

УДК 639:616.982.17

DOI: 10.31073/vet\_biotech41-08

**МОЛОЖАНОВА А.В.\***, e-mail: vetereneri@ukr.net,

**НИЧИК С.А.**, д-р вет. наук, проф., член-кор. НААН, e-mail: snychyk@gmail.com,

**ГУДЗЬ Н.В.**, канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: gudznataly@gmail.com,

**ТАРАСОВ О.А.**, канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: ast97@ukr.net

*Інститут ветеринарної медицини НААН*

## ДОСЛІДЖЕННЯ РІЗНИХ ВИДІВ ДОМАШНІХ ТА ПРОДУКТИВНИХ ТВАРИН НА НАЯВНІСТЬ ФРАГМЕНТІВ ГЕНОМУ ВІРУСУ SARS-COV-2 МЕТОДОМ ЗТ-ПЛР В РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

*На основі проведеного епідеміологічного аналізу поширення захворювання COVID-19 в Україні визначено населені пункти в 6 областях України – Львівській, Тернопільській, Хмельницькій, Полтавській, Чернігівській та Житомирській, де від цільових видів тварин (собаки, коти, ВРХ, кози, свині, коні, вівці, кролі) відібрано 1214 проб.*

*За дослідження методом ПЛР в реальному часі наявності специфічних фрагментів геному вірусу SARS-CoV-2 в зразках від тварин не виявлено.*

*Результати досліджень будуть використані при оптимізації заходів біобезпеки та біозахисту стосовно продуктивних тварин та тварин-компаньйонів в населених пунктах та приватних господарствах, де реєструються випадки зараження вірусом SARS-CoV-2.*

**Ключові слова:** SARS-CoV-2, COVID-19, коронавірус, тварини, біологічні зразки, ПЛР.

**Вступ.** Вірус SARS-CoV-2 являє собою одноланцюговий оболонковий РНК-вірус, що відноситься до підроду *Sarbecovirus* роду *Betacoronavirus* [1].

Під час епідемій обумовлених SARS-CoV та MERS-CoV був отриманий великий досвід з їх детектування, що є важливим для розробки засобів діагностики вірусу SARS-CoV-2 [2–4].

Молекулярний аналіз показав, що кажани та гризуни можуть бути джерелом  $\alpha$ -CoV типу, в той час як птахи є основним резервуаром для  $\gamma$ -CoV та  $\Delta$ -CoV типів вірусу [5]. Не дивлячись на те, що SARS-CoV-2 дуже ретельно досліджується, досі немає однозначної відповіді на питання про те, чи можуть тварини, насамперед, домашні, бути джерелом або проміжним господарем для цього коронавірусу. Вважається, що джерелом SARS-CoV-2 можуть бути кажани [6], а роль проміжного господаря, що забезпечив перенесення вірусу від кажанів до людини, відводиться малайзійському панголіну, який нелегально

\* Аспірант, науковий керівник – д-р вет. наук, проф. **Ничик С.А.**

продавався на ринках південного Китаю [7]. Філогенетичний аналіз показав, що коронавірус панголіну (pangolin-CoV-2020), як і група коронавірусів, що циркулює в популяції кажанів різних видів, дійсно генетично пов'язані з SARS-CoV-2, але не було підтверджене припущення, що SARS-CoV-2 утворився безпосередньо з pangolin-CoV-2020 [8]. Секвенування геному показало, що так званий «котячий» SARS-CoV-2 належить до філогенетичного кластеру A2a, так само, як і більшість зразків людського SARS-CoV-2, що виділені останнім часом.

Ряд останніх опублікованих досліджень, що порівнюють послідовності амінокислот білка ACE2 вірусу SARS-CoV-2 серед різних видів або проводять моделювання структури S-білка для прогнозування діапазону потенційних чутливих видів ссавців припустили, що через високу консервативність ACE2 рецепторів багато видів домашніх тварин, таких як коти, корови, вівці та кози віднесені до групи з середнім рівнем ризику. Водночас, собаки, коні та свині мають низьку ймовірність зв'язування коронавірусу з ACE2 через природну варіабельність та низьку афінність у них вказаних рецепторних ділянок [9–12].

Крім невідомих на даний час носіїв SARS-CoV-2 і сприйнятливих видів тварин, нові мутаційні варіації SARS-CoV-2 можуть закріпити компенсаторні мутації, які роблять низькочутливі до SARS-CoV-2 види більш сприйнятливими до інфікування [13].

