



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in
Medicina Veterinaria

Tesi di Laurea

**Impatto di COVID-19 sulla relazione uomo-animale:
indagine sierologica per la ricerca di anticorpi contro
SARS-CoV-2 in furetti italiani**

Relatore: Dott.ssa Claudia Maria Tucciarone

Correlatori: Prof. Michele Drigo
Dott. Marco Bedin

Laureando: Nicola Zorzato

Matricola n. 1089447

ANNO ACCADEMICO: 2020/2021

RIASSUNTO

La recente pandemia di *Coronavirus disease 19* (COVID-19) ha avuto un impatto enorme sulla salute umana e, fin dai primi mesi, positività al severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) sono state individuate anche tra gli animali. Come riportato in diversi paesi, numerose specie animali sono risultate suscettibili all'infezione, sia naturale che sperimentale e, tra queste, spiccano in modo particolare furetti e visoni.

I furetti, già impiegati come modello animale nello studio di numerose patologie respiratorie dell'uomo, appaiono estremamente suscettibili all'infezione sperimentale da parte di SARS-CoV-2, mentre numerosi allevamenti di visoni sono stati duramente colpiti dall'infezione trasmessa dagli addetti ai lavori, con alcuni casi di successiva trasmissione del virus dagli animali all'uomo. Questi riscontri hanno costretto vari paesi a procedere con l'abbattimento degli animali negli allevamenti presenti sul territorio.

In letteratura sono tuttavia disponibili informazioni ancora preliminari riguardo alla suscettibilità degli animali domestici a SARS-CoV-2 in ambiente naturale; le indagini svolte sulla specie furetto contano attualmente numeri irrisori e nessuno studio è stato ancora condotto per valutare la circolazione del virus in questa specie, in Italia.

Durante il presente progetto di tesi, è stata ricercata la presenza di anticorpi contro SARS-CoV-2 in campioni di siero prelevati da furetti portati a visita presso ambulatori specialistici. I campioni sono stati testati con metodica ELISA e di sieroneutralizzazione, per conferma diagnostica e i risultati sono stati interpretati alla luce dei dati anamnestici relativi alla possibile esposizione a COVID-19 del nucleo familiare di provenienza dell'animale, raccolti attraverso un apposito questionario. Tutti i campioni sono risultati negativi, un dato in contrasto con l'ipotesi iniziale, avanzata in seguito agli studi sperimentali, che il furetto sia un animale estremamente suscettibile a SARS-CoV-2. Questo studio preliminare rappresenta la prima indagine sierologica sulla circolazione di SARS-CoV-2 in furetti italiani, sarà perciò interessante mettere in atto un campionamento strutturato, che possa contare su ampi numeri di animali e fornire risultati più solidi. In questo modo, sarà possibile acquisire dati che permettano di comprendere in modo approfondito l'interazione tra il virus, l'uomo e gli animali da compagnia, per controllare o ridurre il rischio che questa patologia rappresenta per una delle specie apparentemente più suscettibili tra i nostri "pets".

ABSTRACT

The recent *Coronavirus disease 19* (COVID-19) pandemic had a huge impact on human health and, since the beginning, severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) detections were confirmed even among animals. In fact, many studies reported the susceptibility of a variety of animal species to the viral infection, both natural and experimental.

Among these species, the most notable are ferrets and minks. Ferrets are commonly employed as animal models for many human respiratory diseases due to a certain physiopathologic affinity and proved to be highly susceptible to experimental infection. On the other hand, many mink farms were heavily affected by the pandemic, with some reported cases of virus transmission from minks back to humans. These findings forced some countries to resort to mink culling in order to contain the viral spreading.

In literature, however, information about the susceptibility of domestic animals to SARS-CoV-2 is still lacking, and research data on ferrets are particularly scarce. To this day, no investigation has yet evaluated the virus circulation among ferrets in Italy.

In this study, the presence of SARS-CoV-2 antibodies was evaluated in serum samples obtained from ferrets brought to specialist clinics. The samples were tested by double antigen multispecies enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and seroneutralization for diagnostic confirmation, and the results were interpreted in light of the anamnestic information of a possible COVID-19 exposure, collected by questionnaire. All samples were negative, in contrast to the initial hypothesis of ferrets being extremely susceptible to SARS-CoV-2. This study represents the first serological investigation concerning the circulation of SARS-CoV-2 among Italian ferrets and for this reason, it will be interesting to implement a future structured sampling, relying on large numbers of animals and yielding solid results. In this way, it will be possible to acquire data allowing a deeper understanding of the interaction between the virus, humans, and pets, and controlling or reducing the risk that this pathology poses for one of the most susceptible species among our pets.

INDICE

1. INTRODUZIONE	9
1.1 - IL FURETTO	9
1.1.1 - TASSONOMIA E STORIA	9
1.1.2 - MORFOLOGIA	9
1.1.3 - GESTIONE E DIETA	11
1.1.4 - PRINCIPALI MALATTIE INFETTIVE DEL FURETTO	14
1.1.4.1 CIMURRO	14
1.1.4.2 RABBIA	16
1.1.4.3 ALEUTIAN DISEASE	17
1.1.4.4 INFLUENZA	18
1.1.4.5 CORONAVIROSI	19
1.1.4.6 INFEZIONI BATTERICHE	20
1.2 - IL FURETTO COME MODELLO ANIMALE NELLA SPERIMENTAZIONE SCIENTIFICA	22
1.2.1 - CARDIOLOGIA	22
1.2.2 - PNEUMOLOGIA	23
1.2.3 - INFLUENZA	24
1.2.4 - SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME-RELATED CORONAVIRUS (SARS-CoV)	25
1.2.5 - ALTRI CORONAVIRUS UMANI	26
1.3 - SARS-CoV-2	27
1.3.1 - TASSONOMIA E MORFOLOGIA	27
1.3.2 - STORIA DELLA PANDEMIA	28
1.3.3 - SPETTRO D'OSPITE E TROPISMO	29
1.3.4 - PATOGENESI E SEGNI CLINICI	30
1.3.5 - DIAGNOSI	31
1.3.6 - INFEZIONE NATURALE NEGLI ANIMALI	32
1.3.7 - INFEZIONE SPERIMENTALE NEGLI ANIMALI	34
2. SCOPO DELLA TESI	39
3. MATERIALI E METODI	41
3.1 - CAMPIONI	41
3.2 - ANALISI SIEROLOGICA CON METODICA ELISA	41
3.3 - ANALISI SIEROLOGICA CON METODICA DI SIERONEUTRALIZZAZIONE	43
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	45
4.1 - CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE INDAGATA	45

4.2 - ANALISI SIEROLOGICA	47
5. CONCLUSIONI	51
6. BIBLIOGRAFIA	53
7. SITOGRAFIA	75
8. ALLEGATI	77
Allegato 1 – Descrizione del progetto	77
Allegato 2 – Modulo per la raccolta del consenso informato	79
Allegato 3 – Questionario per la raccolta di segnalamento e anamnesi	80

1. INTRODUZIONE

1.1 - IL FURETTO

1.1.1 - TASSONOMIA E STORIA

Il furetto (*Mustela putorius furo*, Linnaeus 1758) è un mammifero carnivoro appartenente al genere *Mustela*, famiglia *Mustelidae*, che comprende 67 specie distribuite tra Africa, Eurasia e Americhe (Koopman et al., 1981). Nessun'altra famiglia di carnivori mostra una capacità di adattamento così spiccata, con esemplari che prosperano all'interno degli ecosistemi più vari, dalla tundra artica alle foreste tropicali (Fox and Marini, 2014). I mustelidi mantengono molte caratteristiche primitive, come la taglia ridotta, arti corti e tozzi dotati di 5 dita, una calotta cranica allungata e un rostro corto (Anderson, 1989).

La famiglia *Mustelidae* comprende svariate sottofamiglie, tra cui la sottofamiglia *Mustelinae*, i cui membri più noti sono la donnola (*Mustela nivalis*), il visone europeo (*Mustela lutreola*) e la puzzola europea (*Mustela putorius*), di cui il furetto (*Mustela putorius furo*) rappresenta una sottospecie. Il visone americano (*Neovison vison*) appartiene alla medesima sottofamiglia, ma costituisce un genere distinto (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>).

Il furetto è un animale domestico, frutto dell'addomesticamento e della selezione della puzzola europea (Thomson, 1951; Grzimek and Hutchins, 2011), che scritti greci daterebbero ad oltre 2000 anni fa (Thomson, 1951; Davison et al., 1999; Tynes, 2010). Lo scopo della domesticazione viene imputato al controllo dei roditori e alla caccia, in particolare del coniglio (Price, 2002), grazie alle caratteristiche fisiche del furetto che lo rendono perfetto per stanare la preda anche in spazi angusti (Kaufman, 1980). Questa pratica, conosciuta con il nome di *ferreting*, trova le sue origini in Nord Africa (Sato et al., 2003) ed è stata successivamente introdotta in Europa ed in Asia dove viene tuttora praticata (Fox, 2014).

Alternativamente, è stato proposto che il furetto discenda dalla puzzola delle steppe (*Mustela eversmannii*, Lesson, 1827), con cui condivide molte caratteristiche nella morfologia del cranio (Ashton et al., 1955; Bays et al., 2006; Yalden and Harris, 2008). Il furetto è inoltre parente del furetto dai piedi neri (*Mustela nigripes*, Audubon e Bachman, 1851) (Fox and Marini, 2014) ed è interfertile con la puzzola europea, a conferma della loro stretta correlazione genetica (Bednarz, 1960).

1.1.2 - MORFOLOGIA

Il furetto è un animale dal corpo allungato, con arti corti e muscolosi dotati di cinque artigli non retrattili e possiede una lunga coda (Anderson, 1989). Il peso dell'esemplare è influenzato dal

dimorfismo sessuale in quanto i maschi, che pesano generalmente tra 1,2 e 2,1 kg, presentano dimensioni notevolmente maggiori rispetto alle femmine, che rimangono tra 0,7 e 1,2 kg (Tynes, 2010; Fox et al., 2014). Durante l'anno, il peso di un furetto può variare considerevolmente in quanto, in autunno, l'assunzione di cibo aumenta almeno del 30% rispetto ai mesi caldi. In questo modo, il peso può aumentare anche del 40%, con la deposizione di tessuto adiposo sottocutaneo. In primavera invece, la quantità di cibo assunto viene progressivamente ridotta e il tessuto adiposo in eccesso metabolizzato. Se la lunghezza del fotoperiodo non varia durante l'anno, non si verificano neppure cambi nella quantità di cibo assunto, rendendo il peso dell'animale pressoché costante (Koopman et al., 1981; Lewington, 2007a).

Gli esemplari di furetto possiedono generalmente una pelliccia bruna o nera, ma esistono diverse colorazioni e combinazioni ottenute grazie alla selezione (Fox, 2014). La caratteristica dell'albinismo ad esempio, insieme ad altre colorazioni bianche, è molto frequente, poiché è stata selezionata dai cacciatori, in quanto rende gli animali più facilmente individuabili. Queste colorazioni tuttavia sono spesso associate a gravi problematiche, come una netta riduzione del campo visivo e sordità. Quest'ultima appare più frequentemente associata a colorazioni bianche diverse dall'albinismo, colpendo circa il 30% di questi animali, nel 22% dei casi monolateralmente e nel restante 8% bilateralmente (Garipis and Hoffmann, 2003; Lewington, 2007a; Piazza et al., 2014). Alcune organizzazioni, come l'American Ferret Association, hanno classificato molte colorazioni di pelliccia come standard di razza (<https://www.ferret.org › events › colors › colorchart>).

La cute del furetto è piuttosto spessa, priva di ghiandole sudoripare ben sviluppate (Evans and Quoc An, 2014), perciò la dissipazione del calore in eccesso avviene con l'aumento della frequenza respiratoria, in modo simile al cane. Come molti altri mustelidi, il furetto possiede delle ghiandole perianali ben sviluppate, utilizzate per inviare segnali olfattivi e le cui secrezioni hanno un odore molto forte, soprattutto in soggetti interi. La maggior parte dei furetti venduti negli Stati Uniti viene sottoposta a una procedura chirurgica di rimozione delle ghiandole (Mitchell and Tully, 2009), mentre in Europa questa pratica è considerata una mutilazione non necessaria (European Convention for the Protection of Pet Animals, Strasburg, 14 August 1991).

La formula dentaria del furetto adulto è $2 (I3/3 C1/1 P3/3 M1/2)$, per un totale di 34 denti con canini molto sviluppati, in particolare quelli superiori (Lewington, 2007b).

A supporto delle sue caratteristiche etologiche e dell'istinto di scavare, il furetto possiede un lungo collo e si ritiene che la posizione delle arterie carotidi possa aiutare l'animale a mantenere un flusso ematico cerebrale adeguato nelle fasi di orientamento in spazi molto ristretti (Fox, 2014). Il torace, la capacità polmonare e la riserva respiratoria, ampie per le dimensioni di questo animale, sono anch'esse considerate adattamenti anatomici. Unite al

diametro relativamente ampio delle vie aeree e alla lunga trachea, queste caratteristiche comportano infatti inferiori resistenze al passaggio dell'aria rispetto a quelle di altri animali di dimensioni simili (Boyd and Mangos, 1981).

Il cuore è in posizione più caudale rispetto a cane e gatto, tra la sesta e l'ottava costa, possiede una forma maggiormente globosa e la disposizione dei grossi vasi è sovrapponibile a quella degli altri carnivori (Powers and Brown, 2012).

Il tratto digerente del furetto è corto, una caratteristica propria dei carnivori, tuttavia cieco ed appendice sono del tutto assenti in questa specie. Inoltre, anche il grosso intestino possiede caratteristiche uniche, dal momento che non è presente alcuna divisione anatomica esterna tra ileo e colon (Bueno et al., 1981).

Dal punto di vista riproduttivo, le femmine raggiungono la maturità sessuale tra gli 8 e i 12 mesi di età, generalmente durante la prima primavera dopo la nascita (O'Malley, 2005; Lindeberg, 2008; Hrapkiewicz et al., 2013; Fox et al., 2014), mentre i maschi raggiungono la pubertà a circa 9 mesi (Lindeberg, 2008). Il furetto è un animale a ciclo poliestrale stagionale (Ivey and Morrissey, 1999; Hrapkiewicz et al., 2013) e richiede periodi alternati di giornate lunghe e brevi per avere un ciclo annuale funzionale (Lindeberg, 2008). In entrambi i sessi, la fertilità aumenta con l'allungarsi delle giornate (Fox et al., 2014).

L'ovulazione è indotta dalla penetrazione e avviene 30-36 ore dopo il coito, durante il quale il maschio morde la femmina a livello del collo (Ivey and Morrissey, 1999; Hrapkiewicz et al., 2013). La gestazione dura in media 41 giorni, con un intervallo tra i 39-42 giorni. Se dopo l'ovulazione non avvengono fecondazione e impianto, può instaurarsi uno stato di pseudogavidanza con durata di 40-42 giorni (Ivey and Morrissey, 1999; Lindeberg, 2008; Hrapkiewicz et al., 2013).

Se invece l'ovulazione non viene indotta, la femmina rimarrà in estro fino al successivo cambio di fotoperiodo. Uno stato di estro prolungato predispone al rischio di anemia da soppressione midollare, causata dall'iperestrogenismo prolungato (O'Malley, 2005; Lewington, 2007b; Rosenthal, 2015).

Per evitare che ciò accada, se non si intende far riprodurre il furetto, è possibile intervenire chirurgicamente sterilizzando l'animale oppure, più frequentemente, tramite un controllo ormonale del ciclo. A questo scopo vengono utilizzati impianti sottocutanei, ad esempio a base di agonisti del GnRH, come deslorelina acetato (Schoemaker, 2002; Risi, 2014).

1.1.3 - GESTIONE E DIETA

Al giorno d'oggi, il ruolo del furetto è prevalentemente quello di animale da compagnia.

