. V praktické části jsem pak měla za cíl detekovat protilátky proti koronaviru SARS-CoV-2 ve vybraných krevních vzorcích zajíců ulovených na území ČR za využití sérologické metody ELISA. Vzorky, které po testování touto metodou vykazovaly potenciální možnost positivity byly odeslány na Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně, kde metoda virus neutralizační test pozitivitu nepotvrdila. V tuto chvíli tedy neexistují nezvratné důkazy proto, že je SARS-CoV-2 schopen přirozeně infikovat zajíce a efektivně se šířit v jejich populaci.

Klíčová slova: SARS-CoV-2, COVID-19, zajícovci, koronaviry, zoonózy

Author's abstract

SARS-CoV-2 and other coronaviruses of lagomorphs

The recently discovered Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is a highly transmissible and pathogenic virus that has caused pandemic respiratory disease COVID-19 in recent years. Research has shown that this virus has zoonotic nature and is capable of infecting large numbers of livestock, in addition to humans. Lagomorphs may represent a potential host reservoir of SARS-CoV-2. In rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as well as in hares (*Lepus europaeus*) and pikas (*Ochotona princeps*), the ability of the virus to bind to their ACE2, which represents the main target receptor of the virus, has been demonstrated. In addition to laboratory induced infection, natural infection has also been observed in rabbits. No infection was noted in other lagomorphs. In addition to SARS-CoV-2, there are other coronavirus species that naturally infect rabbits. The aim of this study was to summarize the basic knowledge about coronaviruses, to characterize specific representatives of coronaviruses that infect lagomorphs and to describe the infection of lagomorphs with SARS-CoV-2 coronavirus. In the experimental part, I aimed to detect antibodies against SARS-CoV-2 coronavirus in selected blood samples of hares hunted in the Czech Republic using ELISA serological method. Samples that showed potential positivity after testing with this method were sent to the Veterinary Research Institute in Brno, where the virus neutralization test did not confirm positivity. Therefore, there is no conclusive evidence at this time that SARS-CoV-2 is able to naturally infect hares and spread effectively in their population.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, lagomorphs, coronaviruses, zoonoses

Obsah

1.	Úvod	- 1 -
2.	Cíle literární rešerše	- 4 -
3.	Literární rešerše	- 5 -
3.1	Zoonotické koronaviry	- 5 -
3.1.1	Definice zoonóz.....	- 5 -
3.1.2	Původ koronavirů a jejich fylogeneze	- 6 -
3.2	Struktura koronavirů.....	- 9 -
3.2.1	Strukturní spike protein S koronaviru SARS-CoV-2	- 11 -
3.2.2	Mechanismus vstupu koronavirů do hostitelské buňky.....	- 13 -
3.3	Patogenita a virulence.....	- 14 -
3.4	Koronaviry infikující zajícovce	- 16 -
3.4.1	RECV – Enterální koronavirus králíků	- 16 -
3.4.2	RbCoV – Králičí koronavirus.....	- 17 -
3.4.3	RbCoV HKU14 – Králičí koronavirus HKU14	- 19 -
3.4.4	Ostatní koronaviry zajícovců.....	- 19 -
3.5	SARS-CoV-2 u zajícovců.....	- 20 -
4.	Cíle praktické části	- 22 -
5.	Materiál	- 23 -
6.	Metodika.....	- 24 -
6.1	Metodika literární rešerše	- 24 -
6.2	Metodika praktické části.....	- 24 -
7.	Výsledky	- 26 -
8.	Diskuse.....	- 33 -
9.	Závěr	- 36 -
10.	Reference	- 37 -

Seznam obrázků:

Obrázek 1 – Fylogenetický vývoj koronavirových taxonů s příklady hospodářsky významných zástupců.....	- 8 -
Obrázek 2 – Model vývoje rodů koronavirů s příklady hostitelského rozsahu....	- 8 -
Obrázek 3 – Genomická organizace viru SARS-CoV-2.....	- 11 -
Obrázek 4 – Struktura spike proteinu S	- 12 -
Obrázek 5 – Mechanismus vstupu SARS-CoV-2 do hostitelské buňky	- 14 -
Obrázek 6 – Zobrazení lokalit sběru vzorků na mapě ČR	- 23 -
Obrázek 7 – Přehled výsledků z 1. mikrotitrační destičky	- 26 -
Obrázek 8 – Přehled výsledků z 2. mikrotitrační destičky	- 27 -
Obrázek 9 – Přehled výsledků z 3. mikrotitrační destičky	- 28 -
Obrázek 10 – Přehled výsledků ze 4. mikrotitrační destičky	- 29 -
Obrázek 11 – Přehled výsledků z 5. mikrotitrační destičky	- 30 -
Obrázek 12 – Přehled výsledků z 6. mikrotitrační destičky	- 31 -
Obrázek 13 – Přehled výsledků ze 7. mikrotitrační destičky	- 32 -

Seznam tabulek:

Tabulka 1 – Koronaviry infikující králíky.....	- 16 -
Tabulka 2 – Přehled vzorků a výsledků z 1. mikrotitrační destičky	- 26 -
Tabulka 3 – Přehled vzorků a výsledků z 2. mikrotitrační destičky	- 27 -
Tabulka 4 – Přehled vzorků a výsledků z 3. mikrotitrační destičky	- 28 -
Tabulka 5 – Přehled vzorků a výsledků z 4. mikrotitrační destičky	- 29 -
Tabulka 6 – Přehled vzorků a výsledků z 5. mikrotitrační destičky	- 30 -
Tabulka 7 – Přehled vzorků a výsledků z 6. mikrotitrační destičky	- 31 -
Tabulka 8 – Přehled vzorků a výsledků ze 7. mikrotitrační destičky.....	- 32 -
Tabulka 9 – Přehled celkových výsledků z jednotlivých lokalit.....	- 33 -

Seznam zkratek použitých v práci:

ACE2	Angiotensin Converting Enzyme 2, angiotenzin konvertující enzym 2
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome, syndrom akutní dechové tísně
BANAL	Příbuzné kmeny SARS-CoV-2
BCoV	Bovine Coronavirus, bovinní koronavirus
bp	Base Pair, jednotka pro jeden pár nukleové báze
BSA	Bovine Serum Albumin, hovězí sérový albumin
CCoV	Canine Coronavirus, koronavirus psů
CD	Connector Domain, spojovací doména
CH	Central Helix, centrální šroubovice
CoV	CoronaVirus, označení pro koronavirus
COVID-19	CoronaVirus Disease 2019, koronavirové onemocnění 2019
CT	Cytoplasmic Tail, cytoplazmatický ocásek
CTD1, CTD2	C-terminální doména 1 a 2
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Deoxyribonukleová kyselina
E protein	Obalový protein
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, enzymatická imunoanalýza
FCoV	Feline Coronavirus, koronavirus koček
FIPV	Feline Infectious Peritonitis Virus, virus infekční peritonitidy koček
FP	Fusion Peptide, fúzní peptid
HCoV 229E	Lidský koronavirus 229E
HCoV HKU1	Lidský koronavirus HKU1
HCoV NL63	Lidský koronavirus NL63
HCoV OC43	Lidský koronavirus OC43

HE	Hemagglutinin-esteráza
HIV	Human Immunodeficiency Virus, virus lidské imunodeficiency
HR1, HR2	Heptad Repeat 1 and 2, heptadové repetice 1 a 2
HRT-18G	Lidská buněčná kultura
IBV	Infectious Bronchitis Virus, virus infekční bronchitidy
M protein	Membránový protein
MERS	Middle East Respiratory Syndrome, blízkovýchodní respirační syndrom
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, koronavirus blízkovýchodního respiračního syndromu
MHV	Mouse Hepatitis Virus, virus myší hepatitidy
MIA	Multiplex ImmunoAssay, multiplexní imunoanalýza
N protein	Nukleokapsidový protein
nm	Nanometr
nt	Nukleotidová jednotka
NTD	N-terminální doména
ORF	Open Reading Frame, otevřený čtecí rámeček
ORF1a	Open Reading Frame 1a, otevřený čtecí rámeček kódující polyprotein 1a
ORF1b	Open Reading Frame 1b, otevřený čtecí rámeček kódující polyprotein 1b
PBS	Phosphate Buffered Saline, fosfátový pufr
PDCoV	Porcine Deltacoronavirus, deltakoronavirus prasat
PEDV	Porcine Epidemic Diarrhea Virus, virus prasečího epidemického průjmu
RbCoV	Rabbit Coronavirus, králičí koronavirus
RbCoV HKU14	Rabbit Coronavirus HKU14, králičí koronavirus HKU14
RBD	Receptor-Binding Domain, doména vázající receptor

RBM	Receptor-Binding Motif, motiv vázající receptor
RECV	Rabbit Enteric Coronavirus, enterální koronavirus králíků
RNA	Ribonucleic Acid, ribonukleová kyselina
S protein	Hrotový spike protein
S1, S2	Podjednotky proteinu S
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome, těžký akutní respirační syndrom
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus , koronavirus těžkého akutního respiračního syndromu
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, koronavirus těžkého akutního respiračního syndromu 2
SW1	koronavirus kytovců
TCID ₅₀	Tissue Culture Infectious Dose 50 %, 50% infekční dávka tkáňové kultury
TGEV	Transmissible Gastroenteritis Virus, virus přenosné gastroenteritidy prasat
TM	Transmembrane Domain, transmembránový segment
TMB	Tetramethylbenzidin
TMPRSS2	Transmembrane Protease Serine 2, transmembránová serinová proteáza 2
Tween20	Polyoxyethylene-20 Sorbitan Monolaurate, neiontový detergent
UKMa2	Koronavirus hlodavců
VNT	Virus Neutralization Test, virus neutralizační test
VÚVeL	Výzkumný ústav veterinárního lékařství
2M H ₂ SO ₄	Dvoumolární kyselina sírová

1. Úvod

Koronaviry jsou různorodou skupinou virů, které infikují člověka a mnoho druhů domácích i volně žijících zvířat. U zvířat mohou koronaviry způsobovat mírné až závažné respirační, střevní či systémová onemocnění. U lidí způsobují navíc také zápal plic (Hasöksüz et al. 2020; Hu et al. 2021). Z taxonomického hlediska se koronaviry řadí do řádu Nidovirales, podřádu Coronidovirineae a čeledi Coronaviridae. Jedná se o skupinu jednovlákných RNA (ribonukleová kyselina, z anglického Ribonucleic Acid) virů s genomem pozitivní polaritity (Ludwig & Zarbock 2020). Pojmenování „coronaviruses“ získaly díky své morfologii, jelikož při pohledu do elektronového mikroskopu připomínají korunu (Ye et al. 2020). S délkou 26 400–31 700 nt je genom koronaviřů největším genomem ze všech známých RNA virů. Vůbec největším genomem mezi koronaviry disponuje koronavirus SW1 s 31 686 nt, který infikuje běluhy severní (*Delphinapterus leucas*) (Mihindukulasuriya et al. 2008).

Koronaviry jsou rozděleny do 4 rodů: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* a *Deltacoronavirus*, přičemž alfakoronaviry a betakoronaviry infikují zejména savce (Mammalia), zatímco gammakoronaviry a deltakoronaviry infikují primárně ptáky (Aves) (Ludwig & Zarbock 2020). V současné době je známo 7 druhů koronaviřů, které způsobují infekce u lidí, z nichž 4 – HCoV 229E, HCoV NL63, HCoV HKU1 a HCoV OC43, obvykle způsobují příznaky nachlazení u imunokompetentních jedinců. Ostatní, konkrétně SARS-CoV (koronavirus těžkého akutního respiračního syndromu, z anglického Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus) a MERS-CoV (koronavirus blízkovýchodního respiračního syndromu, z anglického Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) způsobují závažná respirační onemocnění SARS (těžký akutní respirační syndrom, z anglického Severe Acute Respiratory Syndrome) a MERS (blízkovýchodní respirační syndrom, z anglického Middle East Respiratory Syndrome) (Hasöksüz et al. 2020).

Všechny zmíněné koronaviry mají zoonotický původ. Za primární přirozené hostitele koronaviřů SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV NL63 a HCoV 229E se považují netopýři (Chiroptera), zatímco u HCoV OC43 a HCoV HKU1 se za primární hostitele považují hlodavci (Rodentia) (Cui et al. 2019).

Na konci roku 2019 se v čínském Wu-Chanu objevil nový vysoce přenosný a patogenní koronavirus, později označený jako SARS-CoV-2 (koronavirus těžkého akutního respiračního syndromu 2, z anglického Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), který způsobil celosvětovou pandemii akutního respiračního onemocnění COVID-19 (CoronaVirus Disease 2019) (Hu et al. 2021). Za doposud nejbližší příbuzné virové kmeny SARS-CoV-2 se nyní považují BANAL-52, BANAL-103 a BANAL-236, které byly nalezeny u vrápenců rodu *Rhinolophus* (konkrétně *R. malayanus* BANAL-52, *R. pusillus* BANAL-103 a *R. marshalli* BANAL-236). Shodnost v sekvenci domény vázající receptor RBD (z anglického Receptor-Binding Domain) je u BANAL-236 96,9 % a u zbylých dvou kmenů až 97,4 % (Temmam et al. 2022).

Pandemie COVID-19 otevřela otázky ohledně přenosu SARS-CoV-2 mezi zvířaty a lidmi. Rozsáhlá infekce lidské populace tímto virem představuje možnost reverzně zoonotického přenosu, kdy lidé pozitivní na SARS-CoV-2 mohou infikovat domácí nebo volně žijící zvířata, což potenciálně vede k vytvoření nových rezervoárů hostitelů. Mezi druhy, které se mohou přirozeně infikovat můžeme zařadit například kočky (*Felis catus*), psy (*Canis lupus familiaris*), křečky (*Cricetus cricetus*), fretky (*Mustela putorius furo*), norky (*Mustela lutreola*), tygry (*Panthera tigris*), lvy (*Panthera leo*), primáty (Primates), vydry (*Aonyx cinerea*) či jelence (*Odocoileus virginianus*) (McAloose et al. 2020; Trimpert et al. 2020; Animal and Plant Health Inspection Service 2021a; Animal and Plant Health Inspection Service 2021b; Oude Munnink et al. 2021; Račnik et al. 2021; Yaglom et al. 2021; Hale et al. 2022). Významným objevem je, že norci a jelenci běloocasý mohou virus přenášet mezi ostatními příslušníky svého druhu poté, co byli infikováni člověkem. V Dánsku a Norsku byl dokonce zaznamenán přenos z norků na lidi, což dokazuje potenciál sekundárního zoonotického přenosu (Lu et al. 2021; Oude Munnink et al. 2021; Rabalski et al. 2022; Hale et al. 2022; Vandegrift et al. 2022).

Významný rezervoár pro zoonotické viry ve volné přírodě by mohli představovat i zajícovci (Preziuso 2020). Dle provedených experimentů Mykytyn et al. (2021) a Bosco-Lauth et al. (2021) je prokázáno, že virem SARS-CoV-2 mohou být nakaženi králíci, u nichž byla infekce navozena laboratorně, nicméně u nich probíhá asymptomaticky a velmi neefektivně. V roce 2022 prokázal tým vědců ve Francii též schopnost viru infikovat králíky přirozenou cestou, avšak provedené testy vykazaly velmi nízkou séroprevalenci a náchylnost k nákaze (Fritz et al. 2022). Tato práce se zaměřuje na infekci zajícovců koronavirem SARS-CoV-2 a dalšími koronaviry. Přirozená infekce

virem SARS-CoV-2 byla pozorována u králíků, nicméně u ostatních zajíců nikoliv. Cílem této práce je vypracovat literární rešerši na téma koronavirových infekcí u zajíců, otestovat vybrané vzorky sér zajíců na přítomnost protilátek proti koronaviru SARS-CoV-2 a tím přispět k rozšíření znalostí o možném novém rezervoáru hostitelů SARS-CoV-2 mezi volně žijícími zvířaty. Experiment probíhá za využití laboratorní testovací metody ELISA (enzymatická imunoanalýza, z anglického Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), která se používá k detekci přítomnosti antigenů nebo protilátek v biologických vzorcích.

2. Cíle literární rešerše

- Shrnout poznatky o koronavirech
- Charakterizovat koronaviry infikující zajícovce
- Popsat průběh nákazy koronavirem SARS-CoV-2 u zajícovců

3. Literární rešerše

3.1 Zoonotické koronaviry

3.1.1 Definice zoonóz

Zoonózami nazýváme infekční onemocnění, která se přenášejí ze zvířete na člověka (World Health Organization 2020). Tato onemocnění mohou být klasifikována podle toho, jaký druh patogenu je přenášen. Jsou jimi především viry, bakterie, paraziti, plísňe, nebo priony (Chomel 2009). Nejobvyklejším způsobem nákazy je přímý kontakt se zvířaty, při kterém nás nebezpečný patogen infikuje buďto prostřednictvím vzduchu, prostřednictvím vektoru nebo kontaktem se zvířecími sekrety (Cross et al. 2019). Mezi nejčastější vektory můžeme řadit blechy (Siphonaptera), klíšťata (Ixodida) nebo komáry (Culicidae) (Chomel 2009), zatímco sekrety rozumíme moč, sliny, krev, mléko, trus nebo hnis (Hubálek & Rudolf 2014). Infekce ovšem může propuknout i nepřímým kontaktem, a to prostřednictvím jídla, vody, nebo prostředí, se kterými daný patogen přišel do styku (World Health Organization 2020). Zoonotické patogeny jsou rozšířené po celém světě. K přenosu nemoci ze zvířete na člověka může dojít kdekoliv žijí lidé, s nimiž mohou přijít zvířata do styku, ať už ve městech, nebo rurálních oblastech (Cross et al. 2019). Předpokládá se, že více než 6 z 10 případů známých infekčních onemocnění u lidí může být přenášeno zvířaty a až 3 ze 4 emergentních onemocnění u lidí pochází od zvířat (Centers for Disease Control and Prevention 2021).