Ці дані підтверджують можливість динамічних змін щодо сприйнятливості різних видів тварин, оскільки нові штами SARS-CoV-2 характеризуються новими мутаціями, які можуть сприяти збільшенню спектру чутливих видів тварин, тим самим утворенню зворотної міжвидової передачі.

Зворотна міжвидова передача вірусу також являє собою потенційну проблему для прискорення вірусної еволюції.

Можливість створення нових резервуарів SARS-CoV-2, першочерговим завданням на національному та глобальному рівнях повинно бути швидке виявлення таких мутаційних змін та зниження ризиків передачі від людини до тварини (зворотний зооноз).

Проведені зарубіжними авторами (Китай, США, Нідерланди, Данія, Іспанія, Німеччина та ін.) дослідження підтвердили можливість зворотної передачі вірусу від людини до тварин та передачу між достатньо далекими в генетичному відношенні видами. Про це свідчать також повідомлення про інфікування котів, які характеризувалися як безсимптомним перебігом, так і вираженими ознаками респіраторного захворювання [14–17].

Скринінгові дослідження в Італії щодо серопревалентності серед котів та собак, які мешкали в місцях проживання хворих на COVID-19 людей встановили, що 3,3% собак та 5,8% котів були серопозитивними із достовірно

високими титрами специфічних антитіл [18]. Підтверджено випадки інфікування кошачих інших видів (леви, тигри, пуми) в умовах зоопарків в США [19].

Про можливість ураження норок свідчать повідомлення інфікування значної кількості ферм по вирощуванню цих видів тварин в Данії, Нідерландах, Греції, Франції та Іспанії [20–23].

Однак, об'єму вибірки тварин в опублікованих матеріалах на даний момент недостатньо для остаточного заключення про можливість певних видів тварин виступати проміжними господарями або природнім резервуаром вірусу.

Моніторингові дослідження в популяції диких, домашніх, зоопаркових та інших тварин є важливим заходом для визначення потенційних проміжних господарів для цього вірусу, що дозволить попередити ймовірні реверсивні зоонози за участю збудника.

Тому, поєднання високої трансмісивності та присутності у значної частини людей, що можуть бути носіями вірусу SARS-CoV-2, створює небезпеку передачі вірусу в популяції тварин, де він може циркулювати тривалий час, провокуючи зворотні спалахи серед людей. Отже, моніторингові дослідження на наявність збудника в популяціях тварин різних видів має важливе значення для проведення профілактичних заходів на певних територіях. Активний моніторинг допоможе точно встановити циркуляцію вірусу в популяції цільових тварин та сприятиме здійсненню оцінки ризиків та впровадженню заходів на локальному та глобальному рівнях.

**Мета роботи** Здійснити відбір зразків від різних видів домашніх та продуктивних тварин та дослідити їх на присутність фрагментів геному вірусу SARS-CoV-2 методом ЗТ-ПЛР в реальному часі;

**Матеріали та методи досліджень.** Для виконання поставлених завдань був виконаний аналіз наявних статистичних даних щодо поширення коронавірусу SARS-CoV-2 в Україні, наявних у відкритому доступі просторових та експериментальних даних, аналіз літературних даних, використано відповідні методи для відбору та обробки зразків та безпосередньо діагностичних досліджень із застосуванням молекулярно-генетичних методів.

Епідеміологічний аналіз поширення збудника COVID-19 в Україні був проведений на основі офіційних статистичних даних щодо виявлених випадків захворювання.

Відбір зразків (мазки з ротової порожнини, носа, ректальні мазки) від різних домашніх (собаки, коти) і продуктивних тварин (кролі, свині, вівці, кози, ВРХ, коні) в регіонах з високою кількістю зареєстрованих випадків COVID-19 серед населення і в регіонах з меншою кількістю таких випадків був здійснений у відповідності зі схемою дослідження, який передбачав проведення кластерної

вибірки локацій для відбору зразків: в кожній області було обрано 5 районів, в межах яких у п'яти населених пунктах було відібрано по 40 зразків від тварин, всього 200 зразків з області.