Grazie alla sua crescente popolarità, può essere reperito anche in allevamenti privati di piccole

dimensioni. Se adeguatamente gestito, il furetto può vivere all'interno delle abitazioni, all'esterno oppure alternando le due sistemazioni senza controindicazioni (Hillyer, 1994). La durata media della vita in cattività è approssimativamente di 6-8 anni (Fox et al., 2014), ma alcuni esemplari arrivano a superare i 10 anni (Ducatelle and Zwart, 1993).

In natura, la puzzola europea è un animale solitario e le uniche relazioni sociali tra gli adulti avvengono durante il periodo dell'accoppiamento o per territorialità, e il furetto dai piedi neri mostra un comportamento non dissimile (Richardson et al., 1987; Norbury et al., 1998; Yalden and Harris, 2008).

Non è scorretto quindi tenere un furetto da solo (Bays et al., 2006; Lewington, 2007a). Quest'ultimo tuttavia possiede sostanziali differenze rispetto alle proprie controparti selvatiche, come una attività maggiormente diurna che si concentra prevalentemente nelle ore crepuscolari, anziché in quelle notturne e la capacità di accettare di buon grado l'introduzione di altri conspecifici nel proprio ambiente (Poole, 1972).

Si ritiene che questi siano effetti dovuti a familiarità ed abitudine, che giocano un ruolo sostanziale nella risposta sociale del furetto sia all'uomo che ai propri simili. A dimostrazione di quest'affermazione, vi è il fatto che giovani puzzole seguono le loro madri durante le spedizioni di caccia, e allo stesso modo furetti cresciuti a mano seguono prontamente gli esseri umani, secondo un classico meccanismo di *imprinting* (Poole, 1972).

Queste caratteristiche consentono al proprietario di interagire piuttosto agevolmente con questo animale, tuttavia la scelta di tenere un furetto da solo potrebbe rivelarsi impegnativa, in quanto il proprietario sarà l'unica fonte degli stimoli necessari ad una sana attività sociale. Potrebbe dunque risultare vantaggioso alloggiare più furetti insieme, che soddisferanno autonomamente il proprio bisogno etologico di gioco, con comportamenti predatori, esploratori e sessuali. Alcuni autori consigliano l'adozione di una coppia, possibilmente maschio-femmina o maschio-maschio (Staton and Crowell-Davis, 2003), mentre altri suggeriscono la compresenza di almeno 3 furetti, in quanto i legami che formano tra loro sono molto profondi, e la perdita di un compagno può avere effetti negativi sulla salute dell'animale (Harris, 2015). In questi casi non sono rari episodi di anoressia o di ulcerazione gastrica, per i quali può anche essere necessario un ricovero ospedaliero (Harris, 2015; Judah and Nuttall, 2016). Va tuttavia sottolineato che possono verificarsi manifestazioni di aggressività nei confronti di conspecifici, che possono essere molto violente ed esitare anche in lesioni (Poole, 1973, 1974; Staton and Crowell-Davis, 2003).

Le dimensioni raccomandate di una gabbia per uno o due furetti sono $1,5-2 \text{ m}^2 + 0,5 \text{ m}^2$ per ogni furetto aggiunto (Tully and Mitchell, 2001). La temperatura dell'ambiente dovrebbe essere mantenuta tra i 4°C e i 25°C , con umidità al 40-60% e gli animali dovrebbero essere esposti ad almeno 12-16 ore di luce (Kiefer and Johnson, 2006; Fox and Broome, 2014).

Per soggetti giovani e in salute, sono consigliate strutture che si sviluppano in verticale, su più

livelli, che permettono all'animale di arrampicarsi e di esplorare. Con l'avanzamento dell'età aumentano i rischi dovuti a cadute per un fisiologico calo dell'agilità e della vista, e diminuisce l'attività locomotoria, per cui si rivelano più adatte strutture su un solo piano.

I furetti tendono a nascondersi in tane per il riposo, attività a cui dedicano tra le 18-20 ore al giorno (Poole, 1972; Bays et al., 2006), quindi all'interno della gabbia è necessario predisporre una e, nel caso in cui più furetti condividano uno stesso spazio, questi tendono a riposare insieme.

Come i loro antenati, anche i furetti sono carnivori obbligati, con una capacità di assorbimento intestinale limitata. Una dieta altamente digeribile composta da elevate quantità di proteine (30-40%) e grassi (15-20%) animali rappresenta la soluzione ideale per un soggetto adulto (Tully TA and Mitchell MA., 2001; Willard, 2002; Powers and Brown, 2012; Johnson-Delaney, 2014), mentre soggetti giovani o in riproduzione necessitano di percentuali maggiori di grassi, anche oltre il 25% (Willard, 2002; Johnson-Delaney, 2014), con un ridotto apporto di carboidrati e fibre, il cui eccesso può infatti esitare in un indesiderato aumento del volume delle feci e un deficit nel rapporto tra proteine e calorie (Lewington, 2007c).

A causa di queste particolarità, sono state sviluppate numerose diete commerciali apposite per furetti (Willard, 2002). È infatti fortemente sconsigliato l'utilizzo di diete commerciali formulate per cani, ed è discusso l'utilizzo di diete formulate per gatti, in quanto diete di alta qualità potrebbero essere considerate appropriate ma la maggior parte di quelle in commercio non riesce a soddisfare i bisogni di questo animale (Tully and Mitchell, 2001). Vengono talvolta adottate diete *whole prey*, perché ritenute in grado di mimare la dieta naturale dell'animale e che prevedono la somministrazione di carcasse di prede tipiche, come conigli o roditori, ma anche sottoprodotti di origine animale (Oyarzun et al., 1995).

I furetti non sotterrano le loro feci, contrariamente ai gatti, e a volte si esibiscono in un comportamento definito *anal drag*, trascinando l'ano per alcuni secondi sul pavimento dopo aver defecato. Ciò è probabilmente correlato alla natura territoriale di questo animale, e all'importanza che rivestono le ghiandole perianali come segnale olfattorio; è stato stabilito infatti che i furetti possono riconoscere altri conspecifici dall'odore delle secrezioni di queste ghiandole, unico per ogni animale (Clapperton et al., 1988).

È fortemente raccomandato di garantire almeno un paio d'ore di attività al giorno all'esterno della gabbia per poter soddisfare i bisogni etologici del furetto; un insufficiente numero di ore di gioco può indurre un comportamento iperattivo e portare a problematiche comportamentali (Chivers and Einon, 1982).

Il furetto discende da un animale ad attività prevalentemente notturna e possiede il *tapetum lucidum*, una particolare struttura a livello oculare che consente una vista ottimale quando la luce è soffusa, tuttavia la sua capacità visiva è piuttosto scarsa, e fa affidamento principalmente su udito ed olfatto (Powers and Brown, 2012), necessitando di tempo per

adattarsi a luci intense.

I furetti hanno una visione binoculare con pupille a fessura orizzontale, un tratto comune in animali che cacciano prede con andature a saltelli, e questa caratteristica li rende estremamente attratti da oggetti che rimbalzano. Possiedono un'acuità visiva molto buona per gli oggetti vicini, ma questa diminuisce man mano che aumenta la distanza, rendendoli più sensibili al movimento (Matulich, 1998). Per soddisfare il bisogno di esplorare è consigliato di portarli in nuovi ambienti, come ad esempio la residenza di un altro proprietario di furetti, tuttavia questa pratica potrebbe rivelarsi problematica per la salute dell'animale: va considerata infatti la loro suscettibilità a malattie infettive trasmissibili.

1.1.4 - PRINCIPALI MALATTIE INFETTIVE DEL FURETTO

Il furetto è un animale suscettibile a svariate patologie infettive, alcune delle quali comuni anche ad altre specie di animali domestici. Tra le patologie di origine virale possono essere annoverate cimurro, rabbia, influenza, Aleutian disease ed enterite catarrale epizootica (Langlois, 2005; Kiupel and Perpiñán, 2014), mentre sono comuni infezioni batteriche sostenute da *Bordetella bronchiseptica*, *Helicobacter mustelae*, *Pseudomonas spp*, *Campylobacter spp*, *Chlamydia spp*, *Mycobacterium bovis*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum* e molti altri (Lewington, 2007a; Powers, 2009; Quesenberry and Carpenter, 2011; Swennes and Fox, 2014).

1.1.4.1 CIMURRO

Il cimurro è una patologia ubiquitaria, che colpisce specie appartenenti a numerose famiglie dell'ordine *Carnivora* (Deem et al., 2000; Beineke et al., 2015) ed è infatti una problematica sanitaria di particolare importanza nel cane (Elia et al., 2006; Martella et al., 2008), ma non solo. Sono stati riscontrati casi di cimurro anche in grandi felini (Beineke et al., 2015), pecari dal collare (*Pecari tajacu*, Linnaeus 1758) (Appel et al., 1991), macachi giapponesi (*Macaca fuscata*, Blyth 1875) (Yoshikawa et al., 1989), macachi reso (*Macaca mulatta*, Zimmermann 1780) (Qiu et al., 2011) e vari mammiferi marini, tra cui la foca del Bajkal (*Pusa sibirica*, Gmelin 1788) (Butina et al., 2010; Wilson et al., 2014), a testimonianza dell'ampiezza dello spettro d'ospite di questo virus.

L'agente eziologico del cimurro è il *Canine morbillivirus*, comunemente conosciuto come canine distemper virus (CDV), appartenente al genere *Morbillivirus*, famiglia *Paramyxoviridae* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>), strettamente correlato al virus responsabile del morbillo nell'uomo (*Measles morbillivirus*, MeV). È un virus dotato di *envelope* con genoma a singolo filamento di RNA negativo non segmentato (Greene, 2006),

e sulla superficie dell'*envelope* sono esposte due glicoproteine, l'emoagglutinina e la proteina di fusione, responsabili rispettivamente del legame con il recettore e della fusione con la membrana cellulare (Lamb and RA, 2001).

Nel furetto, la modalità di trasmissione è simile a quella riscontrata nel cane ed avviene principalmente per via aerogena, o tramite il contatto con fluidi corporei infetti, infatti il virus viene eliminato in secreti ed escreti (oculari, nasali, saliva, urina, feci) (Williams, 2008). CDV possiede una scarsa resistenza nell'ambiente, ed è quindi necessario un contatto diretto perché avvenga l'infezione (Williams, 2008).

Il virus infetta inizialmente le cellule del sistema immunitario nel tratto respiratorio (von Messling et al., 2004; Lemon et al., 2011), cui segue un periodo di incubazione di 7-10 giorni durante i quali avviene la diffusione attraverso il sistema linfatico (von Messling et al., 2003). I segni clinici si manifestano solamente in seguito all'infezione sistemica, con iniziale ipertermia oltre i 40°C ed un *rash* eritematoso su labbra e mento. Man mano che la patologia progredisce il *rash* e il prurito peggiorano e le mucose del tratto respiratorio, rettale e la congiuntiva si presentano infiammate (Stephensen et al., 1997; von Messling et al., 2003), con presenza di scolo oculo nasale (Perpiñán et al., 2008). L'infiammazione, insieme ad uno stato di immunosoppressione, facilita l'instaurarsi di infezioni batteriche secondarie, principalmente gastrointestinali e respiratorie, che aggravano il quadro e si assiste alla comparsa di polmoniti, mentre lo scolo oculo nasale diventa mucopurulento (von Messling et al., 2003; Perpiñán et al., 2008). Alcuni ceppi di CDV mostrano scarso tropismo per il sistema nervoso e provocano una patologia più lieve, che può ugualmente comportare il decesso a seguito di polmoniti (Kauffman et al., 1982; Bonami et al., 2007), mentre in caso di ceppi molto virulenti l'animale può iniziare a manifestare sintomi neurologici, quali mioclono, paresi, tremori muscolari, convulsioni e coma (Stephensen et al., 1997; Bonami et al., 2007). La mortalità in animali colpiti da ceppi virulenti è molto elevata, quasi del 100% (Lewington, 2007a; Kiupel and Perpiñán, 2014).

Se il furetto viene colpito da un ceppo adattato a questa specie la malattia è più grave e può portare più rapidamente al decesso, mentre se il ceppo coinvolto è un ceppo canino il decorso è più lento, ma con esito comunque fatale (Langlois, 2005). Il trattamento, di supporto, dovrebbe essere iniziato il prima possibile, tuttavia è improbabile che furetti con sintomatologia grave o neurologica risultino responsivi (Perpiñán et al., 2008).

A causa della gravità e della diffusione di questa patologia, sono stati sviluppati numerosi vaccini, e il loro uso estensivo ha contribuito a rendere il cimurro una patologia sempre meno frequente (Kiupel and Perpiñán, 2014), tuttavia è stato dimostrato che vaccini inattivati forniscono una protezione inferiore rispetto agli altri (Pavlačík et al., 2007), mentre l'utilizzo di ceppi vivi attenuati comporta il rischio di patogenicità residua (Appel, 1978). Negli USA, per il furetto sono stati approvati vaccini ricombinanti (Tanner et al., 2000), che si dimostrano efficaci

e sicuri, tuttavia non sono ancora disponibili in commercio in Europa, dove vengono attualmente utilizzati in deroga vaccini destinati al cane (Moore et al., 2005).

1.1.4.2 RABBIA

La rabbia è una patologia che può colpire la maggior parte dei mammiferi (Rupprecht et al., 2002; Ding et al., 2017), con esito invariabilmente fatale se non trattata tempestivamente (Hemachudha et al., 2002).

L'agente eziologico responsabile di questa patologia è il *Rabies lyssavirus* (RABV), appartenente al genere *Lyssavirus*, famiglia *Rhabdoviridae* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>), ed è un virus dotato di genoma a singolo filamento di RNA negativo non segmentato (Champoux et al., 2004). Il capside è ricoperto da *envelope*, sul quale sono presenti le glicoproteine G, la cui funzione è quella di legare il recettore della cellula bersaglio (Greene, 2006)

Il virus è presente in elevate concentrazioni nella saliva degli animali infetti, e la trasmissione avviene principalmente tramite il morso (Jackson, 2008). A seguire, il virus migra attraverso il sistema nervoso periferico dell'ospite per invadere il sistema nervoso centrale con un periodo di incubazione medio di 2-3 mesi, ma che può variare da 1 settimana ad 1 anno (Rupprecht et al., 2002). Nei furetti il periodo di incubazione medio è di 33 giorni (Niezgoda et al., 1997).

La sintomatologia provocata da RABV è stata ampiamente studiata nel cane, ed è caratterizzata da 3 fasi (Laothamatas et al., 2008). Inizialmente si ha una fase prodromica di 1-3 giorni, con alterazioni del comportamento. In seguito si assiste alla fase furiosa, di 3-4 giorni in cui l'animale dimostra ipersensibilità a stimoli esterni con manifestazioni aggressività immotivata, anche nei confronti di oggetti. In questa fase sono presenti anche ipersalivazione, aritmie, e idrofobia. L'ultima fase, di 2-4 giorni è definita paralitica, ed è caratterizzata da incoordinazione, paralisi della laringe, degli arti, depressione, coma ed infine morte per paralisi respiratoria, dovuta ad un danno progressivo ai motoneuroni (Hemachudha et al., 2002).

Nel furetto la rabbia si manifesta principalmente nella sua forma paralitica con sintomi simili a quelli del cane (Vos et al., 2004) e, in infezioni sperimentali, solamente nel 10% dei casi si sono verificate manifestazioni di aggressività (Lackay et al., 2008). Come nelle altre specie, le uniche lesioni individuabili sono a carico del sistema nervoso centrale, e sono caratterizzate da polioencefalomielite virale non suppurativa (Barnes et al., 2003; Lackay et al., 2008; Kiupel and Perpiñán, 2014).

Una volta instaurata la sintomatologia, ogni trattamento si rivela inefficace e l'esito è sempre fatale (Lackay et al., 2008), per cui la prevenzione gioca un ruolo fondamentale nel controllo di questa patologia. Nei furetti, la vaccinazione viene effettuata generalmente tramite vaccini inattivati, e risulta efficace nel 90% dei casi (Kiupel and Perpiñán, 2014). Dopo la somministrazione della prima dose di vaccino, si assiste ad una rapida comparsa di anticorpi

neutralizzanti, e il soggetto viene considerato coperto dopo 28 giorni, con un'immunità dimostrata per almeno 7 mesi (Hoover et al., 1989; Brown et al., 2016). La risposta ad iniezioni successive, che devono essere ripetute annualmente, è immediata e l'animale è protetto da subito (Brown et al., 2016).