Emergentními zoonózami rozumíme nově se objevující zoonózy, které jsou nově rozpoznány, nově se vyvinuly, anebo se vyskytly již dříve, ale vykazují zvýšenou početnost nebo rozšíření zeměpisného, hostitelského nebo vektorového areálu. V posledních 70 letech bylo na seznam nově objevených zoonóz zapsáno minimálně 250 zoonóz (Rahman et al. 2020). Některé patogeny, jako například HIV (virus lidské imunodeficiency, z anglického Human Immunodeficiency Virus), začínají jako zoonózy, ale později mohou cirkulovat jen mezi lidmi. Další mohou zapříčinit opakované epidemie, příkladem může být bakteriální onemocnění salmonelóza a virové onemocnění Ebola. Jiné, jako je koronavirus SARS-CoV-2, který způsobuje onemocnění COVID-19, mají potenciál vyvolat globální pandemii (World Health Organization 2020). Přestože

velké množství původců zoonotických viróz spadá mezi RNA viry, existují i zoonózy, které jsou způsobeny i herpetickými či neštovičnými DNA (deoxyribonukleová kyselina, z anglického Deoxyribonucleic Acid) viry (Hubálek & Rudolf 2014).

3.1.2 Původ koronavirů a jejich fylogeneze

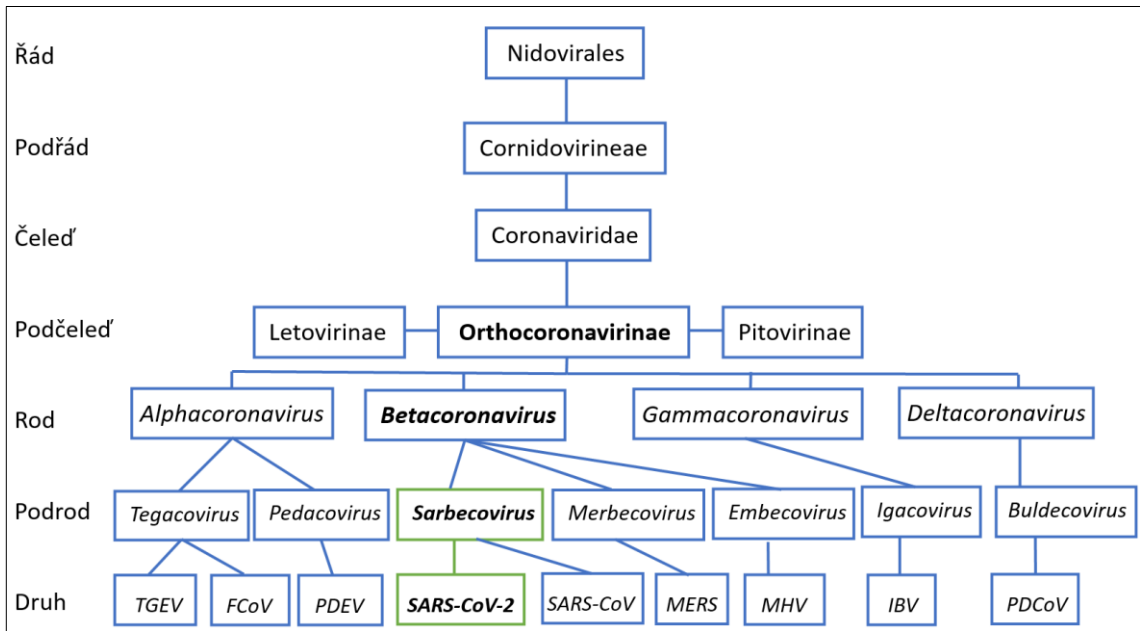
Lidské koronaviry byly objeveny a poprvé popsány v pozdních 60. letech minulého století britským virologem Davidem Tyrrellem, který poprvé v roce 1966 izoloval kmen HCoV 229E z dýchacího traktu pacienta potýkajícího se s infekcí horních cest dýchacích (Tyrrell & Bynoe 1966). Avšak již dříve, konkrétněji na konci 30. let 20. století, byly izolovány různé koronaviry z různých druhů zvířat např. myši (*Mus musculus*), skotu (*Bos taurus*), prasat (*Sus scrofa*), koček, psů nebo krocanů (*Meleagris gallopavo*) (Ye et al. 2020). Paralelně na tomto tématu pracoval i americký tým doktora McIntoshe, který věnoval svou práci lidským a zvířecím virům jako například IBV (virus infekční bronchitidy, z anglického Infectious Bronchitis Virus), MHV (virus myši hepatitidy, z anglického Mouse Hepatitis Virus), nebo TGEV (virus přenosné gastroenteritidy prasat, z anglického Transmissible Gastroenteritis Virus) (McIntosh et al. 1967). U těchto virů byla pomocí elektronového mikroskopu prokázána významná morfologická podobnost. Tato skupina byla později pojmenována jako koronaviry („corona“ – označující korunovitý vzhled povrchových výběžků) a oficiálně přijata jako nová čeleď (Tyrrell et al. 1975).

International Committee on Taxonomy of Viruses (česky Mezinárodní výbor pro taxonomii virů) zařazuje koronaviry do řádu Nidovirales, podřádu Cornidovirineae a čeledi Coronaviridae. Tato čeleď je rozdělena na 3 podčeledi – Letovirinae, Orthocoronavirinae a Pitovirinae. V rámci podčeledi Orthocoronavirinae rozlišujeme 4 hlavní rody koronavirů. Jedná se o rody *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* a *Deltacoronavirus* (viz **Obrázek 1**) (International Committee on Taxonomy of Viruses 2022). Jsou to právě betakoronaviry, do kterých jsou zařazeny 3 nejvýznamnější zástupci koronavirů jako jsou SARS-CoV, SARS-CoV-2 a MERS-CoV, které způsobují onemocnění SARS, COVID-19 a MERS (Chan et al. 2015). U všech těchto koronavirů považujeme netopýry za primární přirozené hostitele, nicméně k přenosu na člověka došlo prostřednictvím mezihostitelů. Podle Luan et. al (2020) je jím pro SARS-CoV ovíječ maskovaný (*Paguma larvata*), pro MERS-CoV je to

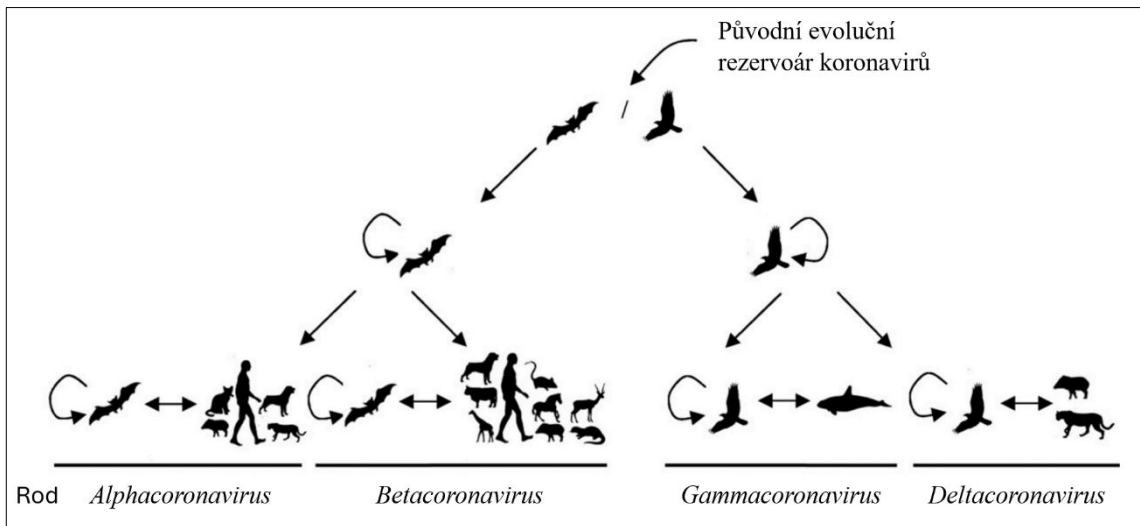
velbloud jednohrbý (*Camelus dromedarius*) a v případě SARS-CoV-2 je předpokládaným mezihostitelem luskoun krátkoocasý (*Manis pentadactyla*) (Makarenkov et al. 2021), avšak další zdroj uvádí jako možného mezihostitele rovněž psíka mývalovitého (*Nyctereutes procyonoides*) (Xiao et al. 2021).

Tyto 3 významné koronaviry patří do podrodu *Sarbecovirus* (SARS-CoV a SARS-CoV-2) a do podrodu *Merbecovirus* (MERS-CoV) (International Committee on Taxonomy of Viruses 2022). Obecně lze říci, že alfa-koronaviry a beta-koronaviry infikují pouze savce (Ludwig & Zarbock 2020), přičemž podle Umakanthan et al. (2020) tvoří hlavní evoluční rezervoár netopýři. Zbylé dva rody způsobují infekce především u ptáků, avšak příležitostně se vyskytují i u savců jako jsou velryby (Cetacea) či prasata (viz **Obrázek 2**) (Cui et al. 2019; Woo et al. 2012).

Aktuální klasifikace koronavirů rozeznává 53 zástupců ve 28 podrodech (International Committee on Taxonomy of Viruses 2022). Koronaviry způsobují onemocnění u hospodářsky, ale i chovatelsky významných zvířat jako jsou například prasata, skot, kuř (*Gallus gallus*), psy a kočky. U lidí způsobují zástupci rodu alfa-koronavirů a beta-koronavirů (HCoV 229E, HCoV NL63, HCoV OC43, HCoV HKU1) celou řadu onemocnění od lehkých respiračních infekcí až po syndrom akutní dechové tísně ARDS (z anglického Acute Respiratory Distress Syndrome) (Umakanthan et al. 2020). Mezi nejvýznamnější koronaviry zvířat řadíme virus přenosné gastroenteritidy prasat TGEV (podrod *Tegacovirus* – rod *Alphacoronavirus*), virus prasečího epidemického průjmu PEDV (z anglického Porcine Epidemic Diarrhea Virus) (podrod *Pedacovirus* – rod *Alphacoronavirus*), prasečí deltakoronavirus PDCoV (z anglického Porcine Deltacoronavirus) (podrod *Buldecovirus* – rod *Deltacoronavirus*), virus myší hepatitidy MHV (podrod *Embecovirus* – rod *Betacoronavirus*), kočičí koronavirus FCoV (z anglického Feline Coronavirus) (podrod *Tegacovirus* – rod *Alphacoronavirus*), nebo virus infekční bronchitidy IBV (podrod *Igacovirus* – rod *Gammacoronavirus*) (International Committee on Taxonomy of Viruses 2022).



Obrázek 1 – **Fylogenetický vývoj koronavirových taxonů s příklady hospodářsky významných zástupců (vytvořeno na základě taxonomického prohlížeče International Committee on Taxonomy of Viruses 2022).**



Obrázek 2 – **Model vývoje rodů koronavirových s příklady hostitelského rozsahu (upraveno dle Woo et al. 2012).**

3.2 Struktura koronavirů

Viry z čeledi Coronaviridae mají kulovitý tvar s průměrem 120–160 nm (Colina et al. 2021). Koronaviry jsou obecně obalené jednovlákné nesegmentované RNA viry s genomem pozitivní polaritity (Yang & Leibowitz 2015). Jejich genom je se svou délkou 26 400–31 700 nt považován za největší ze všech známých RNA virů (Ludwig & Zarbock 2020). Genom koronavirů obsahuje poměrně velké množství genů. Jsou jimi především dva dlouhé ORF (otevřené čtecí rámce, z anglického Open Reading Frames) ORF1a a ORF1b kódující dva velké polyproteiny pp1a a pp1b, které se později proteolyticky štěpí na 15–16 nestrukturních proteinů. ORF1a a ORF1b zaujímají až 70 % genomu koronaviru. Zbývajících 30 % genomu obsahuje geny pro strukturní proteiny S, E, M, a N (Liu et al. 2014; Chen et al. 2020). V závislosti na druhu pak může dále kódovat dalších 7–14 genů, které kódují různé další neesenciální virové proteiny. Tyto proteiny hrají roli při interakci s hostitelem, při modulaci buněčného prostředí a při překonávání hostitelské imunitní odpovědi (Masters 2006).

Obal koronavirů tvoří charakteristické hroty kyjovitého tvaru odpovídající trimerům spike proteinu S, které určují typický korunovitý vzhled při pohledu do elektronového mikroskopu (Colina et al. 2021; Malik 2020). Uvnitř obalu se nachází spirálovitě symetrická nukleokapsida tvořená proteinem N (Colina et al. 2021). Takováto morfologie nukleokapsidy je mezi obalenými živočišnými RNA viry s pozitivní orientací neobvyklá (Malik 2020). K vytvoření strukturně kompletní virové částice jsou u většiny koronavirů nezbytné 4 strukturní proteiny – hrotový spike protein (S protein), membránový protein (M protein), nukleokapsidový protein (N protein) a obalový protein (E protein) (Malik 2020). U některých betakoronavirů, konkrétně u HCoV OC43, MHV nebo BCoV (Bovine Coronavirus), nacházíme také druhou menší vrstvu výběžků tvořenou doplňkovým proteinem HE (hemagglutinin-esteráza) (Lang et al. 2020; Klausegger et al. 1999).

S virovým obalem jsou spojeny nejméně 3 strukturní proteiny: Membránový protein M a obalový protein E, které se podílejí na sestavování viru, zatímco spike protein S zprostředkovává vstup viru do hostitelské buňky (Li 2016). U většiny koronavirů je protein S štěpen proteázou furin hostitelské buňky na 2 samostatné polypeptidy S1 a S2. S1 nese velkou RBD a S2 tvoří stopku hrotu (Malik 2020). Kromě zprostředkování vstupu

viru do organismu je hrot rozhodujícím faktorem určujícím hostitelský rozsah a hlavním podnětem imunitních reakcí hostitele (Li 2016).

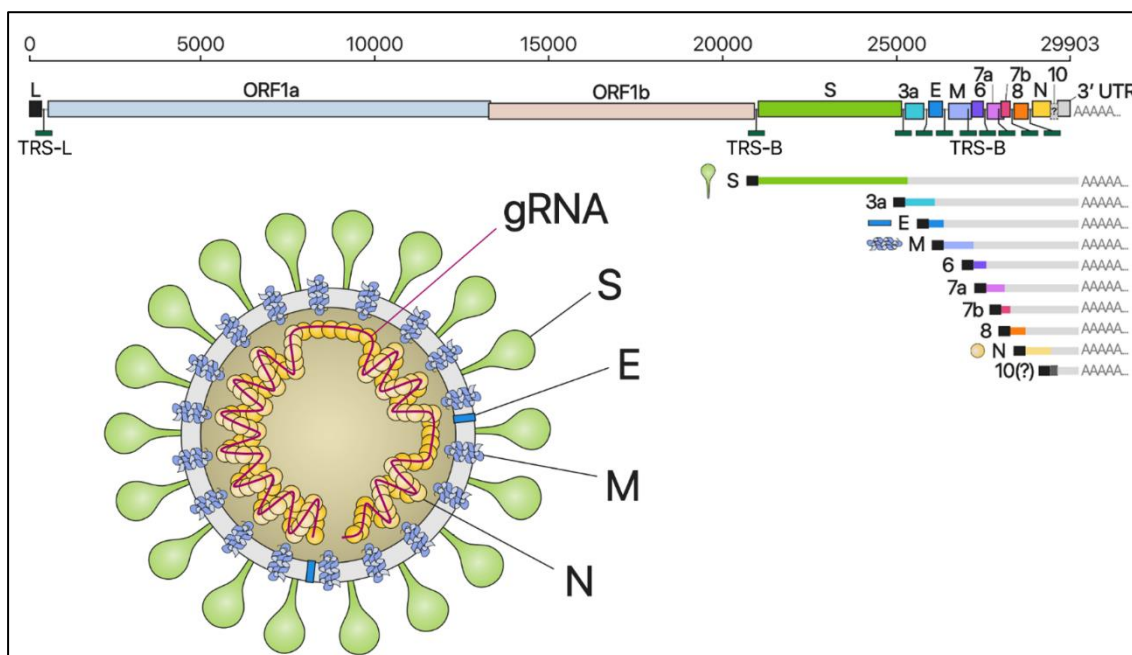
Protein M se třemi transmembránovými doménami je nejhojnějším strukturním proteinem a určuje tvar virového obalu s malou N-koncovou glykosylovanou ektodoménou a mnohem větší C-koncovou endodoménou, která zasahuje 6–8 nm do virové částice. Studie ukázaly, že protein M existuje jako dimer a může zaujmout 2 různé konformace, které mu umožňují podporovat zakřivení membrány i vazbu nukleokapsidu (Malik 2020; Chen et al. 2020).

Protein E je nejmenší ze všech strukturních proteinů (Malik 2020) a hraje roli při sestavování a uvolňování viru a také se podílí na virové patogenezi (Colina et al. 2021).

Protein N obsahuje dvě domény – NTD (N-terminální doménu) a CTD (C-terminální doménu), z nichž obě mohou vázat genom RNA viru různými mechanismy (Chen et al. 2020). Předpokládá se, že optimální vazba RNA vyžaduje účast obou těchto domén. Podílí se také na sestavování viru a jeho pučení, což vede k úplné tvorbě virionu (Malik 2020).

