



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ζωικά μοντέλα στη μελέτη της παθογένειας του ιού SARS
Cov-2**

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΗ:

Χαρισιάδης Αθανάσιος

A.M.:62116067

Επιβλέπουσα

Βογιατζάκη Χρυσάνθη DVM, PhD

Επίκουρη καθηγήτρια, Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας

Αθήνα, 2022



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
Faculty of Health and Care Sciences
Department of Biomedical Sciences



Section of Medical Laboratories

UNDERGRADUATE THESIS

Animal models in the research of the pathogeny of the SARS Cov-2 virus

NAME OF STUDENT:

ATHANASIOS CHARISIADIS

Registration Number: 62116067

NAME OF THE SUPERVISOR:

Vogiatzaki Chrysanthi, DVM, PhD

Assistant Professor, Laboratory of Molecular Microbiology and Immunology

Athens, 2022

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής

Δρ. Βογιατζάκη Χρυσάνθη

**Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα
Βιοϊατρικών Επιστημών**

Δρ. Χανιώτης Δημήτριος

**Καθηγητής, Τμήμα Βιοϊατρικών
Επιστημών**

Δρ. Μπελούκας Απόστολος

**Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα
Βιοϊατρικών Επιστημών**

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Χαρισιάδης Αθανάσιος του Εμμανουήλ, με αριθμό μητρώου 62116067 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοιατρικών Επιστημών του Τομέα Ιατρικών Εργαστηρίων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών

Αθανάσιος Χαρισιάδης



Ευχαριστήρια

Θεωρώ μεγάλη ανάγκη να ευχαριστήσω τα άτομα συντέλεσαν στην εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας μου, παρέχοντας υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια.

Αρχικά, θέλω να ευχαριστήσω τους επιβλέποντες καθηγητές μου, κα. Βογιατζάκη Χρυσάνθη και την κα. Γιαννουλάκη Ελένη, που μου έδωσαν την ευκαιρία να ασχοληθώ με αυτό το επίκαιρο και ενδιαφέρον θέμα, έτσι ώστε να κάνω μια εμπειριστατωμένη μελέτη γύρω από το αντικείμενο για τη πτυχιακή μου εργασία. Τις ευχαριστώ για τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους σε όλη την διάρκεια της εκπόνησής της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους για την ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχαν κατά την διάρκεια των σπουδών μου στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλεται στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, το οποίο μου έδωσε τις κατάλληλες γνώσεις για το μελλοντικό μου επάγγελμα αλλά και φυσικά για να μου είναι δυνατό να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα τέλη του 2019 πρωτοεμφανίστηκε ο ιός SARS-CoV-2, ένας ιός ο οποίος προσβάλλει τον άνθρωπο και προκαλεί την νόσο COVID-19. Λόγω της μεγάλης ανάγκης για την κατανόηση του ιού, με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη θεραπευτικών παραγόντων και εμβολίων, αναπτύχθηκαν ποικίλα ζωικά μοντέλα για την μελέτη των μηχανισμών, της παθογένειας και της μεταδοτικότητας του ιού. Η χρήση των ζώων σε μελέτες, αν και θέτει ηθικά ζητήματα, αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για τις προκλινικές μελέτες, καθώς με την αξιοποίησή τους, μπορεί να γίνουν πιο ακριβείς έρευνες για την συμπτωματολογία και τον τρόπο μετάδοσης του ιού, αλλά και με την χρήση ζώων με συστήματα όμοια με τον άνθρωπο να γίνουν προβλέψεις για τις αντιδράσεις που θα έχει ο ιός στον άνθρωπο αλλά και για την αποτελεσματικότητα υποψηφίων θεραπευτικών προϊόντων. Στην πτυχιακή αυτή εργασία γίνεται ανασκόπηση των μελετών αυτών και των ευρημάτων τους, τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τις μελέτες αυτές καθώς και μεθόδους που δύνανται να βοηθήσουν στην καλύτερη προσέγγιση μελλοντικών μοντέλων για την καλύτερη αναπαράσταση του ιού σε κλινικό επίπεδο στον άνθρωπο. Στα περισσότερα μοντέλα ζώων (ποντίκια ύστερα από γενετικές τροποποιήσεις, χάμστερ, πρωτεύοντα, βιζόν, γάτες, νυχτερίδες, κουνάβια και σκύλοι σε μικρότερο επίπεδο) ήταν μετρήσιμη η αντιγραφή του ιού εντός των ζώων, όμως τα μοντέλα στα οποία παρατηρήθηκαν συμπτώματα ήταν μόνο των ποντικών, των χάμστερ, των κουναβιών και των πρωτευόντων, και κανένα από τα μοντέλα αυτά δεν αναπαριστά πλήρως την συμπτωματολογία στους ανθρώπους. Γι' αυτό το λόγο είναι σημαντικό να αναθεωρηθούν ορισμένες σημεία στα μοντέλα αυτά και να εφαρμοστούν βελτιώσεις, όπως η αλλαγή του τρόπου χορήγησης του ιού στα ζώα, η δυνατότητα αξιολόγησης πιο σοβαρών συμπτωμάτων σε αυτά, η αξιοποίηση μοντέλων που δύνανται να εφαρμοστούν χωρίς τους περιορισμούς της υψηλής επικινδυνότητας του ιού, η εφαρμογή μοντέλων που να λαμβάνουν υπόψιν τους παράγοντες κινδύνου για την σοβαρή έκφραση της νόσου και τους παράγοντες της πήξης καθώς αυτοί είναι πιθανοί επίσης πιθανοί δείκτες για τη σοβαρή COVID-19, και ο έλεγχος των παρεμβάσεων που κάνουν οι ερευνητές στα ζώα.

Λέξεις κλειδιά: SARS-CoV-2, Covid-19, παθογένεια, ζωικά μοντέλα, νέες μεθοδολογίες

ABSTRACT

At the end of the year 2019, the SARS-CoV-2 virus first appeared. It is a virus that infects humans and causes the COVID-19 disease. Due to the great need for understanding the virus, the end goal being developing therapeutic agents and vaccines, various animal models were developed to study the mechanisms, pathogeny and transmissibility of the virus. The use of animals in studies, although it raises ethical issues, is a valuable tool for preclinical studies, as by utilizing them, more accurate research can be done on the symptoms and the mode of transmission of the virus, but also by using animals with human-like systems it is possible to make predictions about the reactions that the virus will have on humans but also the efficacy of potential therapeutics. This dissertation reviews these studies and their findings, the conclusions that emerge from these studies as well as methods that may help to better approach future models for better representation of the virus at the clinical level in humans. In most animal models (genetically modified mice, hamsters, primates, mink, cats, bats, ferrets, and dogs to a lesser extent) the replication of the virus in animals was measurable, but the models in which symptoms were observed were only in mice, hamsters, ferrets and primates, and none of these models fully represent the symptoms in humans. That is why it is important to review some points in these models and to implement improvements, such as changing the way the virus is administered to animals, the possibility of assessing more severe symptoms through them, the use of models that can be applied without the limitations of its high R_0 , the implementation of models that take into account the risk factors for severe disease expression and coagulation factors as these are also possible indicators for severe COVID-19, and the control of interventions made to the animals throughout the researches.

Key words: SARS-CoV-2, Covid-19, pathogeny, animal models, new methods

Περιεχόμενα

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	iv
Ευχαριστήρια.....	v
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	vi
ABSTRACT	vii
Ιστορική αναδρομή των κοροναϊών.....	1
Δομή κοροναϊών.....	3
Γονιδίωμα.....	7
Ο κύκλος ζωής ενός κορονοϊού.....	8
Μόλυνση του κυττάρου ξενιστή	8
Μετάφραση του γονιδιώματος.....	8
Σύμπλοκο ρεπλικάσης-μεταγραφάσης	9
Συναρμολόγηση και απελευθέρωση	9
Μετάδοση του ιού.....	10
Κοροναϊοί και παθογένεια στα ζώα	10
Ιός SARS-CoV-2	13
Μοντέλα ποντικίου	19
Προσαρμογή ιού στο ACE2 του ποντικίου	19
Γενετική τροποποίηση των ποντικών για να εκφράζουν το ανθρώπινο ACE2.....	21
Συμπερασματικά	25
Μοντέλα συριακού χάμστερ	26
Μοντέλα κουναβιών	31
Μοντέλα πρωτεύοντων πλην του ανθρώπου	33
Μοντέλα βιζόν.....	37
Μοντέλα γατών	37
Μοντέλα σκύλων.....	39
Χοίροι	40
Κοτόπουλα.....	41
Νυχτερίδες.....	41
Προτεινόμενες μέθοδοι για τη βελτίωση των ζωικών μοντέλων που αφορούν την παθολογία της ασθένειας Covid-19.....	43
Τρόπος χορήγησης του ιού SARS-CoV-2 στα ζώα	43
Προσομοίωση σοβαρής συμπτωματολογίας στα ζώα.....	43
Προσεγγίσεις αντιμετώπισης των ζητημάτων που προκύπτουν από τις συνθήκες του Επιπέδου Βιοασφάλειας 3	46

Προσεγγίσεις για τους παράγοντες κινδύνου της νόσου COVID-19 σε μοντέλα ζώων	48
Αιμοπεταλιοαπόκριση, παθήσεις της πήξης και υπερφλεγμονή	49
Χρονική πορεία παρεμβάσεων σε σχέση με την εξέλιξη της νόσου	52
Ευρήματα μελετών σημαντικά για το μέλλον.....	53
Συμπεράσματα	54
Βιβλιογραφία.....	57

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1: Αστρικό στέμμα κατά τη διάρκεια της ολικής ηλιακής έκλειψης του 2015 στο Σβάλμπαρντ της Νορβηγίας. (S. Habbal, M. Druckmüller and P. Aniol).....	3
Εικόνα 1.2: Απεικόνιση κορονοϊού και της δομής του (King J. Et. Al. 2020).....	4
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης του γονιδιώματος για τους ιούς SARS-CoV και MERS-CoV (Fang Li, Lanying Du. MERS-CoV, Viruses, 2019).....	7
Εικόνα 3: Ευρήματα από μελέτη SARS-CoV-2 MA (mouse adapted) σε νεαρά ποντίκια BALB/c (Dinnon, K. H. et al, 2020)	18
Εικόνα 4: Απεικονίσεις παθολογίας και ιστοπαθολογία των πνευμόνων από ποντίκια μολυσμένα με το στέλεχος HB-01 του SARS-CoV-2 (Bao L. et. al., 2020).....	20
Εικόνα 5: Παθολογικές αλλαγές και φλεγμονή σε ποντίκια hACE2 που έχουν προσβληθεί από τον SARS-CoV-2 (Shi-Hui Sun et.al., 2020),.....	22
Εικόνα 6: Αλλαγές σωματικού βάρους και τροπισμός των ιστών της μόλυνσης από τον ιό SARS-CoV-2 στο μοντέλο του συριακού χάμστερ (Chan J. et al., 2020).....	25
Εικόνα 7: Μικρο-αξονική τομογραφία των πνευμόνων μολυσμένων συριακών χάμστερ (Masaki I. et. Al., 2020).....	26

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Μεταδοτικές ιδιότητες, κλινικά χαρακτηριστικά και δεδομένα πρόληψης κοροναϊών σε ζώα (Κτηνιατρική κτηνιατρική Ιολογία του Fenner).....	10
Πίνακας 2: Περίληψη των ευρημάτων λοίμωξης και συμπτωματολογίας από τον SARS-CoV-2. (Πίνακας από César Muñoz-Fontela, et al. 2020).....	16
Πίνακας 3: Πίνακας επιρρέπειας σκύλων, χοίρων και κοτόπουλων στον ιό SARS-CoV-2. (Πίνακας από Shi J. et al., 2020)	37

Εισαγωγή

Ιστορική αναδρομή των κοροναϊών

Ο κοινός πρόγονος των κορωνοϊών εκτιμάται ότι προέκυψε κατά το 8000 π.Χ. (ιός MRCA), αν και ορισμένα μοντέλα τοποθετούν τον κοινό πρόγονο στα 55 εκατομμύρια χρόνια ή περισσότερο. Ο πιο πρόσφατος κοινός πρόγονος του γένους *Alphacoronavirus* (αλφακοροναϊοί) έχει τοποθετηθεί στο περίπου 2400 π.Χ., του γένους *Betacoronavirus* (βήτακοροναϊοί) στο 3300 π.Χ., του γένους *Gammacoronavirus* (γάμμακοροναϊοί) στο 2800 π.Χ., και της γραμμής *Deltacoronavirus* (δέλτακοροναϊοί) στο περίπου 3000 π.Χ.¹ Οι νυχτερίδες και τα πουλιά, ως θερμόαιμα ιπτάμενα σπονδυλωτά, είναι μια ιδανική φυσική δεξαμενή για την ομάδα γονιδίων του κορωνοϊού (με νυχτερίδες τη δεξαμενή για τους αλφακοροναϊούς και τους βήτακοροναϊούς - και τα πουλιά η δεξαμενή για τους γάμμακοροναϊούς και τους δέλτακοροναϊούς). Ο μεγάλος αριθμός και η παγκόσμια γκάμα ειδών νυχτερίδων και πτηνών που φιλοξενούν ιούς έχουν επιτρέψει την εκτεταμένη εξέλιξη και διάδοση των κορωνοϊών.²

Πολλοί κοροναϊοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο έχουν την αρχική τους προέλευσή στις νυχτερίδες. Ο MERS-CoV, για παράδειγμα αν και σχετίζεται με διάφορα είδη κορωνοϊού νυχτερίδων, φαίνεται να έχει αποκλίσει από αυτά πριν από αρκετούς αιώνες. Το 1986 μελετήθηκε η γενετική απόκλιση μεταξύ των κορωνοϊών των νυχτερίδων με τον ιό SARS-CoV. Παρατηρήθηκε ότι οι “πρόγονοι” του SARS-CoV είχαν ως αρχικούς ξενιστές τις νυχτερίδες του γένους *Hipposideridae* και ενσυνεχεία έγινε εξάπλωση σε νυχτερίδες της οικογένειας *Rhinolophidae*, σε ασιατικές μοσχογαλές, και τέλος στον άνθρωπο.^{3,4,5,6}

Ο κορωνοϊός των βοοειδών του είδους *Betacoronavirus 1* και του υπογένους *Embecovirus* πιστεύεται ότι προέρχεται από τρωκτικά και όχι από νυχτερίδες.⁵ Στη δεκαετία του 1790, ο κορωνοϊός των ιπποειδών προέκυψε προέκυψε ύστερα από μετάλλαξη του κορωνοϊού των βοοειδών, μετά από ένα άλμα μεταξύ των ειδών. Στη δεκαετία του 1890, εμφανίστηκε ο ανθρώπινος κορωνοϊός OC43 από τον κορωνοϊό βοοειδών μετά από ένα συμβάν υπερπήδησης, στο οποίο ο ιός απέκτησε την ικανότητα να μολύνει επιτυχώς και τους ανθρώπους (spillover event) μεταξύ των ειδών.⁷ Εικάζεται ότι η πανδημία γρίπης του 1890 μπορεί να προκλήθηκε από αυτό το γεγονός, και όχι από τον ιό της γρίπης, λόγω του σχετικού χρόνου, των νευρολογικών συμπτωμάτων (γιατί εκτός από την πρόκληση αναπνευστικών λοιμώξεων, ο ανθρώπινος κορωνοϊός OC43 έχει παρατηρηθεί και ότι δύναται να διαδραματίσει έναν ρόλο σε νευρολογικές ασθένειες) και του άγνωστου αιτιολογικού παράγοντα της πανδημίας.⁸ Στη

δεκαετία του '50, ο ανθρώπινος κορωνοϊός OC43 άρχισε να αποκλίνει προς τους σημερινούς γονότυπους του. Φυλογενετικά, ιός ηπατίτιδας ποντικίου, ο οποίος μολύνει το ήπαρ και το κεντρικό νευρικό σύστημα του ποντικίου, σχετίζεται με τον ανθρώπινο κορωνοϊό OC43 και τον κορωνοϊό βοοειδών.⁹ Ο ανθρώπινος κορωνοϊός HKU1, όπως και οι προαναφερθέντες ιοί, έχει μελετηθεί ότι προέρχεται από κορωνοϊούς που προσβάλλουν τρωκτικά.⁵

Οι πρώτες καταγεγραμμένες αναφορές μόλυνσης από κοροναϊό εμφανίστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1920, όταν παρατηρήθηκε οξεία αναπνευστική λοίμωξη σε κοτόπουλα στη Βόρεια Αμερική, χαρακτηριζόμενη από δυσκολία αναπνοής καθώς και υψηλά ποσοστά θνησιμότητας (40-90%). Επιστήμονες κατάφεραν να απομονώσουν τον ιό αυτό, τον οποίο ονόμασαν IBV (Infectious bronchitis virus ή μολυσματικός ιός βρογχίτιδας). Στη δεκαετία του 1940, ανακαλύφθηκε ο ιός JHM, που προκαλεί εγκεφαλική νόσο σε τρωκτικά, και ο ιός MHV.^{10,11}

Οι ανθρώπινοι κοροναϊοί ανακαλύφθηκαν κατά τη δεκαετία του 1960 στο Ηνωμένο Βασίλειο και τις Ηνωμένες Πολιτείες. Το 1961, οι E.C. Kendall, Malcolm Byrnoe, and David Tyrrell, μέλη του βρετανικού ιατρικού συμβουλίου έρευνας, οι οποίοι εργάζονταν στη μονάδα κοινού κρυολογήματος, ανακάλυψαν τον ιό B814. Το 1962 στο Πανεπιστήμιο του Σικάγο απομονώθηκε ο ιός 229E. Οι δύο αυτοί ιοί προκαλούσαν κρυολόγημα και διαπιστώθηκε ότι φέρουν λιπιδικό φάκελο μέσω της δυνατότητας αδρανοποίησης των ιών με τη χρήση αιθέρα.^{12,13}

Το 1967 στο Νοσοκομείο του Αγίου Θωμά στο Λονδίνο η ιολόγος June Almeida, σε συνεργασία με τον David Tyrrell, σύγκριναν τις δομές των IBV, B814 και 229E. Οι τρεις ιοί ήταν μορφολογικά όμοιοι από το σχήμα τους και τις χαρακτηριστικές άκανθες τους.¹⁴ Μια ερευνητική ομάδα στο Εθνικό Ίδρυμα Υγείας των Ηνωμένων Πολιτειών το ίδιο απομόνωσε τον ιό OC43, ο οποίος, όπως και οι ιοί IBV, B814 και 229E ο ιός OC43, έφερε τις χαρακτηριστικές άκανθες όταν παρατηρώντας τον υπό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.¹⁵ Οι νέοι ιοί τύπου IBV σύντομα αποδείχθηκε ότι σχετίζονται επίσης μορφολογικά με τον ιό της ηπατίτιδας των ποντικών. Σε αυτή τη νέα οικογένεια ιών αποδόθηκε το όνομα *Coronaviridae*.¹⁰ Από τότε έχουν παρατηρηθεί και μελετηθεί και άλλοι ανθρώπινοι κορωνοϊοί, συμπεριλαμβανομένου του SARS-CoV, του HCoV NL63, του HCoV HKU1, του MERS-CoV και πιο πρόσφατα του SARS-CoV-2.¹⁶

Δομή κοροναϊών

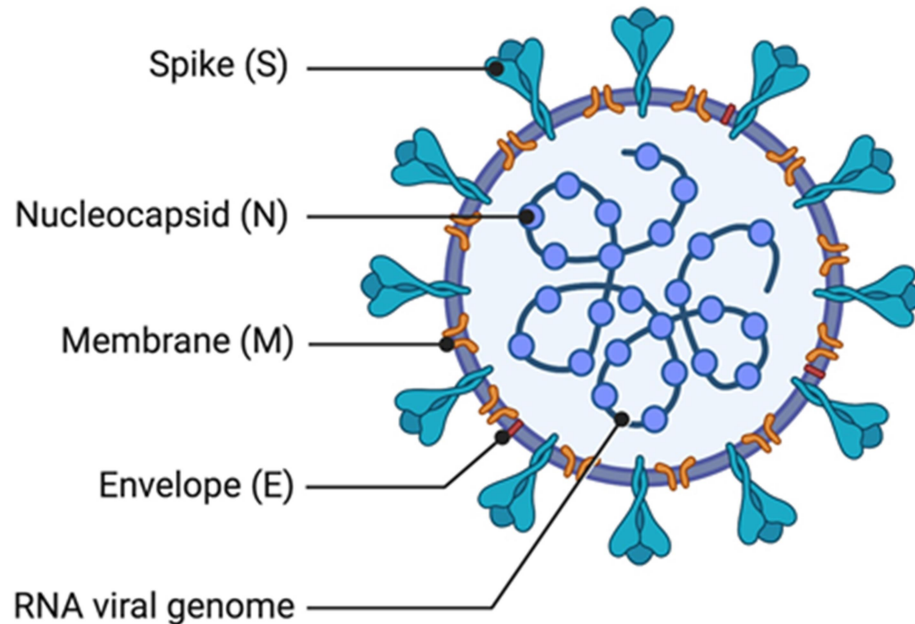
Οι κορωνοϊοί ή κοροναϊοί είναι μια ομάδα συγγενών ιών RNA. Είναι μέρος της υπο-οικογένειας *Orthocoronavirinae*, της οικογένειας *Coronaviridae*, τάξης *Nidovirales* και του phylum (συνομοταξία) *Pisuviricota*. Το μέγεθός τους κυμαίνεται μεταξύ 80 και 120 nm σε διάμετρο. Έχουν παρατηρηθεί όμως και κοροναϊοί από 50 έως 200 nm σε διάμετρο. Έχουν μοριακή μάζα γύρω στο 38.000 με 42.000 kDa. Το σχήμα τους είναι σφαιρικό και φέρουν χαρακτηριστικές ακίδες/άκανθες που προβάλλουν από την επιφάνειά τους, οι οποίες στα μικρογραφήματα ηλεκτρονικών μικροσκοπίων δημιουργούν μια εικόνα που θυμίζει αστρικό στέμμα (πλάσμα που περιβάλλει τα άστρα, παρατηρούμενο κυρίως υπό ολικής ηλιακής έκλειψης), από το οποίο προέρχεται και το όνομά τους (βλ. Εικ. 1.1).¹⁷



Εικόνα 1.1: Αστρικό στέμμα κατά τη διάρκεια της ολικής ηλιακής έκλειψης του 2015 στο Σβάλμπαρντ της Νορβηγίας. (S. Habbal, M. Druckmüller and P. Aniol). [A New Look at the Solar Corona \(aasnova.org\)](http://aasnova.org).