Come parte della strategia per combattere la diffusione di questa patologia, per la movimentazione di un furetto a scopi non commerciali, è necessario che questo sia provvisto di microchip e passaporto (o certificato sanitario), sia stato sottoposto alla vaccinazione antirabbica da almeno 21 giorni e, per l'ingresso da Stati non comunitari, che sia stato effettuato un test per valutare il livello di anticorpi neutralizzanti (https://ec.europa.eu/food/animals/pet-movement/eu-legislation/non-commercial-non-eu_en).

1.1.4.3 ALEUTIAN DISEASE

L'*Aleutian disease* è una patologia cronica e progressiva che colpisce diversi mustelidi, causata dall'*Aleutian mink disease virus* (AMDV), un parvovirus appartenente al genere *Amdoparvovirus*, specie *Carnivore* *amdoparmovirus* 1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>). La patologia prende il nome dal gene *Aleutian*, responsabile della colorazione blu del mantello dei visoni nei quali è stata descritta per la prima volta (Maclachlan and Dubovi, 2010). Successivi studi hanno dimostrato che animali omozigoti per questo gene sono più sensibili all'infezione da parte del virus e manifestano una forma più grave della patologia, dato che l'omozigosi è associata ad un'anomalia lisosomiale del tipo Chediak-Higashi, che inibisce la distruzione di immunocomplessi fagocitati, i quali sono alla base del meccanismo patogenetico dell'*Aleutian disease* (Langlois, 2005; Maclachlan and Dubovi, 2010; Kiupel and Perpiñán, 2014).

Nel visone la patologia si manifesta rapidamente, ed è caratterizzata da un'imponente reazione anticorpale contro le proteine virali, che a lungo termine porta alla formazione di immunocomplessi che si depositano e provocano lesioni in vari organi, inclusi reni, fegato, arterie ed encefalo, esitando in una forma clinica di scadimento generalizzato (Bloom et al., 1982; Aasted et al., 1998). Il furetto si è dimostrato suscettibile all'infezione da AMDV, tuttavia la progressione della patologia è più lenta, e può durare fino a 2 anni. La trasmissione avviene per contatto diretto con feci, urine, saliva o sangue, ma anche per via indiretta data la spiccata resistenza del virus nell'ambiente (Langlois, 2005). In questa specie è stato identificato un gruppo di virus geneticamente distinto dal virus circolante nei visoni, in linea con l'elevata variabilità genetica tipica dei parvovirus (Knuutila et al., 2009). In casi estremamente rari, alcuni allevatori di visoni sono risultati positivi ad AMDV con sintomi e lesioni simili a quelli dei visoni e la persistenza di anticorpi anti-AMDV per lunghi periodi, ponendo degli interrogativi sulla possibile natura zoonotica di AMDV (Jepsen et al., 2009).

I vaccini finora studiati non si sono tuttavia dimostrati sufficientemente efficaci (Aasted et al., 1998; Castelruiz et al., 2005) e la natura immunomediata di questa patologia complica lo sviluppo di una valida strategia di immunizzazione.

1.1.4.4 INFLUENZA

I virus dell'influenza sono virus con genoma a singolo filamento di RNA negativo, segmentato, appartenenti alla famiglia *Orthomyxoviridae*. Esistono 4 generi di influenzavirus, *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus* e *Deltainfluenzavirus*. Ogni genere include una sola specie, rispettivamente *Influenzavirus A*, *B*, *C* e *D* (Pringle, 1999).

I virus conosciuti come influenzavirus A e B sono responsabili dell'influenza stagionale, mentre quello appartenente alla specie C comporta una patologia più lieve, spesso priva di sintomi. Solamente l'influenza A virus è stato ulteriormente diviso in sottotipi, determinati dalle caratteristiche dell'emoagglutinina (HA), una glicoproteina presente sulla superficie delle particelle virali responsabile dell'ingresso del genoma virale nella cellula bersaglio, e della neuroaminidasi (NA), altra glicoproteina responsabile del rilascio delle particelle virali dalla cellula stessa. Le varie differenze in queste proteine determinano la nomenclatura del virus (Belser et al., 2011).

Questo virus in particolare ha infatti dimostrato una capacità di mutazione più rapida rispetto alle altre specie di influenzavirus, caratteristica che lo rende notevolmente più virulento (Eccles, 2005). Il fatto che possa colpire un ampio spettro d'ospiti, tra cui equini, suini, mammiferi acquatici ed uccelli, oltre all'uomo, contribuisce a renderlo ancor più pericoloso in quanto, se introdotto all'interno di una popolazione priva di immunità nei suoi confronti, può avere la capacità di provocare in breve tempo un'epidemia (Khanna et al., 2008).

Ad esempio, studi molecolari hanno dimostrato che il sottotipo H1N1 di influenza A virus responsabile della recente pandemia del 2009 nell'uomo, possiede una stretta correlazione genetica con ceppi rinvenuti nel suino, confermando il salto d'ospite all'origine della pandemia (Girard et al., 2010).

La trasmissione del virus avviene per contatto diretto tra individui, tramite goccioline (*droplets*) prodotte con colpi di tosse o starnuti (Killingley and Nguyen-Van-Tam, 2013) ed è stata documentata anche da uomo a furetto (Enkirch and von Messling, 2015), mentre la trasmissione da furetti ad umani non è mai stata riportata, eccetto un unico caso risalente al 1930 in cui un operatore di laboratorio ha mostrato sintomi dopo uno stretto contatto con un furetto precedentemente sottoposto ad infezione sperimentale (Smith and Stuart-harris, 1936). Al contrario, furetti infetti si sono dimostrati ampiamente in grado di trasmettere il virus a conspecifici alloggiati nella stessa gabbia o in gabbie adiacenti (Jayaraman et al., 2011). Come per gli umani, la morbilità è elevata, mentre la mortalità è ridotta, e questa patologia ha esito fatale soprattutto in soggetti giovani o immunocompromessi (Langlois, 2005). I segni

clinici dovuti all'infezione da parte di questo virus variano in base al ceppo virale e alle caratteristiche dell'ospite. Generalmente il decorso è acuto, in media 3-5 giorni in assenza di complicazioni (Maher and DeStefano, 2004), caratterizzato dalla presenza di rinite che può progredire a tracheobronchite (Maher and DeStefano, 2004). Tra i sintomi più comuni si annoverano starnuti, scolo nasale, abbattimento ed ipertermia, che si manifestano 48 ore dopo l'infezione, e si risolvono spontaneamente (Collie et al., 1980; Kiupel and Perpiñán, 2014). Raramente si assiste allo sviluppo di polmoniti interstiziali, solamente in soggetti colpiti da ceppi pneumotropi del virus (Maher and DeStefano, 2004).

Vista l'elevata contagiosità di questa patologia, è fondamentale evitare il contatto tra animali suscettibili ed animali o esseri umani con sintomi respiratori, in quanto la prevenzione diretta gioca un ruolo importante nel limitarne la diffusione (Langlois, 2005; Quesenberry and Carpenter, 2011). Non esistono in commercio vaccini approvati per furetti, tuttavia la patologia ha un decorso generalmente lieve ed è generalmente sufficiente un trattamento di supporto (Lewington, 2007a; Kiupel and Perpiñán, 2014)

1.1.4.5 CORONAVIROSIS

Sono stati descritti due distinti coronavirus che colpiscono il furetto. Entrambi appartengono al genere *Alphacoronavirus*, sottogenere *Minacovirus*, di cui sono gli unici rappresentanti insieme alla specie *Mink coronavirus 1* e sono conosciuti come ferret enteric coronavirus (FRECV) e ferret systemic coronavirus (FRSCV) (Stout et al., 2021). Ufficialmente, all'interno della tassonomia è possibile individuare solamente *Mink coronavirus 1* (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>), e i coronavirus del furetto vengono categorizzati come varianti di questa specie, sebbene siano recentemente state avanzate diverse proposte per un'effettiva distinzione di specie tra i due virus (Stout et al., 2021).

FRECV è responsabile di una patologia chiamata inizialmente enterite epizootica catarrale, non dissimile dalle forme di enterite provocate da coronavirus in altre specie, come la gastroenterite trasmissibile del suino (TGE) (Williams et al., 2000), ed analisi approfondite hanno individuato una stretta correlazione con feline coronavirus (FeCoV) e canine coronavirus (CCoV) anche a livello genetico (Wise et al., 2006).

Questa patologia, descritta per la prima volta in America nel 1993, è caratterizzata da un'elevata morbilità che spesso raggiunge anche il 100% della popolazione esposta, tuttavia fortunatamente la mortalità risulta bassa, inferiore al 5% (Williams et al., 2000). I soggetti colpiti si presentano inizialmente letargici ed anoressici, successivamente sviluppano sintomi gastrointestinali quali vomito e diarrea mucosa che si risolvono in media entro 5-7 giorni (Williams et al., 2000). La quasi totalità degli animali guarisce entro 21 giorni, ma l'eliminazione del virus può durare per lunghi periodi, fino ad 8 mesi (Williams et al., 2012).

Più recentemente, a partire dal 2004, è stata tuttavia segnalata in vari furetti la presenza di

un'altra patologia, causata da un coronavirus distinto, FRSCV, caratterizzata da infiammazione piogranulomatosa sistemica, molto simile alla peritonite infettiva felina (FIP) (Martínez et al., 2006). I soggetti colpiti presentano sintomi aspecifici, quali perdita di peso, letargia, anoressia, diarrea e presenza di masse addominali palpabili (Garner et al., 2008), non sono responsivi a trattamenti e la progressione della patologia appare invariabilmente fatale, come avviene per la FIP (Hartmann, 2005; Garner et al., 2008). Le lesioni causate da queste due patologie sono quasi sovrapponibili e caratterizzate dalla presenza di foci nodulari disseminati sulla superficie delle sierose e nel parenchima degli organi addominali, con un'importante componente perivascolare. L'infiammazione può progredire fino a coinvolgere il sistema nervoso centrale (Garner et al., 2008).

Sebbene sia stato dimostrato che FRSCV è geneticamente più simile a FRECV che a qualsiasi altro Alphacoronavirus (Wise et al., 2010), non è stato tutt'oggi individuato un legame tra questi due virus paragonabile alla teoria della "mutazione interna" che avverrebbe tra i patotipi di FeCoV responsabili della forma enterica e di FIP (Stout et al., 2020). Come nel caso dei coronavirus felini, non esiste tutt'ora un vaccino efficace contro FRECV e FRSCV, e la prevenzione diretta rimane fondamentale per evitare il contagio (Lewington, 2007a; Perera et al., 2018).

1.1.4.6 INFEZIONI BATTERICHE

Nei furetti, le infezioni primarie da parte di batteri sono più rare rispetto a quanto avviene nelle altre specie animali domestiche, dato che vengono tenuti prevalentemente in casa e conducono generalmente uno stile di vita più protetto (Rosenthal, 2007). Il ruolo di questi organismi come patogeni è infatti quello di infezioni secondarie a condizioni debilitanti oppure a polmoniti da aspirazione (Powers, 2009). Tra i microorganismi individuati come responsabili di polmoniti batteriche secondarie ad influenzavirus possono essere citati *Streptococcus equi zooepidemicus*, *Streptococcus pneumoniae* ed altri streptococchi (Bell and Dudgeon, 1948; Andrews et al., 1979; Swennes and Fox, 2014). Da lesioni polmonari in furetti sono anche state isolate numerose specie di *Mycobacterium spp.* (Lunn et al., 2005; Powers, 2009), vari Gram-negativi come *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Liberson et al., 1983; Martínez et al., 2012; Swennes and Fox, 2014), oltre a *Bordetella bronchiseptica* e *Listeria monocytogenes* (Quesenberry and Carpenter, 2011). È stato inoltre dimostrato un effetto sinergico tra questi patogeni ed influenza, la cui compresenza in un ospite condiziona il decorso della patologia e la prognosi (Jakeman et al., 1991; McCullers et al., 2010). Un trattamento antibiotico è generalmente efficace contro questi agenti patogeni (Swennes and Fox, 2014), tuttavia in soggetti molto giovani spesso l'esito può essere fatale (Collie et al., 1980; Smith and Sweet, 1988). Specie di *Mycobacterium spp.* possono inoltre essere responsabili di patologia gastrointestinale, con comparsa di enterite e diarrea, insieme

a *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni* e *Clostridium perfringens* (Marini R P et al., 1989; Lugton et al., 1997; Lucas et al., 2000; Powers, 2009). Un altro importante patogeno gastroenterico nel furetto è *Helicobacter mustelae*, spesso causa di lesioni ed ulcere gastriche in animali immunodepressi (Johnson-Delaney, 2005). Le infezioni cutanee sono rare nel furetto, generalmente secondarie a graffi o morsi, e i principali agenti responsabili sono *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus spp.* (Paterson, 2008). Una volta instaurata l'infezione, si può manifestare con cellulite, pioderma o ascessi (Pilny and Hess, 2004). Ascessi dovuti ad *Actinomyces spp* si possono riscontrare anche in seguito a lesioni della mucosa del cavo orale, generalmente localizzati a livello cervicale, e possono raggiungere dimensioni tali da causare dispnea rendendo necessaria l'incisione e l'applicazione di un drenaggio (Pilny and Hess, 2004).

1.2 - IL FURETTO COME MODELLO ANIMALE NELLA SPERIMENTAZIONE SCIENTIFICA

Il furetto trova impiego anche come animale da laboratorio nella ricerca scientifica, prevalentemente in ambito medico.

Nonostante la sua antica domesticazione, il furetto non è stato preso in considerazione per questo scopo prima del 1900, e la sua importanza è rimasta marginale per parecchio tempo (Pyle, 1940).

Le dimensioni di questo animale, la facilità di gestione e il suo ciclo biologico, insieme al possesso di caratteristiche anatomiche, metaboliche e fisiologiche simili a quelle della specie umana, hanno portato ad un maggior utilizzo del furetto come modello animale nella ricerca in svariati ambiti medici, come cardiologia, pneumologia, neurologia e gastroenterologia (Pearson R C and Gorham J R, 1987).

1.2.1 - CARDIOLOGIA

L'interesse nell'utilizzo del furetto nello studio di patologie cardiovascolari deriva principalmente dal fatto che l'apparato cardiocircolatorio di questo animale funziona in maniera comparabile a quella di mammiferi di taglia superiore, incluso l'uomo, fornendo in questo modo un modello per studiare stati fisiologici e fisiopatologici in quest'ultimo (Morgan, 2014).

Inoltre, il cuore di furetto è in grado di mantenere condizioni emodinamiche e metaboliche stabili *ex vivo* per un periodo di tempo sensibilmente superiore rispetto al cuore di ratto, caratteristica che rende questa specie preziosa nell'ambito di studi che prevedano l'uso di *cuore isolato e perfuso* secondo Langendorff (Neubauer and Ingwall, 1991; Morgan, 2014).

Il miocardio possiede un rapporto forza/frequenza positivo, come nell'uomo, e la struttura anatomica del nodo senoatriale inoltre si avvicina maggiormente a quella umana se paragonata ad altri modelli animali (Brahmajothi et al., 2010).

I muscoli papillari possono essere agevolmente isolati a partire da entrambi i ventricoli, grazie al loro numero elevato e alle dimensioni ridotte, rendendo possibile lo studio dell'effetto di un elevato numero di sostanze, quali cocaina (Qiu and Morgan, 1993), cocaetilene (Qiu and Morgan, 1993), metilecgonidina (Huang et al., 1997), endotelina (Wang et al., 1991), ATP (Qu et al., 1993), *insulin-like growth factor-1* (Cittadini et al., 1998) e idralazina (Hurrell et al., 1993). Singoli cardiomiociti possono inoltre essere isolati ed utilizzati in studi elettrofisiologici (Morgan, 2014).