Koronavirus SARS-CoV-2 má typickou genomickou organizaci skupiny betakoronavirů (Bai et al. 2022). Sekvence genomu tohoto viru o přibližné velikosti 29 891 bp ukázala, že virus obsahuje pozitivně orientované vlákno RNA, jehož genom obsahuje 5' čepičku a 3' poly-A konec a je zaobalen v proteinové nukleokapsidě (Wu et al. 2022; Kadam et al. 2021). Samotný virion má přibližnou velikost 80–120 nm (Yadav et al. 2021). Genom se skládá ze 14 funkčních ORF, obsahující 2 nekódující oblasti na obou stranách a několik oblastí, které kódují strukturní proteiny, nestrukturní proteiny a několik vedlejších proteinů. Genom SARS-CoV-2 kóduje 16 nestrukturních proteinů, 4 strukturní proteiny a 9 vedlejších proteinů (Bai et al. 2022). Translace většiny ORF SARS-CoV-2 probíhá prostřednictvím subgenomické RNA. Bylo prokázáno, že subgenomická RNA moduluje translační procesy hostitelské buňky a subgenomická transkripce může umožnit variabilitu v expresi virových strukturních proteinů a proteinů zapojených do patogeneze. Subgenomická RNA může také hrát roli ve virové evoluci, jelikož přepínání templatů může způsobit vysokou míru rekombinace (Long 2021). Strukturní proteiny S, E, M a N pro tvorbu virionu a vedlejší proteiny 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c a 10, které jsou kódovány geny ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9B, ORF9c a ORF10 (Khailany et al. 2020; Bai et al. 2022) jsou společně kódovány

30 % virového genomu na 3'konci (viz **Obrázek 3**) (Brant et al. 2021). Všechny funkce těchto vedlejších proteinů nejsou doposud zcela známy (Wu et al. 2022).



Obrázek 3 – Genomická organizace viru SARS-CoV-2 (převzato z Kim et al. 2020).

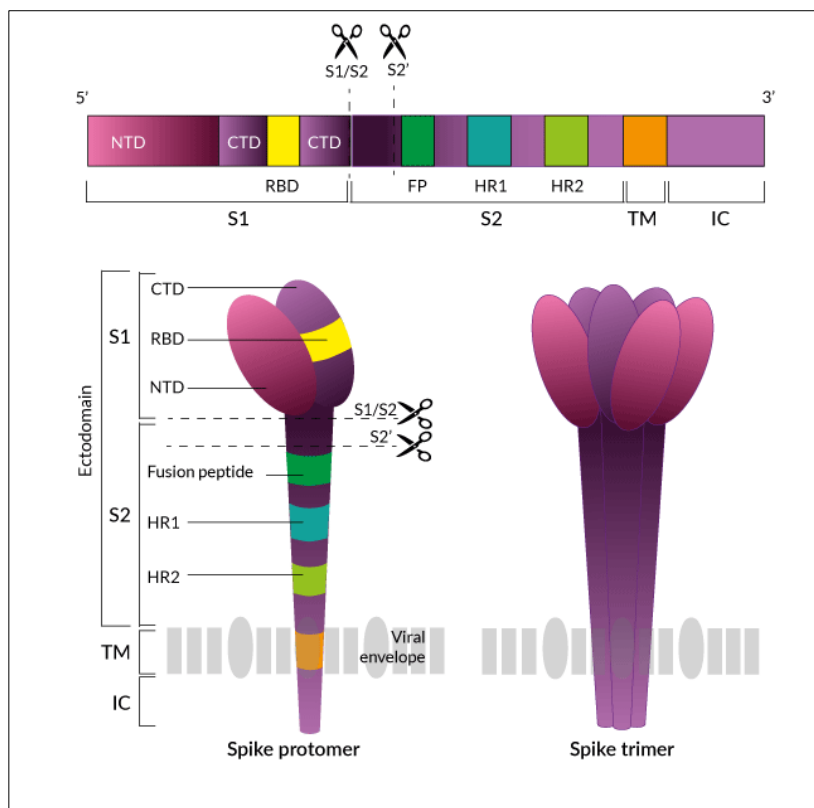
3.2.1 Strukturální spike protein S koronaviru SARS-CoV-2

Hrotový spike glykoprotein koronaviru SARS-CoV-2 je membránový protein typu I, který se skládá z 1273 aminokyselin a vykazuje různý stupeň zachování napříč čeledí Coronaviridae (Yadav et al. 2021). Tvoří trimer ukotvený k virové membráně transmembránovým segmentem a jeho vyčnívající velká ektodoména vytváří charakteristické útvary na povrchu virionu (Zhang et al. 2021). Právě tyto útvary virus používá k vlastnímu ukotvení na hostitelské buňce (Arya et al. 2021), a proto je spike protein považován za významný cíl při léčbě antivirotyky (Wu et al. 2022). Protein je silně glykosylovaný a každý protomer obsahuje 22 N-vázaných glykosylačních oblastí (Zhang et al. 2021). Skládá ze 2 funkčních podjednotek S1 a S2 (viz **Obrázek 4**), přičemž podjednotka S1 je zodpovědná především za vazbu na receptor hostitelské buňky a podjednotka S2 zprostředkovává membránovou fúzi.

Podjednotku S1 lze dále rozdělit na NTD (N-terminální doménu), CTD-1 (C-terminální doménu 1), CTD-2 (C-terminální doménu 2) a RBD. RBD je zodpovědná za rozpoznávání hostitelského receptoru ACE2 (angiotenzin konvertující enzym 2,

z anglického Angiotensin Converting Enzyme 2) a skládá se ze 2 subdomén – jádrové struktury a prodloužené smyčky, která se nazývá motiv vázající receptor RBM (z anglického Receptor-Binding Motif). Právě tento komponent uskutečňuje většinu kontaktů s ACE2 (Yao et al. 2023).

Podjednotka S2 se skládá z více strukturních složek zahrnující hydrofobní fúzní peptid FP (z anglického Fusion Peptide), heptadovou repetici HR1 a HR2 (z anglického Heptad Repeat 1, Heptad Repeat 2), transmembránovou doménu TM (z anglického Transmembrane Domain), centrální šroubovici CH (z anglického Central Helix), spojovací doménu CD (z anglického Connector Domain) a cytoplazmatický ocásek CT (z anglického Cytoplasmic Tail). Podjednotka S2 zaujímá 2 strukturálně odlišné konformační stavy – prefúzní a postfúzní, které představují nezbytné mezikroky k navázání viru na receptory svého hostitele (Arya et al. 2021). Na rozdíl od SARS-CoV a jiných betakoronavirů, obsahuje spike protein S SARS-CoV-2 mezi podjednotkami S1 a S2 i místo pro štěpení furinem které štěpí transmembránová serinová proteáza 2 TMPRSS2 (z anglického Transmembrane Protease Serine 2) (Yadav et al. 2021; Wu et al. 2022).



Obrázek 4 – Struktura spike proteinu S (převzato z Ůnal & Yardimci 2021).

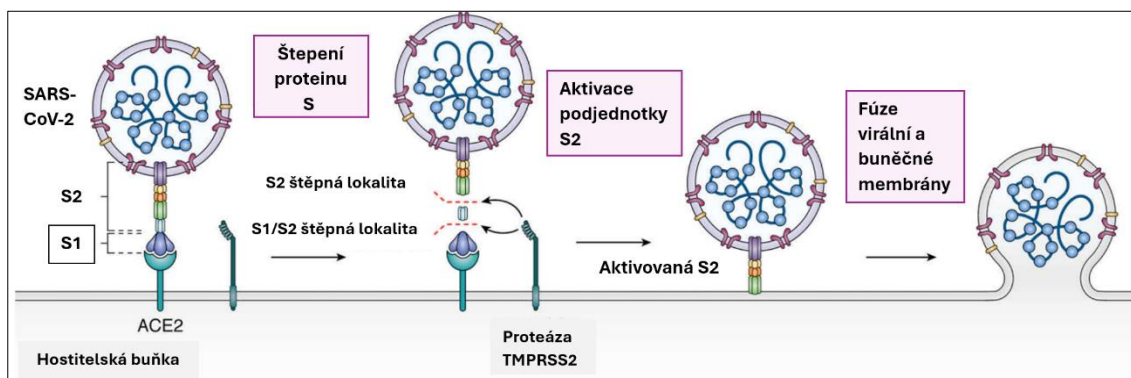
3.2.2 Mechanismus vstupu koronavirů do hostitelské buňky

Vstup koronaviru do hostitelské buňky je klíčovým faktorem určujícím infekčnost a patogenezí viru. Aby virus vstoupil do hostitelské buňky, musí se nejprve navázat na její povrchový receptor, poté následuje vstup do endozomů, a nakonec dochází ke spojení virové a lyzozomální membrány (viz **Obrázek 5**) (Shang et al. 2020).

Při infikaci buňky hraje klíčovou roli molekulární interakce spike glykoproteinu S umístěném na povrchu viru s receptorem ACE2, který se nachází na povrchu hostitelské buňky a představuje hlavní cílový receptor pro navázání viru na buňku (Lan et al. 2020; Arya et al. 2021; Ali & Vijayan 2020). Výzkumy ukázaly, že je to právě doména RBD, která má zásadní funkci v interakci a navázání podjednotky S1 na ACE2 hostitelské buňky. Rovněž bylo zjištěno, že tato interakce je provázena třikrát až čtyřikrát vyšší vazebnou afinitou u koronaviru SARS-CoV-2 oproti SARS-CoV, což vysvětluje jeho vyšší míru transmisibility a infekčnosti (Wrapp et al. 2020; Yan et al. 2020). ACE2 je široce distribuován v srdci, játrech, varlatech, ledvinách, střevech a dalších tkáních. Mezi další fyziologické funkce ACE2 patří regulace srdečního rytmu, funkce ledvin a kontrola krevního tlaku (Luan et al. 2020). Interakce mezi spike proteinem S, respektive jeho RBD, a receptorem ACE2 je klíčovým faktorem pro hostitelský rozsah a šíření viru, jelikož ACE2 je hostitelsky specifický – to znamená, že určuje, které druhy hostitelů může virus infikovat a následně se v nich replikovat (Liu et al. 2021).

Aby byl virus schopný infikovat buňku, musí se nejprve proteiny podílející se na vstupu viru do buňky stabilizovat v energeticky výhodné konfiguraci. Virus následně podstupuje další konformační změny nutné pro spojení s buněčnou membránou. Tyto změny umožňují překonat vzájemnou odpudivost viru a hostitelské buňky. Podobně jako u SARS-CoV-2 a dalších koronavirů je tato konformační změna vedoucí k navázání ACE2 umožněna dvěma proteolytickými štěpícími kroky (Jackson et al. 2022). První z těchto kroků je lokalizován na hranici mezi podjednotkou S1 a S2, zatímco druhý štěpný krok probíhá přímo v podjednotce S2. U SARS-CoV jsou obě tato místa štěpena proteázami v cílové buňce. V případě SARS-CoV-2 je hranice S1 a S2 štěpena enzymem furin v buňce produkující virus, nicméně štěpení na místě S2 vyžaduje proteázy z cílové hostitelské buňky, jimiž jsou TMPRSS2 a katepsin L (Jackson et al. 2022).

Pro navázání podjednotky S1 na ACE2 je zásadní funkce RBD. V trimeru hrotu viru tvoří vrchol špičky 3 RBD, které mohou zaujímat 2 rozlišitelné konformace „nahoru“ značící stav, kdy je receptor přístupný, a „dolů“ pro stav, kdy je receptor nepřístupný (Yao et al. 2023). Poté, co se podjednotka S1 naváže na receptor, podjednotka S2 prochází postfúzní konformací. Nejprve se S1 a S2 oddělí díky proteolytickému účinku proteáz hostitele – serinové proteázy TMPRSS2 a cysteinové proteázy katepsin L, a pak 3 páry HR1 a HR2 trimerické S2 vytvoří strukturu ve tvaru spirály se 6 helixy. Tento přechod přibližuje virovou membránu k membráně hostitele, odhaluje hydrofobní fúzní peptid a činí tuto oblast přístupnou pro další proteolytické štěpení. Po štěpení se fúzní peptidy z každého protomeru spojí a sloučí se s hostitelskou membránou, což vede k začlenění virové RNA do hostitelské buňky (Arya et al. 2021).



Obrázek 5 – Mechanismus vstupu SARS-CoV-2 do hostitelské buňky (převzato a upraveno dle Hartenian et al. 2020).

3.3 Patogenita a virulence

Termíny patogenita a virulence jsou hojně využívány v mnoha vědeckých disciplínách, které se zaměřují na interakci mezi patogenem a hostitelem. Řadíme mezi ně například medicínu, epidemiologii, evoluční ekologii, nebo mikrobiologii, přičemž u každé z disciplín se definice patogenu, patogenity a virulence může lišit (Thomas & Elkinton 2004). Podle Kaishian et al. (2024) je patogen mikrob schopný snížit zdatnost (fitness) hostitele, a zároveň snížení kondice je výsledkem přímého mikrobiálního působení, nebo následné imunitní reakce hostitele. Obecně používaná definice patogena jako mikroba, který způsobuje nemoc v hostiteli, je nedostatečná,

protože ne všechny patogeny způsobují klinické propuknutí nemoci (Casadevall & Pirofski 1999). Proto byl zaveden pojem virulence, který určuje stupeň patogenity (Gaugler 2002). Tento termín tedy vystihuje závažnost projevení příznaku nemoci (včetně smrti) a lze ho měřit pouze u infikovaných jedinců. Thomas a Elkinton (2004) navrhli vzorec pomocí něž můžeme definovat patogenitu, který říká „Pro patogeny, které jsou schopné způsobit smrtelnou infekci platí, že jejich patogenitu můžeme vyjádřit jako podíl jedinců vystavených patogenu, kteří se stanou infikovanými a zemřou. To se rovná podílu jedinců vystavených patogenu, kteří se stanou infikovanými (infekčnost) krát podíl infikovaných jedinců, kteří zemřou (virulence). Infekčnost zahrnuje dvě složky – schopnost patogenu vstoupit do těla hostitele a schopnost šíření se v hostiteli (transmisibilita).“

$$\text{Patogenita} = \frac{\text{počet zemřelých}}{\text{počet vystavených patogenu}} = \frac{\text{počet infikovaných}}{\text{počet vystavených patogenu}} \times \frac{\text{počet zemřelých}}{\text{počet infikovaných}}$$

Jinak řečeno: **Patogenita = infekčnost × virulence**

(Thomas & Elkinton 2004)

Mezi vědci je hojně používaný systém měření infekčnosti pomocí ukazatelu TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50 %). Jedná se o test replikace viru v buňkách pomocí titru, který je definován jako počet infekčních virových jednotek, které jsou schopné způsobit cytopatický efekt v 50 % buněčné kultury (Lei et al. 2021). Pro lepší pochopení může být příkladem výsledek později zmíněného experimentu Mykytyn et al. (2021), který říká, že minimální dávka koronaviru SARS-CoV-2 potřebná k vytvoření produktivní infekce u králíků byla 10⁵ TCID₅₀ (tedy 100 000 jednotek viru).

3.4 Koronaviry infikující zajícovce

V současné chvíli není zaznamenáno mnoho koronavirů, které přirozeně infikují zajícovce. Podle dostupných studií lze říci, že existují 3 konkrétní koronaviry, které byly izolovány z králíků, přičemž dva z nich (viz **Tabulka 1**) jsou nejvýznamnější. Tyto viry jsou spojeny s různými patologickými projevy, jimiž jsou buď střevní onemocnění nebo pleurální efúze s myokarditidou (Domańska-Blicharz et al. 2020). Koronaviry byly zaznamenány u divokých králíků v Evropě i králíků domácích v Kanadě, Nizozemsku, Spojených státech, Číně, Španělsku a Francii. Přepokládá se, že až 8 % zajíců je nakaženo koronavirem, přičemž odpovědný původce pochází z rodu *Alphacoronavirus* (Gilmudinov et al. 2020).

Tabulka 1 – Koronaviry infikující králíky (převzato a upraveno dle Beltz 2022)

Koronavirus	Rod	Cílový orgán	Typické příznaky	Míra úmrtnosti
RECV	<i>Betacoronavirus</i>	Tenké střevo	Enteritida, průjem	3–40%
RbCoV	<i>Alphacoronavirus</i>	Srdce, plíce, játra	Myokarditida, kongestivní srdeční selhání, pulmonální kongesce, hepatální kongesce	60%

3.4.1 RECV – Enterální koronavirus králíků

Enterální koronavirus králíků RECV (z anglického Rabbit Enteric Coronavirus) byl poprvé izolován v Kanadě v roce 1980 ze vzorků trusu králíků trpících silným průjmem (Krogstad et al. 2005). Pomocí vizualizace elektronovým mikroskopem bylo zjištěno, že odpovědným původcem jsou částice sdílející některé morfologické vlastnosti s ostatními členy čeledi Coronaviridae, avšak ve většině případů nenesou známky typických povrchových projekcí (Descôteaux et al. 1985). O několik let později byl přesto RECV oficiálně přijatý mezi viry z rodu *Betacoronavirus* a podrodu *Embecovirus* (Domańska-Blicharz et al. 2020). Jedná se o virus, který se vyznačuje obecně nižší mírou úmrtnosti. RECV se replikuje v tenkém střevě. Jelikož se virus přenáší fekálně-orální cestou, zdrojem infekce jsou virové částice přítomné ve stolici králíků, a to včetně jedinců projevujících se klinicky normálně (Beltz 2022). Ukázalo se, že nejvíce náchylní k infekci jsou mladí králíci ve věku 3–8 týdnů (Domańska-Blicharz et al. 2020).

Králíci, jimž byla infekce navozená experimentálně orální cestou, vykazovali známky enteritidy (Beltz 2022). Mezi nejčastější projevy řadíme: vodnatý průjem, abdominální distenzi, rychlý úbytek na hmotnosti, dehydrataci, nafouknuté slepé střevo s tekutinou mléčné až hnědavé barvy či náhlou smrt (Krogstad et al. 2005; Kerr & Donnelly 2013). Pomocí histopatologického vyšetření lze pozorovat již během šesti hodin po navození infekce léze v tenkém střevě. Na povrchu enterocytů, které tvoří výstelku střevních klků, dochází k nekróze, což vede ke zkrácení klků. Nekróza byla pozorována i u M buněk imunitního systému nacházející se ve střevech, přičemž závažnost projevů se zhoršovala s postupujícím časem (Beltz 2022). Virové částice byly izolovány z trusu experimentálně infikovaných králíků až 29 dní po navození infekce (Krogstad et al. 2005).