Οι κοροναϊοί φέρουν φάκελο ενσωματωμένο με πρωτεϊνικά μόρια και αυτά, μαζί με το νουκλεοκαψίδιο προστατεύουν τον ιό από το περιβάλλον, όταν αυτός είναι εκτός του κυττάρου ξενιστή. Ο ιογενής φάκελος αποτελείται από μία λιπιδική διπλοστιβάδα στην οποία είναι προσδεμένες οι δομικές πρωτεΐνες της μεμβράνης (πρωτεΐνη M), του φακέλου (πρωτεΐνη E) και των ακάνθων/ακίδων (πρωτεΐνη S) (βλ. Εικ. 1.2). Οι πρωτεΐνες M μαζί με τις E και τη διπλοστιβάδα λιπιδίων διαμορφώνουν τη μορφή του ιικού φακέλου. Επίσης βοηθάνε και στη

συντήρηση του μεγέθους του φακέλου. Οι πρωτεΐνες S έχουν ρόλο μεσολαβητή μεταξύ του ιού και τα κύτταρα-ξενιστές. Αξιοσημείωτο είναι ότι σε αυτό διαφέρει ο κορωνοϊός NL63, του οποίου η πρωτεΐνη M φέρει τη θέση δέσμευσης (binding site) για το κύτταρο ξενιστή, και όχι η πρωτεΐνη S.¹⁸



Εικόνα 1.2: Απεικόνιση κορωνοϊού και της δομής του. Παρατηρείται ο ιικός φάκελος, στον οποίο είναι ενσωματωμένες οι πρωτεΐνες μεμβράνης (M), άκανθας (S) και φακέλου (E). Στο εσωτερικό του ιού παρατηρείται το γονιδίωμά του, το οποίο αποτελείται από το RNA αντίγραφο της πρωτεΐνης N, σχηματίζοντας το νουκλεοκαψίδιο. King J. Et. Al. (Biophysical Society, 2020), “Coronavirus Structure, Vaccine and Therapy Development”

Η πρωτεΐνη M είναι η κύρια δομική πρωτεΐνη του φακέλου που συντελεί στην διαμόρφωση του σχήματος του ιού και είναι μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου III, δηλαδή φέρει το αμινοτελικό άκρο της στην εξωκυττάρια μεριά του φακέλου και δεν φέρει πεπτιδίο σηματοδότησης στο άκρο αυτό. Έχει γύρω στα 250 αμινοξέα και σχηματίζει μια στιβάδα πάχους ~7,6 nm στον φάκελο. Έχει τρεις τομείς, τον N-terminal (το αμινοτελικό άκρο), ο οποίος βρίσκεται στο εξωτερικό περιβάλλον

του ιού, έναν διαμεμβρανικό τομέα και τον C-terminal (το καρβοξυτελικό άκρο), ο οποίος βρίσκεται στο εσωτερικά του φακέλου. Ο τομέας C-terminal σχηματίζει ένα πλέγμα που προσθέτει επιπλέον πάχος στον φάκελο. Η πρωτεΐνη M είναι ζωτικής σημασίας σε πολλά στάδια του κύκλου ζωής του ιού, κυρίως στη συναρμολόγηση, στην εκκόλαψη, και το σχηματισμό του φακέλου. Επίσης έχει πολύ σημαντικό ρόλο και στην παθογένεση του ιού.^{19,20}

Οι πρωτεΐνες E είναι μικρές δομικές πρωτεΐνες με μεγάλη ποικιλομορφία ανάμεσα στα διάφορα είδη. Είναι από 8.5 - 12 kDa και αποτελούνται από 75 - 110 αμινοξέα. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι διαμεμβρανικές (περνάνε μέσα από τη διπλοστιβάδα λιπιδίων) και φέρουν έναν διαμεμβρανικό τομέα και έναν εξωμεμβρανικό C-τερματικό τομέα. Φέρουν σημαντικό ρόλο για τη συναρμολόγηση ιόντων, την ενδοκυτταρική διακίνηση ουσιών και τη μορφογένεση (εκκόλαψη).²¹

Οι άκανθες αποτελούν το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα των κορωνοϊών και είναι αυτές που κάνουν την επιφάνεια του ιού να μοιάζει με κορόνα/φωτοστέφανο. Κατά μέσο όρο ένα σωματίδιο κορωνοϊού φέρει περίπου 75 άκανθες. Κάθε άκανθα έχει μήκος ~20 nm και αποτελείται από ένα τριμερές πρωτεΐνης S. Η πρωτεΐνη S αποτελείται με τη σειρά της από τις υπομονάδες S-1 και S-2. Η πρωτεΐνη S μεσολαβεί στη δέσμευση του υποδοχέα, καθώς και στη μεμβρανική σύντηξη του κυττάρου-ξενιστή με τον κοροναϊό. Η S-1 σχηματίζει την κορυφή της άκανθας και φέρει την περιοχή δέσμευσης για τον υποδοχέα. Η υπομονάδα S-2 σχηματίζει τον τομέα που αγκυρώνει η άκανθα στον ιικό φάκελο και επιτρέπει την σύντηξη κατά την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών. Οι δύο υπομονάδες παραμένουν συνδεδεμένες μέχρι να συνδεθούν με τη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή. Όταν τρεις υπομονάδες S-1 συνδέονται με δύο υπομονάδες S-2, τότε είναι πλήρως εν λειτουργική ενεργεία. Το σύμπλεγμα υπομονάδων χωρίζεται σε μεμονωμένες υπομονάδες όταν ο ιός συνδέεται και συντήκεται με το κύτταρο ξενιστή μέσω της δράσης πρωτεάσεων, κυρίως της οικογένειας των καθεψινών.^{22,23,24}

Οι πρωτεΐνες της υπομονάδας S-1 είναι τα πιο μεταβλητά στοιχεία, καθώς είναι υπεύθυνα για την ειδικότητα του ιού ως προς το κύτταρο ξενιστή. Διαθέτουν δύο σημαντικές περιοχές· τον N-τερματικό άκρο (S1-NTD) και τον C-τερματικό άκρο (S-1-CTD) οι οποίες περιοχές λειτουργούν ως περιοχές δέσμευσης των υποδοχέων. Ο NTD αναγνωρίζει και δεσμεύει σάκχαρα στο κύτταρο ξενιστή. Μια εξαίρεση είναι ο ιός της ηπατίτιδας των ποντικών (MHV) του οποίου ο NTD συνδέεται με ένα μόριο προσκόλλησης κυττάρων δεσμεύει τον πρωτεϊνικό υποδοχέα CEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1). Οι CTDs της υπομονάδας S1 αναγνωρίζουν διαφορετικούς υποδοχείς πρωτεϊνών όπως το μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης 2 (ACE2), την αμινοπεπτιδάση N και τη διπτεπτιδυλο πεπτιδάση 4 (DPP4).^{23,24}

Οι κοροναϊοί του γένους *Betacoronavirus*, υπο-ομάδας A φέρουν επίσης μια μικρότερη πρωτεΐνη επιφάνειας που μοιάζει με άκανθα και ονομάζεται εστεράση αιμοσυγκολλητίνης (Hemagglutinin Esterase/HE). Αυτή η πρωτεΐνη αποτελείται από περίπου 400 αμινοξέα και κυμαίνεται από 40 μέχρι και 50 kDa. Μπορούν να παρατηρηθούν μεταξύ των ακάνθων ως μικρές επιφανειακές προεξοχές μήκους 5 έως 7 nm. Λειτουργούν κυρίως ως καταστροφείς υποδοχέων, αλλά οι HE ορισμένων κοροναϊών φέρουν και βοηθητικό ρόλο στην σύντηξη του ιού με το κύτταρο ξενιστή.^{23,25}

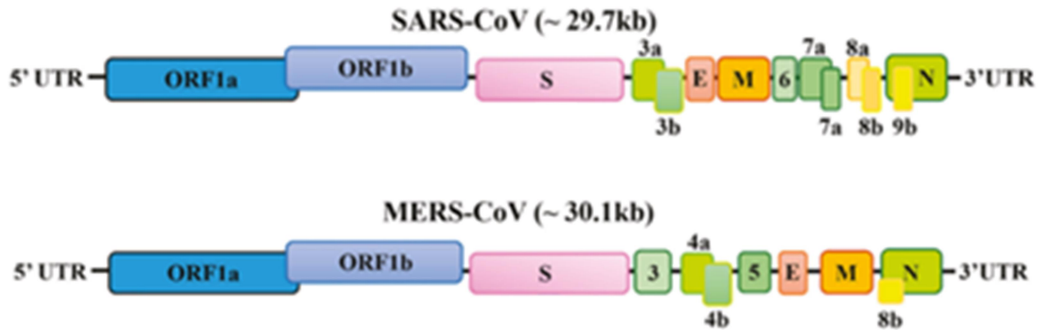
Στο εσωτερικό του φακέλου του κοροναϊού υπάρχει το νουκλεοκαψίδιο, το οποίο σχηματίζεται από πολλαπλά αντίγραφα της πρωτεΐνης νουκλεοκαψίδης (N), τα οποία συνδέονται με το μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA σε μια διαμόρφωση που ομοιάζει με χάντρες σε κλωστή (βλ. Εικ. 1.2). Η πρωτεΐνη N είναι μια φωσφοπρωτεΐνη με μέγεθος μεταξύ 43 και 50 kDa, και μπορεί να χωριστεί σε τρεις τομείς. Η πρωτεΐνη αποτελείται κυρίως από τους τομείς 1 και 2, οι οποίοι είναι συνήθως πλούσιοι σε αργινίνες και λυσίνες. Η 3^η περιοχή φέρει ένα κοντό αρνητικής πολικότητας C-τερματικό άκρο.²³

Γονιδίωμα

Οι κοροναϊοί περιέχουν ένα γονιδίωμα RNA θετικής πολικότητας, του οποίου το μέγεθος κυμαίνεται από 26,4 έως 31,7 kb. Το γονιδίωμα έχει μεθυλιωμένο cap στο 5' άκρο και poly-A ουρά στο 3' άκρο.^{26, 27}

Το γονιδίωμα ενός κορωνοϊού οργανώνεται στις περιοχές 5' UTR, την περιοχή της ρεπλικάσης ORF1ab, την περιοχή κωδικοποίησης της πρωτεΐνης S - την περιοχή κωδικοποίησης της πρωτεΐνης E, την περιοχή κωδικοποίησης της πρωτεΐνης M, την περιοχή κωδικοποίησης της πρωτεΐνης N και την 3'UTR (αμετάφραστη περιοχή) με την poly-A ουρά. Τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης 1a και 1b (δηλαδή τα ORF1a και ORF1b) κωδικοποιούν τις πολυπρωτεΐνες pp1a και pp1ab. Τα λειτουργικά γονίδια είναι μοναδικά σε διαφορετικούς κοροναϊούς όσον αφορά τον αριθμό, τη γονιδιωματική οργάνωση, την αλληλουχία και τη λειτουργία (βλ. Εικ. 2). Οι πολυπρωτεΐνες αυτές “σπάνε” για να σχηματιστούν 16 πρωτεΐνες (nsp1-nsp16), οι οποίες φέρουν σημαντικό ρόλο στην σύνθεση νέου RNA.²⁷

Μεταξύ των προαναφερόμενων πλαισίων ανάγνωσης βρίσκονται τα πλαίσια ανάγνωσης για βοηθητικές πρωτεΐνες. Ανάλογα το είδος κορωνοϊού υπάρχει διαφορά στον αριθμό των βοηθητικών πρωτεϊνών και στις λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών.²⁷



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης του γονιδιώματος για τους ιούς SARS-CoV και MERS-CoV. Απεικονίζονται τα γονίδια ORF1a και ORF1b, τα δομικά γονίδια για τις πρωτεΐνες S, E, N και N και τα λειτουργικά γονίδια (χρώμα πράσινο). Fang Li, Lanying Du. MERS-CoV, *Viruses* (εκδ. 2019)

Ο κύκλος ζωής ενός κορονοϊού

Μόλυνση του κυττάρου ξενιστή

Η μόλυνση αρχίζει όταν οι άκανθες του κοροναϊού προσκολλούνται στον συμπληρωματικό υποδοχέα των κυττάρων του ξενιστή. Μετά την προσκόλληση, πρωτεάσες του κυττάρου ξενιστή διασπούν και ενεργοποιούν την συνδεδεμένη με τον υποδοχέα πρωτεΐνη S. Έτσι, η διάσπαση και η ενεργοποίηση επιτρέπει στον ιό να εισέλθει στο κύτταρο ξενιστή με ενδοκυττάρωση ή άμεση σύντηξη του φακέλου του ιού με τη μεμβράνη του ξενιστή.²⁷

Μετάφραση του γονιδιώματος

Κατά την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή, το ιικό σωματίδιο αποχωρίζεται τον φάκελο και έτσι το γονιδίωμά του εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Χάρη στο μεθυλιωμένο 5' άκρο και τη 3' poly-A ουρά που φέρει, το γονιδίωμα του ιού δρα σαν mRNA και μεταφράζεται απευθείας από τα ριβοσώματα του κυττάρου ξενιστή. Τα ριβοσώματα του ξενιστή μεταφράζουν τα αλληλοεπικαλυπτόμενα πλαίσια ανάγνωσης ORF1a και ORF1b σε δύο μεγάλες πολυπρωτεΐνες, pp1a και pp1ab.²⁷

Η μεγαλύτερη πολυπρωτεΐνη (pp1ab) είναι αποτέλεσμα μιας ριβοσωμικής μετατόπισης -1 (-1 ribosomal frameshift) που προκαλείται από την αλληλουχία UUUAAAC, η οποία είναι γνωστή ως ολισθηρή αλληλουχία (slippery sequence), λόγω του ότι δύναται να προκαλέσει ταχύτερη ριβοσωμική μετατόπιση και έτσι μπορεί να “γλιστρήσει” το ριβόσωμα και να μετατοπιστεί το tRNA κατά μία βάση, και ένα ψευδοκόμπο RNA (μια νουκλεϊκή δευτεροταγής δομή που προκαλεί

κάποια ζεύγη βάσεων να βρίσκονται στην ίδια θέση σε μια αλληλουχία) στο τέλος του ORF1a. Η ιδιότητα της ριβοσωμικής μετατόπισης επιτρέπει να υπάρχει συνεχής μετάφραση του πλαισίου ORF1a και στη συνέχεια του ORF1b. Οι πολυπρωτεΐνες έχουν τις πρωτεάσες nsp3 (PLpro) και nsp5 (3CLpro), οι οποίες διασπούν τις πολυπρωτεΐνες. Όπως έχει προαναφερθεί, η διάσπαση της πολυπρωτεΐνης pp1ab δίνει 16 μη δομικές πρωτεΐνες (nsp1 - nsp16). Οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν την εξωριβονουκλεάση nsp14, την RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση nsp12 και την RNA ελικάση nsp13.²⁷

Σύμπλοκο ρεπλικάσης-μεταγραφάσης

Ένας αριθμός μη δομικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων nsp's, ενώνονται για να σχηματίσουν ένα πολυ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο ρεπλικάσης-μεταγραφάσης. Η πρωτεΐνη nsp12 είναι η κύρια πρωτεΐνη του συμπλόκου αυτού και συμμετέχει στην αντιγραφή και μεταγραφή του RNA. Οι άλλες μη δομικές πρωτεΐνες στο σύμπλοκο αυτό συντελούν στη διαδικασία της αντιγραφής και της μεταγραφής. Η εξωριβονουκλεάση (nsp14) παρέχει επιπλέον ακρίβεια στην αντιγραφή καθώς, σε αντίθεση με την RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, έχει τη δυνατότητα διόρθωσης λαθών. Το σύμπλοκο ρεπλικάσης-μεταγραφάσης πραγματοποιεί την αντιγραφή του γονιδιώματος του κορονοϊού. Μέσω της nsp12 επιτυγχάνεται η παραγωγή αρνητικών μορίων RNA. Μετά από αυτή τη διαδικασία έπεται η αντιγραφή, κατά την οποία μέσω του συντιθέμενου αρνητικής πολικότητας RNA συντίθεται RNA θετικής πολικότητας. Επίσης το σύμπλοκο ρεπλικάσης-μεταγραφάσης πραγματοποιεί και τη μεταγραφή του γονιδιώματος του κορονοϊού. Η πρωτεΐνη nsp12 συμμετέχει στη σύνθεση RNA αρνητικού φορτίου. Έπειτα ακολουθεί η μεταγραφή αυτών των μορίων RNA σε mRNA θετικού φορτίου. Το σύμπλοκο ρεπλικάσης-μεταγραφάσης δύναται να κάνει γενετικό ανασυνδυασμό, μέσω εναλλαγής μητρικών αλληλουχιών κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του γονιδιώματος, όταν υπάρχουν τουλάχιστον δύο ιικά γονιδιώματα στο ίδιο μολυσμένο κύτταρο.²⁷

Συναρμολόγηση και απελευθέρωση

Το αναπαραγόμενο γονιδιωματικό θετικού φορτίου RNA αποτελεί το γονιδίωμα των απογόνων ιών. Τα mRNAs είναι τα προϊόντα της μεταγραφής των γονιδίων του τελευταίου τρίτου του γονιδιώματος του κορονοϊού μετά τις περιοχές ORF. Αυτά τα mRNAs μεταφράζονται από τα ριβοσώματα του ξενιστή σε δομικές πρωτεΐνες και σε πολλές βοηθητικές πρωτεΐνες. Η μετάφραση του RNA λαμβάνει χώρα μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Οι ιογενείς δομικές πρωτεΐνες M, E και S κινούνται κατά μήκος της εκκριτικής οδού στο ενδιάμεσο χώρο μεταξύ του συμπλέγματος Golgi και του ενδοπλασματικού δικτύου. Εκεί γίνεται η συναρμολόγηση νέων ιών. Οι απόγονοι κοροναϊοί στη συνέχεια απελευθερώνονται από το κύτταρο-ξενιστή με μέσω κυστιδίων με την διαδικασία

της εξωκυττάρωσης. Με την απελευθέρωσή τους δύνανται οι κορονοϊοί να μολύνουν και άλλα κύτταρα.²⁷

Μετάδοση του ιού

Η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης S του κορωνοϊού με τον συμπληρωματικό υποδοχέα κυττάρων του ξενιστή είναι κεντρικής σημασίας για τον προσδιορισμό του τροπισμού όσον αφορά τους ιστούς, τη μολυσματικότητα και το εύρος των ειδών που μπορεί να μολύνει ο απελευθερωμένος ιός. Οι κορονοϊοί έχουν ως κύριο στόχο τα επιθηλιακά κύτταρα. Μεταδίδονται από τον ένα ξενιστή στον άλλο με αερογενή μετάδοση, μέσω μολυσμένων επιφανειών ή μέσω της κοπρανοστοματικής οδού, ανάλογα με το είδος του κορωνοϊού. Οι ζωικοί κοροναϊοί μολύνουν τα επιθηλιακά κύτταρα της πεπτικής οδού κατά κύριο λόγο, σε αντίθεση με τους ανθρώπινους, οι οποίοι μολύνουν κυρίως τα επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού. Ο κορονοϊός SARS, για παράδειγμα, προσβάλλει τα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων με αερομεταφερόμενη μετάδοση και συνδέεται με τον υποδοχέα του ACE2, ενώ ο κοροναϊός της μεταδοτικής γαστρεντερίτιδας (Transmissible gastroenteritis coronavirus) μολύνει τα επιθηλιακά κύτταρα του πεπτικού συστήματος των χοίρων μέσω της κοπρανοστοματικής οδού, και η σύνδεση στα κύτταρα γίνεται μέσω του υποδοχέα αλανίνης-αμινοπεπτιδάσης (APN).^{27, 28}

Κοροναϊοί και παθογένεια στα ζώα

Οι μελέτες για τις παθολογικές καταστάσεις που δύνανται να προκαλέσουν στα ζώα ξεκίνησαν από τη δεκαετία του 1930. Η πλειοψηφία των κοροναϊών που μπορούν να μολύνουν ζώα μεταδίδονται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού και μολύνουν αρχικά τον εντερικό σωλήνα, αλλά ορισμένοι από αυτούς μεταδίδονται μέσω άμεσης επαφής, αιματογενώς, με αερολύματα ή και με σωματικά υγρά. Τα συμπτώματα ποικίλουν αλλά παρατηρείται ότι κατά κύριο λόγο οι κοροναϊοί επηρεάζουν το γαστρεντερικό και το αναπνευστικό σύστημα των ζώων. (βλ. Πίνακα 1).^{29, 30}

Πίνακας 1: Μεταδοτικές ιδιότητες, κλινικά χαρακτηριστικά και δεδομένα πρόληψης κοροναϊών σε ζώα. Κτηνιατρική κτηνιατρική Ιολογία του Fenner, Κεφάλαιο 24.

Ιός	Νόσος/Συμπτώματα	Μετάδοση	Πρόληψη/Έλεγχος
Υποοικογένεια <i>Coronavirinae</i>			
Γένος <i>Alphacoronavirus</i>			
Κορωνοϊός αιλουροειδών (εντερικός κορωνοϊός αιλουροειδών και Μολυσματικός ιός λοιμώδους περιτονίτιδας αιλουροειδών)	<u>Εντερικός κορωνοϊός αιλουροειδών</u> : ήπια γαστρεντερίτιδα και διάρροια <u>Μολυσματικός ιός περιτονίτιδας αιλουροειδών</u> : περιτονίτιδα, πνευμονία, σημάδια ΚΝΣ κ.λπ.	<u>Εντερικός κορωνοϊός αιλουροειδών</u> : άμεση επαφή. Κοπρανοστοματική οδός μέσω μητρικής ρίψης τριχών <u>Μολυσματικός ιός περιτονίτιδας αιλουροειδών</u> : αίμα, σωματικά υγρά	Διακοπή του κύκλου μετάδοσης, καραντίνα, υγιεινή υψηλού επιπέδου
Κορωνοϊός σκύλων	Ήπια γαστρεντερίτιδα και διάρροια, πιθανή σοβαρή εντερίτιδα και συστηματικά σημεία (λευκοπενία)	Κοπρανοστοματική οδός	Αδρανοποιημένο εμβόλιο
Μεταδοτικός ιός γαστρεντερίτιδας των χοίρων(TGE)	Γαστρεντερίτιδα. Υδατοστεγική διάρροια, έμετος, αφυδάτωση	Κοπρανοστοματική οδός	Από του στόματος εξασθενημένο εμβόλιο σε έγκυες χοιροτρυτίδες. Καλή υγιεινή
Αναπνευστικός κορωνοϊός χοίρων	Ήπια αναπνευστική νόσος ή υποκλινική	Αερολύματα, ρινικά επιχρίσματα. τραχεία, πνευμονικά τμήματα	Δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο
Επιδημικός Ιός διάρροιας των χοίρων (PEDv)	Γαστρεντερίτιδα. Υδατοστεγική διάρροια, έμετος, αφυδάτωση	κοπρανοστοματική οδός	Αδρανοποιημένο και από του στόματος ζωντανό-εξασθενημένο εμβόλιο ιών στις έγκυες χοιρορρηκτές. Καλή υγιεινή
Γένος <i>Betacoronavirus</i>			
Ομάδα A			

Ο ιός αιμοσυγκολλητικής εγκεφαλομελίτιδας των χοίρων	Έμετος, εγκεφαλομελίτιδα. Ανορεξία, υπεραίσθησία, μυϊκές δονήσεις, εξασθένηση	Αερολύματα, οροαναλυτικές εκκρίσεις	Καλή κτηνοτροφία, διατήρηση ανοσοποιητικών χοιροειδών, δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο
Ιός ηπατίτιδας ποντικού (MHV)	Εντενίτιδα, ηπατίτιδα, απομυελινωτική εγκεφαλομελίτιδα	Εισαγωγή του ιού σε μια άγρια αποικία:	Αποπληθυσμός, προληπτική καραντίν, δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο
Ιός σιαλοδακρυοαδενίτιδας αρουραίων	Ρινίτιδα, δακρύρροια, πνευμονία	αερολύματα και άμεση επαφή, αερολύματα	
Κορωνοϊός βοοειδών	Γαστρεντερίτιδα με άφθονη ή αιματηρή διάρροια, αφυδάτωση, μειωμένη παραγωγή γάλακτος, δυσκολία στην αναπνοή	Κοπρανοστοματική οδός, αερολύματα, αναπνευστικά σταγονίδια	Ανοσοποίηση της μητέρας: αδρανοποιημένα ή εξασθενημένα εμβόλια.
Κορωνοϊός ιπποειδών	Γαστρεντερίτιδα	Κοπρανοστοματική οδός	
Αναπνευστικός κορωνοϊός σκύλων	Αναπνευστική ασθένεια	Αερολύματα	
Ομάδα Β			
Κορωνοϊός Σοβαρού οξέου αναπνευστικού συνδρόμου (SARS)	Αναπνευστική νόσος. ζωνοσογόνος με νυχτερίδες ως φυσική δεξαμενή	Αερολύματα, οροαναλυτικές εκκρίσεις	Δεν υπάρχουν διαθέσιμα εμβόλια. ενισχυμένη βιοασφάλεια για ανθρώπινες περιπτώσεις
Ομάδα Γ			
Κορωνοϊός αναπνευστικού συνδρόμου της Μέσης Ανατολής (MERS)	Αναπνευστική νόσος. ζωνοσογόνος με καμήλες και νυχτερίδες ως δεξαμενή	Αερολύματα, εκκρίσεις δια του στόματος ή της μύτης	Δεν υπάρχουν διαθέσιμα εμβόλια. ενισχυμένη βιοασφάλεια για ανθρώπινες περιπτώσεις
Γένος <i>Gammacoronavirus</i>			