Come cane e gatto, anche questo animale è soggetto a numerose patologie cardiache e tra esse le più frequenti sono cardiomiopatia dilatativa (Lipman, 1987; Weiss and Scott, 1997),

aritmie e disordini vascolari acquisiti (Kottwitz et al., 2006). La presentazione clinica di queste patologie è sovrapponibile a quella di cane e gatto (Ensley and Winkle, 1982; Lipman, 1987) sebbene, a differenza di questi ultimi, una delle manifestazioni più significative sia debolezza degli arti posteriori, non necessariamente correlata ad eventi trombotici (Quesenberry and Carpenter, 2011)

Data l'efficacia di tecniche radiografiche (Stepien et al., 1999), elettrocardiografiche (ECG) (Bublout et al., 2006), ed ecografiche (Vastenburg et al., 2004; Dudás-Györki et al., 2011) nella diagnosi e nello studio di tali condizioni patologiche e grazie alla taglia relativamente grande del furetto se paragonato alla maggior parte dei roditori utilizzati come modello animale, questo animale è stato sfruttato anche per studi concernenti lo sviluppo di tecniche chirurgiche e approcci terapeutici invasivi, quale l'impianto di pacemaker (Morgan, 2014).

1.2.2 - PNEUMOLOGIA

Tutt'oggi vengono utilizzate numerose specie animali per lo studio di patologie respiratorie, per l'efficacia di terapie antivirali nel loro trattamento, per lo sviluppo di vaccini e per la sicurezza di questi ultimi.

I piccoli roditori presentano il vantaggio di poter essere utilizzati agevolmente in numero elevato e ciò rende queste specie indispensabili, sebbene esistano alcune sostanziali differenze tra il loro apparato respiratorio e quello umano (Persson and Gelfand, 2002). Allo stesso tempo, le misure di contenimento richieste per accedere a laboratori con livello di biosicurezza 3 (BSL3) rendono complicato l'utilizzo di animali di dimensioni maggiori (Guo et al., 2019).

Per la loro anatomia, i furetti si sono dimostrati un prezioso supporto nello studio di virus respiratori che colpiscono l'uomo, ed inoltre rappresentano un'eccellente alternativa all'utilizzo di primati non umani per tali studi. Sono infatti suscettibili ad un elevato numero di virus respiratori, inclusi influenza A virus (IAV) (Maher and DeStefano, 2004), severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV) (Martina et al., 2003), human respiratory syncytial virus (hRSV) (Chan et al., 2017) e human metapneumovirus (hMPV) (Schildgen et al., 2007), nonché ad altre patologie.

Un problema per la ricerca consiste nel fatto che molti patogeni che colpiscono il tratto respiratorio negli umani hanno la capacità di infettare piccoli animali senza tuttavia provocare in essi segni o sintomi che possano essere correlati a quelli causati nei primati (Martina et al., 2003; MacPhail et al., 2004; Bossart et al., 2009). Al contrario, il furetto si dimostra un modello animale particolarmente adatto, poiché il suo apparato respiratorio condivide numerose proprietà con i tessuti e l'architettura del medesimo apparato nell'essere umano, e ciò

comporta una manifestazione sintomatologica sovrapponibile in queste due specie (Taylor, 2014; Enkirch and von Messling, 2015).

Inoltre, sia il volume polmonare che il diametro delle vie aeree si dimostrano elevati in relazione alla taglia del furetto; basti pensare che la capacità polmonare del furetto supera del 297% il valore che ci si aspetterebbe di norma in un mammifero di tali dimensioni, peculiarità probabilmente dovuta ad un adattamento ad una vita all'interno di tane sotterranee (Vinegar et al., 1985).

Le dimensioni dei polmoni del furetto si dimostrano quindi estremamente vantaggiose per studi di *uptake*, *clearance* e deposizione di aerosol, e sulla meccanica del flusso ematico polmonare (Whary, 2014). La quantità di ghiandole sottomucose nella parete bronchiale (Hyde et al., 1979; Robinson et al., 1986) e la presenza di una o due diramazioni dei bronchioli terminali (Robinson et al., 1986; Johnson-Delaney and Orosz, 2011) sono altre affinità con l'anatomia umana, unite alla lunghezza della trachea, che nel maschio adulto misura in media 10 cm, appena 2 cm più corta rispetto a quella umana che misura in media 12 cm (Ben-Jebria et al., 1995). La dimensione dei polmoni comporta la possibilità di ricavare diversi preparati da un singolo animale, che possono in questo modo anche fungere da controllo nel caso di misurazioni simultanee di risposte fisiologiche a varie condizioni sperimentali *in vitro* (Whary, 2014).

1.2.3 - INFLUENZA

Il furetto viene attualmente utilizzato come modello animale per studi sull'influenza, soprattutto dopo il rinnovato interesse verso il ceppo H1N1 come patogeno umano, che continua a rivelarsi una minaccia per la salute (Belser et al., 2011).

In questo scenario il furetto si è dimostrato un eccellente modello, essendo altamente suscettibile a ceppi di influenzavirus umani e aviari (Belser et al., 2011). Sintomatologia e distribuzione delle lesioni provocate da questo virus sono infatti del tutto simili in uomo e furetto. Questa caratteristica è dovuta alla distribuzione dei recettori dell'acido sialico nel tratto respiratorio quasi sovrapponibile in queste due specie (Shinya et al., 2006; van Riel et al., 2007). Questi recettori fungono infatti da sito di legame per gli influenzavirus determinando così le differenze nella manifestazione della patologia. Influenzavirus stagionali mostrano una maggior affinità verso i recettori localizzati nel tratto respiratorio superiore e la patologia in questo caso è lieve, caratterizzata da un'infezione pressoché limitata alle prime vie aeree (Huang et al., 2011; van den Brand et al., 2012), mentre influenzavirus ad alta patogenicità mostrano una selettività nei confronti dei recettori più profondi, con un esteso coinvolgimento polmonare ed una sintomatologia nettamente più grave (van Riel et al., 2007; Kumlin et al.,

2008; Enkirch and von Messling, 2015).

Oltre all'importanza rivestita nello studio della patogenesi dell'influenza, il furetto è stato ampiamente utilizzato per lo studio della risposta immunitaria e per testare l'efficacia di terapie e vaccini (Smith and Sweet, 1988; Sweet et al., 2002; Maher and DeStefano, 2004; Svitek et al., 2008). Studi condotti su questo animale hanno infatti evidenziato l'importanza che rivestono i linfociti citotossici nel decorso della patologia (McLaren and Butchko, 1978), hanno approfondito la natura immunomediata delle lesioni (Svitek et al., 2008) e hanno portato allo sviluppo di vaccini efficaci contro influenza, fondamentali per combatterne la diffusione (Baras et al., 2008; Mahmood et al., 2008; Chen et al., 2009).

1.2.4 - SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME-RELATED CORONAVIRUS (SARS-CoV)

Come per altre patologie respiratorie, il furetto si è dimostrato estremamente utile nello studio della *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS).

Questa patologia è una zoonosi emersa nel 2002 nel sud della Cina, nella provincia del Guangdong, ed ha causato un'epidemia che ha colpito più di 8000 persone in meno di un anno, con un tasso di mortalità che si approssima al 10% (Cherry, 2004). L'agente eziologico è stato individuato in un coronavirus, denominato *SARS-related coronavirus* (SARS-CoV), la cui origine è stata attribuita a pipistrelli del genere *Rhinolophus spp.*, ospiti naturali di vari coronavirus (Li et al., 2005). In particolare, sono state riscontrate forti omologie con coronavirus SARS-like (SL-CoV) nei pipistrelli, e si ritiene che uno di questi abbia acquisito la capacità di infettare l'uomo dopo il passaggio ad un ospite intermedio, la civetta delle palme mascherata (*Paguma Larvata*, Hamilton-Smith 1826), dando origine a SARS-CoV (Guan et al., 2003; Cheng et al., 2007).

La trasmissione del virus avviene solamente dopo l'instaurarsi dei sintomi, per contatto diretto tra individui, principalmente tramite escrezioni dell'apparato respiratorio (Anderson et al., 2004). Vista l'emergenza causata da questa epidemia, numerose ricerche sono state condotte utilizzando modelli animali (Gautam et al., 2020).

Nello studio della patogenesi di SARS-CoV, il topo si è tuttavia dimostrato un modello inadeguato, in quanto questa specie animale è in grado di supportare la replicazione del virus all'interno delle proprie vie aeree senza tuttavia sviluppare la patologia ad esso correlata (Roberts et al., 2007). Il furetto si è dimostrato invece suscettibile all'infezione da parte di SARS-CoV (Martina et al., 2003; Cameron et al., 2012), manifestando inoltre una sintomatologia respiratoria simile a quella umana, sebbene con una letalità notevolmente inferiore (Darnell et al., 2007; Cameron et al., 2012).

1.2.5 - ALTRI CORONAVIRUS UMANI

A causa della loro rapida evoluzione, i coronavirus rappresentano una minaccia per la salute umana, e l'epidemia di SARS del 2002 ha portato allo sviluppo di numerosi programmi di sorveglianza nei confronti di questo gruppo di virus (To et al., 2013). A dimostrazione del loro potenziale, altre problematiche sanitarie dovute a coronavirus di origine animale sono emerse negli ultimi anni (Guarner, 2020).

Tra queste, la *Middle East respiratory syndrome* (MERS) ha attirato l'attenzione globale a partire dal 2012, quando è emersa causando un'epidemia originata in Arabia Saudita (Mackay and Arden, 2015), con casi ad oggi riscontrati in almeno 27 diversi paesi (<https://www.who.int/health-topics>).

Come la SARS, la MERS è sostenuta da un coronavirus denominato *Middle East respiratory syndrome-related coronavirus* (MERS-CoV). Studi scientifici affermano che MERS-CoV derivi da coronavirus (HKU4 e HKU5) endemici in pipistrelli, rispettivamente dei generi *Tylosycteris* e *Pipistrellus* (Woo et al., 2012b), tuttavia in questo caso l'ospite intermedio è stato individuato nei camelidi (Azhar et al., 2014; Corman et al., 2014). Il genoma di MERS-CoV che colpisce l'essere umano è infatti simile al 99,9% a quello di MERS-CoV che colpisce i dromedari (Hemida et al., 2014), tuttavia non è stato ancora chiarito il passaggio del virus dal pipistrello all'ospite intermedio. Le proteine S di HKU4 e MERS-CoV si legano entrambe al medesimo recettore (Raj et al., 2013), tuttavia solamente MERS-CoV è in grado di infettare l'essere umano, in quanto HKU4 non riesce ad utilizzare le proteasi umane per mediare il suo ingresso nella cellula (Yang et al., 2014).

La trasmissione di questa patologia avviene principalmente in ambito nosocomiale (Chowell et al., 2015), probabilmente poiché l'eliminazione virale avviene solamente in seguito alla manifestazione dei sintomi (Cowling et al., 2015), tuttavia il tasso di mortalità è elevato (34,4%) (M. Park et al., 2020), con il 50-89% dei soggetti colpiti che necessitano il ricovero in terapia intensiva (Assiri et al., 2013; Saad et al., 2014). A settembre 2019, erano stati riportati 2494 casi di MERS (Al-Omari et al., 2019), con 858 decessi (<https://www.who.int/health-topics>).

Diverse ricerche sono state condotte su MERS utilizzando il furetto come modello animale, che tuttavia non si è dimostrato adatto allo studio di questa patologia. Ciò è dovuto al fatto che MERS-CoV utilizza un recettore diverso da quello di SARS-CoV (Raj et al., 2014), e il furetto non è in grado di supportare la replicazione virale (Gretebeck and Subbarao, 2015). Al contrario, si è dimostrato un modello efficace per un altro coronavirus di recente comparsa, SARS-CoV-2 (Gautam et al., 2020; Kim et al., 2020).

1.3 - SARS-CoV-2

18 anni dopo la comparsa di SARS in Cina e 8 dopo la comparsa di MERS in Arabia Saudita, una nuova epidemia causata da un coronavirus minaccia la salute umana (Hasöksüz et al., 2020). L'insorgenza di tre coronavirus altamente patogeni di origine zoonotica in meno di due decenni evidenzia il ruolo degli animali nella trasmissione di questa specie di virus, insieme all'importanza del lavoro dei veterinari per controllarne la diffusione.

1.3.1 – TASSONOMIA E MORFOLOGIA

Con il termine coronavirus si identificano virus appartenenti all'ordine *Nidovirales*, sottordine *Cornidovirineae* famiglia *Coronaviridae*, sottofamiglia *Orthocoronavirinae* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>). Vengono ulteriormente suddivisi in quattro generi, *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* in base ad analisi genetiche (Brian and Baric, 2005). Sono virus dotati di *envelope*, di circa 100 nm di diametro, caratterizzati dalla presenza di peplomeri di grosse dimensioni (180-200 kDa), che ne ricoprono la superficie (Holmes, 1999). Possiedono un genoma a singolo filamento di RNA positivo di 26-32 kilobasi, che contiene 6 open reading frame (ORF), ovvero geni che codificano per proteine (Sieber et al., 2018).

Il primo ORF costituisce all'incirca due terzi dell'intero genoma, e codifica due polipeptidi, chiamati pp1a e pp1ab, associati al gene replicasi. Dopo la trascrizione, questi polipeptidi vengono scissi in un complesso di 15-16 proteine non strutturali, necessarie alla replicazione dell'RNA virale e alla produzione di RNA messaggero (Gorbalenya et al., 1989). La maggior parte del materiale genomico restante codifica invece 4 proteine strutturali, E (proteina *envelope*, del rivestimento del virione), M (proteina di membrana), N (proteina del nucleocapside) ed S (proteina *Spike*). Alcuni coronavirus appartenenti al genere *Betacoronavirus* codificano un'emoagglutinina-esterasi, (HE), non necessaria per la replicazione virale (Lissenberg et al., 2005).

La glicoproteina S, che costituisce i peplomeri presenti sulla superficie virale (Holmes, 1999), riveste un ruolo di particolare rilevanza in quanto è l'unica proteina di membrana responsabile per l'ingresso del virus all'interno della cellula (Cavanagh, 1995), ed è grazie a differenze a questo livello che i coronavirus possono infettare un'ampia varietà di ospiti (Guan et al., 2003). Questa glicoproteina è costituita da 2 subunità: S1 è la subunità periferica e responsabile del legame ai recettori, S2 è la parte di proteina transmembrana che regola la fusione del virus con la membrana cellulare. La proteina *Spike* stimola inoltre le risposte immunitarie cellulo-mediate ed anticorpale da parte dell'ospite infetto (Bosch et al., 2003).

I coronavirus sono caratterizzati da un'eccezionale capacità di evolvere rapidamente,

cambiando il loro profilo antigenico, il tropismo tissutale e lo spettro d'ospite (Decaro and Lorusso, 2020), grazie ad un elevato tasso di sostituzione nucleotidica e alla ricombinazione genetica (Banner and Mc Lai, 1991; Decaro and Lorusso, 2020). Grazie alla loro capacità di adattamento, i coronavirus oggi sono in grado di colpire un ampio spettro di ospiti (Holmes, 1999). A questo proposito, studi scientifici individuano l'origine di coronavirus appartenenti ai generi *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* nei pipistrelli, e quella di *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus* in uccelli (Woo et al., 2012a). Da questi primi ospiti, i virus si sono poi evoluti riuscendo ad adattarsi a diverse specie animali, ad esempio tutt'oggi all'interno della specie *Alphacoronavirus 1* ritroviamo virus in grado di causare patologie in numerosi animali domestici, tra cui transmissible gastroenteritis virus (TGEV) del suino (Threats et al., 2004), canine coronavirus (CCoV) e feline coronavirus (FeCoV) (Tekes and Thiel, 2016).