Zajímavostí je, že protilátky proti RECV podléhají zkřížené protilátkové reakci (cross-reakci) s lidským koronavirem HCoV 229E (Kerr & Donnelly 2013) a dalšími zvířecími druhy koronavirů jako například IBV, TGEV (Descôteaux et al. 1985), CCoV (koronavirus psů, z anglického Canine coronavirus) či MHV (Krogstad et al. 2005). Diagnóza může být potvrzena detekcí virálních částic ve stolici králíků s průjmem nebo pomocí charakteristických lézí při pitvě a histologickém vyšetření zažívacího traktu. V současné chvíli není známý dostupný sérologický test pro RECV, nicméně jej lze detekovat i pomocí komerčního testu na koronavirus psů. Použití sérologie je však omezené, protože zvířata s průjmem pravděpodobně neprojeví protilátkovou odpověď (Krogstad et al. 2005).

3.4.2 RbCoV – Králíčí koronavirus

Králíčí koronavirus RbCoV (z anglického Rabbit Coronavirus), známý také jako Stockholmský agens (Beltz 2022), byl poprvé zaznamenán v roce 1961, kdy se skandinávští výzkumníci setkali s občasnou úmrtností u králíků, kteří byli doposud používáni k množení bakterie *Treponema pallidum* způsobující pohlavně přenosnou chorobu syfilis. Úmrtnost dosáhla 50 % v roce 1968 a v roce 1970 činila již 75 % (Small & Woods 1987). Odpovědný původce byl stejně jako v předchozím případě odhalen pomocí elektronové mikroskopie, při níž se zjistilo, že agens se projevuje velice podobnými morfologickými znaky s ostatními koronaviry. Provedení sérologických testů

potvrdilo, že se jedná o koronavirus, jelikož patogen cross-reagoval s lidskými alfakoronaviry HCoV 229E, HCoV OC43 a dalšími zvířecími koronaviry jako jsou FIPV (virus infekční peritonitidy koček, z anglického Feline Infectious Peritonitis Virus), CCoV nebo TGEV. Na základě těchto výsledků byl virus později oficiálně přijat mezi alfakoronaviry (Small & Woods 1987; Domańska-Blicharz et al. 2020; Beltz 2022).

Imunofluorescenční barvení s použitím protilátek anti-229E ukázalo fluorescenci v mezibuněčných tkáních myokardu. Toto zjištění indikuje, že srdce je cílovým orgánem viru. Účinnost séra byla ztracena po ošetření éterem, což naznačuje přítomnost obaleného virionu (Small & Woods 1987). Králičí koronavirus způsobuje onemocnění zvané infekční kardiomyopatie králíků (Small et al. 1979). Průběh infekce můžeme rozdělit do 2 fází – akutní (2–5 dní), projevující se zejména dilatací pravé ventrikulární srdeční komory a plicním edémem, a subakutní (6–12 dní), která se projevuje dilatací obou srdečních ventrikulárních komor a srdečním selháním (Edwards et al. 1992). U králíků, jimž byla infekce navozena inokulačně, se mezi 24–48 hodinami zvýšila rektální teplota na více než 41°C. Horečka byla doprovázena výrazným poklesem tělesné hmotnosti a poklesem příjmu potravy i vody. S nárůstem teploty bylo možné pozorovat matnost skléry a těžkou kongesci očních spojivek a duhovky. V některých případech byly zjevné příznaky hyfému nebo chemózy. U přeživších jedinců se oční změny postupně vyrovnaly a oči se jevily jako normální 2–4 týdny po inokulaci. U králíků s hyfémem došlo k vyjasnění očí kolem 12. dne (Small & Woods 1987). První 4 dny jsou pro nemocného králíka kritické. Během této doby dochází k dilataci pravé ventrikulární komory s krevními sraženinami v epikardu a endokardu, objevují se léze na srdci, plicích, brzlíku, bránici, slezině a na lymfatických uzlinách. V rané fázi dochází také k plicnímu edému s 10–50 ml čiré až slámově zbarvené tekutiny. S přežitím více než prvních 4 dnů objem tekutiny opět klesá a vyznačuje se serosanguinózním charakterem.

Dalšími významnými příznaky jsou kongesce plicních laloků a jater. Uvádí se, že úmrtí spojená s infekcí vrcholí právě 4. dnem, pak mortalita klesá a zase se zvyšuje mezi 6.–8. dnem po navození infekce (Small & Woods 1987; Edwards et al. 1992). Celková míra úmrtnosti při pokusech dosáhla 64 % (27 % v akutní fázi a 37 % v subakutní fázi) (Edwards et al. 1992).

3.4.3 RbCoV HKU14 – Králíčí koronavirus HKU14

Králíčí koronavirus RbCoV HKU14 je poměrně nedávno objeveným virem. Jedná se o zástupce rodu *Betacoronavirus*, který byl poprvé popsán v roce 2012, když se virus objevil v králících na tržištích s živými zvířaty v provincii Kuang-tung v jižní Číně. Předpokládá se, že HKU14 je vzdáleně příbuzný s RbCoV způsobujícím myokarditidu. Stejně jako v předchozím případě bylo zjištěno, že RbCoV HKU14 může podléhat cross-reakci s lidským HCoV OC43. Zajímavostí je, že tento koronavirus lze snadno kultivovat v lidské buněčné kultuře HRT-18G, což je ve skutečnosti mezi koronaviry, až na případ SARS-CoV, výjimečné. Infekce králíků tímto virem probíhá zejména asymptomaticky, jelikož u žádného z pozorovaných infikovaných jedinců se neobjevily žádné klinické příznaky propuknutí onemocnění (Lau et al. 2012).

3.4.4 Ostatní koronaviry zajíců

Monchatre-Leroy et al. (2017) zkoumala prevalenci koronavirů volně žijících zvířat v Evropě a v králících divokých prokázala přítomnost několika dalších betakoronavirů a alfakoronavirů. Studie prevalence těchto virů u 291 jedinců ukázala, že 22 z nich (7,56 %) se potýká s nějakým druhem koronaviru. Většina těchto virů sdílela vysokou míru příbuznosti s ostatními koronaviry. U 17 případů to bylo zejména s RbCoV HKU14 a s alfakoronavirem zajíců (94–98 %) a 5 sekvencí vykazalo identitu 96–97 % s alfakoronavirem hlodavců UKMa2. Přestože tento výzkum zmiňuje alfakoronavirus zajíců, nepodařilo se mi vyhledat další relevantní zdroje, které by blíže specifikovaly tento virus.

3.5 SARS-CoV-2 u zajíců

Studie Preziuso et al. (2020), která se zaměřila na zjišťování náchylnosti zajíců ke koronaviru SARS-CoV-2 prokázala, že tito savci mohou být k infekci skutečně náchylní. K testům byly použity data sekvencí ACE2 králíků a pišťuch pik, která byla následně porovnána s dalšími druhy savců s různým stupněm náchylnosti k infekci, mezi nimi psi, kočky, fretky, křečící čínští (*Cricetulus griseus*), myši, křečci a potkani (*Rattus norvegicus*). Sekvence ACE2 člověka byla použita jako referenční hodnota. Analýza ukázala, že ACE2 zmiňovaných zajíců vykazuje vysokou afinitu ke spike proteinu S SARS-CoV-2. Sekvence ACE2 králíků a koček vykazovaly nejvíce podobnosti s lidským, nicméně pišťuchy prokázaly nejmenší podobnost. Podobně jako u koček, ACE2 králíků vykazuje méně substitucí než lidský v oblastech, které se podílejí na vazbě se spike proteinem S. Jinými slovy nemění svoji strukturu tolik jako u lidí, což může viru umožňovat navázat se pevněji a potenciálně tak usnadnit infekci.

Nedávná studie z února roku 2024 potvrdila schopnost koronaviru SARS-CoV-2 navázat se na ACE2 i u zajíců, a to velmi podobnou afinitou jako je tomu u králíků (Shi et al. 2024). Data těchto dvou studií nám tedy naznačují, že u celé taxonomické skupiny zajíců, včetně čeledí zajícovitých (Leporidae) a pišťuchovitých (Ochotonidae) existuje potenciální riziko infekce, přesto stále chybí poměrně velké množství experimentálních ověření, které by infekci potvrdily.

Jeden z experimentů, který se této problematice věnoval, byl proveden týmem vědců Mytytyn et. al (2021). Její výzkum sledoval průběh infekce 3 jedinců novozélandských bílých králíků po inokulaci virem o koncentraci 10^6 TCID₅₀ po dobu 21 dní. Všechna sledovaná zvířata prošla od inokulace procesem sérokonverze, nicméně žádný jedinec nevykazoval klinické známky infekce. Bylo zjištěno, že virová RNA se v těle zvířat nacházela po dobu 21 dní v nosní dutině, 14 dní v hltanu a 9 dní v konečniku. Vylučování infekčního viru z nosní dutiny trvalo 7 dní a z hltanu pouhý 1 den. Dále se testovaly 3 skupiny králíků po inokulaci virem různých koncentrací (10^6 TCID₅₀, 10^5 TCID₅₀ a 10^4 TCID₅₀). Po 4 dnech byly prováděny výtěry, následně byla zvířata usmrcena a podrobena pitvě. Všechna zvířata, která byla inokulována dávkou 10^6 TCID₅₀, měla pozitivní nález virové RNA v nosní dutině a v hltanu po dobu nejméně 4 dnů. Zvířata inokulovaná dávkou 10^5 TCID₅₀ měla pozitivní nález RNA v nosní dutině po dobu nejméně 4 dnů a v hltanu po dobu nejméně 3 dnů, ale v konečniku nebyla zjištěna žádná

RNA. Tito jedinci rovněž vylučovali infekční virus z nosní dutiny po dobu 3 dnů. Králíci inokulovaní dávkou 10^4 TCID₅₀ nevyučovali žádnou detekovatelnou virovou RNA, proto lze říci, že minimální dávka viru potřebná k navození produktivní infekce byla 10^5 TCID₅₀, což je relativně vysoká hodnota. Toto zjištění naznačuje, že přenos viru mezi králíky probíhá velice neefektivně. Histologická analýza plic usmrcených zvířat ukázala, že v oblasti alveolů došlo lokálně k mírnému až středně silnému nárůstu počtu alveolárních makrofágů. Kromě toho byla pozorována také lokálně rozptýlená přítomnost neutrofilů. V plicích nebyla nalezena žádná virová RNA, a to ani u jedinců vystavených největší dávce viru.

Dalším výzkumem věnujícím se otázce infekce králíků koronavirem SARS-CoV-2 je Fritz et al. (2022). Ten sledoval séroprevalenci 144 jedinců králíků, sloužících jako domácí společníci, tedy zkoumal možnost jejich přirozené infekce. K experimentu použil metodu multiplexní imunoanalýzy MIA (z anglického Multiplex ImmunoAssay), přičemž sledované vzorky pocházely z období 2. až 3. epidemiologické vlny ve Francii. U nich se testovala pozitivita na protilátky proti spike proteinu S jako celku a dále jen na jeho součást RBD. Výzkum ukázal, že pouze 1 jedinec byl pozitivní na obě sledované složky a 1 jedinec jen na antigen RBD. Žádné z pozitivně testovaných zvířat nevykazovalo během odběru vzorků klinické příznaky onemocnění. Za použití nejpřísnějšího kritéria positivity, tedy pozitivita na obě sledované složky, dosáhla séroprevalence pouhých 0,7 %. V případě, že kritérium pro pozitivitu bylo posunuto jen na složku RBD, dosáhla séroprevalence hodnoty 1,4 %.

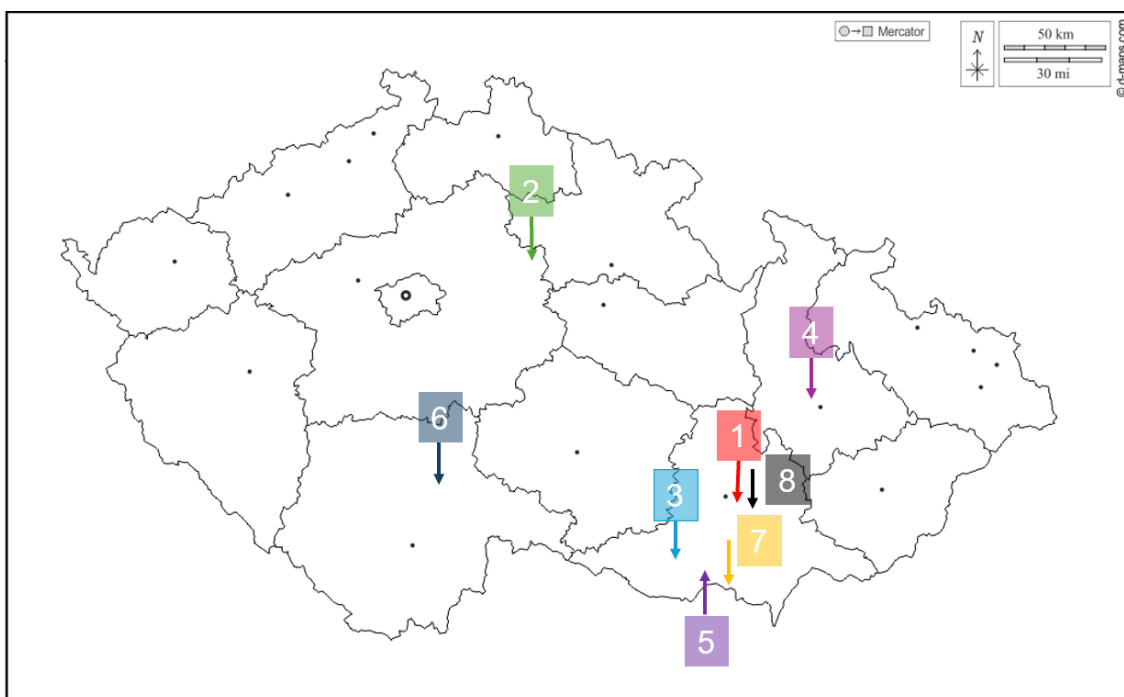
Sérologickou metodu testování vzorků králíků využila i Pomorska-Mól et al. (2021). V tomto experimentu bylo během probíhající pandemie onemocnění COVID-19 v rozmezí června 2020 až února 2021 testováno celkem 29 vzorků z králíků domácích, kteří pocházeli ze středovýchodního Polska. Tyto vzorky byly testovány za využití ELISA metody, avšak žádný z nich nevykazoval séropozitivitu.

4. Cíle praktické části

- Detekovat protilátky proti SARS-CoV-2 v séru zajíců ulovených v ČR pomocí ELISA

5. Materiál

Materiálem pro praktickou část bakalářské práce se staly vzorky krve zajíců střelených při mysliveckých honech v různých částech ČR (viz **Obrázek 6**). Získané vzorky byly přepraveny do laboratoře Fakulty tropického zemědělství k následné analýze. Jejich celkový počet dosáhl 204. Veškeré materiály byly shromážděny během podzimu a zimy roku 2022.



Obrázek 6 – Zobrazení lokalit sběru vzorků na mapě ČR (1 – Šlapanice u Brna, 2 – Kněžice u Městce Králové, 3 – Miroslav, 4 – Skrbeň, 5 – Březí, 6 – Tábor, 7 – Mikulov, 8 – Vážany Nad Litavou). (zdroj mapy – www.d-maps.com)

6. Metodika

6.1 Metodika literární rešerše

K vyhledávání informací v literární části bakalářské práce jsem použila databáze Web of Science, Scopus, PubMed a Google Scholar. Dále byly informace získávány z internetových stránek relevantních institucí World Health Organisation, International Committee on Taxonomy of viruses apod. Ověření latinských názvů různých druhů zvířat a jejich taxonomické zařazení jsem kontrolovala dle mezinárodní encyklopedie rostlin, hub a živočichů BioLib. Výběr použitých citovaných referencí jsem učinila skrze klíčová slova jako jsou „Origin of coronaviruses“, „Structure of coronaviruses“, „Coronaviruses in animals“, „Zoonoses“, „Coronavirus in rabbit“, „SARS-CoV-2 in animals“ a „SARS-CoV-2 in Lagomorpha“. Celkový počet referencí, ze kterých jsem čerpala informace dosáhl 85. Veškeré reference jsou citovány v souladu s citačními pravidly Fakulty tropického zemědělství pomocí vzoru časopisu Conservation Biology a stylu APA.

6.2 Metodika praktické části

Získané vzorky krve zajíců jsem odstředila v centrifuze, abych získala krevní sérum. Sérum jsem následně testovala metodou ELISA za použití proteinu A, který zde fungoval jako detektor přítomnosti zaječích imunoglobulinů. V případě, že protein A tyto protilátky rozpozná, znamená to, že vzorek může být interpretován jako potenciálně pozitivní. Validaci testu jsem prováděla pomocí pozitivní a negativní kontroly, přičemž jako pozitivní kontrolu jsem použila lidské sérum člověka naočkovaného proti SARS-CoV-2 a jako negativní kontrolu jsem použila destilovanou vodu. Výsledky testu jsem zpracovala pomocí dat, která byla vyhodnocena zařízením ELISA Reader na Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Tyto výsledky byly následně prezentovány v tabulkách (viz **Tabulka 2–8** v kapitole **7. Výsledky**), ze kterých byly vytvořeny odpovídající grafy (viz **Obrázek 7–13** v kapitole **7. Výsledky**). Každá tabulka a každý graf zobrazují data z jednotlivých mikrotitračních destiček. Za pozitivní vzorek byl považován takový, který měl dvakrát vyšší hodnotu než negativní kontrola a zároveň jeho hodnota dosahovala minimálně 85 % hodnoty pozitivní kontroly nebo byla vyšší. Na základě výsledků byla vypočítána prevalence výskytu koronavirů u zajíců. Podezřelé

vzorky, které vyšly po testu ELISA jako pozitivní, byly následně odeslány do Brna na VÚVeL (Výzkumný ústav veterinárního lékařství) k prozkoumání pomocí metody virus neutralizační test VNT (z anglického Virus Neutralization Test).