Ιός λοιμώδους βρογχίτιδας των πτηνών (ή αλλιώς Μολυσματικός ιός βρογχίτιδας ή IBV)	Τραχειοβρογχίτιδα, νεφρίτιδα, ρόγχοι, μειωμένη παραγωγή αυγών	Αερολύματα και κατάποση τροφίμων μολυσμένων με κόπτρανα	Διατίθενται πολυδύναμα εξασθενημένα και αδρανοποιημένα εμβόλια. Καλά αποχετευτικά συστήματα
Κορωνοϊός γαλοπούλας, ιός Bluecomb	Εντερίτιδα, διάρροια, κυανωτικό δέρμα	Κοπρανοστοματική όδος, αερολύματα	Αδρανοποιημένο εμβόλιο κατά του ιού
Γένος <i>Deltacoronavirus</i>			
Δελτακοροναϊός των Χοίρων	Γαστρεντερίτιδα σε χοιρομητέρες και θηλάζουσες χοίρους. χαμηλή θνησιμότητα σε θηλάζουσες χοίρους. κλινικά δυσδιάκριτο από τους TGE και PEDv	Κοπρανοστοματική όδος	Δεν υπάρχει εμβόλιο.
<u>Υποοικογένεια <i>Torovirinae</i></u>			
Γένος <i>Torovirus</i>			
Ιός Breda (βοοειδή)	Εντερίτιδα, διάρροια, αφυδάτωση	Κοπρανοστοματική όδος	Δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο
Γένος <i>Bafinivirus</i>			
Ιός λευκής τσιπούρας	Δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα	Θεωρείται οριζόντια μέσω του νερού	Δεν προτείνεται μέθοδος ελέγχου
Χοντροκέφαλος μιννού	Αιμορραγίες στα μάτια και το δέρμα	Θεωρείται οριζόντια	Κανένα στοιχείο διαθέσιμο
Νεκρωτικός νιδοϊός (necrotic nidovirus)	Αλλοιώσεις σε νεφρά, ήπαρ, σπλήνα		

Ιός SARS-CoV-2

Ο κορωνοϊός του σοβαρού οξέου αναπνευστικού συνδρόμου 2 ή ιός SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) είναι ένας κοροναϊός που προκαλεί την ασθένεια COVID-19, η οποία πρωτοεμφανίστηκε το 2019 στην περιοχή Γούχαν (Wuhan) της Κίνας. Όπως όλοι οι κοροναϊοί έχει γονιδίωμα μονόκλωνου RNA θετικής πολικότητας, μήκους 29,9kb. Φέρει 4 δομικές

πρωτεΐνες (M, N, E και S) και 16 μη δομικές πρωτεΐνες (nsp1-nsp16). Όσον αφορά τον τρόπο μετάδοσης, ο SARS-CoV-2 εξαπλώνεται μέσω στενής επαφής και μέσω σταγονιδίων από το φτέρνισμα ή τον βήχα, ενώ η έμμεση επαφή με μολυσμένες επιφάνειες είναι άλλη μία αιτία μόλυνσης. Ο ιός εισέρχεται στα ανθρώπινα κύτταρα μέσω του ενζύμου ACE2, στο οποίο προσκολλάται η πρωτεΐνη-ακίδα του ιού, και στη συνέχεια, μέσω του διαμεμβρανικού ενζύμου/πρωτεάσης TMPRSS2, ενεργοποιείται η σύντιξη του ιού με τη κυτταρική μεμβράνη, μέσω της υπομονάδας S2 της πρωτεϊνικής άκανθας.^{31, 32}

Ο ιός εμφανίζει γενετική ομοιότητα με άλλους κοροναϊούς (~80% με τον ιό SARS-CoV, κοινώς SARS). Θεωρείται ότι η προήλθε από κορονοϊό ο οποίος μπορούσε να μολύνει νυχτερίδες, ύστερα από μετάλλαξη του για να δύναται να μολύνει και ανθρώπους (σε έρευνες ο ιός RaTG13 του είδους *Rhinolophus affinis* έχει ~95% γενετική ομοιότητα με τον ιό SARS-CoV-2). Έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες για να διακριβωθεί αν υπήρχε ενδιάμεσος ξενιστής, με κύριο 'ύποπτο' το παγκολίνο, όμως δεν έχουν υπάρξει ακόμα σαφή συμπεράσματα, ενώ αποκλείεται να είναι φυσική δεξαμενή για τον ιό, σε αντίθεση με τις νυχτερίδες. Τα τον τελευταίο χρόνο έχει εμφανίσει γενετική ποικιλομορφία, με πιο σημαντικές τις μεταλλάξεις δέλτα και όμικρον, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορές ως προς το αρχικό στέλεχος όσον αφορά τη μεταδοτικότητα αλλά και τη νοσηρότητα του ιού.^{33, 34}

Παρόλο που υπάρχουν διαφωνίες στην εκτιμώμενη αναλογία μολύνσεων προς θνησιμότητα της νόσου COVID-19 στους ανθρώπους, είναι ευρέως αποδεκτό πως η σοβαρότητα της συμπτωματολογίας είναι συσχετισμένη με την ηλικία του υποκειμένου και ότι το ποσοστό μολύνσεων προς θνησιμότητας σε ασθενείς άνω των 65 ετών είναι υψηλότερος από 1%, γεγονός ανησυχητικό λόγω της υψηλής μεταδοτικότητας του ιού³⁵. Η νόσος μπορεί να προκαλέσει ένα πολλά ήπια συμπτώματα, με χαρακτηριστικά τη δύσπνοια και το βήχα, εξ' αιτίας της δυνατότητας του ιού να αναπαράγεται στην ανώτερη αναπνευστική οδό. Αν και τα περισσότερα άτομα στη συνέχεια δεν εμφανίζουν επιμέρους συμπτωματολογία, η ασθένεια μπορεί επίσης να εξελιχθεί σε σοβαρή πνευμονία. Σε σοβαρές περιπτώσεις, η αμφίπλευρη παρουσίαση των πνευμόνων με σκίαση

δίκην θολού υάλου (ground-glass opacities - ggo) είναι το πιο συνηθισμένο εύρημα σε σάρωση τομογραφίας του θώρακα. Κατά την εξέλιξη της νόσου μπορεί εν συνεχεία να εμφανιστούν συμπτώματα όπως το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας, γνωστό και ως ARDS (acute respiratory distress syndrome) και, σε ορισμένες περιπτώσεις, να προκαλέσει φλεγμονώδες σύνδρομο όμοιο με σηπτικό σοκ. Κατά την ιστολογική εξέταση των πνευμόνων των ασθενών παρατηρείται αμφίπλευρη διάχυτη κυψελιδική βλάβη και πνευμονικό οίδημα. Η νόσος COVID-19 χαρακτηρίζεται επίσης από επιπλοκές σε άλλα συστήματα του οργανισμού, και συχνά προκαλεί διαταραχές στην πήξη του αίματος, με χαρακτηριστικά ευρήματα τα αυξημένα επίπεδα Δ-διμερών και ινωδογόνου, στοιχεία που υποδηλώνουν ινωδόλυση και παραγωγή θρόμβου. Τα άτομα που εμφανίζουν υψηλότερο κίνδυνο για να αποκτήσουν πιο σοβαρά συμπτώματα κατά τη νόσηση περιλαμβάνουν άτομα με υποκείμενες καταστάσεις, όπως διαβήτη, καρδιαγγειακές παθήσεις, υπέρταση, παχυσαρκία και χρόνια αναπνευστική νόσο.^{35, 36}

Μέχρι και τον Δεκέμβρη του 2021, ο ιός έχει εξαπλωθεί σε 222 χώρες και περιοχές, και έχει μολύνει πάνω από 288 εκατομμύρια άτομα, με τους θανάτους να ανέρχονται στα 5,45 εκατομμύρια.³⁷ Καθώς αρκετοί άνθρωποι δεν έχουν προϋπάρχουσα ανοσία έναντι του SARS-CoV-2, υπάρχει επείγουσα ανάγκη κατανόησης της παθογένειας και της μεταδοτικότητας του ιού, καθώς και ανάπτυξης θεραπευτικών παραγόντων και εμβολίων για το μετριασμό της τρέχουσας πανδημίας και για την πρόληψη της επανεμφάνισης του COVID-19. Τον Φεβρουάριο του 2020, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (γνωστός και ως Π.Ο.Υ.) διοργάνωσε μια παγκόσμια εκστρατεία για τις δοκιμές θεραπευτικών παραγόντων και εμβολίων. Για το σκοπό αυτό, η Ομάδα Σχεδίου Έρευνας & Ανάπτυξης του Π.Ο.Υ. δημιούργησε μια ειδική ομάδα που επικεντρώθηκε στην μοντελοποίηση COVID-19 (COM), γνωστή ως WHO-COM.³⁹

Σημαντικό ρόλο είχε η χρήση ζωικών μοντέλων. Τα ζωικά μοντέλα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη φαρμάκων και θεραπευτικών παραγόντων και την απόδειξη της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας τους, καθώς και για την

παροχή βασικών πληροφοριών σχετικά με την οδό χορήγησης, τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική και για τον εντοπισμό βασικών μηχανισμών που προκαλούν την in vivo παθολογία. Ωστόσο, κάθε μοντέλο έχει τα μειονεκτήματά του. Κανένα ζωικό μοντέλο μόλυνσης με SARS-CoV-2 δεν αναπαράγει πλήρως τη συμπτωματολογία της σοβαρής έκφρασης της ασθένειας COVID-19 στον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτό το έλλειμμα στην προκλινική μοντελοποίηση είναι σημαντικό καθώς υπάρχει ιδιαίτερα επείγουσα ανάγκη να εντοπιστούν πιθανές θεραπείες για ασθενείς που έχουν ήδη διαπιστώσει λοίμωξη SARS-CoV-2 και οι οποίοι κινδυνεύουν να προχωρήσουν σε σοβαρή νόσο COVID-19 που απαιτούν νοσηλεία και την ανάγκη αναπνευστικής υποστήριξης σε μονάδα υψηλής εξάρτησης ή εντατικής θεραπείας.³⁸

Ο ιός SARS-CoV-2 έχει ζωονοσογόνο προέλευση αλλά αρκετοί σημαντικοί παράγοντες φέρουν εμπόδια στη μελέτη αυτού του ιού σε μοντέλα ζώων. Αυτές περιλαμβάνουν την έλλειψη μολυσματικότητας των κλινικών απομονωθέντων του SARS-CoV-2 σε ορισμένα είδη, συμπεριλαμβανομένων των ποντικών, τα οποία αποτελούν σημαντικό υποκείμενο μελέτης στα εργαστήρια, αλλά και απουσία επίμονης λοίμωξης, ανοσοπαθολογίας, A.R.D.S. και επιπλοκές των υπόλοιπων συστημάτων του οργανισμού, φαινόμενα που χαρακτηρίζουν κλινικά τη νόσο COVID-19. Επιπλέον, ο SARS-CoV-2 προκαλεί κατά κύριο λόγο σοβαρή νόσο COVID-19 σε ηλικιωμένους με συννοσηρότητες, παρουσιάζοντας πρόβλημα εγκυρότητας κατασκευής με απόπειρα χρήσης νεαρών και ανοσολογικά άγριων εργαστηριακών ζώων σε δοκιμές COVID-19.³⁸

Παρά τις ανάγκες για θεραπείες λόγω της πανδημίας που έχει προκληθεί από τον ιό, ο σχεδιασμός αλλά και η εφαρμογή προκλινικών μελετών για την COVID-19 θα πρέπει να διατηρούν την ποιότητα για την παραγωγή ουσιαστικών αποτελεσμάτων, την αποφυγή περιττών επικαλυπτόμενων μελετών και την αποφυγή αδικαιολόγητης κακομεταχείρισης των ζώων.³⁸

Στην διπλωματική αυτή εργασία, παρουσιάζονται τα ευρήματα της τρέχουσας βιβλιογραφίας για την ασθένεια COVID-19 που περιλαμβάνει μελέτες που

δημιουργήθηκαν εν καιρώ της πανδημίας, οι οποίες αφορούν τη παθογένεια και μεταδοτικότητα του ιού και που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ζωικών μοντέλων και σκοπεύουν τη διευκόλυνση περαιτέρω προκλινικής ανάλυσης εμβολίων και θεραπευτικών παραγόντων. Στον επερχόμενο πίνακα (βλ. Πίνακα 2) παρουσιάζεται μια σύνοψη των ευρημάτων των μελετών αυτών για τα ζώα. Σημαντικό είναι να σημειωθεί πως όλα αυτά τα ευρήματα παρουσιάζονται και στους ανθρώπους.^{38, 39}

Πίνακας 2: Περίληψη των ευρημάτων λοίμωξης και συμπτωματολογίας από τον SARS-CoV-2. Όλα τα γεγραμμένα υφίστανται και στους ανθρώπους. César Muñoz-Fontela, et al. (Nature, 2020). “Animal models for COVID-19”

Χαρακτηριστικό	Οργανισμός
Αντιγραφή του ιού	
Ανώτερη αναπνευστική οδός	Ποντίκια, κουνάβια, πρωτεύοντα, βιζόν, γάτες και νυχτερίδες
Κατώτερη αναπνευστική οδός	Ποντίκια, χάμστερ, κουνάβια και πρωτεύοντα
Άλλα όργανα	hACE2 ποντίκια (ΚΝΣ), χάμστερ, κουνάβια και πρωτεύοντα (γαστρεντερική οδός)
Ήπια κλινικά σημεία	
Πυρετός	Κουνάβια
Ρινική εκκένωση	Κουνάβια
Δύσπνοια	Χάμστερ
Πνευμονία	
Αμφόπλευρη εμπλοκή πνευμόνων	Χάμστερ, γάτες και πρωτεύοντα
σκιάσεις δίκην θολού ύαλου (ground-glass opacities - ggo)	Χάμστερ και πρωτεύοντα
Τοπικό οίδημα και φλεγμονή	Χάμστερ, κουνάβια, γάτες και πρωτεύοντα
Μετάδοση	Χάμστερ, κουνάβια, γάτες, σκύλοι (σε μικρότερο επίπεδο) και νυχτερίδες
Ανοσολογία	
Ορομετατροπή (Seroconversion)	Ποντίκια, χάμστερ, κουνάβια, πρωτεύοντα και νυχτερίδες

Εξουδετερωτικοί τίτλοι αντισμάτων	Ποντίκια, χάμστερ, κουνάβια και πρωτεύοντα
Ανοσία Τ κυττάρων	Ποντίκια, κουνάβια και πρωτεύοντα
Προφλεγμονώδεις κυτοκίνες	Ποντίκια και πρωτεύοντα
Δημογραφικά ευρήματα	
Πιο σοβαρή ασθένεια στα αρσενικά	Χάμστερ

Κύριο Μέρος

Ζωικά μοντέλα για το COVID-19

Μοντέλα ποντικίου

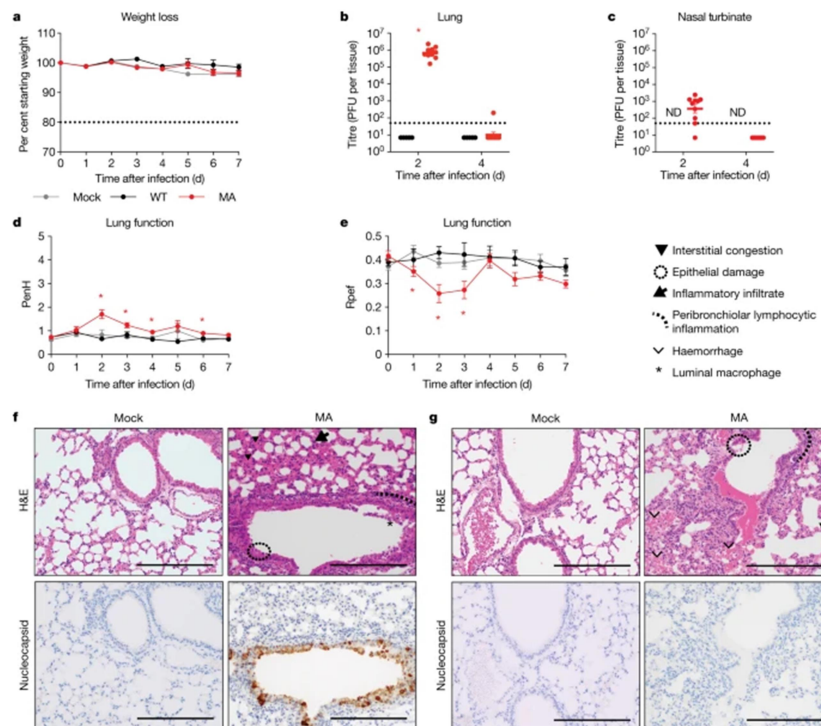
Τα ποντίκια (*Mus musculus*) χρησιμοποιούνται ευρέως σε μελέτες ανοσολογίας και πνευμονικών βλαβών και έχουν ένα εκτενώς μελετημένο ανοσοποιητικό σύστημα, όμοιο με του ανθρώπου και γρήγορο κύκλο αναπαραγωγής. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το μέγεθος και η ταχεία αναπαραγωγή και ανάπτυξη ποντικών είναι χρήσιμα για την επιτάχυνση της ολοκλήρωσης μελετών με αριθμό υποκειμένων αρκετά υψηλό για τον ορθό στατιστικό έλεγχο της ακρίβειας των μεθόδων και της αποτελεσματικότητας πιθανών παρεμβάσεων.⁴⁰

Το κύριο εμπόδιο στη μόλυνση των κυττάρων ποντικού με SARS-CoV-2 είναι το γεγονός ότι δεν έχουν τους κατάλληλους υποδοχείς για την έναρξη ιογενούς λοίμωξης. Ο ιός SARS-CoV-2, όπως και ο SARS-CoV, χρησιμοποιεί το ACE2 για δέσμευση και είσοδο στα κύτταρα, και το ACE2 του ποντικίου δε δεσμεύει αποτελεσματικά την ιική πρωτεϊνική άκανθα. Γι' αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την επίλυση αυτού του προβλήματος.

Προσαρμογή ιού στο ACE2 του ποντικίου

Η πρωτεϊνική άκανθα του SARS-CoV-2 μπορεί να τροποποιηθεί για να μπορέσει αν συνδεθεί επιτυχώς με το ACE2 του ποντικού. Μία στρατηγική για την επίτευξη αυτής της τροποποίησης είναι η διαδοχική μετάδοση του SARS-CoV-2 στον ιστό του πνεύμονα του ποντικού. Αυτή η μέθοδος έχει φέρει επιτυχή αποτελέσματα, επειδή οι πληθυσμοί των RNA ιών αποτελούνται από στενά συγγενικά ιικά ψευδοείδη (quasispecies). Ιοί στο πλήθος που περιέχουν μεταλλάξεις στην πρωτεϊνική άκανθα που αυξάνουν τη συγγένεια δέσμευσής τους με το ACE2 του ποντικού αναμένεται να αναπτυχθούν, λόγω των υψηλότερων επιπέδων αντιγραφής τους στους πνεύμονες του ποντικού, και έτσι είναι εφικτή, και με απλό τρόπο, η μελέτη του ιού στους ποντικούς. Εναλλακτικά, ο SARS-CoV-2 μπορεί, χρησιμοποιώντας μεθόδους γενετικής τροποποίησης, να προσαρμοστεί

για να μολύνει κύτταρα ποντικού. Για να επιτευχθεί αυτό γίνεται τροποποίηση της περιοχής δέσμευσης του υποδοχέα του ιού. Με αυτό το τρόπο θα είναι δυνατή η σύνδεση με την πρωτεΐνη ACE2 του ποντικού και ως αποτέλεσμα να προκύψει επιτυχής μόλυνση. Μελέτες με τη χρήση ποντικών BALB/c (ανοσοανεπαρκή αλμπίνο ποντίκια τα οποία εκτρέφονται σε εργαστήρια) και προσαρμοσμένου ιού SARS-CoV-2 (MACSp6P) προέκυψε σε μόλυνση των ποντικών (βλ. Εικ. 3). Χρησιμοποιώντας τις προσεγγίσεις αυτές, τα ποντίκια έχουν ευαισθητοποιηθεί προς λοίμωξη, και έχουν αναπτύξει συμπτώματα ήπιας έως και μέτριας σοβαρότητας^{39, 41}. Εικάζεται ότι μέσω τέτοιων μοντέλων θα αναπτυχθούν μεταλλάξεις του SARS-CoV-2 που μπορεί να προκαλέσουν στα ποντίκια πιο σοβαρά συμπτώματα, όπως αυτά του ανθρώπου, και έτσι να είναι εφικτή η καλύτερη μελέτη της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού σε τέτοιες καταστάσεις, αλλά και μελέτες για ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων και εμβολίων.³⁹

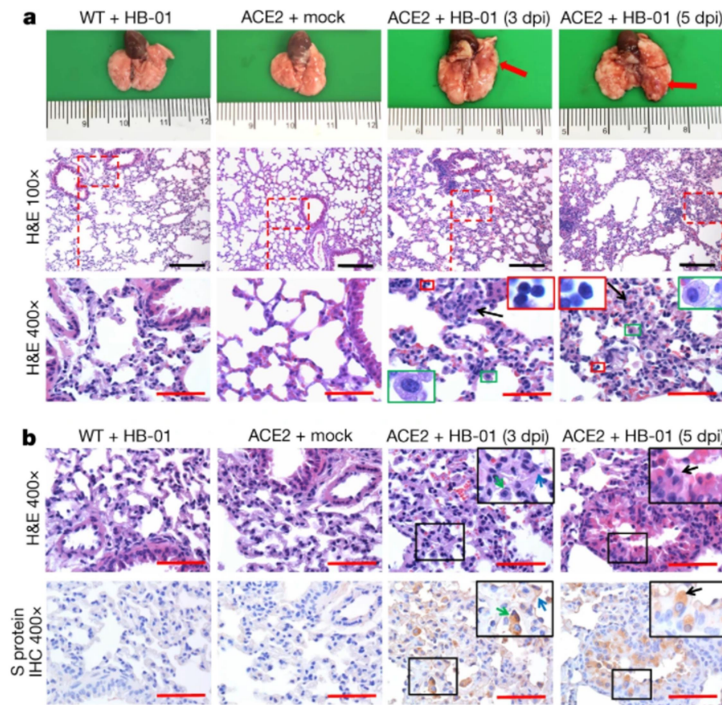


Εικόνα 3: Ευρήματα από μελέτη SARS-CoV-2 MA (mouse adapted) σε νεαρά ποντίκια BALB/c. Θηλυκά ποντίκια BALB/c ηλικίας δώδεκα εβδομάδων

μολύνθηκαν ή με 10^5 PFU (plaque forming unit) άγριου τύπου SARS-CoV-2 (μαύρο) ή με SARS-CoV-2 M.A. (mouse adapted, κόκκινο) ή ήταν mock-infected, δηλαδή χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα ελέγχου, χωρίς να έχουν μολυνθεί από τον ιό (γκρί) (a-e). Παρατηρήθηκε απώλεια βάρους (a), εμφανές ιικό φορτίο στους πνεύμονες και στη ρινική οδό (b, c), καθώς και επηρεασμένη λειτουργία των πνευμόνων, έχοντας ως δείκτες το Penh (enhanced pause, χρησιμοποιείται για αξιολογήση αλλαγών στα μοτίβα αναπνοής του ζώου) και το R_{pref} (ποσοστό της μέγιστης ροής εκπνοής προς το συνολικό χρόνο εκπνοής) (d, e). Η ιστολογική ανάλυση των ποντικών που έχουν προσβληθεί από SARS-CoV-2 M.A. αποκάλυψε συμφόρηση, επιθηλιακή βλάβη, φλεγμονώδη διήθηση και περιβρογχιολητική λεμφοκυτταρική φλεγμονή που περιβάλλει τους αεραγωγούς στη 2η dpi (day post infection, μέρα μετά τη μόλυνση), (f). Στη 4η dpi, η ιστολογική ανάλυση έδειξε αυξημένη φλεγμονή και αιμορραγία στον πνεύμονα (g). Dinno, K. H. et al (Nature, 2020), “A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures”.