Anche all'interno del genere *Betacoronavirus* sono annoverate specie in grado di causare patologia in un'ampia varietà di animali, tra cui bovine coronavirus (BCoV), canine respiratory coronavirus (CRCoV) e murine coronavirus (MCoV) (Zappulli et al., 2020), tuttavia questo genere assume particolare rilevanza per la sanità pubblica in quanto tutte le specie di coronavirus in grado di provocare patologia grave nell'uomo appartengono proprio ad esso. Negli esseri umani sono state infatti individuate ad oggi 7 specie di coronavirus in grado di causare patologia. Human coronavirus HCoV-229E e HCoV-NL63 (*Alphacoronavirus*), come pure HCoV-HKU1 e HCoV-OC43 (*Betacoronavirus*), hanno un comportamento stagionale e provocano generalmente una sintomatologia lieve simil-influenzale (Richman et al., 2009). I restanti, che appartengono tutti al genere *Betacoronavirus*, sono invece agenti zoonotici in grado di causare patologia grave con esito anche fatale. Questi sono SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 (Fehr and Perlman, 2015; Hasöksüz et al., 2020).

1.3.2 - STORIA DELLA PANDEMIA

Il 31 dicembre 2019, la sede cinese dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) è stata allertata sulla presenza di svariati casi di polmonite ad eziologia sconosciuta sviluppatasi a Wuhan, città situata nella provincia cinese di Hubei (Riou and Althaus, 2020).

L'agente eziologico è stato individuato il 7 gennaio 2020 e denominato inizialmente *novel coronavirus 2019* (2019-nCoV) (WHO/2019 nCoV/Surveillance/2020.2, 2020), poi rinominato *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2* (SARS-CoV-2) il 13 febbraio 2020 (<http://www.salute.gov.it/portale/news/>). La patologia da esso causata è stata chiamata COVID-19.

Il 30 gennaio 2020 l'OMS ha dichiarato questa patologia un'emergenza sanitaria pubblica di portata internazionale (<https://www.who.int/news>). Il 31 gennaio, i primi 2 casi di COVID-19

sono stati registrati in Italia. I pazienti positivi totali confermati al tempo erano 9826, 9720 dei quali in Cina (<https://www.who.int/docs>). Un mese dopo, l'1 Marzo 2020, i casi confermati erano saliti a 87137, con 2977 decessi correlati a questa patologia (<https://www.who.int/docs>). L'11 Marzo l'OMS ha dichiarato COVID19 una pandemia, con 118319 casi confermati e 4292 decessi (<https://www.who.int/director-general/speeches>).

1.3.3 - SPETTRO D'OSPITE E TROPISMO

SARS-CoV-2 è un *Betacoronavirus*, apparente al sottogenere *Sarbecovirus* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>), strettamente correlato ai SARS-like coronavirus dei pipistrelli e a SARS-CoV, con cui condivide nomenclatura e sottogenere. Come quest'ultimo, si presume che SARS-CoV-2 derivi da coronavirus dei pipistrelli (Benvenuto et al., 2020), e sono stati indagati anche altri possibili ospiti intermedi, sebbene non ci sia ancora certezza su quale animale abbia ricoperto questo ruolo (Wan et al., 2020). Dopo le fasi iniziali della pandemia, è stata resa pubblica la sequenza genetica del patogeno (Lu et al., 2020), che si è rivelata identica all'88% a quella di due coronavirus trovati nei pipistrelli, bat-SL-CoVZC45 e bat-SL-CoVZXC21, nonché simile al 79% a quella di SARS-CoV (Lu et al., 2020). Successive analisi hanno evidenziato un'identità del 96% tra SARS-CoV-2 e il virus RaTG13, campionato da pipistrelli *Rhinolophus affinis* in Cina già nel 2013 (Rahalkar and Bahulikar, 2020), ma le caratteristiche di RaTG13 a livello di *receptor binding domain* (RBD) impedirebbero la replicazione nell'ospite uomo, indebolendo l'ipotesi di uno *spillover* diretto. Altre ipotesi sono state avanzate a partire da campionamenti effettuati su pangolini, nei quali sono stati rinvenuti coronavirus con una minore identità con SARS-CoV-2, ma con maggiore affinità dell'RBD per i recettori umani. Queste evidenze suggerirebbero una circolazione virale e un adattamento al nuovo ospite promosso da pressioni selettive naturali (Andersen et al., 2020).

Allo stesso tempo, la sequenza nucleotidica di SARS-CoV-2 è identica circa al 91% a quella di pangolin-CoV-2020, un coronavirus che trova come ospite il pangolino del Borneo (*Manis javanica*, Desmarest 1822) (T. Zhang et al., 2020).

Per quanto riguarda l'ospite serpente, il suo ruolo è stato suggerito sulla base di una similitudine con il *codon usage bias* di SARS-CoV2 (Ji et al., 2020), che può indicare l'adattamento di un virus al suo ospite attraverso l'utilizzo preferenziale di determinati codoni in favore di quelli maggiormente utilizzati dall'ospite (Bahir et al., 2009).

Tuttavia, come già accennato, la variabilità in regioni chiave per il legame al recettore della cellula ospite può determinare la capacità del virus di replicare o meno in un determinato ospite. Tra queste, l'RBD della proteina *Spike* lega l'enzima 2 convertitore dell'angiotensina

(*Angiotensin-converting enzyme 2*, ACE2), lo stesso recettore utilizzato da SARS-CoV (Hoffmann et al., 2020). Nel caso di SARS-CoV-2, questo dominio tuttavia assume una conformazione più compatta rispetto a quella di SARS-CoV, caratteristica che gli consente di legare i recettori ACE2 con un'affinità maggiore rispetto a quella degli altri coronavirus conosciuti (Kirchdoerfer et al., 2016; Shang et al., 2020). Nell'essere umano, questo recettore è localizzato principalmente a livello di pneumociti di tipo 1 e 2, ma anche di cellule endoteliali in numerosi tessuti e sulla superficie di tutto il tratto enterico (Hamming et al., 2004). La distribuzione di ACE2 nel furetto è lievemente differente e i recettori sono assenti a livello di pneumociti di tipo 1 (Zamoto et al., 2006), ma la loro affinità verso SARS-CoV-2 è pari a quella nell'uomo (Sun et al., 2021).

1.3.4 - PATOGENESI E SEGNI CLINICI

La sintomatologia causata dall'infezione da SARS-CoV-2 è generalmente respiratoria (febbre, tosse, dispnea), talvolta associata ad episodi di diarrea e può essere molto variabile, da casi subclinici a polmoniti di varia gravità (Habas et al., 2020). I casi critici sono caratterizzati da *acute respiratory distress syndrome* (ARDS), shock settico e insufficienza multiorgano (Wu and McGoogan, 2020), ma in generale la letalità di SARS-CoV-2 è inferiore a quella di SARS-CoV e MERS-CoV (Ruan, 2020). Questa caratteristica tuttavia contribuisce anche all'elevata capacità di diffusione del virus (Cleary et al., 2020). La mortalità varia in base al paese preso in considerazione, attestandosi tra l'1 e il 2%, dal momento che è influenzata da misure di prevenzione, controllo e livello di assistenza sanitaria (Ruan, 2020), ma esistono numerosi altri fattori di rischio relativi al paziente, come età, obesità, diabete, immunodepressione e sesso maschile (Cleary et al., 2020) (Ruan, 2020).

Il decorso clinico è caratteristico di una risposta immunitaria incontrollata contro l'agente virale, con lo sviluppo di ARDS in seguito ad un'infezione persistente (Gattinoni et al., 2020). Le lesioni provocate da ARDS sono eterogenee, e possono coinvolgere sia aree di scambio gassoso che spazi morti polmonari, con diversa estensione (Gattinoni et al., 2020). Inoltre, l'attività del sistema immunitario può esitare in una sovrapproduzione di citochine (*cytokine storm*), che può coinvolgere diversi altri organi ed aggravare le stesse lesioni polmonari, fino a causare la morte per insufficienza multiorgano (Blanco-Melo et al., 2020).

In questo caso, l'infiammazione è stata anche associata a coagulopatia caratterizzata da elevati livelli di fibrinogeno e D-dimeri, che suggeriscono un'aumentata produzione di trombina e fibrinolisi (L. Zhang et al., 2020; Tang et al., 2020). I pazienti sono quindi in una condizione protrombotica, contro la quale la terapia anticoagulante si è dimostrata solo parzialmente efficace (Llitjos et al., 2020). Piastrine, autoanticorpi e neutrofili potrebbero essere inoltre

coinvolti nel processo (Bikdeli et al., 2020).

Rispetto a SARS-CoV, SARS-CoV-2 replica molto più rapidamente nelle vie aeree superficiali (Zou et al., 2020), dimostrando la capacità di essere trasmesso anche da ospiti asintomatici (Chau et al., 2020; Yu and Yang, 2020). Questo virus può essere trasmesso sia per contatto diretto che tramite contatto indiretto (Chan et al., 2020). Particolare importanza riveste la trasmissione tramite goccioline (*droplets*) prodotte con colpi di tosse o starnuti, ed è stato dimostrato che SARS-CoV-2 può rimanere sospeso in aria fino a 3 ore (van Doremalen et al., 2020). La resistenza di questo virus è stata studiata su diverse superfici e varie condizioni ambientali, ed è risultata simile a quella di SARS-CoV, rimanendo infettivo fino a 72 ore su plastica e acciaio (van Doremalen et al., 2020), e fino a 14 giorni a temperature inferiori a 4°C (Chan et al., 2020). Diversi solventi dei lipidi (alcol etilico) si sono dimostrati efficaci nell'inattivazione di SARS-CoV-2, distruggendo l'*envelope* virale e rendendo impossibile l'ingresso del virus nelle cellule (Hasöksüz et al., 2020; van Doremalen et al., 2020).

1.3.5 - DIAGNOSI

Data la diffusione ormai ubiquitaria del virus, la corretta identificazione dei soggetti infetti assume un ruolo di particolare rilevanza, in quanto consente in primo luogo un loro monitoraggio e un trattamento tempestivo, ed allo stesso tempo risulta indispensabile per limitare la diffusione del virus (Kevadiya et al., 2021). L'elevato numero di pazienti asintomatici rende infatti complicata l'attuazione di efficaci misure di contenimento nel caso in cui questi non vengano individuati (Oran and Topol, 2020) e la sintomatologia inoltre, quando lieve, è aspecifica ed ascrivibile a numerose patologie respiratorie (Udugama et al., 2020).

Ad oggi, il test principalmente utilizzato per la diagnosi ufficiale e riconosciuta dall'OMS di COVID-19, consiste nell'individuazione dell'RNA di SARS-CoV-2 tramite *real-time reverse transcription–polymerase chain reaction* (RT–PCR). Questo test è infatti dotato di elevate specificità e sensibilità (Sethuraman et al., 2020; Udugama et al., 2020). Questo genere di test tuttavia incorre in alcune limitazioni, in quanto utilizza *primer* specifici per determinate porzioni del genoma di SARS-COV-2, che potrebbero non dimostrarsi efficaci qualora fossero presenti mutazioni in queste regioni. Inoltre, l'esecuzione di una real time RT-PCR richiede tempistiche e costi superiori a quelli di altri test diagnostici (Kevadiya et al., 2021).

Per ovviare a questi problemi, sono stati messi a punto test più rapidi e meno costosi, volti alla ricerca diretta dell'antigene virale. Questo genere di test si basa su una metodica di *lateral flow immunochromatographic assay* (LFT), e viene già impiegato nel caso di altri virus respiratori, come influenzavirus e Human respiratory syncytial virus. Oltre a richiedere tempi d'esecuzione di pochi minuti e costi estremamente contenuti, possiedono inoltre il vantaggio di essere semplici da eseguire. La specificità di questo test, inoltre, risulta simile a quella

evidenziata dalla RT-PCR, sebbene la sensibilità invece appaia inferiore (Candel et al., 2020). Gli antigeni virali vengono infatti espressi solamente quando il virus è in attiva replicazione, durante le prime fasi della patologia (Kevadiya et al., 2021), e l'accuratezza del test risulta massima in concomitanza con la comparsa della sintomatologia, periodo nel quale la carica virale è più alta. Grazie alle loro caratteristiche, i test antigenici rapidi si sono dimostrati utili nel controllo della diffusione del virus rispetto a test più sensibili, che purtroppo impongono costi e tempistiche superiori (Candel et al., 2020).

La sintesi di anticorpi neutralizzanti in seguito all'infezione avviene nel 50% dei pazienti entro 7 giorni, ed entro 14 giorni più del 90% sieroconverte (Theel et al., 2020; Kevadiya et al., 2021). I livelli di IgM, che costituiscono la prima linea di immunità umorale, aumentano a partire da 3 giorni post-infezione e rimangono elevati fino a 3 settimane, periodo oltre il quale non sono più rilevabili, mentre le IgG possono essere individuate a partire da 1 settimana post-infezione, ma mantengono livelli elevati per un lungo periodo, assumendo un ruolo di spicco nella protezione contro eventuali reinfezioni (Hou et al., 2020). Grazie a questa caratteristica, i test sierologici sono un ottimo strumento per la valutazione della circolazione virale a livello di popolazione, per l'individuazione di infezioni asintomatiche pregresse e per la valutazione della risposta all'immunizzazione. Attualmente, sono utilizzati diversi test in grado di individuare la presenza di anticorpi tramite differenti metodologie, tra cui *lateral-flow immunoassay* (LFA), *fluorescence immunoassay* (FIA), *chemiluminescence immunoassays* (CLIA) (Kevadiya et al., 2021) ed *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (Tré-Hardy et al., 2021). Un'ulteriore fonte di variabilità è dovuta alla possibilità di utilizzare diversi antigeni per identificare gli anticorpi, e sebbene quello maggiormente utilizzato attualmente risulti la proteina *spike* del virus, bersaglio principale degli anticorpi neutralizzanti (Jiang et al., 2020), una valida alternativa sembra essere l'utilizzo della proteina N (Tré-Hardy et al., 2021), prodotta in quantità elevata nelle prime fasi dell'infezione (Roy et al., 2020). Alla luce del fatto che la maggior parte dei vaccini finora prodotti contro SARS-CoV-2 trova come bersaglio proprio la proteina *spike* (Creech et al., 2021), utilizzando la proteina N sarebbe teoricamente possibile distinguere un'immunità vaccinale da un'avvenuta esposizione (Tré-Hardy et al., 2021). Questi test sono dotati di una sensibilità variabile tra l'80 ed il 100% (Hou et al., 2020; Kevadiya et al., 2021), e di una buona specificità (J. Zhao et al., 2020), dimostrando tuttavia un certo numero di falsi positivi dovuti a cross-reattività nei confronti di anticorpi prodotti contro altri coronavirus respiratori (Lv et al., 2020).

1.3.6 - INFEZIONE NATURALE NEGLI ANIMALI

Il 28 febbraio 2020 è stato individuato il primo caso di positività a SARS-CoV 2 in un cane ad

Hong Kong, riportato dall'Agriculture, Fisheries, and Conservation Department (<https://www.info.gov.hk>). Da allora hanno iniziato ad emergere sporadiche positività in questa specie, in assenza tuttavia di manifestazioni cliniche (Sit et al., 2020).

Il 31 marzo 2020 SARS-CoV-2 è stato individuato in un gatto, sempre ad Hong Kong, anche in questo caso in assenza di sintomatologia (<https://www.info.gov.hk/gia>). Successivamente, il 21 aprile il Center for Disease Control e l'US Veterinary Services Laboratories hanno annunciato due casi di COVID19 in gatti (<https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/>). In quest'occasione entrambi gli animali manifestavano sintomi respiratori, di diversa entità. Anche in questa specie, sono iniziate ad emergere nuove positività (Newman et al., 2020). Il siero di 102 gatti analizzati a Wuhan ha rivelato che il 14,7% dei campioni presentava anticorpi neutralizzanti (Q. Zhang et al., 2020).

Il 5 aprile dello stesso anno è stata riscontrata una positività a SARS-CoV-2 in una tigre (*Panthera tigris jacksoni*, Luo et al. 2004) nel Bronx Zoo di New York che presentava tosse e appetito diminuito. Inizialmente si pensò che il contagio fosse avvenuto per mezzo di un lavoratore asintomatico (Wang et al., 2020). Il 22 aprile, l'RNA virale di SARS-CoV-2 è stato individuato in campioni fecali, tamponi nasali e orofaringei di altre 4 tigri (*Panthera tigris altaica*, Temminck 1844) e 3 leoni (*Panthera leo krugeri*, Roberts 1929) presenti nello stesso zoo. Da analisi filogenetiche è emerso come i virus identificati in tigri e leoni appartenessero a cladi diverse, per cui l'infezione di questi animali è avvenuta presumibilmente in due occasioni distinte. Tutti gli esemplari mostravano una sintomatologia respiratoria simile, che si è risolta spontaneamente in 5 giorni (McAloose et al., 2020).