Всього було здійснено шість експедицій: у 4 області України з відносно високим рівнем захворюваності: Львівська, Тернопільська, Хмельницька та Житомирська і в регіони з відносно низьким рівнем поширення вірусу SARS-CoV-2: Полтавська і Чернігівська області, де разом було відібрано 1214 зразків. Після чого зразки доставлено в діагностичну лабораторію «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» Інституту ветеринарної медицини НААН, де було проведено їх первинну підготовку та дослідження на наявність специфічних фрагментів геному збудника методом ЗТ-ПЛР у реальному часі.

Відбір проб проводили за розробленим СОПом (СОП Збір, транспортування, зберігання, знищення зразків біологічного матеріалу від тварин з метою дослідження на наявність специфічних фрагментів геному коронавірусу SARS-CoV-2), створеним на основі методик, рекомендованих для відбору вірусного матеріалу з використанням стерильних аплікаторів (FLOQSwabs, Copan Flocked Swabs та EUROTUBO Collection swab). Зразки поміщали у кріопробірки зі стерильним буферним розчином pH 7,4±0,2.

Проби (змиви та мазки) протягом всього часу відбору зберігали за температури мінус 70(±5)°C із використанням кріокамери із сухим льодом. В умовах лабораторії зразки та виділена РНК зберігались у низькотемпературній морозильній камері за температури мінус 70(±5)°C для забезпечення тривалого зберігання зразків та виділеної вірусної РНК.

Відбір проб, транспортування та зберігання, а також з метою забезпечення стабільності зразків при зберіганні протягом звітного періоду виконавцями проекту було проведено у відповідності до діючих нормативних документів та рекомендацій щодо біобезпеки та біозахисту.

Виділення РНК із зразків біологічного матеріалу проведено із використанням набору «IndiSpin Pathogen kit» (Indical Bioscience, Германія) згідно інструкції виробника.

Детектування специфічних фрагментів геному вірусу SARS-CoV-2 проведено з використанням ЗТ-ПЛР у реальному часі за допомогою комерційної тест-системи *Allplex SARS-CoV-2 Assay* (Seegene, Південна Корея), Ref RV10248X, LOT RV9120H23 згідно рекомендацій виробника на ампліфікаторі планшетного типу BioRad 1000 з модулем SFX96 із застосуванням вбудованого програмного забезпечення.

Оцінку результатів тесту ЗТ-ПЛР у реальному часі проводили із застосуванням програми SARS-CoV-2 Viewer V1 (Seegene, Південна Корея).

**Результати досліджень та їх обговорення.** На основі комплексного аналізу епідемічної ситуації було обрано 6 областей України для відбору зразків: Львівська, Хмельницька, Тернопільська, Полтавська, Житомирська та Чернігівська, які, за оцінкою авторів, забезпечили отримання репрезентативної вибірки по Україні та дозволили оцінити превалентність збудника в популяціях домашніх тварин різних видів.

Загальна характеристика обраних для відбору зразків областей представлена в таблиці 1. Згідно досліджень, оснований на відкритій статистичній інформації, встановлено, що захворюваність серед населення на COVID-19 складала близько 10%, тому очікувана превалентність вірусу серед цільових видів тварин визначалась нами з ймовірністю до 5%.

*Таблиця 1*

**Загальна характеристика областей, де проводився відбір проб від тварин з метою виявлення вірусу SARS-CoV-2 (дані Державної служби статистики України)**

№	Область	Площа, км <sup>2</sup>	Наявне населення на 01.01.21	Кількість випадків COVID-19 серед людей на 07.12.2021	Поголів'я ВРХ	Поголів'я свиней	Поголів'я ДРХ
1	Львівська	21 830	2 497 750	215204	173 200	139 400	34 000
2	Полтавська	28 750	1 365 518	133347	93 600	71 300	58 600
3	Хмельницька	20 650	1 243 787	142513	169 600	134 700	33 600
4	Тернопільська	13 820	1 030 600	104918	125 900	155 600	17 800
5	Житомирська	29 830	1 195 495	137871	134 600	81 000	26 400
6	Чернігівська	31 870	976 700	92155	59 000	59 100	31 900

Загалом протягом 2021 року ми відібрали 1214 зразків. Співвідношення зразків між видами тварин по окремим областям, а також узагальнено по усіх областях зображено на рисунках 1 і 2. В кожній області було відібрано приблизно 200 зразків з 5 районів, по 40 зразків в кожному. Зразки були також відібрані від тварин в подвір'ях, де були зафіксовані випадки захворювання людей.