Γενετική τροποποίηση των ποντικών για να εκφράζουν το ανθρώπινο ACE2

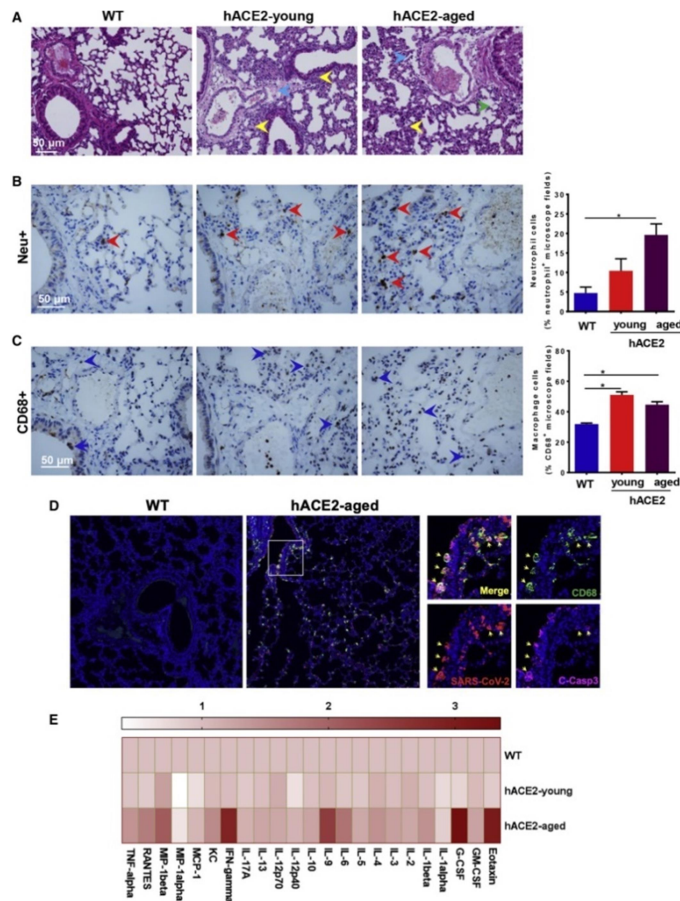
Μια άλλη προσέγγιση για τη μόλυνση ποντικών τον SARS-CoV-2 βασίζεται στην τροποποίηση των ποντικών ώστε να εκφράζουν το ανθρώπινο ACE2 (hACE2). Υπάρχουν επί του παρόντος διάφορα διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών, στα οποία το ανθρώπινο ACE2 βρίσκεται υπό την έκφραση ενός υποκινητή ειδικού για ένα συγκεκριμένο ιστό (ο υποκινητής Krt18 για επιθηλιακά κύτταρα: K18-hACE2 ή ο υποκινητής HFH4/FOXJ1-hACE2 για επιθηλιακά κύτταρα), ενός καθολικού υποκινητή (υποκινητής CAG, ο οποίος αποτελείται από τον ενισχυτή CMV-IE σε συνδυασμό με τον β-υποκινητή της ακτίνης του κοτόπουλου) ή του ενδογενή ACE2 υποκινητή του ποντικού (βλ. Εικ. 4). Σε αυτά τα μοντέλα, τα ποντίκια παρουσίασαν λοίμωξη από τον SARS-CoV-2, αλλά λόγω των διαφορών που παρουσιάζονται στην έκφραση του ανθρώπινου ACE2 στα διάφορα μοντέλα έχουν ως αποτέλεσμα την ποικίλης συμπτωματολογίας.^{42,43, 44}



Εικόνα 4: Απεικονίσεις παθολογίας και ιστοπαθολογία των πνευμόνων από ποντίκια άγριου τύπου μολυσμένα με το στέλεχος HB-01 του SARS-CoV-2 (3η dpi), ποντίκια hACE2 που δεν έχουν μολυνθεί από τον ιό (3η dpi) και ποντίκια hACE2 μολυσμένα με HB-01 (3η και 5η dpi). Οι εξετάσεις που πραγματοποιήθηκαν μεταθανάτια έδειξαν εστιαστικές σκούρες-κόκκινες βλάβες (κόκκινο βέλος) σε όλη τη ρινική περιοχή του δεξιού μέσου λοβού του πνεύμονα στη 3η dpi. Οι βλάβες εξελίχθηκαν σε διάσπαρτες σκούρες-κοκκινωπές περιοχές και ψηλαφητά οζίδια (κόκκινο βέλος) σε όλο το δεξί λοβό του πνεύμονα στη 5η dpi. Οι ιστοπαθολογικές παρατηρήσεις έδειξαν μέτρια πνευμονία με πυκνωμένα κυψελιδικά τοιχώματα (μαύρα βέλη) και διείσδυση λεμφοκυττάρων (κόκκινα πλαίσια). Τα διογκωμένα και εκφυλιστικά μονοπύρρηνα κύτταρα (πράσινα πλαίσια) είναι διάσπαρτα μέσα στις κυψελιδικές κοιλότητες στη 3η και 5η dpi.(a) Σε ανοσοϊστοχημική εξέταση των πνευμόνων κάθε ομάδας ποντικών παρατηρήθηκαν ιογενή αντιγόνα στα μονοπύρρηνα κύτταρα (πράσινα βέλη), το επιθήλιο των κυψελίδων (μπλε βέλη) και τα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα που ήταν εκφυλιστικά και αφυδατωμένα (μαύρα βέλη) (b). Bao L. et al.(Nature, 2020), “The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice”.

Με εξαίρεση το μοντέλο στο οποίο γινόταν έκφραση του ανθρώπινου ACE2 από τον υποκινητή Ace2 του ποντικού, στα άλλα μοντέλα ποντικών τα υποκείμενα ανέπτυσαν εγκεφαλίτιδα μετά από μόλυνση με SARS-CoV-2. Ποντίκια που υπέστησαν νευρολογική λοίμωξη ύστερα από τη μόλυνση με SARS-CoV-2 δεν είχαν θανατηφόρες επιπλοκές. Μερικά ποντίκια όμως, σε περιπτώσεις που η εγκεφαλική λοίμωξη δεν ήταν σοβαρή, ανέπτυξαν πνευμονία. Επιπλέον, αυτά τα ποντίκια αναπτύσσουν ενδείξεις θρόμβωσης και απώλειας οσμής μετά από μόλυνση με SARS-CoV-2. Τα ποντίκια αυτά αναπτύσσουν σοβαρή νόσο μετά τη μόλυνση με SARS-CoV-2 σε αυτά τα μοντέλα και επομένως μπορεί να παρέχουν σημαντικά στοιχεία κατά την μελέτη της αποτελεσματικότητας θεραπευτικών και προληπτικών παραγόντων.^{45, 46}

Ένα μοντέλο που μπορεί να βοηθήσει στην μελέτη της ειδικής ιστικής έκφρασης του ανθρώπινου ACE2 είναι η αντικατάσταση του ζωϊκού γονιδίου Ace2 με το ανθρώπινο γονίδιο για το ACE2³⁹. Έχουν αναπτυχθεί στο παρελθόν μοντέλα για την έκφραση της ανθρώπινης διπεπτιδυλοπεπτιδάση 4, ή οποία είναι ο υποδοχέας που χρησιμοποιείται από το κοροναϊό του αναπνευστικού συνδρόμου της Μέσης Ανατολής (MERS-CoV), και έχουν φέρει επιτυχή αποτελέσματα.⁴⁷ Σε ένα μοντέλο στο οποίο μελετιόταν ποντικός γενετικά τροποποιημένος με εισαγόμενο το ανθρώπινο ACE2 παρατηρήθηκε αντιγραφή του SARS-CoV-2 σε αναπνευστικούς και εγκεφαλικούς ιστούς, αλλά τα ποντίκια δεν ανέπτυξαν σοβαρή ασθένεια (βλ. Εικ. 5.). Αυτά τα ποντίκια, σε συνδυασμό με την αξιοποίηση μεθόδων ιογενούς προσαρμογής που θα προκαλέσουν αύξηση στην μολυσματικότητα του SARS-CoV-2 στα ποντίκια, θα αποτελέσουν πολύ χρήσιμα μοντέλα στην μελέτη της νόσου στον άνθρωπο.⁴⁸



Εικόνα 5: Παθολογικές αλλαγές και φλεγμονή σε ποντίκια hACE2 που έχουν προσβληθεί από τον SARS-CoV-2. Σε ανάλυση με χρώση H&E παρατηρείται φλεγμονώδης κυτταρική διείσδυση (κίτρινο βέλος), σηπτική πάχυνση κυψελίδων, εστιακή αιμορραγία (πράσινο βέλος) και διακριτικό τραυματισμό του αγγειακού συστήματος (μπλε βέλος) σε ποντίκια hACE2 (A). Μέσω ανοσοιστοχημικής ανάλυσης σε ουδετερόφιλα (Neu) και μακροφάγα (CD68) σε μολυσμένα ποντίκια hACE2 του SARS-CoV-2 παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα ουδετερόφιλων (Neu⁺) αλλά και μακροφάγων CD68⁺ (B και Γ). Μέσω ανάλυσης με χρώση ανοσοφθορισμού σε πνευμονικά τμήματα παραφίνης με δείκτες για CD68 (πράσινο), C-Casp3 (μωβ, δηλώνουν απόπτωση των μακροφάγων) και πρωτεΐνη S του SARS-CoV-2 (κόκκινο). Τα κίτρινα βέλη υποδεικνύουν κύτταρα SARS-CoV-2/CD68/C-Casp3⁺. Στα μολυσμένα ποντίκια σημειώθηκε και η παραγωγή κυτοκίνων στον ορό τους. Shi-Hui Sun et.al.(Cell Host & Microbe, 2020), “A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis”.

Μια άλλη προσέγγιση είναι, αντί να γίνει γενετική τροποποίηση, να δημιουργηθούν ποντίκια που είναι ευπαθή σε μόλυνση με SARS-CoV-2 ευαισθητοποιώντας την αναπνευστική οδό αυτών των ποντικών σε αντιγραφή SARS-CoV-2 μέσω μεταγωγής με αδενοϊό ή σχετιζόμενο με αδενοϊό ιό που εκφράζει το ανθρώπινο ACE2 (Ad5-hACE2 ή AAV-hACE2, αντίστοιχα). Αυτό το σύστημα, επιτρέπει τον αναδιπλασιασμό του SARS-CoV-2 στους πνεύμονες των ποντικών για πολλές ημέρες. Επιπλέον μπορεί να εφαρμοστεί γρήγορα σε διαφορετικά στελέχη ποντικών³⁹. Σε μια μελέτη, κατά τη μόλυνση με τον SARS-CoV-2, τα ποντίκια που έχουν υποστεί μεταγωγή με το Ad5-hACE2 παρατηρήθηκε ότι αναπτύσσουν μια εκτεταμένη λοίμωξη των πνευμόνων και ιστοπαθολογικές αλλαγές όμοιες με περίπτωση ιικής πνευμονίας. Αυτοί οι ποντικοί νόσησαν, με συμπτωματολογία όπως αλλαγές στο βαθμό καμπουριάσματος του σώματος τους και την απώλεια βάρους. Ο ιός γενικά εκκαθαρίζεται επτά ημέρες μετά τη μόλυνση, αν και όχι σε ορισμένα ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια.⁴⁹ Τα ποντίκια που ευαισθητοποιούνται μέσω της παράδοσης του AAV-hACE2 είναι επίσης ευαίσθητα στη μόλυνση με SARS-CoV-2, αλλά η αντιγραφή του ιού φαίνεται να είναι χαμηλότερη από ότι σε ποντίκια που είχαν υποστεί μεταγωγή με Ad5-hACE223. Τέτοια μοντέλα χρησιμεύουν στην αξιολόγηση εμβολίων, αντιϊκών θεραπειών και για την ταυτοποίηση ειδικών επιτόπων για αντισώματα του SARS-CoV-2 και των T-κυττάρων.³⁸ Ένα ζήτημα της χρήσης των ποντικών αυτών, καθώς και σε ορισμένα από τα διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν το ανθρώπινο ACE2, είναι ότι το ανθρώπινο ACE2 σε αυτά εκφράζεται σε κύτταρα στα οποία δεν γίνεται έκφραση στον άνθρωπο. Έτσι δεν μπορεί να γίνει ορθή σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των ποντικών για να γίνουν προβλέψεις και εφαρμογές για τους ανθρώπους.⁵⁰

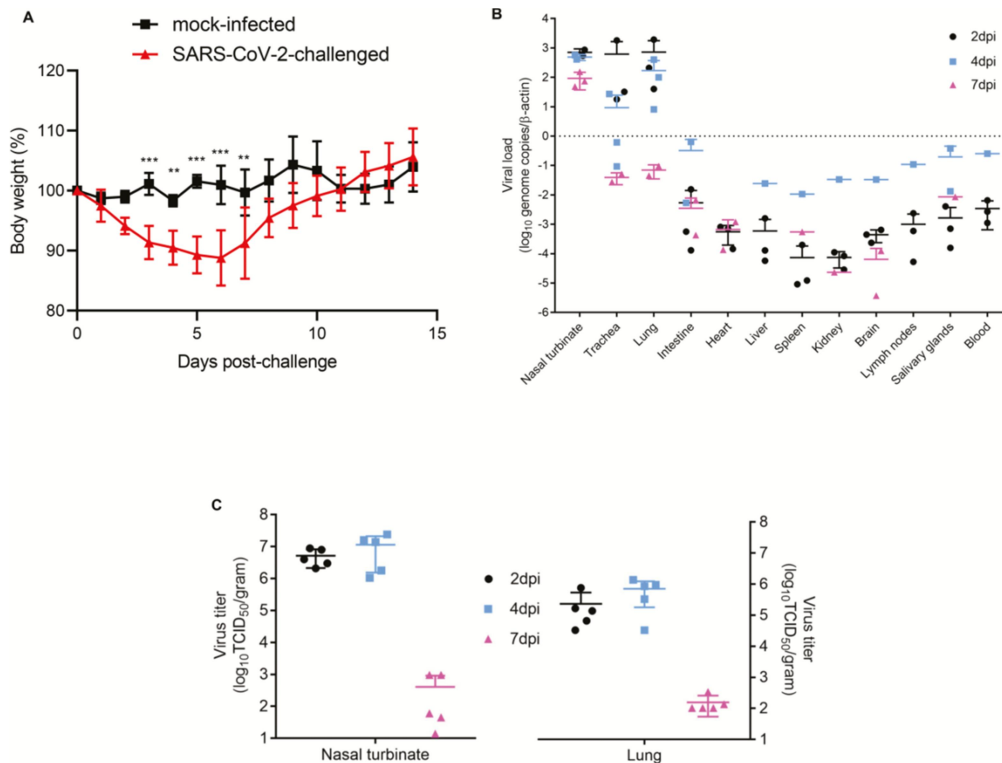
Συμπερασματικά

Μοντέλα ποντικών ήπιας και σοβαρής μορφής της νόσου COVID-19 έχουν περιγραφεί και κάποια έχουν ήδη τεθεί σε εφαρμογή. Αυτά τα μοντέλα αποτελούν σημαντικό εργαλείο για την αξιολόγηση θεραπειών και εμβολίων, όμως λίγα από

αυτά τα μοντέλα έχουν κοινά χαρακτηριστικά με την ανθρώπινη ασθένεια, και όχι πλήρως (ειδικά όσον αφορά τη σοβαρή συμπτωματολογία όπως το σύνδρομο οξέως αναπνευστικής δυσχέρειας και πνευμονική αγγειακή νόσος). Ωστόσο, η συνεχής βελτίωση των μοντέλων αυτών μπορεί να οδηγήσει στη δυνατότητα της μελέτης και αυτών των στοιχείων της ανθρώπινης νόσου.^{39, 53}

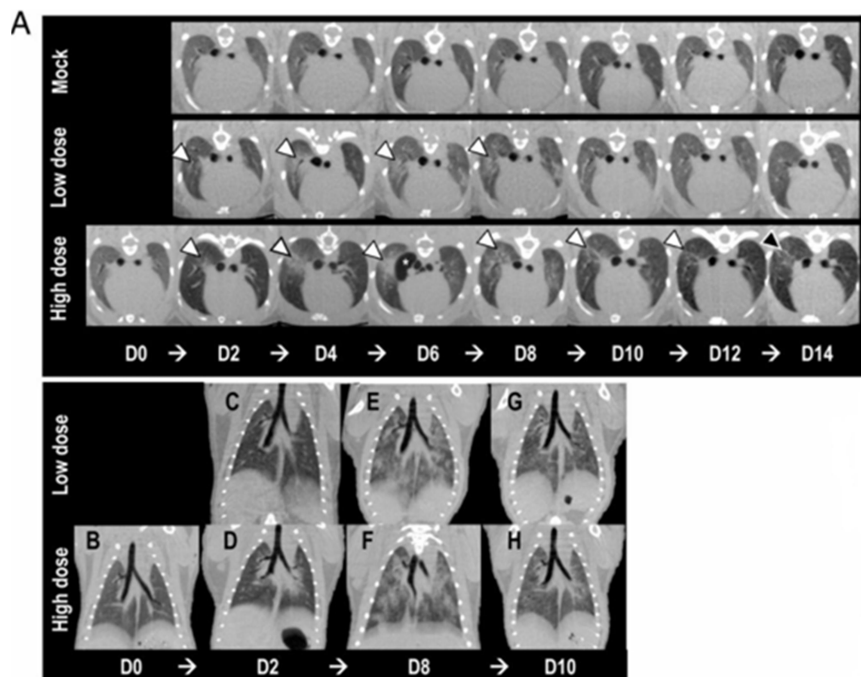
Μοντέλα συριακού χάμστερ

Τα συριακά χάμστερ (*Mesocricetus auratus*) είναι μικρά θηλαστικά που έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοντέλα μόλυνσης για αναπνευστικούς ιούς, συμπεριλαμβανομένων του SARS-CoV, του ιού της γρίπης και πολλών άλλων.⁵⁴ Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση υπολογιστών προσομοιώσεων ή μοντελοποιήσεων στον υπολογιστή (in silico) οι οποίες σύγκριναν την αλληλουχία ACE2 των ανθρώπων, που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με τον τομέα δέσμευσης υποδοχέα της γλυκοπρωτεΐνης της ακίδας του SARS-CoV-2, με εκείνη των χάμστερ, βρέθηκε ότι τα συριακά χάμστερ ενδέχεται να είναι δυνατό να μολυνθούν από τον SARS-CoV-2. Αυτό επιβεβαιώθηκε, καθώς σε πειράματα λοιμώξης της ενδορινικής κοιλότητας, τα συριακά χάμστερ εμφάνιζαν συμπτώματα ήπιας έως μέτριας βαρύτητας με χαρακτηριστική προοδευτική απώλεια βάρους που ξεκινά πολύ νωρίς κατά τη μόλυνση (1-2 ημέρες μετά τον εμβολιασμό). Όλα τα χάμστερ που έχουν προσβληθεί από διαφορετικές ομάδες και με διαφορετικά στελέχη SARS-CoV-2 έδειξαν σταθερά σημάδια αναπνευστικής δυσχέρειας. Επιπλέον στη συμπτωματολογία παρατηρήθηκε απώλεια βάρους, αναστατωμένο τρίχωμα, λήθαργος, και καμπουριασμένη στάση. Κατά τις δύο βδομάδες μετά τη μόλυνση, τα χάμστερ παρουσίαζαν ανάρρωση (βλ. Εικ. 6) .⁵⁵ Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η μόλυνση με τον SARS-CoV-2 σε χάμστερ παρουσιάζει δημογραφικές ομοιότητες με την νόσο COVID-19 στους ανθρώπους, καθώς τα ηλικιωμένα χάμστερ και τα αρσενικά χάμστερ φαίνεται να αναπτύσσουν πιο σοβαρή ασθένεια από τα νεαρά και τα θηλυκά χάμστερ.^{56, 57}



Εικόνα 6: Αλλαγές σωματικού βάρους και τροπισμός των ιστών της μόλυνσης από τον ιό SARS-CoV-2 στο μοντέλο του συριακού χάμστερ. Παρατηρούνται αλλαγές σωματικού βάρους του SARS-CoV-2 και mock-infected χάμστερ (a). Το ιικό τους φορτίο ελέγχθηκε με μέθοδο qRT-PCR στους ιστούς της αναπνευστικής οδού, σε ιστούς οργάνων πέραν του πνεύμονα και αίμα χάμστερ μολυσμένων με SARS-CoV-2 (b). Ποσοτική τιτλοποίηση του ιού μέσω ανάλυσης TCID₅₀ (δηλαδή χρησιμοποιώντας τη μέση δοσολογία μόλυνσης για τις ιστικές καλλιέργειες) στη ρινική κοιλότητα και στους πνεύμονες των μολυσμένων με SARS-CoV-2 χάμστερ (c). Chan J. et al. (Clinical Infectious Diseases, 2020), “Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility”

Σε χάμστερ, η λοίμωξη SARS-CoV-2 σχετίζεται με υψηλά επίπεδα πολλαπλασιασμού του ιού και ιστοπαθολογικά στοιχεία ασθένειας, τα οποία περιλάμβαναν σκιάσεις δίκην θολού ύαλου και ενδείξεις αερίου στην κοιλότητα που περιβάλλει τους πνεύμονες (βλ εικόνα 7). Ιικό RNA μπορεί να ανιχνευτεί στα χάμστερ σε κύτταρα της αναπνευστικής οδού και σε άλλους ιστούς, όπως του λεπτού εντέρου. Αυτό δύναται να είναι χρήσιμο για την μελέτη θεραπευτικών παραγόντων και εμβολίων.³⁹ Έχει επίσης παρατηρηθεί μετάδοση ιών μεταξύ χάμστερ που ζούσαν στο ίδιο κλουβί, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα χάμστερ μπορεί να είναι χρήσιμα σε μελέτες μετάδοσης. Τα μολυσμένα χάμστερ που συγκατοικούσαν παρουσίασαν παρόμοια παθολογικά ευρήματα στους πνεύμονες, αλλά δεν εμφάνισαν απώλεια βάρους, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα χάμστερ που μολύνθηκαν άμεσα με τον ιό είχαν πιο σοβαρά συμπτώματα λόγω του υψηλότερου ιικού φορτίου στους πνεύμονες τους.^{55, 57}