Il 26 aprile in Olanda sono state individuate numerose positività in due allevamenti di visoni. Gli allevamenti in questione ospitavano rispettivamente 13700 e 7500 animali, ed erano situati a 14km di distanza l'uno dall'altro. Gli animali avevano iniziato a manifestare sintomatologia respiratoria con scolo nasale e dispnea, in alcuni casi estremamente grave. Gli animali deceduti sono stati sottoposti a necropsia e testati per influenza A, adenovirus, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e SARS-CoV-2, con esito negativo per tutti i patogeni, tranne SARS-CoV-2. All'esame istologico tutti gli animali presentavano polmonite interstiziale (Oreshkova et al., 2020). La mortalità registrata al 30 Aprile era pari al 2,4% nel primo allevamento, e 1,2% nel secondo (Oreshkova et al., 2020). Il siero di 24 gatti nelle prossimità degli allevamenti è stato testato, e 7 di essi presentavano anticorpi contro SARS-CoV-2 (Oreshkova et al., 2020).

L'analisi filogenetica dei virus circolanti nei visoni ha mostrato la comparsa di varianti virali adattate a questi animali (Hammer et al., 2021; Munnink et al., 2021). L'ipotesi iniziale fu che il contagio avesse avuto origine da lavoratori infetti e si fosse diffuso poi tra i visoni, suggerendo la capacità di questo animale di trasmettere il virus. Studi successivi hanno confermato quest'ipotesi, dimostrando la sua capacità di trasmissione intra-specie (Shuai et

al., 2021). Diversi lavoratori impiegati in questi allevamenti sono risultati positivi a SARS-CoV-2, e l'analisi del genoma virale ha dimostrato per la prima volta una direzionalità del contagio da visone a uomo (Oreshkova et al., 2020; Munnink et al., 2021). La pandemia ha coinvolto almeno 290 dei 1147 allevamenti di visoni in Olanda, con circa 4000 casi umani risultati positivi alla variante derivata dal visone di questo virus (Larsen et al., 2021) e il governo del paese ha quindi risposto all'emergenza con l'abbattimento di circa 17 milioni di animali, tutti quelli presenti nel paese, per limitare la diffusione di SARS-CoV-2 (Koopmans, 2021). Ad oggi gli allevamenti di visone colpiti da SARS-CoV-2 sono più di 400, con positività riscontrate in numerosi paesi europei, ovvero Olanda (64), Danimarca (290), Grecia (22), Svezia (13), Lituania (2), Italia (1), Francia (1), Spagna (1), Polonia (1) e, recentemente, anche il Nord America, con positività negli Stati Uniti (17) e in Canada (2) (Boklund et al., 2021; Fenollar et al., 2021). Alcuni studi hanno inoltre supposto come la presenza di allevamenti di visone possa aver influenzato la distribuzione a livello regionale di questa patologia, in particolare riguardo alla comparsa di varianti, come la mutazione D614G presente in Lombardia (Fenollar et al., 2021).

In seguito a questi eventi, le autorità britanniche hanno inoltre sollecitato i proprietari di mustelidi, in particolare di furetti e visoni, a registrare i propri animali in anagrafe, in modo da poterli monitorare per poter garantire un intervento tempestivo nel momento in cui emerga un focolaio in queste specie (<https://www.gov.uk/government/publications>).

1.3.7 - INFEZIONE SPERIMENTALE NEGLI ANIMALI

I modelli animali sono purtroppo ancora necessari per lo studio approfondito di agenti patogeni *in vivo* e per lo sviluppo di terapie efficaci. La pandemia di COVID-19 ha portato alla valutazione di numerosi modelli animali, che hanno fornito un enorme contributo allo studio di questa patologia (Cleary et al., 2020; Shi et al., 2020). L'infezione sperimentale è stata effettuata con modalità differenti nei vari studi, ma le vie principalmente utilizzate sono quelle intranasale ed endotracheale (Cleary et al., 2020; Shi et al., 2020).

I primati non umani sono filogeneticamente simili all'uomo, e questa caratteristica li rende estremamente importanti, in particolare per lo sviluppo di vaccini (Barnhill et al., 2016). Indagini sulla patogenicità di SARS-CoV-2 sono state condotte in macaco reso (*Macaca mulatta*, Zimmermann 1780) (Munster et al., 2020) e macaco di Giava (*Macaca fascicularis*, Raffles 1821) (Rockx et al., 2020), animali che si sono dimostrati in grado di supportare la replicazione virale, con sintomatologia e lesioni simili a quelle riscontrate nell'uomo, incluso un certo grado di ARDS (Munster et al., 2020; Rockx et al., 2020). Gli studi che coinvolgono primati non umani sono tuttavia sottoposti a notevoli limitazioni, e possono contare solo su un

numero ridotto di esemplari (Barnhill et al., 2016).

È stata indagata la suscettibilità a SARS-CoV-2 anche in cane e gatto, dal momento che queste due specie vivono a stretto contatto con l'uomo e tra di essi erano già emerse alcune positività. Tra i mammiferi non primati, inoltre, il gatto presenta la sequenza genetica di ACE2 più simile a quella umana, con un'omologia dell'85,2% (Stout et al., 2020). I risultati di questi studi hanno dimostrato che SARS-CoV-2 è in grado di replicare efficientemente nel gatto, e che questo è in grado di trasmettere il virus a conspecifici per via aerea. Al contrario, il cane si è dimostrato scarsamente suscettibile all'infezione da parte di questo virus, sebbene siano state riscontrate alcune positività (Shi et al., 2020).

Ulteriori indagini hanno coinvolto suino, pollo e anatra. Dopo l'inoculazione, tuttavia, in nessun esemplare è stato individuato RNA virale in tamponi e non sono stati individuati anticorpi neutralizzanti tramite test ELISA, per cui sono state ritenute specie non suscettibili all'infezione da parte di SARS-CoV-2 (Shi et al., 2020). Analisi genetiche sul recettore ACE2 di vari mammiferi suggeriscono inoltre che questo sia in grado di legare SARS-CoV-2 in bovino, bufalo, capra, pecora e piccione, quindi sarebbero da considerare specie potenzialmente suscettibili all'infezione (Qiu et al., 2020). Successive indagini *ex vivo* condotte sull'apparato respiratorio di vari ruminanti domestici hanno dimostrato che il virus è in grado di replicare nei tessuti di queste specie (di Teodoro et al., 2021), ed un recente studio ha confermato che ciò avviene, seppur in maniera limitata, anche *in vivo* (Ulrich et al., 2020).

Per comprendere meglio il passaggio dall'ospite naturale all'uomo, e per tentare di identificare il possibile ospite intermedio, alcuni recenti studi hanno coinvolto pipistrelli (*Rosettus aegyptiacus*, E. Geoffroy 1810) (Schlottau et al., 2020) e la tupaia settentrionale (*Tupaia belangeri chinensis*, Anderson 1879) (Zhao et al., 2020), ma entrambe le specie si sono rivelate solo parzialmente suscettibili all'infezione.

Nel topo, animale ampiamente utilizzato in ricerca grazie al rapido ciclo vitale e alla possibilità di impiegarne grandi numeri negli studi, il recettore ACE2 non possiede sufficiente affinità per SARS-CoV-2, come per SARS-CoV. Ne deriva che il topo non sia un modello efficiente per lo studio di questa patologia (Wan et al., 2020; Sun et al., 2021). Per lo studio di SARS-CoV, tuttavia, sono stati prodotti topi transgenici che esprimono la proteina ACE2 umana (hACE2) (McCray et al., 2007). In questi soggetti, all'inoculazione di SARS-CoV-2 è seguita la manifestazione di sintomatologia respiratoria, sebbene non siano stati registrati decessi dovuti all'infezione (Bao et al., 2020). Anche questi tuttavia si dimostrano un modello incompleto, in quanto l'espressione tissutale di ACE2 è concentrata a livello bronchiale, mentre nell'uomo questo recettore è molto più diffuso, distribuendosi anche nelle vie aeree profonde (Sun et al., 2021). Più promettente si è rivelato il criceto siriano, animale suscettibile all'infezione che mostra inoltre lesioni a livello polmonare simili a quelle umane (Imai et al., 2020).

Il furetto si è dimostrato utile nello studio di varie patologie respiratorie, in particolare di origine

virale. Si è dimostrato un ottimo modello per lo studio di SARS-CoV (Enkirch and von Messling, 2015), perciò è stato fin da subito ampiamente impiegato anche nello studio di SARS-CoV-2. Inizialmente non erano presenti report di eventuali infezioni naturali in questo animale (Abdel-Moneim and Abdelwhab, 2020), quindi è stata indagata la sua suscettibilità al patogeno. In una prima infezione sperimentale, il virus è stato rinvenuto con alte cariche nei turbinati nasali, in palato molle e tonsille (Shi et al., 2020), mentre in un secondo studio, il virus è stato identificato e isolato da tamponi nasali, mentre da tamponi rettali è stato ottenuto solo RNA virale, senza capacità infettante. Tutti i soggetti coinvolti nello studio sono risultati positivi a test ELISA e di sieroneutralizzazione per la ricerca di anticorpi contro SARS-CoV-2 (Shi et al., 2020).

Successivamente è stata indagata la trasmissione del virus da parte di questo animale a conspecifici, dimostrando l'avvenuta trasmissione sia a soggetti posti a contatto diretto sia indiretto, tramite il rinvenimento dell'RNA virale e la sieroconversione di tutti i soggetti, seppure a titoli differenti (Kim et al., 2020).

Ulteriori studi hanno consolidato questi risultati (Richard et al., 2020), evidenziando come la trasmissione di SARS-CoV-2 tra furetti possa avvenire per via indiretta anche in soggetti alloggiati a distanze superiori ad 1 metro. In questo caso, è stato installato un condotto ventilato, lungo 118cm, a collegare le gabbie, e l'RNA virale è stato individuato nel 50% dei soggetti posti a contatto indiretto. In seguito ad ELISA sono stati inoltre individuati anticorpi in tutti i soggetti risultati positivi alla PCR (Kutter et al., 2021). L'RNA virale è stato individuato in tamponi nasali di furetto a partire da 2 giorni post-infezione fino a 20 giorni, con la carica virale massima al quarto giorno (Kim et al., 2020; Ryan et al., 2021). Successivamente è stato individuato anche nel tessuto renale (Kim et al., 2020), intestinale (Kim et al., 2020; Schlottau et al., 2020), muscolare e nervoso (Schlottau et al., 2020), nonché nelle vie aeree profonde (Schlottau et al., 2020) di animali infettati sperimentalmente, sebbene il sito principale di replicazione virale rimanga il tratto superiore delle vie aeree (Zaech et al., 2021). Dai dati ricavati è stato inoltre possibile evincere che il furetto è in grado di trasmettere l'infezione anche nel caso in cui il soggetto manifesti sintomatologia lieve o persino in assenza di sintomi (Kim et al., 2020; Schlottau et al., 2020), caratteristica analoga a quanto avviene nella fascia giovane-adulta della popolazione umana (Davies et al., 2020).

Questi aspetti si sono rivelati di fondamentale importanza, poiché hanno permesso di indagare l'efficacia di diversi trattamenti antivirali in soggetti colpiti (Park et al., 2020), gli effetti dei vari trattamenti nel ridurre la trasmissione del virus (Cox et al., 2021), l'infezione in soggetti asintomatici ed il ruolo che questi giocano nella diffusione della patologia (Beale et al., 2021; Everett et al., 2021). In uno di questi studi inoltre è stata per la prima volta evidenziata la presenza di SARS-CoV-2 a livello di mucosa olfattoria e tessuto nervoso associato, caratteristica che potrebbe essere alla base dell'anosmia riferita come sintomo precoce

dell'infezione (Everett et al., 2021).

Numerosi studi hanno quindi dimostrato la capacità di SARS-CoV-2 di replicare efficacemente nelle vie aeree superiori di questo animale (Hossain et al., 2020; Schlottau et al., 2020), nonché la presenza di anticorpi neutralizzanti in animali infetti. Grazie a queste caratteristiche, il furetto è stato ampiamente utilizzato per indagare il ruolo degli stessi anticorpi durante l'infezione da parte di SARS-CoV-2 e la protezione che questi sono in grado di conferire al soggetto anche in caso di re-infezione (Kim et al., 2021b; Patel et al., 2021). Lo studio della risposta immunitaria di questo animale ha permesso inoltre il suo impiego nello sviluppo di vaccini, come ad esempio "ChAdOx1 nCoV-19", prodotto dalla collaborazione *AstraZeneca-Oxford* e attualmente noto con il nome commerciale *Vaxzevria* (Wu et al., 2020; Kim et al., 2021a; Marsh et al., 2021), e più recentemente ha permesso di valutare l'efficacia delle vaccinazioni nei confronti delle nuove varianti di SARS-CoV-2 (McAuley et al., 2020). La maggior parte dei vaccini attualmente sviluppati infatti bersaglia la glicoproteina *Spike* del virus, codificata da una regione estremamente variabile del genoma di SARS-CoV-2, le cui mutazioni possono favorire trasmissibilità, patogenicità e la capacità di evadere il sistema immunitario dell'ospite (Zhang et al., 2020).

2. SCOPO DELLA TESI

In letteratura sono presenti numerosi esempi di infezioni naturali in animali sostenute da SARS-CoV-2 e appare evidente come le specie appartenenti alla sottofamiglia *Mustelinae*, in particolare visoni e furetti, siano particolarmente suscettibili all'infezione da parte di questo virus. Numerosi allevamenti di visone sono stati infatti duramente colpiti dalla pandemia e questi animali si sono dimostrati in grado di trasmettere in maniera efficiente il virus, in alcuni casi anche all'uomo, assumendo in questo modo un ruolo di rilievo nella diffusione del virus stesso.

Anche i furetti hanno dimostrato sperimentalmente un'elevata suscettibilità all'infezione e i dati finora raccolti evidenziano come, in questa specie, la diffusione di SARS-CoV-2 abbia un comportamento non dissimile da quanto avviene nel visone e nella specie umana.

Al giorno d'oggi il ruolo del furetto è prevalentemente quello di animale domestico, vivendo a stretto contatto con l'uomo, condizione che ne facilita l'esposizione a SARS-CoV-2. Nonostante ciò, sono attualmente disponibili pochissime informazioni sull'andamento dell'infezione naturale in questa specie animale e le ricerche condotte in questo senso contano numeri irrisori. In Italia, la presenza di SARS-CoV-2 all'interno della popolazione furetto non è stata ancora indagata.

Alla luce di ciò, questa tesi ha l'obiettivo di valutare la presenza di anticorpi contro SARS-CoV-2 in furetti da compagnia, per approfondire le dinamiche di infezione a livello domestico.

Durante lo studio sono stati quindi raccolti dei campioni di siero da furetti di proprietà, grazie alla collaborazione con veterinari liberi professionisti, per la ricerca di anticorpi contro SARS-CoV-2 con metodica ELISA e di sieroneutralizzazione, per conferma diagnostica. I risultati ottenuti sono stati messi in relazione alle informazioni anamnestiche relative agli animali e ai nuclei familiari, raccolte mediante un questionario sottoposto ai proprietari.

Quest'indagine preliminare permetterà una prima valutazione del rischio che questo virus rappresenta per una delle specie più suscettibili tra i nostri "*pets*", esaminando possibili ripercussioni sul controllo della pandemia e sulla gestione sanitaria della convivenza tra proprietari e animali da compagnia particolarmente vulnerabili.

3. MATERIALI E METODI

3.1 - CAMPIONI

Per la raccolta dei campioni si è proceduto reclutando una rete di contatti tra veterinari liberi professionisti, specializzati nella cura di animali da compagnia non convenzionali.