На рисунку 1 представлено співвідношення видів тварин по кожній області, від яких було відібрано мазки. Найбільша кількість зразків припадає на котів (від 26,0% до 36,5%), собак (від 20,0% до 35,5%) та кролів (2,0–24,0%), що пов'язано із переважанням утримання даних видів тварин в приватних домогосподарствах.

В середньому по всіх досліджених областях проби від котів складали 29,8%; від собак – 27,9%; від кролів – 13,7%; від ВРХ – 10,7%; від кіз – 10,3%; від свиней – 4,75%; від коней – 1,75% та від овець – 1,1%.

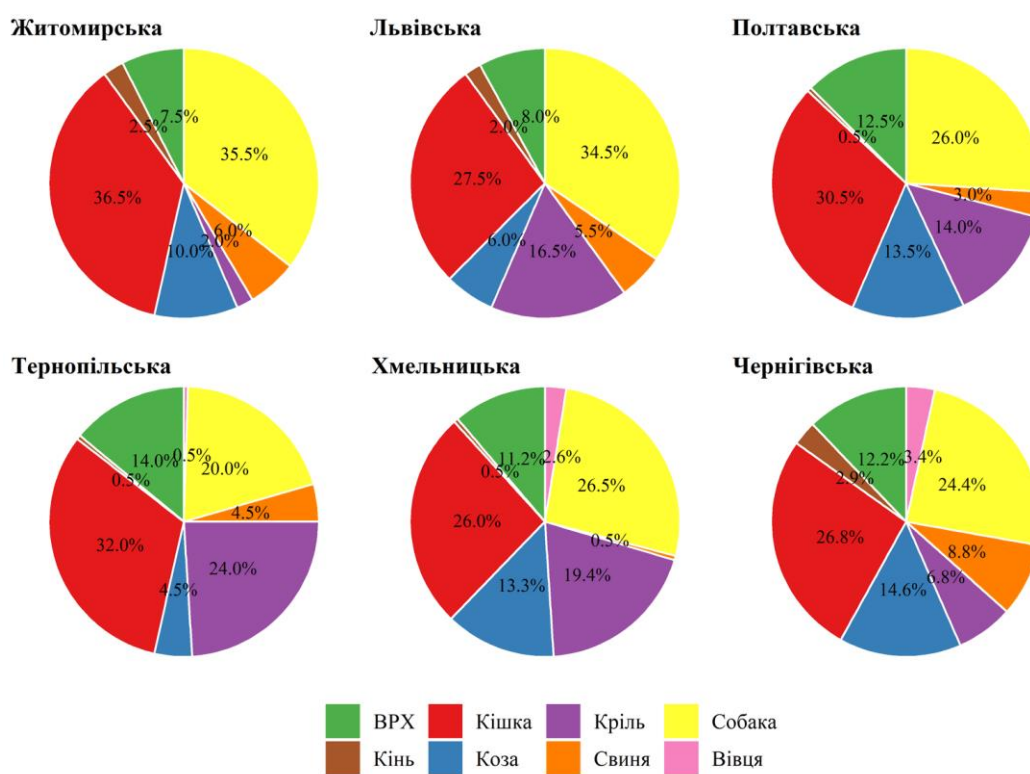


Рис. 1. Співвідношення відібраних зразків за видами тварин по окремих областях України.