Εικόνα 7: Μικρο-αξονική τομογραφία των πνευμόνων μολυσμένων συριακών χάμστερ. (A) Πραγματοποιήθηκε αξονική τομογραφία του θώρακα σε mock-infected χάμστερ, σε χάμστερ μολυσμένα με χαμηλή δοσολογία και

χάμστερ μολυσμένα με υψηλή δοσολογία. Οι πνευμονικές ανωμαλίες εντοπίστηκαν για πρώτη φορά 2 μέρες μετά τη μόλυνση και οι πιο σοβαρές αλλαγές παρατηρήθηκαν 8 μέρες μετά τη μόλυνση σε ζώα που έχουν μολυνθεί από ιούς (λευκά βέλη). Τα ζώα που μολύνθηκαν με υψηλή δοσολογία είχαν, συνολικά, πιο σοβαρές πνευμονικές ανωμαλίες σε σύγκριση με τα ζώα που είχαν μολυνθεί από χαμηλή δόση. Οι πνευμονικές ανωμαλίες άρχισαν να βελτιώνουν γύρω στις 10 μέρες μετά τη μόλυνση τόσο για τα ζώα που υπέστησαν χαμηλή δοσολογία του ιού όσο και για τα ζώα που είχαν προσβληθεί από υψηλές δόσεις. Την 14^η ημέρα, τα ζώα που είχαν μολυνθεί από την υψηλή δόση είχαν υψηλότερο βαθμό υπολειμματικών πνευμονικών ανωμαλιών σε σύγκριση με τα ζώα που είχαν μολυνθεί με χαμηλή δόση, (οι υπολειμματικές ανωμαλίες επισημαίνονται από τη μαύρη αιχμή του βέλους. Η εικόνα ελέγχου ημέρας 0 ελήφθη μόνο για το ζώο που είχε προσβληθεί από υψηλές δόσεις και δεν είναι διαθέσιμη για τα ζώα που έχουν μολυνθεί από χαμηλή δόση ή ήταν mock-infected. (B-H) Σε Εικόνες αξονικής τομογραφίας ανακατασκευής ραχιαίου/στεφανιαίου επιπέδου του θώρακα σε ζώα που έχουν προσβληθεί από χαμηλή δόση και ζώα με υψηλή δόση που παρουσιάζουν (B) εικόνα ελέγχου, (C και D) αρχικές πνευμονικές μεταβολές, (E και F) πιο σοβαρές πνευμονικές μεταβολές και (G και H) την έναρξη της φάσης αποκατάστασης με την πάροδο του χρόνου. Τα ζώα που είχαν προσβληθεί από υψηλές δόσεις είχαν πιο σοβαρές πνευμονικές ανωμαλίες από τα ζώα που είχαν μολυνθεί από χαμηλή δόση. Να σημειωθεί ότι η εικόνα ελέγχου ημέρας 0 ελήφθη μόνο για τα ζώα που έχουν προσβληθεί από υψηλές δόσεις και δεν είναι διαθέσιμη για τα ζώα που έχουν προσβληθεί από χαμηλή δόση. Masaki I. et. Al. (PNAS, 2020), “Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development”

Ιστολογικά, παρατηρήθηκαν φλεγμονώδη διηθήματα με παρουσία ιικού αντιγόνου και απόπτωση στην άνω και κάτω αναπνευστική οδό. Σε ιστούς εκτός της αναπνευστικής οδού, στο έντερο εντοπίστηκε ιικό αντιγόνο αλλά και σοβαρή

νέκρωση επιθηλιακών κυττάρων, και διήθηση του χορίου του βλεννογόνου από μονοπύρρηνα κύτταρα. Η νόσος επιβεβαιώθηκε με τη χρήση μεθόδων υπολογιστικής τομογραφίας. Οι σαρώσεις τομογραφίας υψηλής ανάλυσης έδειξαν διαστολή των αεραγωγών και ύπαρξη υγρού στους πνεύμονες μολυσμένων χάμστερ. Σε περαιτέρω ανάλυση παρατηρήθηκε ότι επηρεάστηκε ο μη αεριζόμενος πνευμονικός όγκος σε αυτά τα χάμστερ. Όλα αυτά τα συμπτώματα δηλώνουν πως τα χάμστερ μπορούν να αποτελέσουν σημαντικά μοντέλα για την μελέτη των αναπνευστικών επιπτώσεων της νόσου.^{39, 57, 58}

Η έκφραση των χημειοκινών και των κυτοκινών στους πνεύμονες των χάμστερ εμφάνισε κορύφωση στις τέσσερις ημέρες μετά τη μόλυνση και στη συνέχεια σταδιακή υποχώρηση κατά τις επτά ημέρες μετά τη μόλυνση. Η ιντερφερόνη-γ και οι προφλεγμονώδεις χημειοκίνες και οι κυτοκίνες αυξήθηκαν έντονα στις δύο και τέσσερις ημέρες μετά τη μόλυνση αντίστοιχα, και έπεσαν στα αρχικά τους επίπεδα επτά ημέρες μετά τη μόλυνση. Η παθολογία των πνευμόνων που προκαλείται από SARS-CoV-2 σε χάμστερ φαίνεται να εξαρτάται από ανοσολογική παθολογία, καθώς ο τραυματισμός των πνευμόνων σε τέσσερις ημέρες μετά τη μόλυνση μειώνεται σημαντικά σε STAT2-knockout χάμστερ, δηλαδή σε χάμστερ των οποίων έχει αφαιρεθεί το γονίδιο STAT2, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη σημαντική για την λειτουργία των ιντερφερών τύπου 1, ενώ τα ιικά φορτία αυξάνονται μαζικά και το ιικό RNA διασπείρεται σε αρκετούς περιφερειακούς ιστούς.³⁹ Στις επτά ημέρες μετά τη μόλυνση ανιχνεύθηκαν εξουδετερωτικά αντισώματα στον ορό. Η ανοσοποίηση των άγριων χάμστερ με δείγματα αυτού του ορού είχε οδηγήσει σε σημαντικά μειωμένα ιικά φορτία στην αναπνευστική οδό, αλλά δεν υπήρχε εμφανής βελτίωση στη συμπτωματολογία και τα ιστολογικά ευρήματα. Επιπλέον, βρέθηκε ότι ο SARS-CoV-2 μπορεί να μεταδοθεί μεταξύ χάμστερ μέσω στενής επαφής αλλά και μη επαφής.³⁹ Έγινε επίσης προσπάθεια μετάδοσης μέσω μολυσμένων επιφανειών αλλά δεν έφερε επιτυχή αποτελέσματα.⁵⁹

Επειδή οι μελέτες σε χάμστερ είναι οικονομικές και μη χρονοβόρες, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση αυτών των ζώων σε μοντέλα για τον

έλεγχο θεραπευτικών παραγόντων. Έχει αποδειχθεί η ανεπαρκής αποτελεσματικότητα για τα φάρμακα υδροξυχλωροκίνη (με ή χωρίς αζιθρομυκίνη) και φαβιπιραβίρη, αν και η φαβιπιραβίρη σε υψηλές δόσεις μείωσε το ιικό φορτίο στους πνεύμονες των μολυσμένων χάμστερ. Ένα υποψήφιο εμβόλιο για τον SARS-CoV-2 με φορέα το YF17D παρείχε αποτελεσματική προστασία έναντι της πρόκλησης COVID-19 σε χάμστερ. Επιπλέον, η επιτυχής μεταφορά εξουδετερωτικών αντισωμάτων προστάτεψε τα χάμστερ από τη νόσο. Σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι για τα μοντέλα χάμστερ υπάρχει έλλειψη ερευνητικών εργαλείων για αυτό το είδος συγκριτικά με αυτά που είναι διαθέσιμα για ποντίκια και άλλα είδη.^{39, 60}

Μοντέλα κουναβιών

Έχει φανεί ότι μπορούν να αναπτυχθούν σημαντικά μοντέλα από τα κουνάβια (*Mustela putorius furo*) για τη δοκιμή της παθογένειας και της μετάδοσης ανθρώπινων αναπνευστικών ιών, συμπεριλαμβανομένου του ιού της γρίπης και του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού. Σε αντίθεση με τα ποντίκια και τους αρουραίους, εμφανίζουν αντανακλαστικό βήχα, το οποίο δύναται να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο σε μελέτες αναπνευστικών ιών. Γι' αυτό το λόγο, μοντέλα κουναβιών έχουν χρησιμοποιηθεί για μελέτες του ιού SARS-CoV-2. Παρά τη χρήση διάφορων απομονωμένων στελεχών του SARS-CoV-2, τα αποτελέσματα ήταν όμοια σε σε όλες τις μελέτες.⁶¹

Σε μελέτες *in silico* που έγιναν για τα ζώα αυτά, σημειώθηκε ότι προβλέπεται να μὴν είναι ευαίσθητα σε μόλυνση από τον ιό. Παρ'όλα αυτά σε πειραματικές μελέτες πάνω στα ζά αυτά παρατηρήθηκε επιρρέπεια σε λοίμωξη. Σε μία μελέτη, μετά την έκθεση του βλεννογόνου των κουναβιών με τον SARS-CoV-2, οι αλλαγές στα κουνάβια ήταν μη ανιχνεύσιμες ή ήπιες, με τη συμπτωματολογία να περιλαμβάνει λήθαργο, ρινική εκφόρτιση, συριγμό, συσσώρευση βλέννας, φτέρνισμα και ευκοιλία κόπρανα. Τα κουνάβια που μολύνθηκαν από αερολύματα

μικρών σωματιδίων είχαν παρόμοια ασθένεια, όμως η δοσολογία ήταν χαμηλότερη. Σε ορισμένες μελέτες έχουν παρατηρηθεί αυξημένες θερμοκρασίες σώματος, αν και οι μεταβολές στο σωματικό βάρος απουσιάζουν ή είναι ελάχιστες. Έχουν επίσης παρατηρηθεί αλλαγές στις αιματολογικές τους εξετάσεις, όπως ήπια λεμφοπενία και ουδετεροφιλία. Επίσης έχει επιβεβαιωθεί η έκκριση του ιού μέσω μελέτης ρινικών και στοματοφαρυγγικών επιχρισμάτων. Η αντιγραφή του ιού ανιχνεύεται στην ανώτερη αναπνευστική οδό κατά τη 2^η ημέρα μετά τη μόλυνση, και είναι ανιχνεύσιμη εντός δύο εβδομάδων από τη μόλυνση.³⁹ Η αναπαραγωγή του ιού στα κουνάβια φαίνεται ότι περιορίζεται στις αναπνευστικές και γαστρεντερικές οδούς.^{61, 62, 63}

Τα κύρια ιστοπαθολογικά ευρήματα στα κουνάβια που έχουν μολυνθεί με SARS-CoV-2 περιλαμβάνουν φλεγμονή εντός των κυψελιδικών χώρων και περιαγγειακή μονοπύρηνη φλεγμονή. Επιπλέον, στους μεγαλύτερους αεραγωγούς αυτών των κουνάβων, παρατηρήθηκαν βρογχικές βλεννογονικές εστίες με ηωσινόφιλα και θραύσματα κολλαγόνου (υποδηλώνουν εκφυλισμό κολλαγόνου). Σε αυτοψίες κουνάβων παρατηρήθηκαν ήπια ευρήματα που περιλάμβαναν βρογχο-κυψελιδική ή κυψελιδική φλεγμονή. Επίσης βρέθηκε ότι μπορούν να μεταδώσουν τον ιό αποτελεσματικά σε κουνάβια που δεν έχουν ακόμη μολυνθεί. Πραγματοποιήθηκε αποτελεσματική μετάδοση από πειραματικά μολυσμένα κουνάβια σε μη μολυσμένους “συγκατοίκους”. Πραγματοποιήθηκε επίσης επιτυχής μετάδοση από μολυσμένα κουνάβια σε κουνάβια που είχαν χωριστεί. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι είναι δυνατή η αερομεταφερόμενη μετάδοση του SARS-CoV-2 και υποδηλώνει ότι τα κουνάβια ως υποκείμενο για ανάπτυξη μοντέλων μπορεί να είναι χρήσιμα για περαιτέρω μελέτες μετάδοσης.^{62,64}

Στις μελέτες λοιπόν που πραγματοποιήθηκαν σε κουνάβια παρατηρείται ότι η λοίμωξη από τον SARS-CoV-2 οδηγεί σε κυρίως λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος σε αυτά τα ζώα. Τα δεδομένα αυτά καθιστούν τα κουνάβια κατάλληλα για τη δοκιμή της αποτελεσματικότητας των εμβολίων που

χορηγούνται δια του βλεννογόνου αλλά και θεραπευτικών παραγόντων που στοχεύουν στην πρόληψη της μόλυνσης ή και της μετάδοσης στην άνω αναπνευστική οδό.³⁹

Μοντέλα πρωτεύοντων πλην του ανθρώπου

Τα πρωτεύοντα πλην του ανθρώπου βρίσκονται κοντά στη φυλογένεση στον άνθρωπο, γεγονός που τα καθιστά ιδιαίτερα σημαντικά για χρήση στην ανάπτυξη εμβολίων αλλά και φαρμάκων. Μοντέλα πρωτεύοντων έχουν αναπτυχθεί για τη νόσο COVID-19, με τη χρήση μακάκων cynomolgus (*Macaca fascicularis*), rhesus macaques (*Macaca mulatta*), και αφρικανικών πράσινων πιθήκων (*Chlorocebus aethiops*). Μελέτες από διάφορα εργαστήρια έχουν δείξει υψηλά επίπεδα ιικής αναπαραγωγής για 7-14 ημέρες, στην ανώτερη αλλά και στην κατώτερη αναπνευστική οδό, με συμπτωματολογία ιογενούς πνευμονίας και της ήπιας κλινικής νόσου μεταβλητής συμπτωματολογίας. Μόνο ήπια κλινική νόσος έχει αναφερθεί σε πρωτεύοντα πλην του ανθρώπου και δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα αυτή τη στιγμή για να προσδιοριστεί εάν παρατηρούνται πιο σοβαρά συμπτώματα σε rhesus macaques, cynomolgus macaques ή αφρικανικούς πράσινους πιθήκους.³⁹ Έχει επίσης αναφερθεί η επαγωγή έμφυτης, χυμικής και κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης, καθώς και ισχυρή προστασία από το επαναλοίμωξη, η οποία καταδεικνύει την επαγωγή φυσικής προστατευτικής ανοσίας σε αυτό το μοντέλο. Τα πρωτεύοντα πλην του ανθρώπου τα οποία μολύνθηκαν μέσω του βλεννογόνου, μέσω ενδοβρογχικής έκθεσης ή έκθεσης σε αεροζόλ έδειξαν ανωμαλίες κατά την ακτινογραφία θώρακος, αξονική τομογραφία ή τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων φθοριοδεοξυγλυκόζης μέσα σε 2 ημέρες, οι οποίες ανωμαλίες βελτιώνονταν γύρω στις 11-15 ημέρες μετά τη μόλυνση. Έκκριση ιού έχει αποδειχθεί ότι είναι δυνατή τόσο μέσω της αναπνευστικής όσο και της γαστρεντερικής οδού. Έχουν επίσης παρατηρηθεί αιματολογικές αλλαγές με ενδείξεις ενεργοποίησης των T κυτάρων, ήπιας λεμφοπενίας και ουδετερόφιλων σε μολυσμένα πρωτεύοντα.^{65, 66}

Η μόλυνση με τον SARS-CoV-2 σε ηλικιωμένους ανθρώπους σχετίζεται με επιδεινωμένα κλινικά συμπτώματα. Έως τώρα, δύο μελέτες σε *rhesus* και *cynomolgus macaques* έχουν επικεντρωθεί στην σημασία της ηλικίας στη μόλυνση από τον SARS-CoV-2. Και οι δύο μελέτες έδειξαν ότι οι ηλικιωμένοι μακάκοι φέρουν ιικό φορτίο στο λαιμό και τη μύτη για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους απ' ό,τι οι νεαροί ή οι ενήλικες μακάκοι. Υψηλότερα ιικά φορτία εντοπίστηκαν επίσης σε ιστούς των πνευμόνων ηλικιωμένων *rhesus macaques*. Η προχωρημένη ηλικία σε *rhesus macaques* συσχετίστηκε επίσης με αυξημένα και μεγαλύτερης σοβαρότητας ακτινολογικά και ιστοπαθολογικά ευρήματα.³⁹ Οι μελέτες αυτές δηλώνουν ότι είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη η ηλικία κατά την επιλογή των ζώων, καθώς οι μελέτες θεραπευτικών παραγόντων για σοβαρές ασθένειες απαιτούν ζωικά μοντέλα που αναπαριστούν την ασθένεια όπως φαίνεται και στον άνθρωπο.^{66, 67}

Μελέτες έχουν αναφέρει την ανοσογονικότητα και την προστατευτική αποτελεσματικότητα των υποψηφίων εμβολίων COVID-19 σε μοντέλα που χρησιμοποιούν *rhesus macaques*. Τα εμβόλια που υπάρχουν μέχρι στιγμής έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή δεσμευτικών και εξουδετερωτικών αντισωμάτων και προκαλούν σημαντικές μειώσεις της αναπαραγωγής του ιού στην κατώτερη αναπνευστική οδό και στην ανώτερη αναπνευστική οδό (αλλά σε μικρότερο βαθμό), μετά από μόλυνση από τον SARS-CoV-2. Τα ευρήματα αυτά δηλώνουν ότι τα εμβόλια είναι πιο αποτελεσματικά στην καταπολέμηση ασθένειας του κατώτερου αναπνευστικού απ' ό,τι της ανώτερης αναπνευστικής οδού.^{68, 69}

Αν και η χρήση πρωτευόντων σε μοντέλα προσομοιώνει καλύτερα τα ανθρώπινα συστήματα από μοντέλα που χρησιμοποιούν ζώα που είναι πιο φυλογενετικά απομακρυσμένα, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι στις μελέτες αυτές χρησιμοποιείται περιορισμένος αριθμός ζώων στα πειράματά, καμιά φορά όσο ένα ή δύο ζώα ανά μελέτη, και έτσι τα αποτελέσματά τους θα πρέπει να ελέγχονται και να ερμηνεύονται με τη προσοχή.⁷⁰

Οι ερευνητές που χρησιμοποιούν αυτά τα ζώα έχουν ωστόσο περιορισμένο αριθμό πρωτευόντων διαθέσιμο για ολοκληρωμένες μελέτες παθολογίας, ειδικά καθώς πολλά από αυτά τα ζώα χρειάζονται και για δοκιμές εμβολίων και έτσι οι χρειάζεται να γίνουν συμβιβασμοί μεταξύ των μεγεθών των ομάδων σε πρώιμες παθολογικές μελέτες και εκείνων σε μεταγενέστερες προκλινικές δοκιμές θεραπευτικών παραγόντων.³⁸

Σε μία μελέτη, *rhesus macaques* μολύνθηκαν ενδορρινικά, ενδοτραχειακά, από το στόμα και από τα δύο μάτια. Παρατηρήθηκαν πνευμονικές διηθήσεις με ακτινολογικές μεθόδους και το έγινε βαρυμετρική μέτρηση του οιδήματος, αν και κατά την επιφανειακή μελέτη βρέθηκε ότι οι βλάβες ήταν εστιακές και σποραδικές. Υγρό στις κυψελίδες αλλά και άλλα ευρήματα που υποδηλώνουν δυσκολία στην αναπνοή και υψηλή απαίτηση οξυγόνου από τον οργανισμό, ευρήματα τα οποία σπάνια παρατηρούνται σε άλλα ζωικά μοντέλα για τη μελέτη του ARDS παρατηρήθηκαν στην ιστολογική εξέταση των πνευμόνων. Αυτό συνοδεύτηκε από ακανόνιστη αναπνοή και αυξημένο αναπνευστικό ρυθμό σε ορισμένα ζώα, ευρήματα που υποδηλώνουν υποξαιμία, αν και αυτή η ένδειξη μπορεί επίσης να είναι ένας δείκτης πόνου ή δυσφορίας. Όλα αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ανάπτυξη ARDS.³⁸ Ωστόσο, η εξασθένηση της ανταλλαγής αερίων δεν μετρήθηκε και η ανάλυση κυτταροκινών ορού δεν εντόπισε συνεπή ενδείξεις συστηματικής φλεγμονής.^{71, 72}

Δεδομένου ότι η ηλικία αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για τη σοβαρή COVID-19, η ανταπόκριση των ηλικιωμένων *macaques rhesus* στον ενδοτραχειακό εμβολιασμό με SARS-CoV-2 έχει επίσης συγκριθεί με εκείνη των νεότερων ελέγχων (3-5 ετών). Αυτή η έκθεση δείχνει ότι υπάρχουν αυξήσεις του ιικού φορτίου που σχετίζονται με την ηλικία 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Τα ευρήματα των μελετών υποδήλωναν ήπιες διάμεσες διηθήσεις στους πνεύμονες στα νεότερα ζώα με σημεία πιο σοβαρού οιδήματος, όπως εμφάνιση υγρού στις κυψελίδες σε ηλικιωμένους μακάκους. Αυτή η μελέτη δείχνει ότι μοντέλα που

χρησιμοποιούν ηλικιωμένους μακάκους μπορεί να είναι χρήσιμα για τη μοντελοποίηση πιο σοβαρής έκφρασης της νόσου.⁶⁷

Οι μακάκοι *rhesus* έχουν χρησιμοποιηθεί και για να ελεγχθεί η προστατευτική ισχύς της ορομετατροπής έναντι του SARS-CoV-2. Σε μία έρευνα, πραγματοποιήθηκε ενδοτραχειακή μόλυνση δύο *rhesus macacus* με τον SARS-CoV-2 και στη συνέχεια τα επαναμόλυναν μετά από ένα μήνα. Η έλλειψη στοιχείων ιογενούς αποβολής μετά από την εκ νέου πρόκληση ασθένειας και στους δύο μακάκους πρότεινε την ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας. Ωστόσο, η μελέτη αυτή δεν θα πρέπει να υπερεκτιμάται, καθώς άλλες μελέτες υποδηλώνουν χαμηλούς, ή ακόμη και μη ανιχνεύσιμους, τίτλους εξουδετερωτικών αντισωμάτων σε ασθενείς που είχαν προσβληθεί προηγουμένως και το Κορεατικό Κέντρο Ελέγχου Νόσων έχει αναφέρει επαναλοίμωξη ασθενών με προηγούμενη COVID-19. Περιορισμένα σημεία φλεγμονής των πνευμόνων και πνευμονίας αποδείχθηκαν επίσης σε αυτή τη μελέτη.⁷³

Σε άλλη μελέτη πραγματοποιήθηκε μόλυνση τόσο σε νέους ενήλικες όσο και τους ηλικιωμένους μακάκους *cynomolgus* με SARS-CoV-2 χρησιμοποιώντας μια συνδυασμένη ενδορινική και ενδοτραχειακή προσέγγιση εμβολιασμού. Για κάθε ηλικιακή ομάδα μελετήθηκαν από δύο ζώα. Μετά τη μόλυνση παρατηρήθηκαν εστιακές βλάβες στους πνεύμονες ενός νεαρού ενήλικα και ενός ηλικιωμένου μακάκου.³⁸ Κατά την εξέταση των πνευμόνων του νεαρού ενήλικα παρατηρήθηκε υγρό στις κυψείδες και άλλα ευρήματα που δήλωναν αυξημένες απαιτήσεις σε οξυγόνο και δυσκολία στην αναπνοή, μαζί με άλλα σημεία διάχυτης κυψελιδικής βλάβης. Αυτές οι παρατηρήσεις είναι ελπιδοφόρες ενδείξεις ότι μια τροποποιημένη προσέγγιση στους μακάκους *cynomolgus* όπου η ιογενής λοίμωξη επηρεάζει μεγαλύτερο ποσοστό των πνευμόνων μπορεί να είναι χρήσιμη σε μηχανισμούς μοντελοποίησης που οδηγούν σε σοβαρή νόσο COVID-19.⁶⁶