Postup testu ELISA:

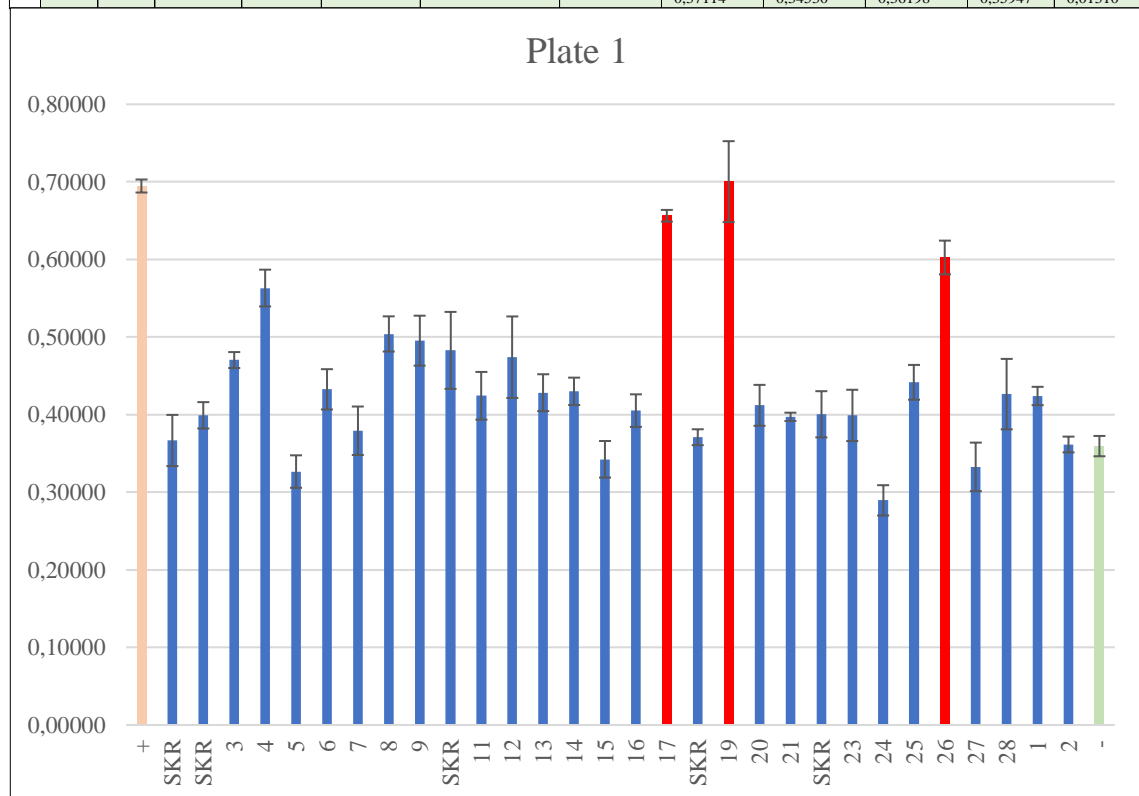
1. Vzorky krevních sér jsem naředila s roztokem PBS (Phosphate Buffered Saline) v poměru 1:800.
2. Následně jsem naředila antigen SARS-CoV-2 s roztokem PBS v poměru 1:2000. Do každé jamky připravených mikrotitračních destiček jsem poté přidala 100 μ l vzniklého roztoku.
3. Destičky jsem vložila na 3 hodiny na třepačku při pokojové teplotě.
4. Následovalo třikrát opakované vyplachování oplachovacím pufrem o koncentraci 0,05 %. Pufr jsem nejdříve připravila naředěním 250 ml PBS se 125 μ l neiontového detergentu Tween20 (Polyoxyethylene-20 Sorbitan Monolaurate).
5. Přidala jsem 100 μ l BSA (Bovine Serum Albumin) do každé jamky a vložila na 2 hodiny na třepačku při pokojové teplotě.
6. Následovalo třikrát opakované vyplachování oplachovacím pufrem.
7. Do destiček jsem přidala vzorky naředěných krevních sér. Destička má celkem 96 jamek a je rozdělena na sloupce označené 1–12 a řádky označené A–H. Každý jednotlivý vzorek byl vložen do 3 jamek příkladným způsobem 1A-1B-1C, 2A-2B-2C atd., z jejichž hodnot se následně počítal průměr. První a poslední 3 jamky byly vyhrazeny pro pozitivní a negativní kontrolu. Celkem bylo tedy možné použít 30 vzorků pro jednu destičku.
8. Destičky jsem vložila přes noc do lednice.
9. Následně jsem připravila roztok sloučením 100 μ l proteinu A s 2% BSA. Do každé jamky jsem přidala 100 μ l vzniklého roztoku a dala na 3 hodiny na třepačku při pokojové teplotě.
10. Poté jsem znovu třikrát vyplachovala destičky oplachovacím pufrem.
11. Dále jsem přidala 50 μ l substrátu TMB (Tetramethylbenzidine) a nechala 15 minut reagovat. Reakce proběhla viditelně zmodráním vzorků.
12. Po 15 minutách jsem reakci zastavila přidáním 50 μ l 2M H₂SO₄ a vzorky zežloutly.
13. Následovalo vyhodnocení dat na přístroji ELISA Reader.

7. Výsledky

Zcelkového počtu 204 vzorků vyšlo po testu ELISA 12 vzorků jako potenciálně pozitivních (viz **Tabulka 2–8** a **Obrázek 7–13**).

Tabulka 2 – Přehled vzorků a výsledků z 1. mikrotitrační destičky

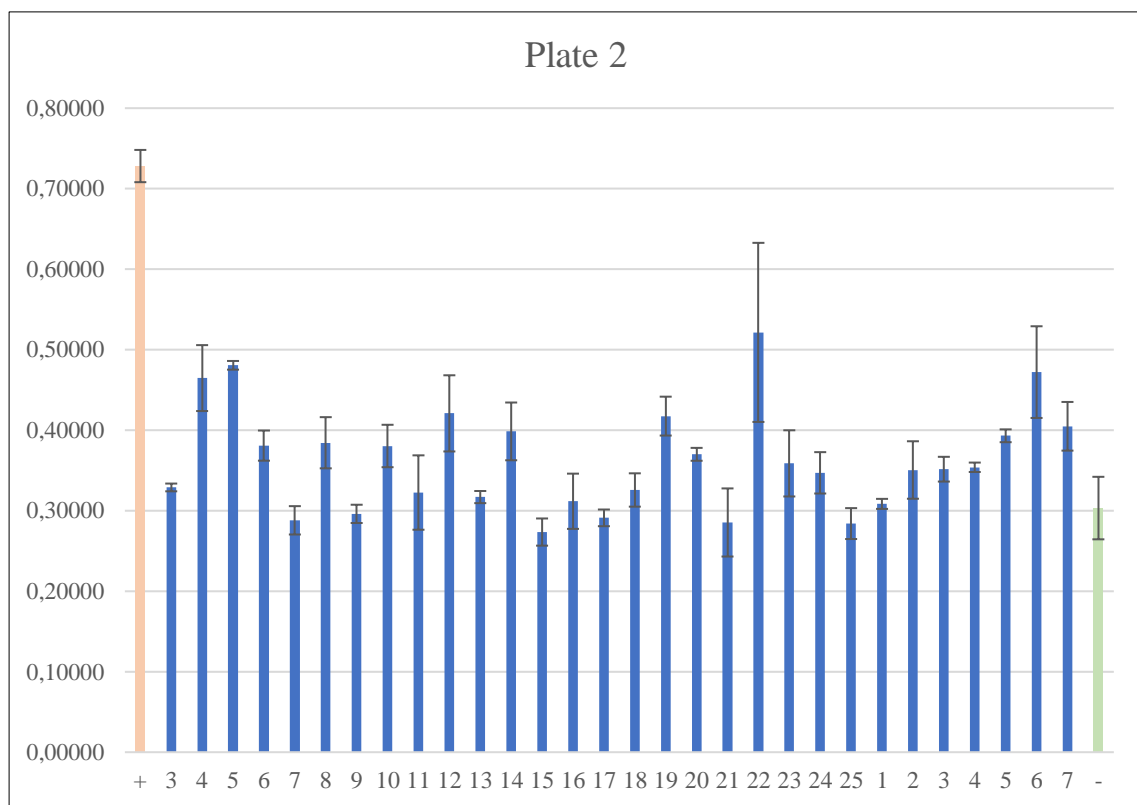
No.	ID	Location	ZIP	Date	Species	Sample type	Results			Mean	S.D.S
	+						0,68659	0,69409	0,70337	0,69468	0,00841
1	SKR	Skrbeň	783 35	26.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,34595	0,34944	0,40472	0,36670	0,03297
2	SKR	Skrbeň	783 35	26.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,38351	0,39682	0,41720	0,39918	0,01697
3	3	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,45935	0,47974	0,47207	0,47039	0,01030
4	4	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,55119	0,54781	0,59049	0,56316	0,02373
5	5	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,30338	0,33274	0,34386	0,32666	0,02091
6	6	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,40386	0,43977	0,45430	0,43264	0,02596
7	7	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,34394	0,40318	0,39068	0,37927	0,03123
8	8	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,48533	0,52926	0,49749	0,50403	0,02268
9	9	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,45865	0,50880	0,51866	0,49537	0,03218
10	SKR	Skrbeň	783 35	26.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,49239	0,42921	0,52696	0,48285	0,04957
11	11	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,39156	0,42881	0,45257	0,42431	0,03075
12	12	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,41824	0,48144	0,52251	0,47406	0,05252
13	13	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,41845	0,41105	0,45541	0,42830	0,02376
14	14	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,41870	0,42110	0,45038	0,43006	0,01764
15	15	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,32615	0,33180	0,36949	0,34248	0,02356
16	16	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,42754	0,40220	0,38588	0,40521	0,02099
17	17	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,64918	0,65571	0,66417	0,65635	0,00752
18	SKR	Skrbeň	783 35	26.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,37583	0,37777	0,35912	0,37091	0,01025
19	19	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,67699	0,76010	0,66385	0,70031	0,05219
20	20	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,40614	0,44086	0,38913	0,41204	0,02637
21	21	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,39411	0,39414	0,40337	0,39721	0,00534
22	SKR	Skrbeň	783 35	26.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,38147	0,43477	0,38516	0,40047	0,02976
23	23	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,43578	0,38961	0,37165	0,39901	0,03308
24	24	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,28301	0,31151	0,27416	0,28956	0,01952
25	25	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,46684	0,43444	0,42377	0,44168	0,02243
26	26	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,62634	0,59768	0,58371	0,60258	0,02173
27	27	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,34547	0,35556	0,29702	0,33268	0,03129
28	28	Březi	691 81	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,43224	0,46869	0,37846	0,42646	0,04539
29	1	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,41180	0,43542	0,42495	0,42406	0,01184
30	2	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,35356	0,37300	0,35804	0,36153	0,01018
-	-						0,37114	0,34530	0,36198	0,35947	0,01310



Obrázek 7 – Přehled výsledků z 1. mikrotitrační destičky. Potenciálně pozitivní vzorky jsou zde červeně označené. V tomto případě se jedná o vzorky 17, 19 a 26.

Tabulka 3 – Přehled vzorků a výsledků z 2. mikrotitrační destičky

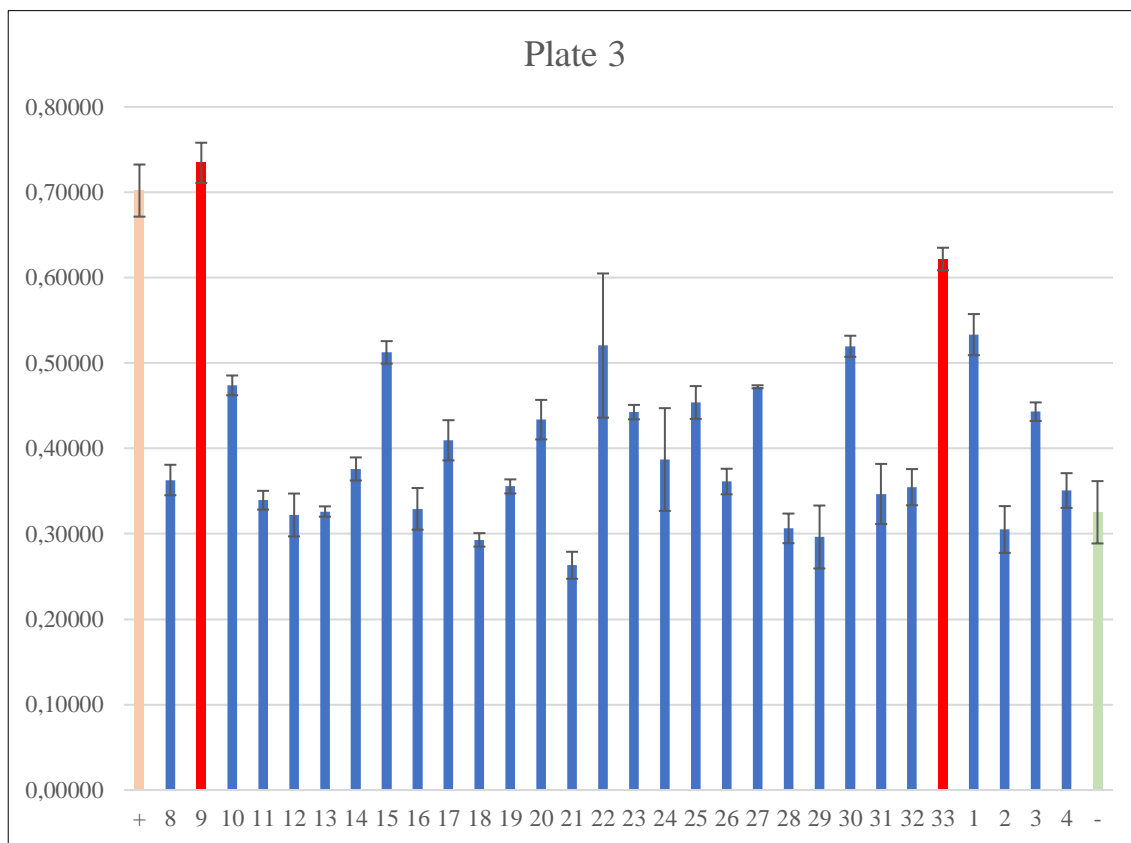
No.	ID	Location	ZIP	Date	Species	Sample type	Results			Mean	S.D.S
	+						0,71945	0,71386	0,75099	0,72810	0,02002
31	3	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,33351	0,32923	0,32389	0,32888	0,00482
32	4	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,45009	0,43310	0,51095	0,46471	0,04093
33	5	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,48679	0,47699	0,47794	0,48057	0,00540
34	6	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,36075	0,38397	0,39782	0,38085	0,01873
35	7	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,26828	0,29363	0,30213	0,28801	0,01761
36	8	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,34771	0,40179	0,40368	0,38439	0,03178
37	9	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,28353	0,29891	0,30567	0,29604	0,01135
38	10	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,36686	0,41071	0,36347	0,38035	0,02635
39	11	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,28706	0,37478	0,30578	0,32254	0,04620
40	12	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,39780	0,47531	0,38955	0,42089	0,04731
41	13	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,30880	0,31824	0,32368	0,31691	0,00753
42	14	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,43899	0,37067	0,38584	0,39850	0,03588
43	15	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,27543	0,25565	0,28925	0,27344	0,01689
44	16	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,28561	0,29894	0,35057	0,31171	0,03431
45	17	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,28197	0,28892	0,30237	0,29109	0,01037
46	18	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,30258	0,33199	0,34252	0,32570	0,02070
47	19	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,44192	0,39363	0,41686	0,41747	0,02415
48	20	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,37905	0,36722	0,36379	0,37002	0,00801
49	21	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,28151	0,32945	0,24509	0,28535	0,04231
50	22	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,64918	0,44573	0,46951	0,52147	0,11123
51	23	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,39242	0,31296	0,37094	0,35877	0,04110
52	24	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,32690	0,37597	0,33823	0,34703	0,02569
53	25	Tábor	390 01	03.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,29854	0,29119	0,26222	0,28398	0,01920
54	1	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,30188	0,30916	0,31428	0,30844	0,00623
55	2	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,38896	0,34429	0,31839	0,35055	0,03570
56	3	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,36182	0,33387	0,35894	0,35154	0,01537
57	4	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,35991	0,35361	0,34821	0,35391	0,00586
58	5	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,40134	0,39236	0,38545	0,39305	0,00797
59	6	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,52733	0,47545	0,41360	0,47213	0,05694
60	7	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,43291	0,37284	0,40879	0,40485	0,03023
	-						0,33849	0,26162	0,30963	0,30325	0,03883



Obrázek 8 – Přehled výsledků z 2. mikrotitrační destičky. V tomto případě žádné vzorky neodpovídají kritériu pro pozitivitu.