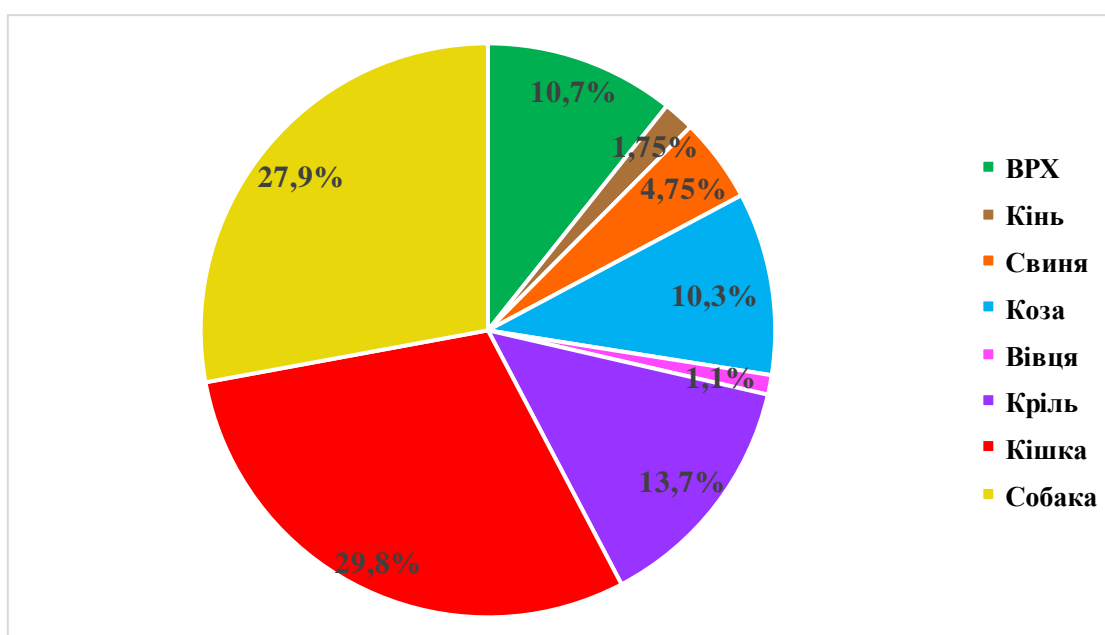


Рис. 2. Розподіл зразків за видами тварин по всіх досліджених областях України.

Всі зібрані проби були досліджені на наявність специфічних фрагментів генів S, N та E, та внутрішнього контролю виділення РНК, які дозволяє виявляти тест система Allplex SARS-CoV-2 Assay (Seegene).

Клінічні дані підтверджують 100% специфічність (95% CI 99,27–100%) та чутливість 100% (95% CI 98,99–100%) не тільки для уханського штаму, але й для нових варіантів вірусу: NV69/70 делеція, чутливість у відношенні якої становить 100% (95% CI 99,55–100%) та специфічність 100% (95% CI 93,73–100%). Також чутливість складає 100% (95% CI 98,94–100%) та специфічність 98,10% (95% CI 96,53–99,08%) у відношенні до нової E484K мутації (дані виробника тест-набору Allplex SARS-CoV-2 Assay (Seegene)).

У зв'язку із тим, що тест система виявляє одночасно три гена збудника, навіть мутації в певних генах дозволять виявити потенційних мутантів, при випадінні певних генів, як діагностичних цілей для праймерів, включених в діагностичний набір.

В результаті досліджень, в усіх 1214 зразках не виявлено позитивних реакцій на жоден із трьох таких генів. При цьому внутрішні контролю виділення й оцінки якості РНК та позитивні контролю, якими комплектується тестовий набір, спрацювали як передбачено інструкцією до набору ( $Ct \leq 24$ ).

Отже, за результатами дослідження зразків тварин з 6 областей України, наявності вірусу SARS-CoV-2 не встановлено. Тому можна зробити припущення про неможливість досліджених видів домашніх тварин слугувати резервуаром для вірусу та являти небезпеку для зворотних зоонозів, наражаючи на небезпеку господарів цих тварин.

Оскільки на сьогодні наявні дані свідчать про те, що сільськогосподарські тварини, а саме ВРХ, свині, вівці, кози характеризуються відсутністю сприйнятливості до SARS-CoV-2, а також відсутністю симптомів та можуть виступати лише в якості механічного фактору передачі збудника, такі тварини не потребують специфічних заходів профілактики та вживання карантинних заходів.

#### **Висновки та перспективи подальших досліджень:**

1. На основі проведеного епідеміологічного аналізу поширення захворювання COVID-19 в Україні було визначено населені пункти в 6 областях України: Львівській, Тернопольській, Хмельницькій, Полтавській, Чернігівській та Житомирській, де від певних видів тварин (собаки, коти, ВРХ, кози, свині, коні, вівці, кролі) відібрано 1214 проб.

2. За дослідження методом ПЛР в реальному часі наявності специфічних фрагментів геному вірусу SARS-CoV-2 в зразках від тварин не виявлено.

Результати досліджень будуть використані при оптимізації заходів біобезпеки та біозахисту стосовно продуктивних тварин та тварин-компаньонів

в населених пунктах та приватних господарствах, де реєструються випадки зараження вірусом SARS-CoV-2.