Μοντέλα βιζόν

Η νυφίτσα (*Neovison vison*), είχε αποδειχθεί ότι είναι ένα ζώο ευαίσθητο σε μόλυνση από τον SARS-CoV, και αποδείχθηκε ότι είναι επίσης ευαίσθητο σε λοίμωξη με SARS-CoV-2. Στις Κάτω Χώρες, στα τέλη Απριλίου 2020 εντοπίστηκε μια μόλυνση των βιζόν με SARS-CoV-2 σε δύο αγροκτήματα αναπαραγωγής, πιθανότατα ως αποτέλεσμα επαφής με έναν εργάτη που μολύνθηκε με SARS-CoV-2. Σε πάνω από σαράντα φάρμες βιζόν έχουν υπάρξει επιδημίες από SARS-CoV-2 και Κάτω Χώρες και την Ισπανία έχουν καταγραφεί χιλιάδες θάνατοι. Σε αντίθεση με τα κουνάβια, τα βιζόν εμφανίζουν αναπνευστικά συμπτώματα μέτριας σοβαρότητας, όπως δυσκολία στην αναπνοή. Μερικά από τα ζώα μάλιστα πέθαναν. Ο ιός SARS-CoV-2 βρέθηκε σε επιχρίσματα του λαιμού και του ορθού που συλλέχθηκαν από νεκρά βιζόν από τις φάρμες. Τα βιζόν ομοιάζουν με τα κουνάβια στο γεγονός ότι το ιικό φορτίο στον λαιμό των ζώων ήταν υψηλότερο απ' ό,τι στα επιχρίσματα του ορθού. Τα δεδομένα δηλώνουν πως το βιζόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα μοντέλο για την μελέτη μέτριας έως σοβαρής νόσου COVID-19, όμως πρέπει να ληφθεί υπόψιν η δυσκολία χειρισμού τους.^{74, 75, 76}

Μοντέλα γατών

Αν και οι οικιακές γάτες (*Felis catus*) δεν χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μελέτη αναπνευστικών παθήσεων, η στενή συσχέτιση ανθρώπων και κατοικίδιων γατών σημαίνει ότι η διερεύνηση της λοίμωξης και της μετάδοσης SARS-CoV-2 στις γάτες είναι σημαντική, αν και η σχέση των κατοικίδιων γατών με τον άνθρωπο με τη σειρά της περιπλέκει τη χρήση τους ως πειραματόζωα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι οικιακές γάτες, καθώς και οι τίγρεις που στεγάζονται σε ζωολογικούς κήπους και βρίσκονται επίσης στην οικογένεια Felidae, έχουν προκύψει θετικές ως προς τον SARS-CoV-2 στις Ηνωμένες Πολιτείες.⁷⁷

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι γάτες είναι πολύ ευαίσθητες σε μόλυνση από τον ιό και είναι δυνατόν να μεταδώσουν τον ιό σε άγριες γάτες. Για παράδειγμα, σε μία

μελέτη πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός του στελέχους SARS-CoV-2 CTan-H σε γάτες 70-100 ημερών και σε γάτες 6-9 μηνών μέσω της ενδορινικής οδού είχε ως αποτέλεσμα την αντιγραφή του ιού στην άνω και κάτω αναπνευστική οδό, καθώς και στο γαστρεντερικό σωλήνα. Παρατηρήθηκε ορομετατροπή και στις πειραματικά μολυσμένες και στις με τις οποίες ήρθαν σε επαφή. Σε νεκροψία παρατηρήθηκε διάμεση πνευμονία, επιθηλιακή νέκρωση, καθώς και φλεγμονή στη ρινική κοιλότητα και τραχεία. Στις μελέτες δεν πραγματοποιήθηκε περιγραφή των κλινικών συμπτωμάτων, εκτός από το ότι 2 νεαρές γάτες (από τις 10 συνολικά) πέθαναν (η μία την 3^η ημέρα και η άλλη 13^η ημέρα μετά τη μόλυνση). Το αντιγόνο του ιού βρέθηκε σε επιθηλιακά κύτταρα της ρινικής κοιλότητας, καθώς και εντοπίστηκαν νεκρωτικά υπολείμματα στην αμυγδαλή, τους υποβλεννογόνους αδένες της τραχείας και στα εντεροκύτταρα του λεπτού εντέρου.^{63,78, 79}

Σε άλλη μελέτη για τον έλεγχο της μετάδοσης του SARS-CoV-2, δύο ζεύγη γατών ηλικίας 6-9 μηνών και τρία ζεύγη γατών ηλικίας 10- 14 εβδομάδων (ένα μολυσμένο και ένα μη μολυσμένο σε κάθε ζεύγος), στεγάστηκαν μαζί, και έγινε ανάλυση δειγμάτων κοπράνων για την παρουσία ιογενούς RNA για την επιβεβαίωση λοίμωξης. Δεν ήταν δυνατή η σωστή λήψη δειγμάτων διά της μύτης στις γάτες λόγω της επιθετικότητας τους. Τόσο στις υπο-ενήλικες όσο και στις νεαρές γάτες, μόνο σε μία από τις τρεις άγριες γάτες είχε ανιχνευθεί ιικό RNA στα δείγματα κοπράνων, γεγονός που υποδηλώνει ότι επιτεύχθηκε μετάδοση. Επίσης αξιοσημείωτος ήταν ο αναφερόμενος θάνατος μιας από τις εμβολιασμένες με ιό νεαρές γάτες στη 3^η ημέρα μετά τη μόλυνση κατά τη διάρκεια της μελέτης, γεγονός που υποδηλώνει την πρόκληση σοβαρής νόσου σε ένα νεαρό ζώο. Η ιστολογική εξέταση των πνευμόνων κατά την νεκροψία έδειξε ύπαρξη υγρού στις κυψελίδες, υποδεικνύοντας ανάπτυξη πνευμονικού οιδήματος.³⁸

Αν και οι γάτες μπορεί να αντιπροσωπεύουν ένα κατάλληλο μοντέλο την νόσο COVID-19, πριν χρησιμοποιηθούν για αυτό το σκοπό, πρέπει να γίνει

αξιολόγηση για το αν τα οφέλη υπερτερούν των ανησυχιών της χρήσης κατοικίδιων ζώων για έρευνες. Επιπλέον, είναι δύσκολος ο χειρισμός γατών κατάστασης επιπέδου βιοασφάλειας επιπέδου 3 και δεν αποτελούν τυπικό ζωικό μοντέλο. Ωστόσο, λόγω της στενής επαφής τους με τον άνθρωπο, πρόσθετες μελέτες, για παράδειγμα, σχετικά με τη μόλυνση του περιβάλλοντος (κλουβιά, κρεβάτια, μπολ με τρόφιμα και νερό, κουτιά απορριμμάτων και ούτω καθεξής) ή μεταδοτικότητας, μπορεί να είναι σημαντικές για την ενημέρωση των κτηνιατρικών και δημόσιων υγειονομικών αρχών σχετικά με τον κίνδυνο του να είναι πιθανός ενδιάμεσος ξενιστής ή φορέας στη διεπαφή μεταξύ του SARS-CoV-2, ανθρώπων και ζώων.³⁹

Μοντέλα σκύλων

Τα σκυλιά (*Canis lupus familiaris*) έχουν αποδειχθεί ότι είναι ευαίσθητα στο SARS-CoV-2, αλλά σε πολύ ήπιο βαθμό. Σε μελέτη *in silico* μελέτης του ACE2 υποδοχέα όσον αφορά τη συγγένειά του με την πρωτεΐνη S του ιού, καταγράφηκε ότι οι σκύλοι προβλέπεται να είναι επιρρεπείς σε λοίμωξη από αυτόν. Σε μελέτη όμως που πραγματοποιήθηκε για αυτό το είδος με τη χρήση του στελέχους CTan-H, βρέθηκε ότι τα σκυλιά έχουν χαμηλή ευαισθησία σε λοίμωξη με SARS-CoV-2 (βλ. Πίνακα 3). Επίσης έχουν καταγραφεί και μολύνσεις σκύλων σε μη εργαστηριακό περιβάλλον. Η ευαισθησία τόσο των γατών όσο και των σκύλων σε φυσική αλλά και πειραματική λοίμωξη με SARS-CoV-2 υποδηλώνει ότι η δοκιμή αντισωμάτων σε αυτά τα είδη θα μπορούσε να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για επιδημιολογικές μελέτες, αλλά και είναι απαραίτητη η μελέτη τους ως προς την μεταδοτικότητά τους, για να γίνει σωστή αξιολόγηση της δυνατότητας μεταφοράς του ιού από κατοικίδιο σε ιδιοκτήτη. Παρ' όλα αυτά, όπως και στις γάτες, τίθενται διλήμματα όσον αφορά το ηθικό κομμάτι του να χρησιμοποιούνται κατοικίδια ζώα για τέτοιες μελέτες, και έτσι θα ήταν προτιμότερη η στρέψη σε άλλα μοντέλα ζώων,^{39,63, 78}

Χοίροι

Σε μελέτες *in silico* είχε προταθεί ότι η πρωτεΐνη ACE2 των χοίρων (*Sus scrofa domestica*) μπορεί να κάνει δέσμευση με την πρωτεΐνη S του SARS-CoV-2. Επίσης, σε μελέτες που είχαν πραγματοποιηθεί για SARS-CoV είχε επιτευχθεί μόλυνση σε χοίρους. Σε πειραματική μόλυνση των χοίρων με SARS-CoV ανιχνεύτηκε ιικό φορτίο στο αίμα αλλά και ορομετατροπή. Ωστόσο, σε πειραματικές *in vivo* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε χοίρους δείχνουν ότι τα ζώα αυτά δεν είναι ευαίσθητα σε μόλυνση από τον SARS-CoV-2 *in vivo*. Εως τώρα δεν έχουν καταγραφεί παθολογικά ευρήματα και καμία ένδειξη αντιγραφής του ιού σε χοίρους (βλ. Πίνακα 3). Επομένως, οι χοίροι δεν φαίνεται να αντιπροσωπεύουν ένα κατάλληλο ζωικό μοντέλο για το COVID-19.

Πίνακας 3: Πίνακας επιρρότητας σκύλων, χοίρων και κοτόπουλων στον ιό SARS-CoV-2. Shi J. et al. (Science, 2020)

Ζώο	Τρόπος Μόλυνσης	Εντοπισμός ιικού RNA σε ζώα προσβεβλημένα από το στέλεχος CTan-H SARS-CoV-2								Ορομετατροπή, θετικά αποτελέσματα διά του συνόλου
		θετικά αποτελέσματα διά του συνόλου (αντίγραφα log10)								
		Oropharyngeal swab				Ορθικό επίχρισμα				
		2 μέρες μετά τη μόλυνση	4 μέρες μετά τη μόλυνση	6 μέρες μετά τη μόλυνση	Άλλα χρονικά σημεία	2 μέρες μετά τη μόλυνση	4 μέρες μετά τη μόλυνση	6 μέρες μετά τη μόλυνση	Άλλα χρονικά σημεία	
Σκύλος	Εμβολιασμός	0/5	0/5	0/4	0/4	2/5 (6.5, 5.4)	0/5	1/4 (4.2)	0/4	2/4.
	Επαφή	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Χοίρος	Εμβολιασμός	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Επαφή	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Κοτόπουλο	Εμβολιασμός	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Επαφή	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

Παρ' όλα, λόγω της σημασίας τους στον αγροτικό τομέα και του τεράστιου παγκόσμιου αριθμού χοίρων, και βάσει των δεδομένων που προέκυψαν από την *in silico* μελέτη αλλά και τα ευρήματα από μελέτες με άλλους κορονοϊούς, θα

ήταν συνετό να γίνουν και μελέτες για να παρατηρηθεί πιθανή μελλοντική ευαισθησία των χοίρων σε μόλυνση από τον SARS-CoV-2.^{63, 78, 79}

Κοτόπουλα

Σε μελέτη *in silico* είχε μελετηθεί το κοτόπουλο (*Gallus domesticus*) ως είδος ζώου που είναι πιθανό να είναι ευπαθές σε μόλυνση με SARS-CoV-2. Σε αντίθεση με τους χοίρους, σε μελέτες λοίμωξης από τον SARS-CoV σε κοτόπουλα, δεν πραγματοποιήθηκε ούτε αντιγραφή του ιού ούτε ορομετατροπή. Περαιτέρω σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί μέχρι στιγμής δεν έχουν προκύψει ευρήματα που να δηλώνουν ευαισθησία των κοτόπουλων σε μόλυνση από τον SARS-CoV-2 (βλ. Πίνακα 3), και συνεπώς δεν φαίνεται να αντιπροσωπεύουν κατάλληλα υποκείμενα για ανάπτυξη ζωικών μοντέλων για μελέτες λοίμωξης SARS-CoV-2. Όμως, όπως και στους χοίρους, λόγω της υψηλής σημασίας τους στον αγροτικό τομέα η μελέτη της ευαισθησίας των κοτόπουλων ως προς μελλοντικές μεταλλάξεις του ιού θα ήταν συνετή.^{62, 78, 80}

Νυχτερίδες

Το SARS-CoV-2 πιθανώς προήλθε από κοροναϊό που μόλυνε νυχτερίδες. Παρόλο που οι νυχτερίδες δεν χρησιμοποιούνται συνήθως ως υποκείμενα σε ζωικά μοντέλα, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον επειδή φαίνεται να είναι τα καταγόμενα είδη πολλών ιδιαίτερα θανατηφόρων ζωνοσογόνων ιών και επειδή το ανοσοποιητικό τους σύστημα έχει εξελιχθεί για να ανέχεται επίμονες λοιμώξεις από ιούς που εμφανίζουν υψηλότερη λοιμογόνο δύναμη σε άλλα είδη, γεγονός που επιταχύνει την εξέλιξη του ιού.^{81, 82}

Αυτά τα χαρακτηριστικά των νυχτερίδων σημαίνουν ότι οι ζωντανές άγριες νυχτερίδες πρέπει πιθανώς να αποφεύγονται. Ωστόσο, οι μελέτες των κυτταρικών σειρών νυχτερίδων είναι άξιες αναφοράς, καθώς έχουν αποδείξει τους μηχανισμούς μέσω των οποίων το ανοσοποιητικό σύστημα νυχτερίδων ανέχεται τις ιογενείς λοιμώξεις διατηρώντας παράλληλα σωματικές λειτουργίες, οι

οποίες μπορεί να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη διαχείριση της επίμονης λοίμωξης σε σοβαρή COVID-19. Αυτά τα χαρακτηριστικά των νυχτερίδων περιλαμβάνουν μειωμένη επαγωγή των NLRP3 (συντελούν στην ενεργοποίηση της κασπάσης-1, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τις κυτοκίνες IL-1β και IL-18) και συστατική έκφραση της αντιιικής ιντερφερόνης IFN-α (Zhou et al., 2016), συσχετίζοντας αυτούς τους μεσολαβητές ως σημαντικούς για την καταστολή επιβλαβών φλεγμονωδών αντιδράσεων σε ιογενή λοίμωξη ή για την μείωση του ιικού φορτίου.^{83, 84}

Προ-πανδημικές μελέτες που αξιολόγησαν την πιθανή εμφάνιση κοροναϊών που μοιάζουν με SARS σε νυχτερίδες έδειξαν ότι ορισμένοι από αυτούς τους ιούς ήταν σε θέση να χρησιμοποιήσουν για πρόσδεση και είσοδο στο κύτταρο ένζυμα αρκετά όμοια με το ανθρώπινο ACE2..^{81, 85}

Σε μελέτη κατά τη οποία έγινε ενδορινικός εμβολιασμός νυχτερίδων φρούτων (*Rousettus aegyptiacus*) με τον SARS-CoV-2 οδήγησε σε αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό στην άνω αναπνευστική οδό και ορομετατροπή σε επτά από τις εννέα νυχτερίδες. Πραγματοποιήθηκε μετάδοση σε ένα στα τρία ζώα μέσω άμεσης επαφής. Δεν υπήρχαν κλινικά ευρήματα εκτός από εντοπισμό ρινίτιδας μέσω μεθόδων ανοσοϊστολογίας. Σε προηγούμενες μελέτες βρέθηκε ότι ένας κοροναϊός τύπου SARS δεν μπορούσε να αναπαραχθεί σε νυχτερίδες φρούτων μετά από πειραματικό εμβολιασμό. Συμπερασματικά, οι νυχτερίδες *Rousettus* δεν είναι το αρχικό είδος δεξαμενής του SARS-CoV-2, όμως η πειραματική μόλυνση αυτών των νυχτερίδων θα συντελεί στην καλύτερη μοντελοποίηση της φυσιοπαθολογίας του ιού.^{39, 61, 86}

Προτεινόμενες μέθοδοι για τη βελτίωση των ζωικών μοντέλων που αφορούν την παθολογία της ασθένειας Covid-19

Τρόπος χορήγησης του ιού SARS-CoV-2 στα ζώα

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό του ιού στα ζώα μπορεί να επηρεάσει τη σοβαρότητα των μοντέλων ιογενών ασθενειών και έχει χρησιμοποιηθεί μια σειρά οδών εισαγωγής του ιού σε αναφερόμενες μελέτες σε ζώα. Η ενδορινική χορήγηση έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως καθώς αυτή η μέθοδος παράδοσης είναι απλή, είναι πολύ πιθανή η αναρρόφηση του υλικού και επειδή η ενδορινική οδός είναι δυναμικά αντανάκλαστική της πραγματικής διαδρομής εισόδου για τα ιικά σταγονίδια. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμένη χορήγηση στους πνεύμονες, και έχει φανεί πως ιογενείς ασθένειες που επηρεάζουν την κατώτερη αναπνευστική οδό, όπως η COVID-19 μπορεί να προκύψουν από την εισπνοή αερολυμάτων που δύνανται να εισέλθουν βαθύτερα στους πνεύμονες ή από την εκτεταμένη εναπόθεση του ιού στους πνεύμονες λόγω του υψηλού ιικού φορτίου του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος.⁸⁷

Συνεπώς, η αερολυμένη χορήγηση ιού μπορεί να είναι χρήσιμη για την πρόκληση εκτεταμένων επιπλοκών των πνευμόνων, γεγονός το οποίο μπορεί να είναι δυνατό να προκαλέσει σοβαρή νόσο, καθώς και χρήσιμο για την τυποποίηση της δόσης του εμβολιασμού που φθάνει στους κατώτερους αεραγωγούς και τους πνεύμονες. Οι προσεγγίσεις αερολυμένης ή ενδοτραχειακής χορήγησης για ελεγχόμενη χορήγηση ιών μπορεί να είναι άξιες προσοχής σε ζωικά μοντέλα για σοβαρότερες περιπτώσεις COVID-19.^{88, 89}

Προσομοίωση σοβαρής συμπτωματολογίας στα ζώα.

Έχει μελετηθεί η ανάπτυξη φλεγμονής και τραυματισμού των πνευμόνων σε πειραματική λοίμωξη από τον SARS-CoV-2.³⁸ Αυτή η συμπτωματολογία παρατηρείται σπάνια σε ζώα. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται σε τυχαία πρόκληση

τραυματισμού και επειδή η εστίαση των μελετών στην αφορούσε την πρώιμη ιογενή λοίμωξη και μετάδοση. Είναι σημαντικό να μετρώνται στοιχεία της νόσου κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μπορούν να προσδιοριστούν στατιστικά οι επιδράσεις των πιθανών θεραπειών στα συμπτώματα του ARDS (σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας), το οποίο είναι ένα από τα κύρια ευρήματα σε σοβαρές περιπτώσεις COVID-19 στους ανθρώπους . Αρκετές επανεξετάσεις έχουν θεσπίσει σαφή κριτήρια για την αξιολόγηση των παθολογικών χαρακτηριστικών που σχετίζονται με το ARDS σε μοντέλα εργαστηριακών ζώων. Προκειμένου να αποδειχθεί και να μετρηθεί η έκταση του τραυματισμού των πνευμόνων και του ARDS, το ιδανικό πρότυπο είναι η παροχή αποδεικτικών στοιχείων για οπτικό τραυματισμό και φλεγμονή των πνευμόνων, λειτουργική αλλοίωση του κυψελιδικού-τριχοειδούς φράγματος και φυσιολογική δυσλειτουργία όπως αυξημένη διαφορά τάσης κυψελιδικού-αρτηριακού οξυγόνου (μειωμένο PaO_2/FiO_2).^{38, 90, 71}

Δεν έχουν αποδειχθεί ποσοτικοποιημένα αποτελέσματα που αφορούν το ARDS σε ζωικά μοντέλα λοίμωξης από SARS-CoV-2, με εξαίρεση μία μελέτη σε μακάκες όπου το πνευμονικό οίδημα μετρήθηκε σε μολυσμένα ζώα χρησιμοποιώντας το δείκτη βάρους των πνευμόνων ως ποσοστό του σωματικού βάρους. Αυτή η απλή μέθοδος μπορεί να αποδειχθεί μια χρήσιμη τελική προσέγγιση για την εκτίμηση των τραυματισμών των πνευμόνων που είναι εφικτή στις περισσότερες μελέτες εντός των περιορισμών των συνθηκών επιπέδου βιοασφάλειας 3 (BSL3).^{38, 72}

Οι αυξημένες απαιτήσεις ασφαλείας και οι συνθήκες εργασίας του προσωπικού στα εργαστήρια BSL3 και τόσο το μέγεθος των ζώων όσο και η εξέταση της καλής τους μεταχείρισης μπορούν να περιορίσουν τις μετρήσεις που είναι εφικτές στις μελέτες μόλυνσης SARS-CoV-2. Ωστόσο, οι κατά σειρά μετρήσεις του κορεσμού οξυγόνου στο αίμα ή των αρτηριακών αερίων αίματος θα ήταν ιδιαίτερα πολύτιμες για τον καθορισμό της χρονικής πορείας της εξασθένησης της ανταλλαγής αερίων, εάν αυτό συμβαίνει σε ζωικά μοντέλα.³⁸ Είναι αξιοσημείωτο ότι, σε ασθενείς με COVID-19, έχει αναφερθεί μειωμένος κορεσμός

αρτηριακού οξυγόνου πριν από την εμφάνιση δύσπνοιας, και δραματικά μειωμένος κορεσμός που οδηγεί σε νοσηλεία και το PaO_2/FiO_2 μπορεί να παρουσιάσει διακύμανση κατά τη διάρκεια της κλινικής εξέλιξης του COVID-19 και έτσι, όπως και στο κλινικό περιβάλλον, η στενή παρακολούθηση του κορεσμού οξυγόνου είναι ιδανική. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο βαθμός υποξαιμίας και πνευμονίας είναι ενδεικτικός κάποιας νόσου, αλλά αναγκαστικά για τη σοβαρή ARDS σε COVID-19.⁸¹

Είναι σημαντική η εφαρμογή προσεγγίσεων μη επεμβατικής απεικόνισης για την παρακολούθηση της χρονικής πορείας της ανάπτυξης πνευμονικού οιδήματος.³⁸ Ορισμένοι ασθενείς με ARDS που προκλήθηκε από την νόσο COVID-19 έχουν πιο περιορισμένο οίδημα με σοβαρή υποξαιμία, και έτσι πρόσθετες μετρήσεις της αιμάτωσης των πνευμόνων (π.χ. μετρώντας το πνευμονικό κλάσμα νεκρού χώρου) σε ζώα μπορεί επίσης να είναι χρήσιμες για την καλύτερη κατανόηση της νόσου COVID-19.⁹²

Ο σχεδιασμός των μεθόδων των μετρήσεων θα πρέπει να περιλαμβάνει την εξέταση του τρόπου με τον οποίο μπορεί να γίνει ο μέγιστος αριθμός μετρήσεων υψηλής αξίας. Εάν ο εμβολιασμός του ιού μπορεί να επηρεάσει τους πνεύμονες ευρέως και σχετικά ομοιόμορφα, αυτό μπορεί να περιλαμβάνει τη χρήση διαφορετικών λοβών για διαφορετικές μετρήσεις. Για παράδειγμα, η βρογχοκυψελιδική πλύση είναι χρήσιμη για ταυτόχρονες μετρήσεις ιών, φλεγμονωδών κυττάρων, και πρωτεϊνικών εναποθέσεων στους βρογχοκυψελιδικούς χώρους, αλλά δημιουργεί ευρήματα κατά την ιστολογική ανάλυση και αποτρέπει τη μεταγενέστερη μέτρηση του πνευμονικού οιδήματος. Ομοίως, η χρήση φορμαλίνης είναι σημαντική για ιστολογική ανάλυση που μπορεί να πραγματοποιηθεί εκτός συνθηκών BSL3, αλλά αποτρέπει τις πιο άμεσες και ποσοτικές μεθόδους μέτρησης του ιικού φορτίου στους πνεύμονες και το πνευμονικό οίδημα.³⁸ Συνεπώς, οι δύο λοβοί των πνευμόνων μπορούν να αποτελέσουν αντικείμενο δειγματοληψίας για να επιτρέψουν λειτουργικές και ιστολογικές μετρήσεις που σχετίζονται με το ARDS καθώς και το ιικό φορτίο στους πνεύμονες χρησιμοποιώντας τις προαναφερόμενες μεθόδους. Βέβαια

πρέπει να διατηρηθεί μία ισορροπία της πολυπλοκότητας των μελετών και της καλής μεταχείρισης και της ασφάλειας των ζώων στα εργαστήρια.