Tabulka 4 – Přehled vzorků a výsledků z 3. mikrotitrační destičky

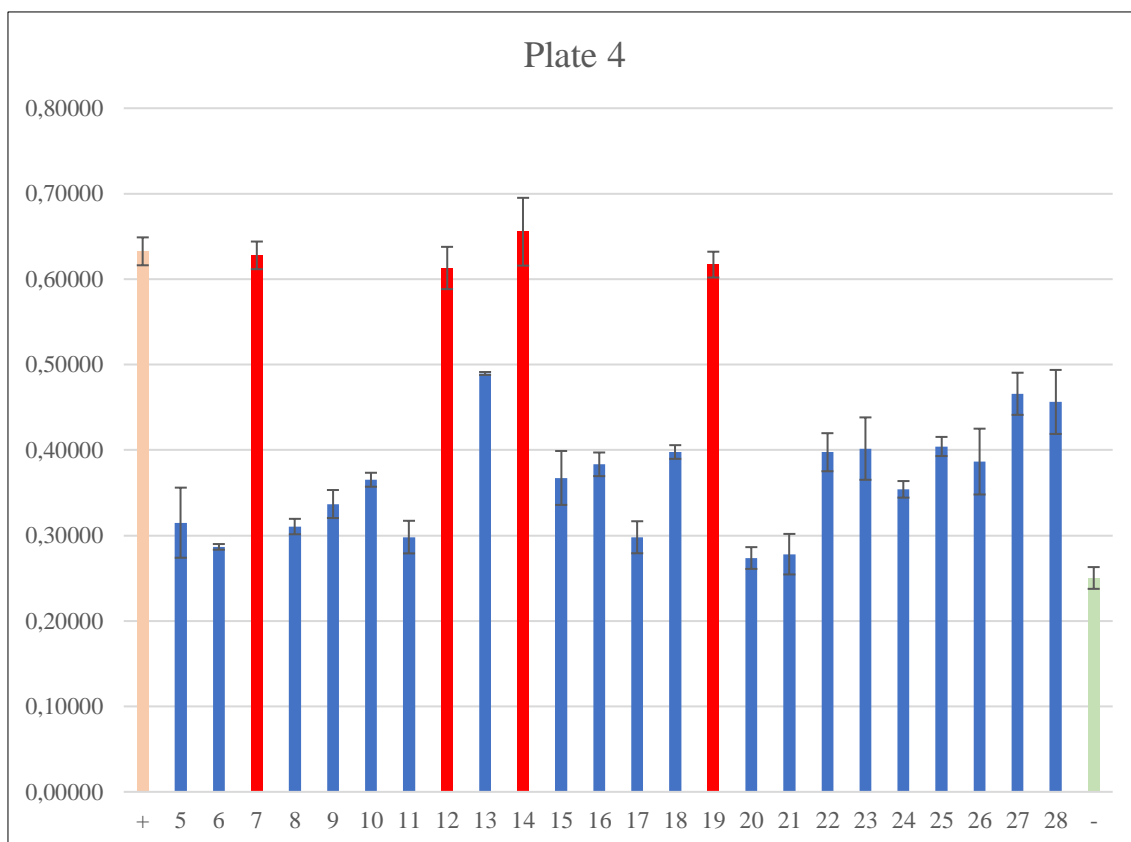
No.	ID	Location	ZIP	Date	Species	Sample type	Results			Mean	S.D.S
	+	+					0,67086	0,70327	0,73186	0,70200	0,03052
61	8	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,35927	0,34739	0,38248	0,36305	0,01785
62	9	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,76154	0,72349	0,71848	0,73450	0,02355
63	10	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,46073	0,47847	0,48244	0,47388	0,01156
64	11	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,35199	0,33184	0,33431	0,33938	0,01099
65	12	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,30018	0,34947	0,31662	0,32209	0,02510
66	13	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,32116	0,33286	0,32433	0,32612	0,00605
67	14	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	missed	0,36638	0,38553	0,37596	0,01354
68	15	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,49959	0,52591	0,51206	0,51252	0,01317
69	16	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,30286	0,33409	0,35089	0,32928	0,02437
70	17	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,43652	0,39301	0,39917	0,40957	0,02354
71	18	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,28389	0,29634	0,29851	0,29291	0,00789
72	19	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,34837	0,36452	0,35380	0,35556	0,00822
73	20	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,43879	0,40849	0,45389	0,43372	0,02312
74	21	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,28063	0,25914	0,24977	0,26318	0,01582
75	22	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,47042	0,47309	0,61796	0,52049	0,08442
76	23	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,44027	0,45190	0,43551	0,44256	0,00843
77	24	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,33158	0,45099	0,37850	0,38702	0,06016
78	25	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,46258	0,43176	0,46711	0,45382	0,01924
79	26	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,34950	0,37811	0,35622	0,36128	0,01496
80	27	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,47033	0,47256	0,47381	0,47223	0,00176
81	28	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,30009	0,29308	0,32601	0,30639	0,01735
82	29	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,25862	0,29801	0,33226	0,29630	0,03685
83	30	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,52197	0,50631	0,53071	0,51966	0,01236
84	31	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,38177	0,34689	0,31143	0,34670	0,03517
85	32	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,36713	0,33019	0,36665	0,35466	0,02119
86	33	Mikulov	692 01	10.12.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,63358	0,60754	0,62441	0,62184	0,01321
87	1	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,55843	0,53106	0,51047	0,53332	0,02406
88	2	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,33663	0,29114	0,28747	0,30508	0,02738
89	3	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,43818	0,45553	0,43551	0,44307	0,01087
90	4	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,32794	0,36706	0,35715	0,35072	0,02034
	-						0,36408	0,31999	0,29164	0,32524	0,03650



Obrázek 9 – Přehled výsledků z 3. mikrotitrační destičky. Potenciálně pozitivní vzorky jsou zde červeně označené. V tomto případě se jedná o vzorky 9 a 33.

Tabulka 5 – Přehled vzorků a výsledků z 4. mikrotitrační destičky

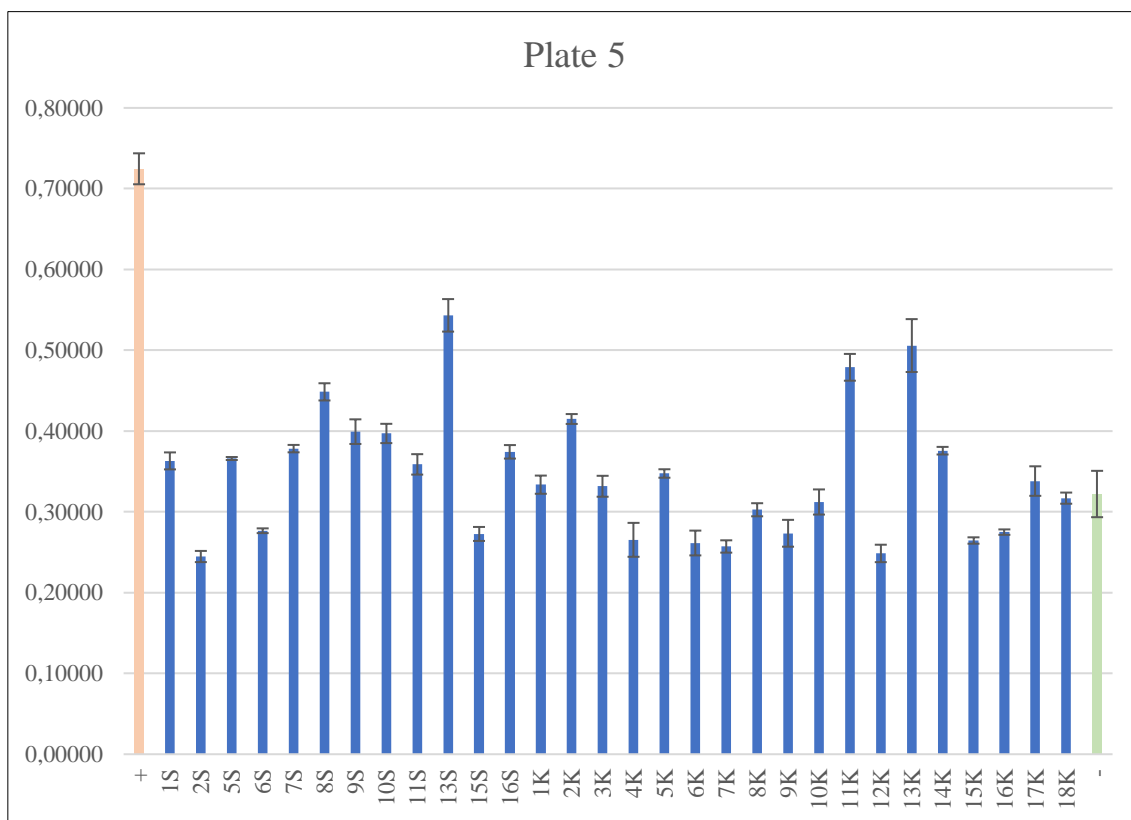
No.	ID	Location	ZIP	Date	Species	Sample type	Results			Mean	S.D.S
	+						0,61403	0,64486	0,63873	0,63254	0,01632
91	5	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,28618	0,36195	0,29680	0,31498	0,04103
92	6	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,28517	0,29048	0,28441	0,28669	0,00331
93	7	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,62697	0,61211	0,64441	0,62783	0,01617
94	8	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,31522	0,31609	0,30004	0,31045	0,00903
95	9	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,31806	0,34408	0,34834	0,33683	0,01639
96	10	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,36149	0,35959	0,37460	0,36523	0,00817
97	11	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,30476	0,27664	0,31299	0,29813	0,01906
98	12	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,58618	0,63488	0,61804	0,61303	0,02473
99	13	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,48899	0,49152	0,48829	0,48960	0,00170
100	14	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,65221	0,69666	0,61752	0,65546	0,03967
101	15	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,33953	0,36089	0,40159	0,36734	0,03153
102	16	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,36791	0,39471	0,38728	0,38330	0,01384
103	17	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,28214	0,29307	0,31863	0,29795	0,01873
104	18	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,38866	0,40056	0,40389	0,39770	0,00801
105	19	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,63436	0,60689	0,60971	0,61699	0,01511
106	20	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,27923	0,28260	0,25905	0,27363	0,01274
107	21	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,25838	0,30444	0,27154	0,27812	0,02372
108	22	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,37324	0,41707	0,40206	0,39746	0,02227
109	23	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,40338	0,36434	0,43731	0,40168	0,03651
110	24	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,35100	0,36485	0,34614	0,35400	0,00971
111	25	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,40333	0,41574	0,39341	0,40416	0,01119
112	26	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,35963	0,43061	0,36924	0,38649	0,03851
113	27	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,44571	0,45839	0,49332	0,46581	0,02466
114	28	Vážany	682 01	19.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,45492	0,49443	0,41953	0,45629	0,03747
	-						0,25674	0,25849	0,23561	0,25028	0,01273



Obrázek 10 – Přehled výsledků ze 4. mikrotitrační destičky. Potenciálně pozitivní vzorky jsou zde červeně označené. V tomto případě se jedná o vzorky 7, 12, 14 a 19.

Tabulka 6 – Přehled vzorků a výsledků z 5. mikrotitrační destičky

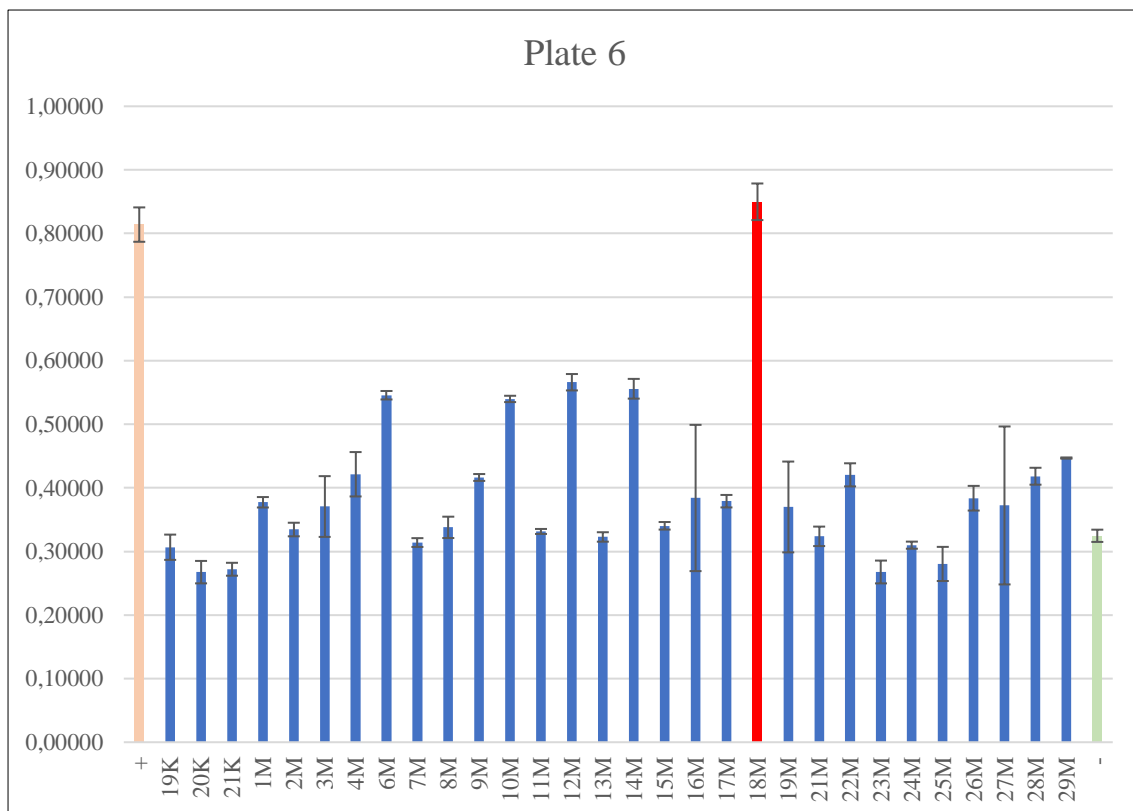
No.	ID	Location	ZIP	Date	Species	Sample type	Results			Mean	S.D.S
	+						0,70425	0,72738	0,74228	0,72464	0,01916
1	1S	Šlapanice	664 51	12.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,35414	0,36043	0,37464	0,36307	0,01050
2	2S	Šlapanice	664 51	12.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,23996	0,25266	0,24158	0,24473	0,00691
3	5S	Šlapanice	664 51	12.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,36469	0,36522	0,36814	0,36602	0,00186
4	6S	Šlapanice	664 51	12.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,28001	0,27469	0,27521	0,27664	0,00293
5	7S	Šlapanice	664 51	12.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,37306	0,38001	0,38172	0,37826	0,00459
6	8S	Šlapanice	664 51	12.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,44615	0,46015	0,43926	0,44852	0,01064
7	9S	Šlapanice	664 51	12.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,39121	0,38976	0,41686	0,39928	0,01524
8	10S	Šlapanice	664 51	12.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,38502	0,39718	0,40891	0,39704	0,01195
9	11S	Šlapanice	664 51	12.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,37268	0,34796	0,35566	0,35877	0,01265
10	13S	Šlapanice	664 51	12.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,53129	0,53196	0,56646	0,54324	0,02011
11	15S	Šlapanice	664 51	12.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,26292	0,27560	0,27946	0,27266	0,00865
12	16S	Šlapanice	664 51	12.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,37084	0,38383	0,36827	0,37431	0,00834
13	1K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,34475	0,32223	0,33396	0,33365	0,01126
14	2K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,41288	0,41012	0,42180	0,41493	0,00610
15	3K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,31858	0,34450	0,33192	0,33167	0,01296
16	4K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,24597	0,28766	0,26249	0,26537	0,02099
17	5K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,34609	0,35328	0,34308	0,34748	0,00524
18	6K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,25761	0,27836	0,24839	0,26145	0,01535
19	7K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,26577	0,25123	0,25450	0,25717	0,00763
20	8K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,31193	0,29812	0,29773	0,30259	0,00809
21	9K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,26604	0,26192	0,29251	0,27349	0,01660
22	10K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,30327	0,30320	0,33018	0,31222	0,01556
23	11K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,47031	0,46839	0,49801	0,47890	0,01657
24	12K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,23614	0,25583	0,25367	0,24855	0,01080
25	13K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,54268	0,49476	0,48010	0,50585	0,03273
26	14K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,37949	0,37044	0,37723	0,37572	0,00471
27	15K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,26891	0,26349	0,26124	0,26455	0,00394
28	16K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,27854	0,27191	0,27433	0,27493	0,00336
29	17K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,32071	0,35715	0,33649	0,33812	0,01827
30	18K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,31448	0,32478	0,31167	0,31698	0,00690
	-						0,32246	0,35056	0,29320	0,32207	0,02868



Obrázek 11 – Přehled výsledků z 5. mikrotitrační destičky. V tomto případě žádné vzorky neodpovídají kritériu pro pozitivitu.