Prima dell'inizio del progetto, sono stati redatti:

- a) un documento contenente le informazioni relative al progetto, incluse le finalità dello studio e le metodiche diagnostiche utilizzate (Allegato 1) da sottoporre ai proprietari, a supporto della spiegazione dei veterinari aderenti all'iniziativa;
- b) un modulo per la raccolta del consenso informato del proprietario all'utilizzo di un'aliquota di materiale prelevato dall'animale (Allegato 2);
- c) un questionario redatto in forma anonima, a tutela della privacy, per la raccolta dei dati di segnalamento e anamnestici, relativi all'animale e al nucleo familiare, al fine di riportare eventuali focolai domestici di COVID-19 (Allegato 3).

Durante le visite, i veterinari reclutati si sono impegnati a descrivere in maniera approfondita il progetto al proprietario che portasse in visita un furetto, valutandone attentamente la disponibilità. In seguito all'adesione al progetto, al proprietario è stata sottoposta la compilazione dei moduli ed è stata garantita la tracciabilità del materiale grazie all'assegnazione di un numero abbinato in maniera univoca a campione e questionario.

I campioni utilizzati per lo studio sono frutto di un campionamento di convenienza e sono stati ottenuti a partire da aliquote di siero prelevate da soggetti portati a visita presso ambulatori veterinari specialistici, per accertamenti diagnostici e monitoraggi clinici indipendenti dal presente progetto. Il prelievo è stato effettuato in maniera asettica individuando come siti la vena giugulare oppure la vena cava craniale, in base alle necessità cliniche del caso. Il campione prelevato è stato centrifugato presso l'ambulatorio, il siero è stato separato dalla parte corpuscolata e inviato presso il Laboratorio di Malattie infettive del Dipartimento MAPS.

3.2 - ANALISI SIEROLOGICA CON METODICA ELISA

La ricerca degli anticorpi contro SARS-CoV-2 è stata effettuata con un kit commerciale basato su metodica *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (ID Screen® SARS-CoV-2 Double Antigen Multi-species ELISA, Innovative Diagnostics, Grabels, FR). Questo kit diagnostico è di particolare interesse, in quanto utilizza la proteina N ricombinante del virus sia come antigene ancorato al fondo del pozzetto, sia come antigene coniugato. Questa caratteristica

permette quindi di identificare la presenza di anticorpi nel siero esaminato indipendentemente dalla tipologia (IgM oppure IgG) e ne permette l'utilizzo in diverse specie animali (quali visone, furetto, cane, gatto, bovino, pecora, capra, equino e ogni altra specie suscettibile a SARS-CoV-2), in quanto l'unica condizione necessaria per consentire l'individuazione degli anticorpi è che essi possiedano almeno 2 domini in grado di legare la proteina N del virus, indipendentemente dal resto della loro struttura.

All'interno di ognuno dei pozzetti sono stati quindi aggiunti 25 µl di *Dilution Buffer 13*. Nei primi quattro pozzetti sono stati aggiunti 25 µl di controllo negativo e controllo positivo, inclusi nel kit e testati in doppio, mentre nei pozzetti successivi sono stati aggiunti 25 µl di campione da indagare. La piastra è stata sottoposta ad una prima incubazione per 45 minuti ad una temperatura di 37°C.

In questa fase, se sono presenti anticorpi in grado di legare la proteina N all'interno del campione, questi formano un complesso anticorpo-antigene, depositandosi sul fondo del pozzetto. A questo punto, è stato effettuato un lavaggio della piastra con *Wash Solution*, e sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 100 µl di coniugato, un complesso costituito dalla proteina N ricombinante purificata e legata all'enzima *horseradish peroxidase*. La piastra è stata nuovamente incubata per 30 minuti a 21°C.

Durante questa incubazione, a livello dei complessi antigene-anticorpo, la proteina N del coniugato occupa il dominio libero dell'anticorpo, legandosi ad esso. In seguito ad un ulteriore lavaggio con *Wash Solution*, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di substrato, e la piastra è stata incubata un'ultima volta per 20 minuti a 21°C, in completa oscurità. In questa fase, nei pozzetti contenenti campioni positivi avviene la reazione enzimatica tra *horseradish peroxidase* e substrato e la presenza di anticorpi viene evidenziata grazie ad una variazione di colore del pozzetto, che assume una colorazione blu. Al termine della procedura, la reazione è stata arrestata tramite l'aggiunta di 100 µl di *Stop Solution*. Il colore dei campioni positivi vira quindi al giallo, il valore di assorbanza viene valutato tramite una lettura spettrofotometrica a 450 nm e la positività dei campioni viene calcolata tramite un confronto con i valori medi dei controlli positivi (OD_{PC}) e negativi (OD_{NC}) ed espressa in *S/P ratio*.

La *S/P ratio* di ogni campione è stata calcolata con la formula:

$$S/P\% = [(OD_{sample} - OD_{NC}) / (OD_{PC} - OD_{NC})] \times 100;$$

con risultati inferiori o uguali a 50% considerati negativi, risultati compresi tra 50-60% considerati dubbi, e risultati superiori o uguali a 60% positivi.

Perché il test sia considerato valido, il valore medio di densità ottica del campione positivo deve essere superiore a 0,350, e il rapporto tra i valori medi dei controlli positivi e di quelli negativi deve essere superiore a 3.

3.3 - ANALISI SIEROLOGICA CON METODICA DI SIERONEUTRALIZZAZIONE

Il *plaque reduction neutralization test* (PRNT50) (Padoan et al., 2021) è stato svolto presso il Laboratorio BSL3 dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

Per la preparazione dei campioni sono state predisposte delle diluizioni seriali 1:2 di ogni campione e sono state sottoposte ad inattivazione del complemento a 56°C per 30 minuti.

Ad ogni diluizione è stata aggiunta una soluzione contenente 25 *focus forming units* (FFUs) di SARS-CoV-2, con un rapporto 1:1. I campioni così preparati sono stati incubati per 1 ora a 37°C. In questa fase, se sono presenti anticorpi anti-SARS-CoV-2 all'interno del campione, questi formano un complesso con l'antigene virale, neutralizzando il virus. La presenza della particella virale completa, non in fase di attiva replicazione, implica che gli anticorpi individuati tramite questa metodica avranno come bersaglio antigeni virali superficiali, come ad esempio la glicoproteina S, e dimostrino capacità neutralizzanti nei confronti del virus.

Da ognuna delle preparazioni, sono stati prelevati 50 µl e sono stati aggiunti ad un monostrato di cellule Vero E6, all'interno di una piastra a 96 pozzetti, e nuovamente posti in incubatore per un'ora a 37°C con 5% di CO₂.

Dopo aver rimosso l'*inoculum*, ad ognuno dei pozzetti sono stati aggiunti 100 µl di soluzione di terreno semisolido composta da *Minimum Essential Medium* (MEM), 2% siero fetale bovino (FBS), 100 UI/ml di penicillina, 100 UI/ml di streptomicina e 0.8% carbossimetilcellulosa, per impedire un'eccessiva propagazione del virus, controllando così l'effetto citopatico e la formazione delle placche. La piastra è stata quindi incubata per 26 ore. In questa fase, il virus aggiunto al campione infetta le cellule, creando le caratteristiche lesioni a placca. Se sono tuttavia presenti anticorpi all'interno del campione, non si assisterà alla comparsa delle placche, o esse saranno in numero ridotto. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state fissate con una soluzione di paraformaldeide al 4%.

Per poter mettere in evidenza l'eventuale presenza di placche, si è proceduto con una colorazione immunocitochimica. Sono stati quindi aggiunti alla piastra anticorpi di topo monoclonali anti-dsRNA (1:10'000), e questa è stata incubata per un'ora. Questi anticorpi individuano l'RNA virale, e si concentrano a livello di cellule infette, se queste sono presenti.

In seguito, alla piastra sono stati aggiunti anticorpi di capra (1:1000) marcati con perossidasi, in grado di individuare e legare gli anticorpi di topo aggiunti precedentemente, agendo come coniugato. Dopo un'ulteriore incubazione di un'ora, è stato infine aggiunto il substrato, True Blue™ (KPL) peroxidase, e la piastra è stata incubata un'ultima volta per 7 minuti. A questo punto si è proceduto contando il numero di placche virali formatesi in ogni pozzetto.

Il titolo anticorpale neutralizzante per ogni campione è stato quindi definito come il valore reciproco del fattore di diluizione massimo dello stesso campione in grado di ridurre di più del

50% la formazione di placche virali, se confrontato con il controllo positivo (PRNT50).
Campioni con titoli uguali o superiori a 1:10 sono stati considerati positivi.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 - CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE INDAGATA

Il numero esatto di furetti in Europa è attualmente sconosciuto, tuttavia nel 2018 in Gran Bretagna ne risultavano registrati circa 100.000 (<https://www.pfma.org.uk/pet-population-2018>), mentre in Spagna nel 2015 erano registrati 143.000 furetti tra “pet” e animali da caccia (<https://www.mapa.gob.es>). Anche in Italia la diffusione di questa specie non è nota, ma è ritenuta ancora più sporadica, con appena 2053 di questi animali registrati in Anagrafe nel 2021 (<https://www.salute.gov.it>). A partire da questi numeri e dalla loro distribuzione territoriale, appare evidente la difficoltà nel pianificare uno studio rigoroso e rappresentativo, con una dimensione campionaria cospicua e sufficiente ad effettuare un’analisi di sieroprevalenza.

Il presente studio non si è avvalso di una ricerca attiva di animali provenienti da nuclei familiari colpiti da COVID-19 o di una chiamata su larga scala di proprietari di furetti, per le quali sarebbe stato necessario ottenere il parere favorevole dell’Organismo Preposto al Benessere Animale (OPBA) dell’Università di Padova, trattandosi di procedure mediche effettuate sugli animali a fini di ricerca scientifica. La raccolta dei campioni si è basata invece su un campionamento di convenienza, permettendo una prima indagine esplorativa sull’impatto dell’ampia circolazione di SARS-CoV-2 in Italia e della conseguente esposizione diretta o indiretta dei nostri “*pets*”, per valutare la necessità e l’urgenza di studi dedicati e di larga scala. Per ottenere i campioni, sono stati contattati ambulatori veterinari siti in diverse regioni, che si occupano di animali da compagnia non convenzionali. La numerosità dei campioni è stata inoltre condizionata dal numero di animali venuti a visita, per i quali fosse richiesto un prelievo di sangue a fini clinici e di monitoraggio, da cui ottenere un’aliquota e dalla disponibilità dei proprietari ad aderire al progetto.

Al termine del periodo dedicato allo studio, sono stati acquisiti un totale di 15 campioni di siero di furetti provenienti da Piemonte, Veneto e Lazio. Dieci campioni provenivano dalla regione Piemonte (Ambulatorio Veterinario Associato, Novara), due dalla regione Veneto (Clinica Veterinaria Euganea, Padova) e i restanti tre provenivano dalla regione Lazio (Centro Veterinario Specialistico, Roma).

La popolazione di furetti esaminata è costituita da 8 esemplari maschi e 7 femmine, di età compresa tra gli 11 mesi e gli 8 anni (Tabella 1). Tutti gli esemplari sono registrati come animali da compagnia e 8 di essi hanno accesso ad aree esterne. Tutti gli esemplari, eccetto uno, convivono almeno con 1 altro animale domestico. Per quanto riguarda l’esposizione a SARS-CoV-2, sono presenti 2 conferme diagnostiche di avvenuta infezione, rispettivamente ad Aprile 2020 e Febbraio 2021, e due proprietari hanno indicato un avvenuto contatto a rischio, a cui

però non sono seguite ulteriori indagini diagnostiche. Uno degli esemplari con anamnesi remota di contatto a rischio da parte del proprietario (ma con datazione mancante nel questionario) manifestava sintomatologia respiratoria al momento del prelievo.

ID	Data prelievo	Località	Età	Sesso	Accesso esterno	Altri animali	Patologie pregresse	Sintomatologia al prelievo	Esposizione a SARS-CoV-2	Proprietario
1	19/04/2021	Venezia (VE)	5 aa	M	SI	furetto	Giardiasi	NO	NO	A
2	01/04/2021	Padova (PD)	7 aa	F	NO	NO	Cardiopatìa	NO	NO	B
3	24/02/2021	Galliate (NO)	6 aa	M	SI	furetti, cani, gatti	NO	NO	NO	C
4	12/03/2021	Borgo Ticino (NO)	7 aa	M	NO	furetti, cane	SI	Respiratoria	contatto a rischio	D
5	24/02/2021	Galliate (NO)	7 aa	F	SI	furetti, cani, gatti	Dimagrimento	NO	NO	C
6	24/02/2021	Galliate (NO)	4 aa	M	NO	furetti, cani, gatti	NO	NO	NO	C
7	24/02/2021	Galliate (NO)	4 aa	F	NO	furetti, cani, gatti	NO	NO	NO	C
8	24/02/2021	Galliate (NO)	7 aa	F	SI	furetti, cani, gatti	NO	NO	NO	C
9	22/02/2021	Novara (NO)	1,5 aa	F	NO	furetto	NO	NO	NO	E
10	22/02/2021	Novara (NO)	1,5 aa	M	NO	furetto	NO	NO	NO	E
11	05/05/2021	Novara (NO)	11 mm	M (intero)	SI	cani	NO	NO	positività 01/02/2021	F
12	17/03/2021	Oleggio (NO)	1 a	F	SI	cani	NO	NO	positività 01/04/2020	G
13	14/05/2021	Roma (RM)	8 aa	M	NO	cane, gatto	NO	NO	contatto (feb-mar 2020)	H
14	15/05/2021	Fiumicino (RM)	2 aa	M	SI	furetti, cani, gatti	NO	NO	NO	I
15	15/05/2021	Fiumicino (RM)	1 a	F	SI	furetti, cani, gatti	NO	NO	NO	I

Tab. 1 – Nella tabella sono inseriti i dati forniti dai proprietari. I soggetti 3-5-6-7-8 provenivano dallo stesso nucleo familiare, tuttavia i soggetti 6 e 7 erano stati introdotti in casa da 4 mesi prima del prelievo, tramite affido da parte di un'associazione. Anche i soggetti 9-10 e 14-15 provenivano da due nuclei familiari. Il soggetto 11 è l'unico non sottoposto a controllo dell'attività riproduttiva.

4.2 - ANALISI SIEROLOGICA

Per la validazione del test ELISA, è stata considerata la densità ottica media dei controlli positivi (1,014; $OD_{PC} > 0,350$) e negativi (0,0775) e il loro rapporto è risultato 13,084 (> 3), per cui i risultati del test sono stati considerati validi. Il valore di densità ottica soglia per indicare una positività è stato calcolato pari a 0,64. I campioni esaminati sono risultati tutti negativi, con valori ottenuti compresi tra 0,09 e 0,248, ben al di sotto della soglia.

Sample	OD	S/P%
C-	0,08	/
C-	0,075	/
C+	1,072	/
C+	0,956	/
1	0,113	3,7907101
2	0,209	14,041644
3	0,113	3,7907101
4	0,092	1,5483182
5	0,165	9,3432995
6	0,248	18,206086
7	0,09	1,3347571
8	0,09	1,3347571
9	0,119	4,4313935
10	0,178	10,731447
11	0,134	6,0331020
12	0,135	6,1398825
13	0,107	3,1500267
14	0,219	15,10945
15	0,171	9,9839829

Tab. 2 - *S/P ratio* di ogni campione. Con risultati inferiori o uguali a 50% i campioni sono negativi, con risultati compresi tra 50-60% sono dubbi, e con risultati superiori o uguali a 60% sono positivi. In questo caso tutti i valori sono compresi tra 1,33% e 18,21%, e non è stata evidenziata alcuna positività.