**STUDY FOR THE FRAGMENTS OF THE SARS-COV-2 VIRUS GENOME DETECTION IN DIFFERENT SPECIES OF DOMESTIC AND PRODUCTIVE ANIMALS BY THE RT-PCR METHOD/ Molozhanova A.V. Nychyk S.A., Hudz N.V., Tarasov O.A.**

**Introduction.** *The combination of high transmissibility and the presence of a large number of people who can carry SARS-CoV-2 creates a risk of transmission of the virus in animal populations, where it can circulate for a long time, provoking reverse outbreaks in humans. Therefore, monitoring studies for the presence of the pathogen in animal populations of various species is important for preventive measures in certain areas. Active monitoring will help to accurately establish the circulation of the virus in target animal populations and facilitate risk assessment and implementation of measures at local and global levels.*

**The goal of the work** was to take samples from different types of domestic and productive animals and examine them for the fragments of the SARS-CoV-2 virus genome presence by the RT-PCR.

**Materials and methods.** *Epidemiological analysis of the spread of the Covid-19 pathogen in Ukraine was carried out on the basis of official statistical data on detected cases of the disease.*

*Sampling (oral swabs, nasal swabs, rectal swabs) from various domestic (dogs, cats) and productive animals (rabbits, pigs, sheep, goats, cattle, horses) in regions with a high number of registered cases of Covid-19 in humans and in the regions with a lower number of such cases was carried out. In each region 5 districts were selected, where 40 samples from animals were selected in five settlements, a total of 200 samples from the region.*

*Isolation of RNA from samples of biological material was carried out using the “IndiSpin Pathogen kit” (Indical Bioscience) according to the manufacturer’s instructions.*

*The detection of specific fragments of the genome of the SARS-CoV-2 virus was carried out using RT-PCR using the commercial test system Allplex SARS-CoV-2 Assay (Seegene, South Korea), Ref RV10248X, LOT RV9120H23 according to the manufacturer’s recommendations on a BioRad 1000 tablet amplifier with the SFX96 module using recommended software.*

*The RT-PCR test results were evaluated using the SARS-CoV-2 Viewer V1 program (Seegene, South Korea).*

**Results of research and discussion.** *On the basis of a comprehensive analysis of the epidemic situation, 6 regions of Ukraine were selected for sampling: Lviv, Khmelnytskyi, Ternopil, Poltava, Zhytomyr and Chernihiv regions. It was established that the incidence rate among the population was about 10%, so the expected prevalence of the virus among domestic animals was probably determined to be below 5%.*

*In total, in 2021, we selected 1,214 samples, which even exceeded the number planned at the beginning of the project. The largest number of samples is from cats (from 26.0% to 36.5%), dogs (from 20.0% to 35.5%), and rabbits (2.0–24.0%), which is associated with the predominance of keeping these species of animals in private households.*

*On average, across all investigated areas, samples from cats made 29.8%; from dogs – 27.9%; from rabbits – 13.7%; from cattle – 10.7%; from goats – 10.3%; from pigs - 4.75%; from horses – 1.75% and from sheep – 1.1%.*



Due to the fact that the test system detects three genes of the pathogen at the same time, even potential mutations in certain genes could be detected in case of loss of one of three genes as diagnostic targets for primers included in the diagnostic set.

As a result of research, in all tested 1214 samples no positive reactions to any of the three target genes were found. At the same time, the internal controls for selection and assessment of RNA quality and the positive controls included in the test set worked as prescribed by the instructions for the kit ( $Ct \leq 24$ ).

Thus, a result of the study of random samples from animals in 6 regions of Ukraine, the presence of the SARS-CoV-2 virus was not detected. According to the results of the research, it is possible to make an assumption about the impossibility of the studied species of domestic animals to be a reservoir for the virus and represent a danger for reverse zoonoses, exposing the owners of these animals to infection risks.

#### **Conclusions and prospects for further research:**

1. On the background of the epidemiological analysis of the spread of the Covid-19 disease in Ukraine and identified settlements in 6 regions of Ukraine: Lviv, Ternopil, Khmelnytskyi, Poltava, Chernihiv and Zhytomyr regions and 1214 samples were taken from the target species of animals (dogs, cats, cattle, goats, pigs, horses, sheep, rabbits).

2. The presence of specific fragments of the genome of the SARS-CoV-2 virus in animal samples was not detected by real-time PCR.

The results of the research will be used in the optimization of biosecurity and biosecurity measures for productive animals and companion animals in settlements and private farms where cases of infection with the SARS-CoV-2 virus are registered.