Tabulka 7 – Přehled vzorků a výsledků z 6. mikrotitrační destičky

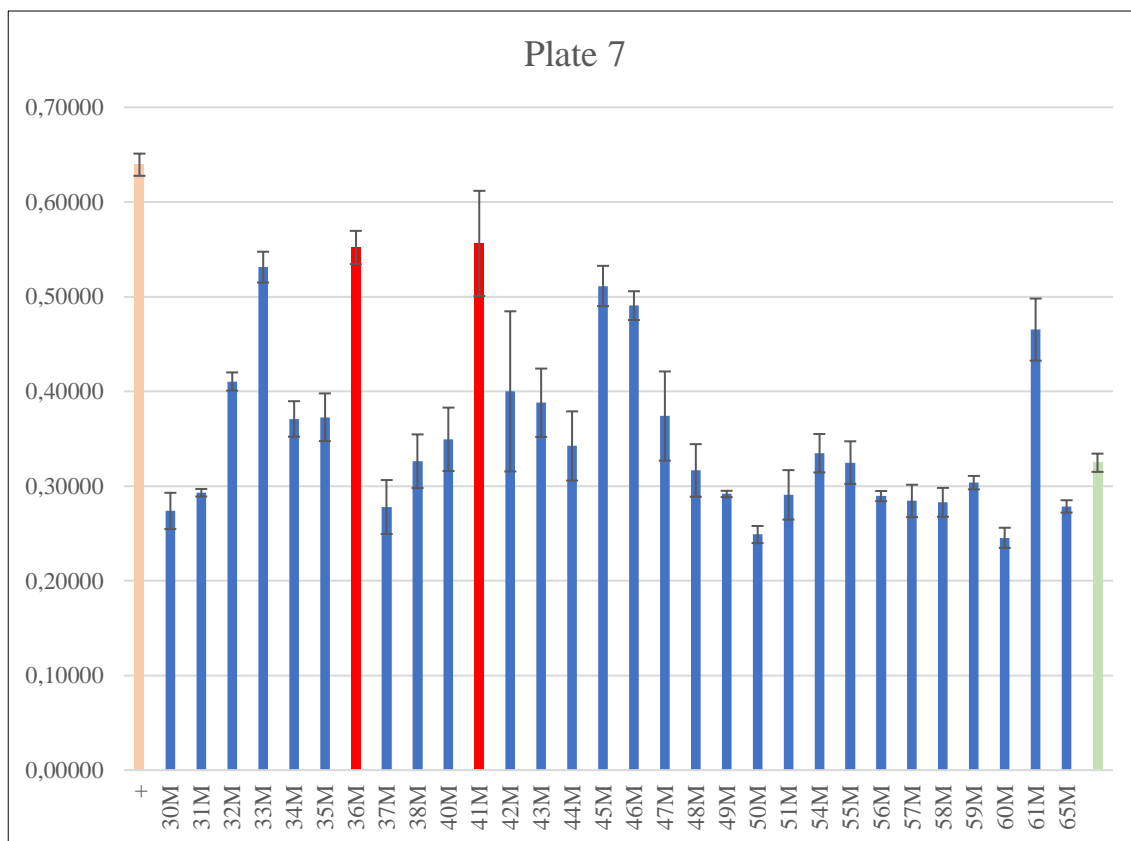
No.	ID	Location	ZIP	Date	Species	Sample type	Results			Mean	S.D.S
	+						0,82556	0,83331	0,78308	0,81398	0,02704
31	19K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,32910	0,29937	0,29145	0,30664	0,01985
32	20K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,28648	0,26428	0,25164	0,26747	0,01764
33	21K	Kněžice	289 02	18.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,27682	0,27886	0,26037	0,27202	0,01014
34	1M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,37760	0,38541	0,36903	0,37735	0,00819
35	2M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,32301	0,33635	0,34412	0,33449	0,01068
36	3M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,42518	0,33624	0,35049	0,37064	0,04777
37	4M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,39688	0,46132	0,40599	0,42140	0,03487
38	6M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,54207	0,54155	0,55334	0,54565	0,00666
39	7M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,30723	0,32106	0,31367	0,31399	0,00692
40	8M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,32261	0,33514	0,35586	0,33787	0,01679
41	9M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,41876	0,42008	0,41019	0,41634	0,00537
42	10M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,54267	0,53409	0,54274	0,53983	0,00497
43	11M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,32793	0,33079	0,33570	0,33147	0,00393
44	12M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,58046	0,55546	0,56242	0,56611	0,01290
45	13M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,31781	0,33134	0,31929	0,32281	0,00742
46	14M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,53975	0,55709	0,57071	0,55585	0,01552
47	15M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,34325	0,34426	0,33347	0,34033	0,00596
48	16M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,51646	0,30898	0,32678	0,38407	0,11500
49	17M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,37269	0,39035	0,37411	0,37905	0,00981
50	18M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,83830	0,82862	0,88262	0,84985	0,02879
51	19M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,36165	0,30308	0,44517	0,36997	0,07141
52	21M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,33844	0,30789	0,32500	0,32378	0,01531
53	22M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,41231	0,40777	0,44127	0,42045	0,01817
54	23M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,26398	0,28724	0,25194	0,26772	0,01794
55	24M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,31574	0,30463	0,30925	0,30987	0,00558
56	25M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,25210	0,28354	0,30549	0,28038	0,02684
57	26M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,37436	0,40603	0,37078	0,38372	0,01940
58	27M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,51572	0,29753	0,30383	0,37236	0,12419
59	28M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,42740	0,40303	0,42445	0,41829	0,01330
60	29M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,44796	0,44618	0,44648	0,44687	0,00095
	-						0,33091	0,31354	0,32944	0,32463	0,00963



Obrázek 12 – Přehled výsledků z 6. mikrotitrační destičky. Potenciálně pozitivní vzorek je zde červeně označen. V tomto případě se jedná o vzorek 18M.

Tabulka 8 – Přehled vzorků a výsledků ze 7. mikrotitrační destičky

No.	ID	Location	ZIP	Date	Species	Sample type	Results			Mean	S.D.S
	+						0,63698	0,62899	0,65211	0,63936	0,01174
61	30M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,29509	0,25806	0,26816	0,27377	0,01914
62	31M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,29586	0,29462	0,28840	0,29296	0,00400
63	32M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,41530	0,41658	0,39930	0,41039	0,00963
64	33M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,54156	0,51242	0,53961	0,53120	0,01629
65	34M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,38483	0,37824	0,34958	0,37088	0,01874
66	35M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,37759	0,39506	0,34539	0,37268	0,02520
67	36M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,54429	0,57203	0,53950	0,55194	0,01756
68	37M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,31056	0,25843	0,26469	0,27789	0,02846
69	38M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,34254	0,29346	0,34263	0,32621	0,02836
70	40M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,38721	0,32357	0,33739	0,34939	0,03347
71	41M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,52908	0,51957	0,62016	0,55627	0,05553
72	42M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,37473	0,33095	0,49435	0,40001	0,08458
73	43M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,40793	0,34637	0,40974	0,38801	0,03608
74	44M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,37298	0,30184	0,35221	0,34234	0,03658
75	45M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,48781	0,52925	0,51682	0,51129	0,02127
76	46M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,48944	0,47591	0,50629	0,49055	0,01522
77	47M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,37041	0,32871	0,42275	0,37396	0,04712
78	48M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,34794	0,29528	0,30632	0,31651	0,02777
79	49M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,29553	0,28971	0,28982	0,29169	0,00333
80	50M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,25614	0,25164	0,23872	0,24883	0,00904
81	51M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,31349	0,26224	0,29650	0,29074	0,02611
82	54M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,31261	0,33885	0,35258	0,33468	0,02031
83	55M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,34843	0,32230	0,30367	0,32480	0,02248
84	56M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,29043	0,28366	0,29422	0,28944	0,00535
85	57M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,28994	0,29790	0,26514	0,28433	0,01709
86	58M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,26758	0,29806	0,28286	0,28283	0,01524
87	59M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,30870	0,29553	0,30664	0,30362	0,00708
88	60M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,25094	0,23314	0,25207	0,24538	0,01062
89	61M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,50309	0,44689	0,44570	0,46523	0,03280
90	65M	Mirotslav	671 72	27.11.2022	<i>Lepus europaeus</i>	serum	0,27109	0,28134	0,28319	0,27854	0,00652
missing negative control - data used from negative control Plate 6							0,33091	0,31354	0,32944	0,32463	0,00963



Obrázek 13 – Přehled výsledků ze 7. mikrotitrační destičky. Potenciálně pozitivní vzorky jsou zde červeně označené. V tomto případě se jedná o vzorky 36M a 41M.

Tabulka 9 – Přehled celkových výsledků z jednotlivých lokalit.

Číslo lokality	Název lokality	PSC	Datum sběru	Počet vzorků	Pozitivní vzorky	Prevalence (%)
1	Šlapanice u Brna	664 51	12.11.2022	12	0	0,00
2	Kněžice u Městce Králové	289 02	18.11.2022	21	0	0,00
3	Miroslav	671 72	27.11.2022	57	3	5,26
4	Skrbeň	783 35	26.11.2022	5	0	0,00
5	Březí	691 81	03.12.2022	23	3	13,04
6	Tábor	390 01	03.12.2022	25	0	0,00
7	Mikulov	692 01	10.12.2022	33	2	6,06
8	Vážany nad Litavou	682 01	19.11.2022	28	4	14,29
Celkem				204	12	5,88

8. Diskuse

V tomto experimentu byla testována krevní séra 204 volně žijících zajíců ulovených v ČR na přítomnost protilátek proti koronaviru SARS-CoV-2 za využití sérologické metody ELISA. V testu jsem na základě stanoveného kritéria pro pozitivitu, kdy se za pozitivní vzorek považoval takový, který měl dvakrát vyšší hodnotu než negativní kontrola a zároveň jeho hodnota dosahovala minimálně 85 % hodnoty pozitivní kontroly nebo byla vyšší, interpretovala celkem 12 vzorků jako potenciálně pozitivní na protilátky proti koronaviru SARS-CoV-2. Nejvyšší míru možné positivity vykazují vzorky ze 4. mikrotitrační destičky (viz **Obrázek 10** v kapitole 7. **Výsledky**), kde z celkového počtu 24 testovaných vzorků 3 vzorky (označené jako 7, 12, a 19) téměř dosahují hodnoty pozitivní kontroly a 1 (označený jako 14) ji převyšuje. Další potenciálně pozitivní vzorky jsem zaznamenala z 1. mikrotitrační destičky (viz **Obrázek 7** v kapitole 7. **Výsledky**). Zde jako potenciálně pozitivní vyšly 3 vzorky z 30 (označené jako 17, 19 a 26), které rovněž téměř dosahují hodnoty pozitivní kontroly nebo ji převyšují.

Následující mikrotitrační destičky 3 a 7 (viz **Obrázek 9** a **13** v kapitole 7. **Výsledky**) vykazují u 2 vzorků možnost positivity. Jedná se o vzorky označené jako 9 a 33 (viz **Obrázek 9** v kapitole 7. **Výsledky**) a vzorky označené jako 36M a 41M (viz **Obrázek 13** v kapitole 7. **Výsledky**). Mikrotitrační destička 6 (viz **Obrázek 12** v kapitole 7. **Výsledky**) rovněž vykazuje možnost positivity u 1 vzorku označeného jako 18M. Oproti tomu žádné z hodnot vzorků z 2. a 5. mikrotitrační destičky neodpovídaly kritériu pro pozitivitu. Celkově lze říci, že nejvyšší míra positivity byla pozorována na lokalitě

Vážany nad Litavou (viz **Tabulka 9** v kapitole **7. Výsledky**), kde hodnota prevalence dosahuje 14,29 % (4 potenciálně pozitivní vzorky z 28 testovaných). Celková prevalence všech testovaných vzorků pak dosahuje 5,88 % (12 potenciálně pozitivních vzorků z 204 testovaných). Nutno však dodat, že se počet získaných vzorků z různých lokalit významně lišil. Například z lokality Skrbeň bylo testováno jen 5 vzorků, zatímco z lokality Miroslav to bylo 57.

Přestože některé vzorky testované pomocí metody ELISA vykazovaly přítomnost protilátek proti SARS-CoV-2, následné ověření pomocí virus neutralizačního testu, který byl proveden na VÚVeL v Brně pozitivitu nepotvrdilo u žádného z analyzovaných vzorků. Lze tedy říci, že všechny testované vzorky jsou negativní na protilátky SARS-CoV-2 a zajíci pravděpodobně neprodělali infekci, což zároveň reflektuje výsledky studií Fritz et al. (2022) a Mykytyn et al. (2021), které prokázaly velice omezenou citlivost zajícovců ke koronaviru SARS-CoV-2. Negativní výsledky po testování ELISA metodou zaznamenala i Pomorska-Mól et al. (2021), která z 29 testovaných vzorků na přítomnost protilátek proti SARS-CoV-2 u zajícovců nezaznamenala séropozitivitu u žádného z nich.

Možným vysvětlením těchto falešně pozitivních reakcí může být zkřížená protilátková reakce, kdy protilátky proti jiným koronaviřům reagují s antigeny SARS-CoV-2, podobně jako tomu bylo u RECV a RbCoV, jejichž protilátky detekovaly antigen koronaviřů HCoV 229E, HCoV OC43, MHV, IBV, TGEV, FIPV, nebo CCoV (Small et al. 1979; Descôteaux et al. 1985; Small & Woods 1987; Kerr & Donnelly 2013). Křížová reaktivita je známý fenomén v sérologii a může vést k nejednoznačným nebo falešně pozitivním výsledkům. Jak ukázal tento experiment, neutralizační test byl zde nezbytný k posouzení relevance sérologických výsledků. Na základě těchto výsledků lze říci, že ačkoliv dostupné studie (Preziuso et al. 2020; Shi et al. 2024) prokázaly u zajícovců teoretickou citlivost receptoru ACE2 ke koronaviru SARS-CoV-2, a to dokonce i vyšší vazebnou afinitou, než je tomu u člověka, zajícovci pravděpodobně nehrají významnou roli v epidemiologii SARS-CoV-2.

Nejenže tento experiment neprokázal u zajíců přítomnost protilátek proti SARS-CoV-2, výsledky ukázaly možnou pozitivitu k protilátkám jiného druhu koronaviru. Monchatre-Leroy et al. (2017), která sledovala prevalenci koronaviřů v králících divokých v Evropě zaznamenala u 22 z 291 jedinců (7,56 %) přítomnost nějakého druhu koronaviru. Bylo zjištěno, že velká většina z nich vykazuje vysokou míru podobnosti

(94–98 %) s již známým druhem betakoronaviru králíků RBCoV HKU14 a s alfa-koronavirem zajíců. Přes skutečnost, že tato studie naznačuje existenci konkrétního druhu koronaviru, který přirozeně infikuje zajíce, nepodařilo se mi dohledat další relevantní zdroje, které by virus blíže specifikovaly. Nicméně na základě výsledků provedeného sérologického testu je možné konstatovat, že pokud ELISA test detekoval protilátky zaměřené na jiný typ koronaviru, výsledky tohoto experimentu s prevalencí 5,88 % jsou téměř v souladu s výsledky prezentovanými ve zmíněné studii. Mírný rozdíl v procentuálním zastoupení pozitivních vzorků tohoto experimentu oproti Monchatre-Leroy et al. (2017) může být vysvětlen například geografickými rozdíly, různorodostí vzorků či testováním v jiném časovém období. Monchatre-Leroy et al. (2017) pracovala se vzorkem z širší geografické oblasti, která zahrnovala západní a střední Francii, kdežto tato studie analyzovala vzorky pocházející zejména z Jihomoravského kraje ČR, který představuje výrazně menší geografickou oblast.

Navzdory širokému využití zajícovců v laboratorním výzkumu, jako domácích společníků, v produkci potravin nebo v myslivosti, stále existuje poměrně omezené množství dat, která by poskytla bližší informace o jejich infekci koronavirem SARS-CoV-2 i dalšími koronaviry. Relevantní výzkumy zkoumající koronaviry, které se přirozeně vyskytují u zajícovců pocházejí již z období 70. až 80. let minulého století (Small et al. 1979; Descôteaux et al. 1985; Small & Woods 1987), což je poměrně dlouhá doba. Proto navrhuji, aby se možné pokračování této studie zaměřilo na analyzování širšího spektra vzorků z celé oblasti ČR, ve kterých by byly představené sekvence konkrétních druhů koronavirů, které se u zajíců vyskytly. Rovněž k posouzení potenciální přirozené infekce zajícovců koronavirem SARS-CoV-2 navrhuji analyzovat vzorky pocházející z urbanistických oblastí, zejména z hustě osídlených městských čtvrtí, kde zajíci přicházejí do přímého kontaktu s lidmi, jelikož v takovém prostředí by mohlo docházet k vyššímu riziku přenosu patogenu mezi zvířaty a lidmi oproti volné přírodě. Tento předpoklad vychází z pozorovaných incidentů ve farmových chovech norků v Norsku a Dánsku, kde byl zaznamenán vzájemný přenos infekce SARS-CoV-2 mezi lidmi a chovanými norky (Lu et al. 2021; Oude Munnink et al. 2021; Rabalski et al. 2022).

9. Závěr

Tato práce se v rámci literární rešerše zaměřila na shrnutí dosavadních poznatků o koronavirech, zejména o zástupcích, které přirozeně infikují zajícovce. Na základě dostupných studií lze říci, že existují 3 konkrétní druhy koronavirů, které byly izolovány z králíků (RECV, RBCoV, RBCoV HKU14) a 1 druh blíže nespecifikovaného alfa-koronaviru, který přirozeně infikuje zajíce. S ohledem na nedávnou pandemii onemocnění COVID-19, způsobené koronavirem SARS-CoV-2, byly také prezentovány nejnovější informace o infekci zajícovců tímto virem. Bylo zjištěno, že vazebná afinita spike proteinu S k receptoru ACE2 králíků je silnější než u člověka, avšak přirozená i laboratorně navozená infekce u králíků probíhá bez klinických příznaků a velice neefektivně.

V návaznosti na literární rešerši byl proveden výzkum na přítomnost protilátek proti SARS-CoV-2 u vybraných krevních vzorků zajíců ulovených na území ČR. Experiment probíhal za využití metody ELISA, kdy byl k detekci zajčích imunoglobulinů použit protein A, který se vyznačuje širší specifikitou. Výsledky testu vyhodnotily celkem 12 z 204 (odpovídající prevalenci 5,88 %) vzorků jako pozitivní. Nicméně následná analýza na VÚVeL v Brně, která měla tuto skutečnost ověřit pomocí metody virus neutralizační test, přítomnost protilátek blokujících replikaci SARS-CoV-2 u žádného ze vzorků nepotvrdila. Proto je možné konstatovat, že zkoumaní zajíci infekci koronavirem SARS-CoV-2 zřejmě neprodělali.