Η προσομοίωση σοβαρής συμπτωματολογίας είναι ένα σημαντικό κομμάτι στη μελέτη της νόσου COVID-19, καθώς είναι ένα από τα κύρια ζητήματα που απασχολεί τους ερευνητές αλλά και την κοινωνία μας, καθώς, όπως θα συζητηθεί στη συνέχεια, η συννοσηρότητα και άλλοι παράγοντες κινδύνου έχουν σημαντικό ρόλο στην έκβαση της νόσου, και έτσι η κατανόηση της συμπτωματολογίας για περιπτώσεις ασθένειας σε άτομα με υποκείμενες καταστάσεις ή νόσους πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω για την καλύτερη μελλοντική αντιμετώπιση τέτοιων περιστατικών.

Προσεγγίσεις αντιμετώπισης των ζητήματων που προκύπτουν από τις συνθήκες του Επιπέδου Βιοασφάλειας 3

Λόγω του δυνητικά θανατηφόρου χαρακτήρα του ιού SARS-CoV-2 απαιτούνται εργαστήρια βιοασφάλειας 3 (BSL3) για πειράματα που μελετάνε τον ιό. Ωστόσο, μπορούν να μελετηθούν οι μηχανισμοί που οδηγούν στη νόσο COVID-19 σε μη μολυσματικά μοντέλα.⁹³

Ορισμένες απαραίτητες μελέτες των προτεινόμενων θεραπευτικών παραγόντων για τη νόσο COVID-19, ιδιαίτερα εκείνες που στοχεύουν στις ανοσολογικές απαντήσεις του ξενιστή, μπορεί να είναι δυνατές χρησιμοποιώντας μοντέλα που αφορούν πνευμονικό τραυματισμό. Οι ιοί της γρίπης έχουν προσαρμοστεί ώστε να μολύνουν τα κύτταρα ποντικών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πειράματα ιικού επαγόμενου, θανατηφόρου τραυματισμού των πνευμόνων σε ποντίκια σε ευρύτερα διαθέσιμα εργαστήρια BSL2, όπου οι υπό μελέτη μηχανισμοί θα μπορούσαν να μοιραστούν στις αποκρίσεις SARS-CoV-2.³⁸ Ωστόσο, οι ανοσολογικές απαντήσεις στους κοροναϊούς και τη γρίπη δεν είναι οι ίδιες, καθώς για παράδειγμα το η απενεργοποίηση του γονιδίου του συστατικού συμπληρώματος 3 σε ποντίκια είναι επιζήμιο για τα μοντέλα μόλυνσης από γρίπη H1N1 και H5N1, αλλά ευεργετικό σε μοντέλα μόλυνσης SARS-CoV.³⁸ Οι ιικοί ψευδοτύποι που εκφράζουν την πρωτεΐνη ακίδα του SARS-CoV-2 μπορεί επίσης

να είναι χρήσιμοι για *in vitro* και *in silico* μελέτες αντιϊκής αποτελεσματικότητας σε περιβάλλον εκτός BSL3, αν και αυτές δεν θα μοντελοποιήσουν τους μηχανισμούς αποφυγής και την ανοσοπαθολογία που είναι μοναδικές για τους SARS-CoV-2 ή τους σχετιζόμενους κοροναϊούς.^{94, 95, 96}

Υπάρχουν πολλά άλλα μοντέλα που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη του ARDS σε ποντίκια και άλλους οργανισμούς μοντέλων πιο κοντά ανατομικά στον άνθρωπο. Από αυτές, ο τραυματισμός των πνευμόνων που προκαλείται από ενσταλάξεις βακτηρίων ή ενδοτοξινών, εξαερισμού και αντισωμάτων μπορεί να σχετίζεται ιδιαίτερα με τον COVID-19 που περιπλέκεται από δευτερογενείς λοιμώξεις, αντιδράσεις αντισωμάτων και σχετιζόμενες δυσρυθμισμένες αντιδράσεις. Επιπλέον, μπορεί να υπάρχουν κεντρικοί μηχανισμοί εξέλιξης και ανάλυσης ARDS που σημαίνει ότι τα μη ιικά μοντέλα μπορεί να έχουν χρησιμότητα για ταχείες μελέτες εκτός των συνθηκών BSL3, αν και είναι πιθανό ότι σε πολλές περιπτώσεις θα χρειαστούν επίσης μελέτες αποτελεσματικότητας με λοίμωξη SARS-CoV-2.³⁸

Τέλος, όπως έχει προαναφερθεί, οι γάτες εμφανίζουν επιρρέπεια στην μόλυνση από τον ιό, όμως εμφανίζεται η δυσκολία χειρισμού τους σε εργαστήρια επιπέδου BSL3. Για σκοπούς μελέτης της μεταδοτικότητας και μόλυνσης του περιβάλλοντος, για λόγους δημόσιας υγείας πρέπει να ληφθεί υπόψιν το ζήτημα αυτό και να γίνει τροποποίηση των συνθηκών στα εργαστήρια, για να είναι πιο εύκολη η μελέτη μοντέλων γατών στις συνθήκες αυτές.

Το ζήτημα της εφαρμογής μη BSL3 περιβάλλοντος για τη μελέτη του ιού SARS-CoV-2 είναι ένα λεπτό ζήτημα λόγω της επικινδυνότητας του ιού, και πρέπει να ληφθούν υπόψιν και η ασφάλεια των ερευνητών στη μελέτη. Τα θετικά και τα αρνητικά της εφαρμογής τέτοιων συνθηκών πρέπει να αξιολογηθούν και ύστερα να γίνει προμελέτη των μεθόδων έτσι ώστε να υπάρχει ασφάλεια κατά τις εφαρμογές τους.

Προσεγγίσεις για τους παράγοντες κινδύνου της νόσου COVID-19 σε μοντέλα ζώων

Γνωστοί παράγοντες κινδύνου για σοβαρή COVID-19 προσφέρουν ευκαιρίες για την προώθηση μοντέλων προς παθολογικές καταστάσεις. Η προχωρημένη ηλικία, η παχυσαρκία και ο διαβήτης είναι πρόσθετοι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας από κρούσματα COVID-19. Αυτά τα χαρακτηριστικά μπορεί να προδιαθέτουν προς σοβαρές ασθένειες μέσω της επιπλοκής της ιατρικής περίθαλψης, με υποαερισμό ως αποτέλεσμα της χαμηλής καρδιοαναπνευστικής ικανότητας και μέσω δυσρυθμισμένης ανοσίας με ανισορροπία φλεγμονής και μηχανισμών επισκευής, καθώς και τάση για υποκείμενες καρδιαγγειακές παθήσεις και αλλαγές στην αιμόσταση που θα επηρεάσουν την εξέλιξη της αναπνευστικής λοίμωξης προς το ARDS.^{38, 97, 98}

Η χρήση ηλικιωμένων ζώων μπορεί να επιτρέψει τη μοντελοποίηση του παράγοντα κινδύνου ηλικίας. Είναι ενθαρρυντικό υπό αυτό το πρίσμα ότι η πρώιμη ανάπτυξη προκλινικών μοντέλων COVID-19 περιλαμβάνει την επίδραση της ηλικίας στους μακάκους rhesus. Η μόλυνση με SARS-CoV-2 φέρεται να οδήγησε σε αυξημένη παθολογία των πνευμόνων και ιογενή αναπαραγωγή σε ηλικιωμένους μακάκους (15 ετών) σε σύγκριση με νεότερα ζώα (5 ετών). Επιπλέον, τα ηλικιωμένα ποντίκια έχουν προηγουμένως επιδείξει επιδεινωμένη φλεγμονή και τραυματισμό των πνευμόνων μετά τη μόλυνση από SARS-CoV.^{38, 67,99}

Τα ζωικά μοντέλα που απαιτούν γήρανση με την πάροδο των ετών ενδέχεται να μην επιτρέπουν την ταχεία δοκιμή των θεραπειών που απαιτούνται για την πανδημία COVID-19. Μοντέλα που ενσωματώνουν άλλους παράγοντες κινδύνου, όπως η επαγόμενη παχυσαρκία (π.χ. δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά), ο διαβήτης (π.χ. ανεπάρκεια υποδοχέων λεπτίνης), ή μειωμένη ανοσολογική απάντηση μπορεί να διατεθούν πιο γρήγορα. Επιπλέον, η νόσος COVID-19 μπορεί να εξελιχθεί σε σοβαρή κατάσταση νόσου ως αποτέλεσμα της δευτερογενούς λοιμώξεως, ή επακόλουθες ενδοαγγειακές βλάβες, και έτσι συνδυάζοντας μοντέλα μόλυνσης SARS-CoV-2 με ένα πρώτο ή δεύτερο χτύπημα, όπως η προετοιμασία του ανοσοποιητικού συστήματος με

λιποπολυσακχαρίτες (LPS) ή άλλες παρεμβολές, όπως οι προσεγγίσεις για την πρόκληση πνευμονικού τραυματισμού που δεν είναι BSL3 (δηλαδή εμβολιασμός με παθογόνα βακτήρια ή ενέσεις επιβλαβών αντισωμάτων) μπορεί να οδηγήσει τις αντιδράσεις του ξενιστή προς μια πιο έντονη παθολογική κατάσταση.^{38, 100, 101}

Η εφαρμογή τέτοιων παραγόντων στη μελέτη του ιού SARS-CoV-2 με τη χρήση ζωικών μοντέλων θα συντελέσει στην καλύτερη κατανόηση των επιπτώσεων της σοβαρής νόσου στους ανθρώπους, και παρά την πιθανή χρηματική και χρονική επιβάρυνση που θα προκαλέσουν τέτοιες μελέτες, είναι σημαντικές για την βελτιστοποίηση των ήδη υπάρχοντων μοντέλων για την προσομοίωση σοβαρής έκφρασης της νόσου COVID-19

[Αιμοπεταλιοαπόκριση, παθήσεις της πήξης και υπερφλεγμονή](#)

Η σοβαρή έκφραση της νόσου COVID-19 συνδέεται με χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων και θρόμβωση, διαταραχή της πήξης, και υπερφλεγμονώδη κατάσταση που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, την απελευθέρωση των ουδετερόφιλων εξωκυτταρικών παγίδων (NETs), και παρατεταμένες συστηματικές αυξήσεις κυτοκινών.¹⁰²

Ο βαθμός της θρομβοκυταροπενίας σε μελέτες συσχετίζεται με την έκφραση σοβαρής νόσου COVID-19. Σε μία μελέτη αποκαλύφθηκε ότι ο βαθμός θρομβοκυταροπενίας είναι υψηλής σημασίας, με τη μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων να είναι προγνωστική της θνησιμότητας σε μεταγενέστερο επίπεδο. Επιπλέον, μεταβολή στην αναλογία αιμοπεταλίων-λεμφοκυττάρων μπορεί να υποδηλώνει την εμφάνιση οξέος φλεγμονώδους ή θρομβωτικού επεισοδίου, και έτσι να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης για την έκβαση της νόσου. Άλλες ασθενείς με χαρακτηριστικά όμοια της παθολογίας της νόσου COVID-19 υποδεικνύουν τον ρόλο αιμοπεταλίων ως προς την χειρότερη έκβαση της νόσου, γεγονός που μπορεί επομένως να παρέχει ευκαιρίες για την υιοθέτηση πιο σοβαρών μηχανιστικών μοντέλων σοβαρής COVID-19.^{38, 103, 104,}

Σε μελέτες ποντικών για τη μοντελοποίηση της influenza επικυρώνουν την σημασία των αιμοπεταλίων στην ανοσολογική απόκριση και φλεγμονή. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια ανταποκρίνονται στον ιό της γρίπης, αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα του συμπληρώματος και την απελευθέρωση των NETs στο αίμα.³⁸ Με αυτό τον τρόπο τα αιμοπετάλια μπορεί να έχουν σημαντικό ρόλο στην σύνδεση της ιογενούς λοίμωξης με τις αποκρίσεις ουδετερόφιλων, οι οποίες σχετίζονται με την πήξη και τη φλεβική θρόμβωση. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια σχετίζονται με τη φλεγμονή των πνευμόνων. Βέβαια πρέπει να γίνουν περεταίρω μελέτες πάνω στην επιρροή των παραγόντων πήξης στον SARS-CoV-2 για να επιβεβαιωθεί αν ισχύουν οι συσχετίσεις αυτές για τον ιό αυτό.^{106, 107, 108}

Επίσης, εξ' αιτίας της σημασίας των αιμοπεταλίων στις διαταραχές της πήξης και της συσχέτισης χαμηλών αιμοπεταλίων με έκβαση σοβαρής νόσου, ο πειραματισμός με τα αιμοπετάλια εικάζεται ότι μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο πειραματικό εργαλείο για την αναπαραγωγή αυτών των παθολογικών συμβάντων σε ζωικά μοντέλα μόλυνσης από SARS-CoV-2. Σε μια μελέτη βρέθηκε ότι η θρομβοκυτταροπενία μπορεί να μετατρέψει μια ήπια βακτηριακή λοίμωξη των πνευμόνων σε μια πιο σοβαρή μορφή συστηματικής λοίμωξης, με περεταίρω επιρροή άλλων οργάνων και θάνατο. Παρόμοια μέθοδος μπορεί να πραγματοποιηθεί και για τον ιό SARS-CoV-2, επάγοντας θρομβοπενία σε ζωικά μοντέλα για να προσομοιωθεί την έκβαση πιο σοβαρής έκφρασης της νόσου.¹⁰⁹ Η μείωση των αιμοπεταλίων στους πνεύμονες μπορεί να προκληθεί μέσω χορήγησης αντισωμάτων anti-MHC-I, τα οποία σχετίζονται με θρομβοκυτταροπενία και απελευθέρωση NETs. Η χρήση αυτών των αντισωμάτων σε πειραματικά μοντέλα μπορεί να βοηθήσει στην έρευνα όσον αφορά τη συμβολή των αιμοπεταλίων και των NETs στην νόσο COVID-19, ειδικά σε περιπτώσεις παρατηρείται μειωμένη αιμάτωση των πνευμόνων, απελευθέρωση των NETs και παραγωγή αυτοαντισωμάτων^{38, 110, 111}

Στον τομέα της ανάπτυξης θεραπευτικών παραγόντων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ηπαρίνη ή ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους, τα οποία δείχνουν μειωμένη θνησιμότητα σε κλινικές μελέτες COVID-19. Παρόλο που η

ηπαρίνη χρησιμοποιείται κλασικά ως αντιπηκτικό, έχει επίσης αποδειχθεί ότι δεσμεύει και μειώνει τη δραστηριότητα μιας σειράς κυτοκινών που εμπλέκονται στην καταιγίδα κυτοκινών που σχετίζεται με τη νόσο COVID-19 και επίσης αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη SARS-CoV-2 Spike με τρόπο που προκαλεί δομική αλλοίωση του τομέα σύνδεσης ACE2 που είναι πιθανό να μειώσει την ιογενή είσοδο. Αυτές οι ιδιότητες της ηπαρίνης απαιτούν in vitro μοντέλα SARS-CoV-2 στις οποίες θα πραγματοποιούνται μετρήσεις όσον αφορά τη πήξη, τις κυτοκίνες και το ιικό φορτίο για την καλύτερη αξιολόγηση της ως θεραπευτικός παράγοντας. Μελέτη του σε ζωικά μοντέλα, και ειδικά η χορήγησή της σε νεφελοποιημένη μορφή, που σε άλλες σοβαρές αναπνευστικές παθήσεις έχει φανεί ότι συντελεί στην μειωμένες απαιτήσεις ως προς την υποβοήθηση της αναπνοής, μπορεί να οδηγήσει σε νέες προόδους ως προς την περίθαλψη των σοβαρά προσβεβλημένων από τη νόσο.^{112, 113, 114}

Η σοβαρότητα της νόσου COVID-19 συσχετίζεται επίσης όχι μόνο με τον αριθμό των αιμοπεταλίων, αλλά και με τα επίπεδα των προφλεγμονωδών μεσολαβητών όπως το CXCL10 (IFN-inducible protein 10) και το TNFα, και τα δύο σχετίζονται με την παθολογία και την εξέλιξη που σχετίζονται με την υπερφλεγμονώδη κατάσταση που σχετίζεται με το ARDS.³⁸ Η βελτίωση της φλεγμονής των πνευμόνων που προκαλείται από LPS μετά την εξουδετέρωση του CXCL10 σε αρουραίους και η πρόταση θεραπείας κατά του TNFα σε ασθενείς με COVID-19, αναδεικνύουν επομένως τη δυνατότητα συνδυασμού λοιμώξεων SARS-CoV-2 με τα TNFα και CXCL10 ως μία περαιτέρω μέθοδο ανάπτυξης μοντέλων με πιο σοβαρό φαινότυπο.^{113, 115}

Σε μελέτες ποντικών για την κυστική ίνωση παρατηρήθηκαν αυξημένα αιμοπετάλια καθώς και υπερφλεγμονή των πνευμόνων. Αυτά τα στοιχεία, αν και οι έως τώρα μελέτες για την επίδραση της COVID-19 σε ασθενείς με κυστική ίνωση είναι ασαφής λόγω των χαμηλών αναφερόμενων περιστατικών μόλυνσης από SARS-CoV-2 σε άτομα που πάσχουν από την ασθένεια αυτή, δηλώνουν πως είναι δυνατή η επιδείνωση της κατάστασης του ασθενούς, όμως χρειάζονται

περεταίρω μελέτες για αυτή την ιδιαίτερη περίπτωση για να δοθούν ακριβείς απαντήσεις.^{116,117}

Χρονική πορεία παρεμβάσεων σε σχέση με την εξέλιξη της νόσου

Έχει επικριθεί η υπερβολική χρήση της προληπτικής εφαρμογής παρεμβάσεων σε μελέτες ζώων, αφού τέτοιες προσεγγίσεις δεν θα ήταν ρεαλιστικές για κλινικές θεραπείες ανθρώπων. Η σοβαρή COVID-19 έχει μια χαρακτηριστική πορεία που υποδηλώνει ότι υπάρχουν πολλά σημεία στα οποία μπορεί να είναι χρήσιμες διαφορετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις. Οι χρήστες ζωικών μοντέλων για την έρευνα COVID-19 θα πρέπει, όπου είναι δυνατόν, να εξετάζουν τον τύπο της θεραπείας που αξιολογείται, τη δυνατότητα κινδύνου για τους ασθενείς από τυχόν αναμενόμενες ανεπιθύμητες αντιδράσεις και κατά πόσον η παρέμβαση είναι πιθανό να χρειαστεί να πραγματοποιηθεί σε νοσοκομειακό περιβάλλον.³⁹ Καθώς αυξάνεται ο ιικός πολλαπλασιασμός, η πιθανότητα μετάδοσης και η επίμονη μόλυνση μεσολαβούν σε σοβαρές ασθένειες, επομένως τα αντιϊικά με χαμηλή τοξικότητα μπορεί να είναι χρήσιμα για όλες τις διαγνωσμένες περιπτώσεις και ίσως ακόμη και προληπτικά σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου. Ορισμένες παρεμβάσεις όπως η νεφελοποιημένη ηπαρίνη μπορεί να είναι επωφελείς ως αντιϊικοί παράγοντες και στη μείωση της φλεγμονώδους αντίδρασης, και μπορεί να χρειαστεί να χορηγηθούν σε διαφορετικούς χρόνους κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου COVID-19. Μόλις αναπτυχθεί σοβαρή ασθένεια, οι παρεμβάσεις που αποσκοπούν στην επίλυση του ARDS και των συστημικών επιπλοκών θα ήταν χρήσιμες και οι ισχυρές προκλινικές δοκιμές μπορεί να απαιτούν μοντέλα που περιλαμβάνουν στοιχεία της εντατικής υποστήριξης. Θα απαιτηθεί προσεκτικός έλεγχος των μοντέλων για τον προσδιορισμό ανάλογων φάσεων ανάπτυξης παθολογίας σε ζωικά μοντέλα και για τον σωστά επιλεγμένο χρόνο παρεμβάσεων για μελέτη των υποκειμένων.^{114, 118, 119, 120}

Ευρήματα μελετών σημαντικά για το μέλλον

Από τότε που το SARS-CoV-2 εμφανίστηκε στον ανθρώπινο πληθυσμό στα τέλη του 2019, έχει εξαπλωθεί μέσω μετάδοσης από άνθρωπο σε άνθρωπο στις περισσότερες χώρες του κόσμου, οδηγώντας σε μια πανδημία κοροναϊού πρωτοφανούς κλίμακας. Όπως έχει αναφερθεί, έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες που δείχνουν ότι σε ορισμένα από τα ζωικά μοντέλα μπορεί να αναπαραχθεί αποτελεσματικά ο ιός αλλά και να φέρει παθογόνο δράση σε αυτά.