**Keywords:** SARS-CoV-2, Covid-19, coronavirus, animals, biological samples, PCR.

#### **REFERENCES**

- Alexander, E. Gorbalenya et al. (2020). Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Nat Microbiol.*, 5(4), 536-544. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z.
- Ying Yan, Le Chang, Lunan, Wang (2020). Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Rev Med Virol.*, 30(3), e2106. doi: 10.1002/rmv.2106.
- Yan, C. et al. (2020). Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Microbiol Infect.*, 26(6), 773-779. doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.001.
- Kashir, J., & Yaqinuddin, A. (2020). Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Med Hypotheses*, 141, 109786. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109786.
- Zi-Wei, Ye, et al. (2020). Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int J Biol Sci*, 16(10), 1686-1697. doi: 10.7150/ijbs.45472.
- Peng, Zhou, et al. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin, *Nature*, 579(7798), 270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- Tommy Tsan-Yuk, Lam, et al. (2020). Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*, 583(7815), 282-285. doi: 10.1038/s41586-020-2169-0.
- Ping, Liu, et al. (2020). Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)? *PLoS Pathog*, 16(5), e1008421. doi: 10.1371/journal.ppat.1008421.

9. Ahmed, R., et al. (2021). Host range projection of SARS-CoV-2: South Asia perspective. *Infect Genet Evol*, 87, 104670. [https://doi.org/ 10.1016/j.meegid.2020.104670](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104670).
10. Fischhoff, I.R., et al. (2021). Predicting the zoonotic capacity of mammal species for SARS-CoV-2. *Proceedings of the Royal Society B*, 288, 20211651. <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.1651>.
11. Kumar, A., et al. (2021). Predicting susceptibility for SARS-CoV-2 infection in domestic and wildlife animals using ACE2 protein sequence homology. *Zoo Biol*, 40 (1), 79-85. <https://doi.org/10.1101/2021.02.18.431844>.
12. Liu, Y., et al. (2021). Functional and genetic analysis of viral receptor ACE2 orthologs reveals a broad potential host range of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 18 (12), e2025373118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025373118>.
13. Gu, H., et al. (2020). Adaptation of SARS-CoV-2 in BAB/c mice for testing vaccine efficacy. *Science*, 369 (6511), 1603-1607. <https://doi.org/10.1126/science.abc4730>.
14. Garigliany, M., et al. (2020). SARS-CoV-2 Natural Transmission from Human to Cat. *Emerg Infect Dis.*, 26 (12), 3069-3071. <https://doi.org/10.3201/eid2612.202223>.
15. Michelitsch, A., et al. (2020). Occurrence of Antibodies against SARS-CoV-2 in the Domestic Cat Population of Germany. *Vaccines (Basel)*, 8(4), 772. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040772>.
16. Ruiz-Arrondo, I., et al. (2021). Detection of SARS-CoV-2 in pets living with COVID-19 owners diagnosed during the COVID-19 lockdown in Spain: A case of an asymptomatic cat with SARS-CoV-2 in Europe. *Transbound Emerg Dis*, 68(2), 973-976. <https://doi.org/10.1111/tbed.13803>.
17. Zhao, J., Cui, W., Tian, B.P. (2020). The Potential Intermediate Hosts for SARS-CoV-2. *Front Microbiol*, 11, 580137. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580137>.
18. Patterson, E.I. et al. (2020). Evidence of exposure to SARS-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy. *Nature Communications*, 11, 6231. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20097-0>.
19. McAloose, D., et al. (2020). From People to Panthera: Natural SARS-CoV-2 Infection in Tigers and Lions at the Bronx Zoo. *Host-Microbe Biology*, 11(5), e02220-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02220-20>.
20. Domanska-Blicharz, K., et al. (2021). Mink SARS-CoV-2 Infection in Poland – short communication. *J Vet Res*, 65 (1), 1-5. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2021-0017>.
21. Fenollar, F., et al. (2021). Mink, SARS-CoV-2, and the Human-Animal Interface. *Front Microbiol*, 12, 663815. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663815>.
22. Schlottau, K., et al. (2020). SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. *Lancet Microbe*, 1(5), e218–e225. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30089-6](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30089-6).
23. Rabalski, L., et al. (2021). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Farmed Mink (*Neovison vison*), Poland. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 27, No.9. <https://doi.org/10.1101/2020.12.24.422670>.