Rovněž lze říci, že ačkoliv výsledky jiných experimentů ukazují možnost infekce zajícovců koronavirem SARS-CoV-2, neexistují důkazy proto, že zajícovci hrají nějakou roli v šíření tohoto koronaviru.

Na závěr bych ráda zmínila, že výzkum koronavirů, včetně SARS-CoV-2 u zajícovců je potřeba stále více prohlubovat, neboť v tuto chvíli neexistuje příliš mnoho relevantních zdrojů, které by se tomuto tématu věnovaly. Pokračování tohoto výzkumu bych ráda zaměřila na analýzu vzorků zajíců a králíků, kteří byli v užším kontaktu s lidmi a existuje zde tedy potenciálně vyšší riziko infekce než ve volné přírodě.

10. Reference

Ali A, Vijayan R. 2020. Dynamics of the ACE2–SARS-CoV-2/SARS-CoV Spike Protein Interface Reveal Unique Mechanisms. *Scientific Reports* (e14214) DOI: 10.1038/s41598-020-71188-3.

Animal and Plant Health Inspection Service. 2021a. Confirmation of COVID-19 in Gorillas at a California Zoo. Animal and Plant Health Inspection Service. Available from https://www.aphis.usda.gov/aphis/newsroom/stakeholder-info/sa_by_date/sa-2021/sa-01/ca-gorillas-sars-cov-2 (accessed March 2023).

Animal and Plant Health Inspection Service. 2021b. Confirmation of COVID-19 in Otters at an Aquarium in Georgia. Animal and Plant Health Inspection Service. Available from https://www.aphis.usda.gov/aphis/newsroom/stakeholder-info/sa_by_date/sa-2021/sa-04/covid-georgia-otters (accessed March 2023).

Arya R, Kumari S, Pandey B, Mistry H, Bihani SC, Das A, Prashar V, Gupta GD, Panicker L, Kumar M. 2021. Structural Insights into SARS-CoV-2 Proteins. *Journal of Molecular Biology* (e166725) DOI: 10.1016/j.jmb.2020.11.024.

Bai C, Zhong Q, Ga GF. 2022. Overview of SARS-CoV-2 Genome-encoded Proteins. *Science China Life Sciences* **65**:280-294.

Beltz LA. 2022. Coronaviruses of Wild and Semidomesticated Animals with the Potential for Zoonotic Transmission. Pages 275-340 in *Microbiology and Public Health*, editor. Pathogenic Coronaviruses of Humans and Animals: SARS, MERS, COVID-19, and Animal Coronaviruses with Zoonotic Potential. Academic Press.

Bosco-Lauth AM, Walker A, Guilbert L, Porter S, Hartwig A, McVicker E, Bielefeldt-Ohmann H, Bowen RA. 2021. Susceptibility of Livestock to SARS-CoV-2 Infection. *Emerging Microbes & Infections* **10**:2199-2201.

Brant AC, et al. 2021. SARS-CoV-2: From its Discovery to Genome Structure, Transcription, and Replication. *Cell & Bioscience* (e136) DOI: 10.1186/s13578-021-00643-z.

Colina SE, Serena MS, Echeverría MG, Metz GE. 2021. Clinical and Molecular Aspects of Veterinary Coronaviruses. *Virus Research* (e198382) DOI: 10.1016/j.virusres.2021.198382.

Cross AR, Baldwin VM, Ro S, Essex-Lopresti AE, Prior JL, Harmer NJ. 2019. Zoonoses under our Noses. *Microbes and Infection* **21**:10-19.

Cui J, Li F, Shi Z-L. 2019. Origin and Evolution of Pathogenic Coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology* **17**:181-192.

Descôteaux JP, Lussier G, Berthiaume L, Alain R, Seguin C, Trudel M. 1985. An Enteric Coronavirus of the Rabbit: Detection by Immunoelectron Microscopy and Identification of Structural Polypeptides. *Original Papers* **84**:241-250.

Domańska-Blicharz K, et al. 2020. Animal Coronaviruses in the Light of COVID-19. *Journal of Veterinary Research* **64**:333-345.

Edwards S, Small JD, Gerat JD, Alexander LK, Baric RS. 1992. An Experimental Model for Myocarditis and Congestive Heart Failure after Rabbit Coronavirus Infection. *The Journal of Infectious Diseases* **165**:134-140.

Casadevall A, Pirofski L-A. 1999. Host-Pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. *Infection and Immunity* **67**:3703-3713.

Fritz M, de Riols de Fronclare D, Garcia D, Beurlet S, Becquart P, Rosolen SG, Briend-Marchal A, Leroy EM. 2022. First Evidence of Natural SARS-CoV-2 Infection in Domestic Rabbits. *Veterinary Sciences* **9**:49-49.

Gaugler R. 2002. *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, New Jersey USA.

Gilmudtinov R, Shalamova G, Domolazov S, Muratov A, Ignatieva S. 2020. Coronaviruses of Wild Animals in Russia. *Ecological and Biological Well-Being of Flora and Fauna* (e01013) DOI: 10.1051/e3sconf/202020301013.

Hale VL, et al. 2022. SARS-CoV-2 Infection in Free-ranging White-tailed Deer. *Nature* **602**:481-486.

Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA. 2020. The Molecular Virology of Coronaviruses. *Journal of Biological Chemistry* **295**:12910-12934.

Hasöksüz M, Kilic S, Saraç F. 2020. Coronaviruses and SARS-CoV-2. *Turkish Journal of Medical Sciences* **50**:549-556.

Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. 2021. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* **19**:141-154.

Hubálek Z, Rudolf I. 2014. *Mikrobiální zoonózy a sapronózy*. Masarykova univerzita, Brno.

Chan JFW, Lau SKP, To KKW, Cheng VCC, Woo PCY, Yuen KY. 2015. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: Another Zoonotic Betacoronavirus Causing SARS-Like Disease. *Clinical Microbiology Reviews* **28**:465-522.

Chen Y, Liu Q, Guo D. 2020. Emerging Coronaviruses: Genome Structure, Replication, and Pathogenesis. *Journal of Medical Virology* **92**:418-423.

Chomel BB. 2009. Zoonoses. Pages 820-829 in Moselio Schaechter, editor. *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, USA San Diego.

International Committee on Taxonomy of Viruses. 2022. Taxonomy Browser. Available from <https://ictv.global/taxonomy> (accessed April 2023).

Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. 2021. Mechanisms of SARS-CoV-2 Entry into Cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **23**:3-20.

Kadam SB, Sukhramani GS, Bishnoi P, Pable AA, Barvkar VT. 2021. SARS-CoV-2, the Pandemic Coronavirus: Molecular and Structural Insights. *Journal of Basic Microbiology* **61**:180-202.

Kaishian P, Lubbers M, Fekih I, de Groot M, Schilthuizen M, Haelewaters D. 2024. Definitions of Parasites and Pathogens Through Time. *Authorea* DOI: 10.22541/au.165712662.22738369/v2.

Kerr PJ, Donnelly TM. 2013. Viral Infections of Rabbits. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* **16**:437-468.

Khailany RA, Safdar M, Ozaslan M. 2020. Genomic Characterization of a Novel SARS-CoV-2. *Gene Reports* (e100682) DOI: 10.1016/j.genrep.2020.100682.

Kim D, Lee J-Y, Yang J-S, Kim JW, Kim VN, Chang H. 2020. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* **181**:914-921.

Klauegger A, Strobl B, Regl G, Kaser A, Luytjes W, Vlasak R. 1999. Identification of a Coronavirus Hemagglutinin-Esterase With a Substrate Specificity Different from Those of Influenza C Virus and Bovine Coronavirus. *Journal of Virology* **73**:3737-3743.

Krogstad AP, Simpson JE, Korte SW. 2005. Viral Diseases of the Rabbit. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* **8**:123-138.

Lan J, et al. 2020. Structure of the SARS-CoV-2 Spike Receptor-binding Domain Bound to the ACE2 Receptor. *Nature* **581**:215-220.

Lang Y, et al. 2020. Coronavirus Hemagglutinin-esterase and Spike Proteins Coevolve for Functional Balance and Optimal Virion Avidity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**:25759-25770.

Lau SK, et al. 2012. Isolation and Characterization of a Novel Betacoronavirus Subgroup A Coronavirus, Rabbit Coronavirus HKU14, from Domestic Rabbits. *Journal of Virology* **86**:5481-5496.

Lei C, Yang J, Hu J, Sun X. 2021. On the Calculation of TCID₅₀ for Quantitation of Virus Infectivity. *Virologica Sinica* **36**:141-144.

Li F. 2016. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual Review of Virology* **3**:237-261.

Liu DX, Fung TS, Chong KK-L, Shukla A, Hilgenfeld R. 2014. Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. *Antiviral Research* **109**:97-109.

Liu Y, et al. 2021. Functional and Genetic Analysis of Viral Receptor ACE2 Orthologs Reveals a Broad Potential Host Range of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (e2025373118) DOI: 10.1073/pnas.2025373118.

Long S. 2021. SARS-CoV-2 Subgenomic RNAs: Characterization, Utility, and Perspectives. *Viruses* (e1923) DOI: 10.3390/v13101923.

Lu L, et al. 2021. Adaptation, Spread and Transmission of SARS-CoV-2 in Farmed Minks and Associated Humans in the Netherlands. *Nature Communications* (e6802) DOI: 10.1038/s41467-021-27096-9.

Luan J, Lu Y, Jin X, Zhang L. 2020. Spike Protein Recognition of Mammalian ACE2 Predicts the Host Range and an Optimized ACE2 for SARS-CoV-2 Infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **526**:165-169.

Ludwig S, Zarbock A. 2020. Coronaviruses and SARS-CoV-2: a Brief Overview. *Anesthesia & Analgesia* **131**:93-96.

Makarenkov V, Mazoure B, Rabusseau G, Legendre P. 2021. Horizontal Gene Transfer and Recombination Analysis of SARS-CoV-2 Genes Helps Discover its Close Relatives and Shed Light on its Origin. *BMC Ecology and Evolution* (e5) DOI: 10.1186/s12862-020-01732-2.

Malik YA. 2020. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *The Malaysian Journal of Pathology* **42**:3-11.

Masters PS. 2006. The Molecular Biology of Coronaviruses. *Advances in Virus Research* **66**:193-292.

McAloose D, et al. 2020. From People to Panthera: Natural SARS-CoV-2 Infection in Tigers and Lions at the Bronx Zoo. *mBIO* (e02220-20) DOI: 10.1128/mBio.02220-20.

McIntosh K, Becker WB, Chanock RM. 1967. Growth in Suckling-mouse Brain of "IBV-like" Viruses from Patients with Upper Respiratory Tract Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **58**:2268-2273.

Mihindukulasuriya KA, Wu G, St Leger J, Nordhausen RW, Wang D. 2008. Identification of a Novel Coronavirus from a Beluga Whale by Using a Panviral Microarray. *Journal of Virology* **82**:5084-5088.

Monchatre-Leroy E, Boué F, Boucher J-M, Renault C, Moutou F, Ar Gouilh M, Umhang G. 2017. Identification of Alpha and Beta Coronavirus in Wildlife Species in France: Bats, Rodents, Rabbits, and Hedgehogs. *Viruses* (e364) DOI: 10.3390/v9120364.

Mykytyn AZ, et al. 2021. Susceptibility of rabbits to SARS-CoV-2. *Emerging Microbes & Infections* **10**:1-7.

Oude Munnink BB, et al. 2021. Transmission of SARS-CoV-2 on Mink Farms Between Humans and Mink and Back to Humans. *Science* **371**:172-177.

Pomorska-Mól M, Turlewicz-Podbielska H, Gogulski M, Ruszkowski JJ, Kubiak M, Kuriga A, Barket P, Postrzech M. 2021. A Cross-sectional Retrospective Study of SARS-CoV-2 Seroprevalence in Domestic Cats, Dogs and Rabbits in Poland. *BMC Veterinary Research* (e322) DOI: 10.1186/s12917-021-03033-2.

Preziuso S. 2020. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Exhibits High Predicted Binding Affinity to ACE2 from Lagomorphs (Rabbits and Pikas). *Animals* (e1460) DOI: 10.3390/ani10091460.

Rabalski L, Kosinski M, Mazur-Panasiuk N, Szewczyk B, Bienkowska-Szewczyk K, Kant R, Sironen T, Pyrc K, Grzybek M. 2022. Zoonotic Spill-over of SARS-CoV-2: Mink-adapted Virus in Humans. *Clinical Microbiology and Infection* (e451) DOI: 10.1016/j.cmi.2021.12.001.

Račnik J, et al. 2021. Transmission of SARS-CoV-2 from Human to Domestic Ferret. *Emerging Infectious Diseases* **27**:2450-2453.

Rahman MT, Sobur MA, Islam MS, Ievy S, Hossain MJ, Zowalaty El ME, Rahman AMMT, Ashour HM. 2020. Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. *Microorganisms* (e1405) DOI: 10.3390/microorganisms8091405.

Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, Li F. 2020. Cell Entry Mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**:11727-11734.

Shi K, Li L, Luo C, Xu Z, Huang B, Ma S, Liu K, Yu G, Gao GF, Rappuoli R. 2024. Structural Basis of Increased Binding Affinities of Spikes from SARS-CoV-2 Omicron Variants to Rabbit and Hare ACE2s Reveals the Expanding Host Tendency. *mBIO* (e02988-23) DOI: 10.1128/mbio.02988-23.

Small JD, Woods RD. 1987. Relatedness of Rabbit Coronavirus to Other Coronaviruses. In *Advances in Experimental Medicine and Biology, Coronaviruses* **218**:521-527.

Small JD, Aurelian L, Squire RA, Strandberg JD, Melby Jr EC, Turner TB, Newman B. 1979. Rabbit Cardiomyopathy Associated with a Virus Antigenically Related to Human Coronavirus Strain 229E. *The American Journal of Pathology* **95**:709-29.

Temmam S, et al. 2022. Bat Coronaviruses Related to SARS-CoV-2 and Infectious for Human Cells. *Nature* **604**:330-336.

Thomas SR, Elkinton JS. 2004. Pathogenicity and Virulence. *Journal of Invertebrate Pathology* **85**:146-151.

Trimpert J, Vladimirova D, Dietert K, Abdelgawad A, Kunec D, Dökel S, Voss A, Gruber AD, Bertzbach LD, Osterrieder N. 2020. The Roborovski Dwarf Hamster is a Highly Susceptible Model for a Rapid and Fatal Course of SARS-CoV-2 Infection. *Cell Reports* (e108488) DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108488.

Tyrrell DAJ, Bynoe ML. 1966. Cultivation of Viruses From a High Proportion of Patients With Colds. *The Lancet* **287**:76-77.

Tyrrell DAJ, et al. 1975. Coronaviridae. *Intervirology* **5**:76-82.

Centers for Disease Control and Prevention. 2021. Zoonotic Diseases. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, USA Atlanta. Available from <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/zoonotic-diseases.html#print> (accessed February 2023).

Umakanthan S, Sahu P, Ranade AV, Bukelo MM, Rao JS, Abrahao-Machado LF, Dahal S, Kumar H, Kv D. 2020. Origin, Transmission, Diagnosis and Management of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Postgraduate Medical Journal* **96**:753-758.

Ünal A, Yardimci H. 2021. Kanatlı Korona Virüslerinin Zoonotik Potansiyelinin Değerlendirilmesi. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni* **12**:33-42.

Vandegrift K, et al. 2022. SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) Infection of Wild White-tailed Deer in New York City. *Viruses* (e2770) DOI: 10.3390/v14122770.

Woo PC, et al. 2012. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *Journal of virology* **86**:3995-4008.

World Health Organization. 2020. Zoonoses. World health organization. Available from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses> (accessed January 2023).

Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C-L, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. 2020. Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV Spike in the Prefusion Conformation. *Science* **367**:1260-1263.

Wu C-R, Yin W-C, Jiang Y, Xu HE. 2022. Structure Genomics of SARS-CoV-2 and its Omicron Variant: Drug Design Templates for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica* **43**:3021-3033.

Xiao X, Newman C, Buesching CD, Macdonald DW, Z-M Zhou. 2021. Animal Sales from Wuhan Wet Markets Immediately Prior to the COVID-19 Pandemic. *Scientific Reports* (e11898) DOI:10.1038/s41598-021-91470-2.

Yadav R, Chaudhary JK, Jain N, Chaudhary PK, Khanra S, Dhamia P, Sharma A, Kumar A, Handu S. 2021. Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cell* (e821) DOI: 10.3390/cells10040821.

Yaglom HD, Hecht G, Goedderz A, Jasso-Selles D, Ely JL, Ruberto I, Bowers JR, Engelthaler DM, Venkat H. 2021. Genomic Investigation of a Household SARS-CoV-2 Disease Cluster in Arizona Involving a Cat, Dog, and Pet Owner. *One Health* (e100333) DOI: 10.1016/j.onehlt.2021.100333.

Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. 2020. Structural Basis for the Recognition of SARS-CoV-2 by Full-length Human ACE2. *Science* **367**:1444-1448.

Yang D, Leibowitz JL. 2015. The Structure and Functions of Coronavirus Genomic 3' and 5' ends. *Virus Research* **206**:120-133.

Yao W, et al. 2023. Evolution of SARS-CoV-2 Spikes Shapes their Binding Affinities to Animal ACE2 Orthologs. *Microbiology Spectrum* (e02676-23) DOI: 10.1128/spectrum.02676-23.

Ye Z-W, Yuan S, Yuen K-S, Fung S-Y, Chan C-P, Jin D-Y. 2020. Zoonotic Origins of Human Coronaviruses. *International Journal of Biological Sciences* **16**:1686-1697.

Zhang J, Xiao T, Cai Y, Chen B. 2021. Structure of SARS-CoV-2 Spike Protein. *Current Opinion in Virology* **50**:173-182.