Σε μία *in silico* έρευνα, η οποία μελετούσε την δομή της πρωτεΐνης ακίδας του SARS-CoV-2, η ανάλυση έδειξε ότι αν και υπάρχει συγγένεια της πρωτεΐνης ακίδας με τον υποδοχέα ACE2 (ειδικά εκείνες του σκύλου, του κοτόπουλου και του χοίρου), τα ευρήματα αυτά δεν συνάδουν με τη σχετική φυσική αντίσταση των αντίστοιχων ειδών στο SARS-CoV-2. Σε μια άλλη μελέτη έγινε πρόβλεψη του εύρους ξενιστών του SARS-CoV-2 μέσω μιας συγκριτικής δομικής ανάλυσης του ACE2 σε ζώα, όπου και πάλι υπήρχαν μερικές διαφορές μεταξύ των *in silico* ευρημάτων με τα εργαστηριακά πειράματα. Έτσι υποδηλώνεται ότι η ευαισθησία σε λοίμωξη από τον SARS-CoV-2 ενδέχεται να είναι πολυπαραγοντική.^{80, 121}

Σημαντική είναι η αξιολόγηση του εάν η μίμηση ανθρώπινης συννοσηρότητας, συν-λοιμώξεων ή η ανοσολογική γήρανση που σχετίζεται με την ηλικία σε ζωικά μοντέλα μπορεί να οδηγήσει σε πιο σοβαρούς φαινοτύπους της νόσου. Τα ζωικά μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί ήταν επίσης πολύτιμα για τον έλεγχο εμβολίων και φαρμάκων.^{68, 69, 122, 123}

Πολλές από τις μελέτες παθογένεσης που έχουν περιγραφεί έχουν επίσης επισημάνει ένα σημαντικό εύρημα στην έρευνα COVID-19, οι οποίες είναι οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της αντιγραφής του ιού. Κατά τις μελέτες διαπιστώθηκε ότι οι αριθμοί αντιγράφων RNA του ιού ή του γονιδιώματος που μετρήθηκαν με ποσοτικούς προσδιορισμούς PCR ήταν τρεις έως τέσσερις τάξεις μεγέθους υψηλότεροι από τις τιτλοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν με προσδιορισμούς κυτταρικής καλλιέργειας και συνεπώς επισημάνθηκε ότι

συνδυάζοντας τις δύο μεθόδους είναι μια αναγκαία προσέγγιση για την ορθή αξιολόγηση της αποβολής του ιού από τα κύτταρα-ξενιστές και της μεταδοτικότητας των ιών.³⁹

Σε μελέτες έχει προταθεί ότι οι κοροναϊοί ενδέχεται να φέρουν κίνδυνο αναπνευστικής νόσου λόγω εμβολιασμού ή ενίσχυση της εισόδου και αντιγραφής των ιών σε κύτταρα που φέρουν τον υποδοχέα Fc λόγω αυξημένων αντισωμάτων. Αυτά τα φαινόμενα έχουν συνδεθεί με εμβόλια που λόγω αυτών παράχθηκαν σημαντικά επίπεδα μη εξουδετερωτικών αντισωμάτων ή ανοσοαποκρίσεων με μειωμένη παραγωγή βοηθητικών CD4 T κυττάρων τύπου 2. Επομένως, η είναι σημαντική η αξιολόγηση της εξουδετερωτικής και της δεσμευτικής δραστηριότητας και η διερεύνηση αποκρίσεων με μειωμένη παραγωγή CD4 T κυττάρων μέσω παραγωγής κυτοκινών και των αποκρίσεων των αντισωμάτων. Για να διασφαλιστεί ότι τέτοια μοντέλα είναι σε θέση να παρέχουν αυτές τις μετρήσεις, είναι σημαντικό να γίνουν μελέτες με πρόκληση αυξημένης αναπνευστικής νόσου που σχετίζεται με το εμβόλιο σε μοντέλα πρόκλησης COVID-19 χρησιμοποιώντας υποβέλτιστες δόσεις υποψήφιων εμβολίων ή αντιγονικών παρασκευασμάτων με στόχο την πρόκληση της προς μελέτη ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού και παθολογίας των πνευμόνων.¹²⁴

Συμπεράσματα

Υπάρχουν πολλά ζωικά μοντέλα που οι ερευνητές μπορούν να χρησιμοποιήσουν για να διερευνήσουν την νόσο COVID-19 και τις διάφορες ιδιαιτερότητές της, όπως τη παθολογία, της μετάδοση και των αποκρίσεων των ξενιστών προς τον ιό SARS-CoV-2. Στο μέλλον για να μπορεί να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ των διάφορων μελετών θα πρέπει να γίνει τυποποίηση των πρωτοκόλλων. Επίσης απαιτούνται μοντέλα ζώων για την αξιολόγηση των ανεπιθύμητων αντιδράσεων που σχετίζονται με τα εμβόλια. Λόγω των πολλών κλινικών δοκιμών που πραγματοποιούνται για τη δοκιμή πολλών υποψήφιων προληπτικών και

θεραπευτικών παραγόντων σε ανθρώπους, δίνεται η ευκαιρία να γίνει αξιολόγηση και εν συνεχεία να βελτιωθούν τα ζωικά μοντέλα για τον ιό.

Ενώ πολλές χρήσιμες παρατηρήσεις έχουν ήδη κοινοποιηθεί³⁹, είναι σημαντικό οι μελέτες σε ζώα να προσαρμόζονται για τη μέτρηση και την αναφορά βασικών στοιχείων που σχετίζονται με τη κλινική εικόνα της ασθένειας COVID-19, όπως ενδείξεις πνευμονικής βλάβης που μοιάζει με ARDS, διαταραχή ανταλλαγής αερίων, υπερφλεγμονή, αποκρίσεις αιμοπεταλίων και διαταραχές πήξης. Οι τρόποι διεξαγωγής των μελετών μπορεί να χρειαστεί να αλλάξουν ενσωματώνοντας πρόσθετους παράγοντες κινδύνου ή παράγοντες που προκαλούν ασθένειες για να μεταβούν από τη μοντελοποίηση προστατευτικής και αυτοθεραπευόμενης λοίμωξης και φλεγμονής στην αναπαραγωγή σοβαρής νόσου με ARDS και ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων. Είναι επομένως σημαντική η ανάπτυξη μοντέλων που αναπαράγουν αυτά τα στοιχεία της νόσου, καθώς θα είναι δυνατή η καλύτερη κατανόηση της παθογένειας COVID-19 αλλά και θα βοηθήσει στη τη μελέτη της αποτελεσματικότητας των θεραπειών που χρειάζονται στην πανδημία που επικρατεί.

Ένα σημαντικό σημείο που πρέπει να συζητηθεί είναι η χρήση των ποντικών στο εργαστήριο. Αν και το συγκεκριμένο ζώο δεν είναι επιρρεπής σε μόλυνση από τον SARS-CoV-2, λόγω της υψηλής ομοιότητας που έχει το ανοσοποιητικό σύστημα του ποντικού με τον άνθρωπο, και εξ' αιτίας της ευκολίας διαχείρησής τους στο εργαστήριο αλλά και των άλλων πλεονεκτημάτων που φέρουν για τις εργαστηριακές μελέτες, ήταν αναγκαία η τροποποίηση των μοντέλων έτσι ώστε να είναι δυνατή η μόλυνσή τους. Αυτές οι μέθοδοι απαιτούν περαιτέρω δαπάνες και χρόνο για τις μελέτες. Επιλογή άλλων ζώων που φέρουν όμοια πλεονεκτήματα για εργαστηριακές έρευνες αλλά και γίνεται επιτυχημένη λοίμωξη σε αυτά θα είναι συνετή για μελλοντικές μελέτες, όχι μόνο για τον SARS-CoV-2, αλλά και για άλλους μικροοργανισμούς υπό μελέτη.

Σε άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν *in silico* για τα κουνάβια, τους σκύλους, τους χοίρους και τα κοτόπουλα), υπήρχαν διαφορές στα ευρήματα των

μελετών αυτών όσον αφορά την επιρρέπεια των ζώων στον ιό απ' ότι στις εργαστηριακές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν. Αυτό δηλώνει πως οι δυνατότητες της εφαρμογής της πληροφορικής σε αυτόν τον τομέα χρειάζεται πολλές ακόμα βελτιώσεις έτσι ώστε να είναι αξιόπιστες, καθώς όπως προαναφέρθηκε η ευαισθησία στην μόλυνση από τον ιό είναι πολυπαραγοντική, και γι' αυτό το λόγο ποτέ δεν πρέπει να εφαρμόζονται μόνες τους οι μέθοδοι αυτοί χωρίς περαιτέρω έρευνες στον εργαστηριακό χώρο.

Τέλος, να σημειωθεί ότι τα μοντέλα ζώων τα οποία δεν έφεραν σημαντικές πληροφορίες ως προς την παθογένεια του ιού δεν πρέπει να διαγράφονται τελείως, καθώς μπορούν ακόμα να γίνουν μελέτες πάνω στην μεταδοτικότητα του ιού στα ζώα αυτά (δηλαδή τους χοίρους, κοτόπουλα και σκύλους) λόγω της σημασίας τους για τον γενικό πληθυσμό και τον κίνδυνο που τίθεται στην δημόσια υγεία, εφ' όσον τα κατοικίδια και τα οικόσιτα ζώα αν δύνανται να μεταδώσουν την ασθένεια στον άνθρωπο ή εάν μπορούν να νοσήσουν, θα τεθεί και σε κίνδυνο ο ανθρώπινος πληθυσμός λόγω της στενής σχέσης του με τα ζώα αυτά.

Βιβλιογραφία

1. Wertheim JO, et al. (Journal of Virology, 2013). "A case for the ancient origin of coronaviruses"
2. Woo PC, et al. (Journal of Virology, 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".
3. Huynh J, et al. (Journal of Virology, 2012). "Evidence supporting a zoonotic origin of human coronavirus strain NL63".
4. Pfefferle S, et al. (Emerging Infectious Diseases, 2009). "Distant relatives of severe acute respiratory syndrome coronavirus and close relatives of human coronavirus 229E in bats, Ghana".
5. Forni D, et al. (Trends in Microbiology, 2017). "Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes".
6. Vijaykrishna D, et al. (Journal of Virology, 2007). "Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses".
7. Bidokhti MR, et al. (The Journal of General Virology, 2013). "Evolutionary dynamics of bovine coronaviruses: natural selection pattern of the spike gene implies adaptive evolution of the strains".
8. Vijgen L, et al. (Journal of Virology, 2005). "Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event"
9. Lau SK, et al. (Journal of Virology, 2011). "Molecular epidemiology of human coronavirus OC43 reveals evolution of different genotypes over time and recent emergence of a novel genotype due to natural recombination".
10. McIntosh K. (1974). "Coronaviruses: A Comparative Review".
11. Lalchandama K (Science Vision, 2020). "The chronicles of coronaviruses: the bronchitis, the hepatitis and the common cold".

12. Kahn JS, McIntosh K (The Pediatric Infectious Disease Journal, 2005). "History and recent advances in coronavirus discovery".
13. Kendall EJ, et al. (British Medical Journal 1962). "Virus isolations from common colds occurring in a residential school".
14. Almeida JD et al. (Journal of General Virology, 1967). "The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture".
15. McIntosh K, et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., 1967). "Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease".
16. De Groot RJ, et al. (2011). "Family Coronaviridae".
17. Almeida JD, et al. (Nature, 1968). "Virology: Coronaviruses"
18. Lai MM, Cavanagh D (Advances in Virus Research 1997). "The molecular biology of coronaviruses".
19. Lalchhandama K (Science Vision, 2020). "The chronicles of coronaviruses: the electron microscope, the doughnut, and the spike"
20. Neuman BW, et al. (Journal of Structural Biology, 2011). "A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology"
21. Schoeman D, Fielding BC (Virology Journal, 2019). "Coronavirus envelope protein: current knowledge".
22. Alsaadi EA, Jones IM (Future Virology, 2019). "Membrane binding proteins of coronaviruses".
23. Masters PS (Advances in Virus Research, 2006). "The molecular biology of coronaviruses".
24. Lalchhandama K (Science Vision, 2020). "The chronicles of coronaviruses: the electron microscope, the doughnut, and the spike".
25. De Groot RJ, et al. "Family Coronaviridae".
26. Woo PC, et al. (Viruses, 2010). "Coronavirus genomics and bioinformatics analysis".
27. Fehr AR, Perlman S (2015). "Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis".

28. Cui J, et al. (Nature Reviews. Microbiology, 2019). "Origin and evolution of pathogenic coronaviruses".
29. Murphy FA, et al. (Boston Academic Press, 1999). "Veterinary Virology".
30. Fenner's Veterinary Virology (2017).
31. Machhi J, et al. (Journal of Neuroimmune Pharmacology, 2020). "The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections".
32. Aronson JK (Centre for Evidence-Based Medicine, Nuffield Department of Primary Care Health Sciences, 25 March 2020). "Coronaviruses – a general introduction".
33. Gu H, et al. (Virus Evolution, 2020). "Multivariate analyses of codon usage of SARS-CoV-2 and other betacoronaviruses".
34. Lu, et al. (Lancet, 2020). "Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding."
35. Verity, R. et al. (Lancet, 2020). "Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis."
36. Tang, D., et al. (PLoS Pathogens, 2020). "The hallmarks of COVID-19 disease."
37. Johns Hopkins University, "COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE)"
38. Cleary S. J. et al. (British Pharmacological Society, 2020). "Animal models of mechanisms of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 pathology."
39. César Muñoz-Fontela, et al. (Nature, 2020). "Animal models for COVID-19"
40. Masopust D. et al. (Journal of Immunology, 2017), "Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using Mice to Understand Human Immunology"
41. Kenneth H. et al. (Nature, 2020). "A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures"

42. McCray Jr. P. B. et al. (Journal of Virology, 2007), “Lethal Infection of K18-hACE2 Mice Infected with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus”
43. Chien-Te K. T. et al. (Journal of Virology, 2007), „Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection of Mice Transgenic for the Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 Virus Receptor”
44. Bao L et al. (Nature, 2020), “The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice”
45. Rathnasinghe R. et al. (Emerging Microbes & Infections, 2020), “Comparison of Transgenic and Adenovirus hACE2 Mouse Models for SARS-CoV-2 Infection”
46. Zheng J. et al. (Nature, 2021), “K18-hACE2 Mice for Studies of COVID-19 Treatments and Pathogenesis Including Anosmia”
47. Pascal K. E. et al. (P.N.A.S., 2015), “Pre- and postexposure efficacy of fully human antibodies against Spike protein in a novel humanized mouse model of MERS-CoV infection”
48. Shi-Hui Sun et al. (Cell Host & Microbe, 2020), “A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis”
49. Hassan A. O. et al. (Cell, 2020), “A SARS-CoV-2 Infection Model in Mice Demonstrates Protection by Neutralizing Antibodies”
50. Israelow B. et al. (Journal of Experimental Medicine, 2021), “Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling”
51. Frias-Staheo N. et al. (Journal of Virology, 2014), “Utility of Humanized BLT Mice for Analysis of Dengue Virus Infection and Antiviral Drug Testing”
52. Price A. et al. (Cell Reports, 2020), “Transcriptional Correlates of Tolerance and Lethality in Mice Predict Ebola Virus Disease Patient Outcomes”

53. Ackermann M, et al. (New England Journal of Medicine, 2020), "Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19"
54. Miao J. et al. (Frontiers in Immunology, 2019), "Syrian Hamster as an Animal Model for the Study on Infectious Diseases"
55. Chan J. et al. (Clinical Infectious Diseases, 2020), "Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility"
56. Osterrieder N. et al. (Viruses, 2020), "Age-Dependent Progression of SARS-CoV-2 Infection in Syrian Hamsters"
57. Coffman R. L. et al. (P.N.A.S., 2020), "Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development"
58. Chan J. F-W. et al. (Clinical Infectious Diseases, 2020), "Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility"
59. Sia S. F et al. (Nature, 2020), "Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters"
60. Rogers T. F. et al. (Science, 2020), "Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model"
61. Blanco-Melo D. et al. (Cell, 2020), "Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19"
62. Schlottau K. et al. (The Lancet Microbe, 2020), "SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study"
63. Shi J. et al. (Science, 2020), "Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2"
64. Richard M. et al. (Nature Communications, 2020), "SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets"

65. Chandrashekar A. et al. (Science, 2020), "SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques"
66. Rockx B. et al. (Science, 2020), "Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model"
67. Yu P. et al. (Animal Models and Experimental Medicine, 2020), "Age-related rhesus macaque models of COVID-19"
68. Yu J. et al. (Science, 2020), "DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques"
69. Gao Q. et al. (Science, 2020), "Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2"
70. Curtis M. J. et al. (B.J.P., 2018), "Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers"
71. Matute-Bello G. et al. (American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2009), "An Official American Thoracic Society Workshop Report: Features and Measurements of Experimental Acute Lung Injury in Animals"
72. Munster V. J. et al. (Nature, 2020), "Respiratory disease and virus shedding in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2"
73. Wu F. et al. (2020), "Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications"
74. Shi Z. et al. (Virus Research, 2007), "A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus"
75. Gillim-Ross L. et al. (Journal of Clinical Microbiology, 2004), "Discovery of Novel Human and Animal Cells Infected by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus by Replication-Specific Multiplex Reverse Transcription-PCR"
76. Oreshkova N. et al. (Europe's journal on infectious disease surveillance, epidemiology, prevention and control, 2020), "SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020"
77. C.D.C. (2022), "Animals and COVID-19"

78. Halfmann P. J. et al. (New England Journal of Medicine, 2020), "Transmission of SARS-CoV-2 in Domestic Cats"
79. Weingartl H. M. et al. (Emerging Infectious Diseases, 2004), "Susceptibility of Pigs and Chickens to SARS Coronavirus"
80. Veljkovic V. et al. (F1000 Research, 2020), "Use of the informational spectrum methodology for rapid biological analysis of the novel coronavirus 2019-nCoV: prediction of potential receptor, natural reservoir, tropism and therapeutic/vaccine target"
81. Andersen K. G. et al. (Nature Medicine, 2020), "The proximal origin of SARS-CoV-2"
82. Brook C. E. et al. (eLife, 2020), "Accelerated viral dynamics in bat cell lines, with implications for zoonotic emergence"
83. Ahn M. et al. (Nature Microbiology, 2019), "Dampened NLRP3-mediated inflammation in bats and implications for a special viral reservoir host"
84. Zhou P. et al. (P.N.A.S., 2016), "Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of IFN- α in bats"
85. Menachery V. D. et al. (Nature Medicine, 2015), "A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence"
86. Doremalen N. V. et al. (Viruses, 2018), "SARS-Like Coronavirus WIV1-CoV Does Not Replicate in Egyptian Fruit Bats (*Rousettus aegyptiacus*)"
87. Su X. et al. (Experimental Lung Research, 2004), "Direct Visual Instillation as a Method for Efficient Delivery of Fluid Into the Distal Airspaces of Anesthetized Mice"
88. Wonderlich E. R. et al. (J. Immunol., 2017), "Widespread Virus Replication in Alveoli Drives Acute Respiratory Distress Syndrome in Aerosolized H5N1 Influenza Infection of Macaques"
89. Lexmond A. J. et al. (Springer, 2018), "A novel method for studying airway hyperresponsiveness in allergic guinea pigs in vivo using the PreciseInhale system for delivery of dry powder aerosols"

90. Aeffner F. et al. (Toxic Pathology, 2015), "Mouse Models of Acute Respiratory Distress Syndrome: A Review of Analytical Approaches, Pathologic Features, and Common Measurements"
91. Cascella M. et al. (StatPearls, 2022), "Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus"
92. Carla A. et al. (Respiratory Research, 2020), "Acute respiratory distress syndrome subphenotypes and therapy responsive traits among preclinical models: protocol for a systematic review and meta-analysis"
93. CDC (2021), "Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)"
94. O'Brien K. B. et al. (PlosOne, 2011), "A Protective Role for Complement C3 Protein during Pandemic 2009 H1N1 and H5N1 Influenza A Virus Infection"
95. Gralinski L. E. et al. (mBio, 2018), "Complement Activation Contributes to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Pathogenesis"
96. Hoffmann M. et al. (Cell, 2020), "SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor"
97. Onder G. et al. (Jama, 2020), "Case-Fatality Rate and Characteristics of Patients Dying in Relation to COVID-19 in Italy"
98. Sattar N. et al. (Circulation, 2020), "Obesity Is a Risk Factor for Severe COVID-19 Infection"
99. Rockx B. et al. (Journal of Virology, 2009), "Early Upregulation of Acute Respiratory Distress Syndrome-Associated Cytokines Promotes Lethal Disease in an Aged-Mouse Model of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection"
100. Paul W. et al. (British Journal of Pharmacology, 2009), "Increased platelet aggregation in vivo in the Zucker Diabetic Fatty rat: differences from the streptozotocin diabetic rat:"

101. Frieman M. B. et al. (P.L.O.S. Pathogens, 2010), "SARS-CoV Pathogenesis Is Regulated by a STAT1 Dependent but a Type I, II and III Interferon Receptor Independent Mechanism"
102. Bikdeli B. et al. (Journal of the American College of Cardiology, 2020), "COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up: JACC State-of-the-Art Review"
103. Liu Y. et al. (Platelets, 2020), "Association between platelet parameters and mortality in coronavirus disease 2019: Retrospective cohort study"
104. Amgalan A. et al. (Wiley Public Health Emergency Collection, 2020), "Exploring possible mechanisms for COVID-19 induced thrombocytopenia: Unanswered questions"
105. Qu R. et al. (Journal of Medical Virology, 2020), "Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19"
106. Koupenova M. et al. (Nature Communications, 2019), "The role of platelets in mediating a response to human influenza infection"
107. Weyrch A. S, Zimmerman G. A. (Annual Review of Physiology, 2013), "Platelets in Lung Biology"
108. Campbell R. A. et al. (Blood, 2019), "Human megakaryocytes possess intrinsic antiviral immunity through regulated induction of IFITM3"
109. Amison R. T. et al. (ATS Journals, 2017), "Platelet Depletion Impairs Host Defense to Pulmonary Infection with *Pseudomonas aeruginosa* in Mice"
110. Cadrillier A. et al. (Journal of Clinical Investigation, 2012), "Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury"
111. Zhang Y. et al. (New England Journal of Medicine, 2020), "Coagulopathy and Antiphospholipid Antibodies in Patients with Covid-19"

112. Ashoor T. M. et al. (Korean Journal of Anesthesiology, 2020), "Nebulized heparin and salbutamol versus salbutamol alone in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring mechanical ventilation: a double-blind randomized controlled trial"
113. Tang N. et al. (Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2020), "Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy"
114. Courtney M-W. et al. (University of Liverpool Repository, 2022), "The 2019 coronavirus (SARS-CoV-2) surface protein (Spike) S1 Receptor Binding Domain undergoes conformational change upon heparin binding"
115. Lang S. et al. (P.L.O.S. One, 2017), "CXCL10/IP-10 Neutralization Can Ameliorate Lipopolysaccharide-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome in Rats"
116. Colombo C. et al. (TheLancet, 2020), "Impact of COVID-19 on people with cystic fibrosis"
117. Ortiz-Muñoz G. et al. (Journal of Clinical Investigation), "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction in platelets drives lung hyperinflammation"
118. Denayer T. et al. (New Horizons in Translational Medicine, 2014), "Animal models in translational medicine: Validation and prediction"
119. Dixon B. et al. (Springer, 2010), "Nebulized heparin reduces levels of pulmonary coagulation activation in acute lung injury"
120. Alexander S. P. H. et al. (British Journal of Pharmacology, 2020), "A rational roadmap for SARS-CoV-2/COVID-19 pharmacotherapeutic research and development: IUPHAR Review 29"
121. Zhai X. et al (Journal of Virology, 2020), "Comparison of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Spike Protein Binding to ACE2 Receptors from Human, Pets, Farm Animals, and Putative Intermediate Hosts"

122. Williamson B. N. et al. (Nature, 2020), “Clinical benefit of remdesivir in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2”
123. Corbett K. S. et al. (New England Journal of Medicine, 2020), “Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates”
124. Graham B. S. (Science, 2020), “Rapid COVID-19 vaccine development”