L'analisi tramite sieroneutralizzazione ha confermato i risultati ottenuti con il test ELISA, e tutti i campioni sono risultati negativi. Questo risultato non consente di effettuare alcuna ulteriore valutazione sulle performance del test ELISA. Eventuali disaccordi nei risultati avrebbero permesso una valutazione delle caratteristiche dei test (specificità e sensibilità), in funzione anche dei diversi antigeni utilizzati nei due test, per rilevare un avvenuto contatto con SARS-CoV-2 nella specie furetto. Sarà necessario ampliare la popolazione da sottoporre ad analisi

per poter trarre conclusioni in merito, individuando almeno un soggetto positivo.

Sebbene siano stati effettuati numerosi studi in ambito sperimentale, il numero di pubblicazioni sulla presenza di SARS-CoV-2 in furetti domestici è ancora irrisorio, contando solamente 2 studi effettuati in Spagna (di cui 1 attualmente in preprint) (Giner et al., 2021; Gortázar et al., 2021), oltre a un singolo caso riportato in Slovenia (www.oie.int/wahis_2/public) (<https://www.avma.org/resources-tools>). In Italia al momento non sono presenti dati sulla diffusione della patologia in questi animali. In un recente articolo l'EFSA (European Food Safety Authority) sottolinea l'importanza di monitorare la patologia nei mustelidi, anche in maniera attiva (Boklund et al., 2021). Nonostante i limiti dovuti alla scarsa affluenza di campioni, i risultati di questo studio si dimostrano in linea con quelli dei lavori simili pubblicati recentemente. L'assenza di positività nei 15 campioni esaminati, se messa in relazione alla popolazione registrata di 2053 furetti in Italia, permette infatti alcune considerazioni. Statisticamente, questo dato indica che la prevalenza massima possibile di SARS-CoV-2 nella popolazione non indagata di furetti italiani non sia superiore al 18%. Questa considerazione dev'essere tuttavia esaminata alla luce del fatto che sono presenti sul territorio animali non registrati, il che rende complicato valutarne il numero effettivo.

Inoltre, le positività a SARS-CoV-2 e gli eventuali contatti a rischio riferiti dai proprietari dei furetti su cui è stata effettuata l'indagine, sono lontane nel tempo rispetto al prelievo. A causa di ciò, è possibile che alcuni degli animali esaminati fossero effettivamente entrati in contatto con il virus e avessero sierconvertito ma che, a causa del tempo intercorso tra l'esposizione e il prelievo, i loro livelli anticorpali siano diminuiti al di sotto dei limiti rilevabili dai test. Non sono ancora infatti disponibili informazioni riguardanti il tempo per il decadimento anticorpale in seguito ad infezione naturale nel furetto.

Nell'indagine condotta in Spagna, su 127 esemplari esaminati sono state individuate 2 positività, pari all'1,57%. Nello specifico, 1 dei 2 soggetti soffriva di una patologia neoplastica trattata con chemioterapici, i quali hanno indotto nel paziente uno stato di immunosoppressione, mentre l'altro sembrava soffrire di una patologia cronica debilitante, che non è stata tuttavia ulteriormente indagata (Giner et al., 2021).

Sebbene il furetto dimostri quindi una spiccata suscettibilità all'infezione da parte di SARS-CoV-2 a livello sperimentale, sembrerebbe avere una minore sensibilità all'infezione naturale. Uno studio americano non ha rilevato alcuna positività in 29 furetti che hanno avuto un contatto diretto e prolungato, convivendo per un tempo approssimativo di 1 mese con 2 persone sintomatiche, a cui era stata diagnosticata una positività a SARS-CoV-2 (Sawatzki et al., 2021). Nello studio in questione si è dunque deciso di analizzare e confrontare la sequenza genetica dei virus responsabili di infezione sperimentale nel furetto e naturale nell'ospite più vicino, il visone, e sono state individuate 2 mutazioni a livello di glicoproteina Spike. Gli autori quindi ipotizzano che attualmente SARS-CoV-2 necessiti di adattamento anche all'ospite

furetto perché l'infezione avvenga in maniera efficiente, e che l'infezione naturale possa avvenire solamente a seguito di esposizione ad un'elevatissima carica virale (Sawatzki et al., 2021).

La discrepanza tra i report di infezione naturale e sperimentale suggerisce come le condizioni sperimentali non siano sempre rappresentative dell'infezione naturale, in quanto viene ricreato un *optimum* per le dinamiche di infezione. Ospite, ambiente e agente patogeno possiedono infatti caratteristiche differenti e, negli studi sperimentali, vengono spesso utilizzate cariche infettanti elevate, in un ambiente controllato. Queste condizioni, insieme alla scelta della modalità di infezione, generalmente favoriscono l'instaurarsi dell'infezione stessa. Contrariamente, la sintomatologia manifestata può essere notevolmente influenzata dalle condizioni di salute dell'ospite. Gli studi sperimentali si avvalgono solamente di animali appositamente selezionati, in condizioni di salute uniformi e questi soggetti potrebbero mostrare una suscettibilità variabile e sintomatologia di intensità differente da quanto avviene nel caso in cui i soggetti colpiti siano debilitati o immunocompromessi, situazione purtroppo comune negli animali domestici.

5. CONCLUSIONI

Gli studi sull'infezione da parte di SARS-CoV-2 in furetti domestici effettuati finora sono in numero esiguo e questo progetto, costituendo la prima indagine sierologica relativa alla circolazione di SARS-CoV-2 in furetti, svolta in Italia, rappresenta quindi un contributo preliminare alle conoscenze sulle dinamiche della diffusione del virus in ambiente domestico. Dal momento che l'ospite principale di SARS-CoV-2 è infatti l'uomo, ne consegue che il ruolo del furetto come "pet" comporta per questo animale una frequente esposizione al virus e, conferma ancora una volta l'importanza dello studio delle problematiche sanitarie nell'ottica *One Health*. Alla luce delle conseguenze che questa pandemia ha avuto sugli allevamenti di visoni, della suscettibilità a livello sperimentale del furetto e dell'elevata capacità di mutazione e adattamento che dimostra SARS-CoV-2, con la continua comparsa di nuove varianti, risulta quindi importante continuare a monitorare anche questa specie, per approfondire i meccanismi che ne caratterizzano la suscettibilità.

I dati raccolti in questo senso possono aiutare a comprendere meglio l'interazione tra il virus, l'essere umano e gli animali da compagnia, sensibilizzando l'opinione pubblica, i proprietari di animali e i veterinari. Inoltre, questi lavori sottolineano il ruolo fondamentale che riveste l'analisi congiunta di dati raccolti tramite studi sperimentali, indagini molecolari ed indagini in ambiente naturale, nel supportare o smentire eventuali ipotesi. In questo caso, i risultati preliminari ridimensionano l'ipotesi iniziale, assunta in seguito agli studi sperimentali, che il furetto fosse un animale estremamente suscettibile a SARS-CoV-2, sebbene siano auspicabili ulteriori indagini in tal senso. Nonostante non siano state individuate positività in questa indagine preliminare, risulta interessante proseguire il monitoraggio dell'andamento dell'infezione naturale nel furetto tramite ulteriori progetti. Un importante sviluppo di questo studio potrebbe essere l'attuazione di un campionamento strutturato, che coinvolga una più ampia popolazione campionaria, per il quale sarà necessaria l'approvazione da parte dell'Organismo Preposto al Benessere Animale (OPBA). Questa tipologia di studio sarebbe in grado di reperire, tramite reclutamento attivo dei proprietari rispondenti a particolari requisiti (i.e. nuclei familiari con pregressi episodi di COVID-19), un numero elevato di campioni, e sarebbe in grado di fornire dati più solidi sul reale impatto dell'infezione da SARS-CoV-2 in questa specie animale, ovvero effettuando un vero e proprio studio sulla sieroprevalenza di SARS-CoV-2 in furetti italiani. Nel caso in cui i risultati di studi futuri confermassero le basse sieroprevalenze finora rilevate, sarebbe inoltre interessante continuare ad indagare in maniera approfondita i fattori che causano la divergenza tra l'*outcome* di infezione sperimentale e naturale, ampliando le nostre conoscenze sulle caratteristiche delle mutazioni nei ceppi di SARS-CoV-2 in grado di colpire il furetto. Infine, i dati raccolti grazie a questa ed altre indagini

potrebbero consentire di comprendere in modo più approfondito le dinamiche di circolazione e di mantenimento di SARS-CoV-2 in ambito domestico, permettendo di monitorare l'esposizione dei nostri "pets" e di prevenire o contenere il rischio a cui sono esposti proprio a causa della stretta e irrinunciabile convivenza tra animale e proprietario.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aasted, B., Alexandersen, S., Christensen, J., 1998. Vaccination with aleutian mink disease parvovirus (AMDV) capsid proteins enhances disease, while vaccination with the major non-structural AMDV protein causes partial protection from disease. *Vaccine* 16, 1158–1165. doi:10.1016/S0264-410X(98)80114-X
- Abdel-Moneim, A.S., Abdelwhab, E.M., 2020. Evidence for SARS-COV-2 infection of animal hosts. *Pathogens* 9, 1–27. doi:10.3390/pathogens9070529
- Al-Omari, A., Rabaan, A.A., Salih, S., Al-Tawfiq, J.A., Memish, Z.A., 2019. MERS coronavirus outbreak: Implications for emerging viral infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 93, 265–285. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.011
- Andersen, K.G., Rambaut, A., Lipkin, W.I., Holmes, E.C., Garry, R.F., 2020. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*. doi:10.1038/s41591-020-0820-9
- Anderson, E., 1989. The phylogeny of mustelids and systematics of ferrets. *Conservation Biology and the Black-Footed Ferret*.
- Anderson, R.M., Fraser, C., Ghani, A.C., Donnelly, C.A., Riley, S., Ferguson, N.M., Leung, G.M., Lam, T.H., Hedley, A.J., 2004. Epidemiology, transmission dynamics and control of SARS: The 2002-2003 epidemic, in: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society, pp. 1091–1105. doi:10.1098/rstb.2004.1490
- Andrews, P.L., Illman, O., Mellersh, A., 1979. Some observations of anatomical abnormalities and disease states in a population of 350 ferrets (*Mustela furo* L.). *Zeitschrift fur Versuchstierkunde* 21, 346–353.
- Appel, M.J.G., 1978. Reversion to virulence of attenuated canine distemper virus in vivo and in vitro. *Journal of General Virology* 41, 385–393. doi:10.1099/0022-1317-41-2-385
- Appel, M.J.G., Reggiardo, C., Summers, B.A., Pearce-Kelling, S., Mare, C.J., Noon, T.H., Reed, R.E., Shively, J.N., Örvell, C., 1991. Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinas (collared peccaries). *Archives of Virology* 119, 147–152. doi:10.1007/BF01314331
- Assiri, A., Al-Tawfiq, J.A., Al-Rabeeah, A.A., Al-Rabiah, F.A., Al-Hajjar, S., Al-Barrak, A., Flemma, H., Al-Nassir, W.N., Balkhy, H.H., Al-Hakeem, R.F., Makhdoom, H.Q., Zumla, A.I., Memish, Z.A., 2013. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: A descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases* 13, 752–761. doi:10.1016/S1473-3099(13)70204-4
- Bahir, I., Fromer, M., Prat, Y., Linial, M., 2009. Viral adaptation to host: A proteome-based analysis of codon usage and amino acid preferences. *Molecular Systems Biology* 5, 311. doi:10.1038/msb.2009.71
- Banner, L.R., Mc Lai, M., 1991. Random nature of coronavirus RNA recombination in the absence of selection pressure. *Virology* 185, 441–445. doi:10.1016/0042-6822(91)90795-D
- Bao, L., Deng, W., Huang, B., Gao, H., Liu, J., Ren, L., Wei, Q., Yu, P., Xu, Y., Qi, F., Qu, Y., Li, F., Lv, Q., Wang, W., Xue, J., Gong, S., Liu, M., Wang, G., Wang, S., Song, Z., Zhao, Linna, Liu, P., Zhao, Li, Ye, F., Wang, H., Zhou, W., Zhu, N., Zhen, W., Yu, H., Zhang, X., Guo, L., Chen, L., Wang, C., Wang, Y., Wang, X., Xiao, Y., Sun, Q., Liu, H., Zhu, F., Ma, C., Yan, L., Yang, M., Han, J., Xu, W., Tan, W., Peng, X., Jin, Q., Wu, G., Qin, C., 2020. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature* 583, 830–833. doi:10.1038/s41586-020-2312-y

- Baras, B., Stittelaar, K.J., Simon, J.H., Thoolen, R.J.M.M., Mossman, S.P., Pistor, F.H.M., van Amerongen, G., Wettendorff, M.A., Hanon, E., Osterhaus, A.D.M.E., 2008. Cross-protection against lethal H5N1 challenge ferrets with an adjuvanted pandemic influenza vaccine. *PLoS ONE* 3, e1401. doi:10.1371/journal.pone.0001401
- Barnes, H.L., Chrisman, C.L., Farina, L., Detrisac, C.J., 2003. Clinical evaluation of rabies virus meningoencephalomyelitis in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 39, 547–550. doi:10.5326/0390547
- Barnhill, A., Joffe, S., Miller, F.G., 2016. The Ethics of Infection Challenges in Primates. *Hastings Center Report* 46, 20–26. doi:10.1002/hast.580
- Bays, T.B., Lightfoot, T., Mayer, J., 2006. *Exotic Pet Behavior: Birds, Reptiles, and Small Mammals*, Elsevier Health Sciences. Elsevier Health Sciences.
- Beale, D.J., Shah, R., Karpe, A. v., Hillyer, K.E., McAuley, A.J., Au, G.G., Marsh, G.A., Vasan, S.S., 2021. Metabolic Profiling from an Asymptomatic Ferret Model of SARS-CoV-2 Infection. *Metabolites* 11, 327. doi:10.3390/metabo11050327
- Bednarz, M., 1960. Observations on reproduction in polecat × ferret hybrids. *Rocznik nauk rolniczych. Seria B. Zootechnika* 76, 269–284.
- Beineke, A., Baumgärtner, W., Wohlsein, P., 2015. Cross-species transmission of canine distemper virus—an update. *One Health*. doi:10.1016/j.onehlt.2015.09.002
- Bell, F.R., Dudgeon, J.A., 1948. An epizootic in influenza in a ferret colony. *The Journal of comparative pathology and therapeutics* 58, 167–171. doi:10.1016/s0368-1742(48)80016-0
- Belser, J.A., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2011. The ferret as a model organism to study influenza A virus infection. *DMM Disease Models and Mechanisms* 4, 575–579. doi:10.1242/dmm.007823
- Ben-Jebria, A., Crozet, Y., Eskew, M. lou, Rudeen, B.L., Ultman, J.S., 1995. Acrolein-induced smooth muscle hyperresponsiveness and eicosanoid release in excised ferret tracheas. *Toxicology and Applied Pharmacology* 135, 35–44. doi:10.1006/taap.1995.1206
- Benvenuto, D., Giovanetti, M., Ciccozzi, A., Spoto, S., Angeletti, S., Ciccozzi, M., 2020. The 2019-new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution. *Journal of Medical Virology* 92, 455–459. doi:10.1002/jmv.25688
- Bikdeli, B., Madhavan, M. v., Jimenez, D., Chuich, T., Dreyfus, I., Driggin, E., Nigoghossian, C. der, Ageno, W., Madjid, M., Guo, Y., Tang, L. v., Hu, Y., Giri, J., Cushman, M., Quéré, I., Dimakakos, E.P., Gibson, C.M., Lippi, G., Favaloro, E.J., Fareed, J., Caprini, J.A., Tafur, A.J., Burton, J.R., Francese, D.P., Wang, E.Y., Falanga, A., McLintock, C., Hunt, B.J., Spyropoulos, A.C., Barnes, G.D., Eikelboom, J.W., Weinberg, I., Schulman, S., Carrier, M., Piazza, G., Beckman, J.A., Steg, P.G., Stone, G.W., Rosenkranz, S., Goldhaber, S.Z., Parikh, S.A., Monreal, M., Krumholz, H.M., Konstantinides, S. v., Weitz, J.I., Lip, G.Y.H., 2020. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology* 75, 2950–2973. doi:10.1016/j.jacc.2020.04.031
- Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B.E., Liu, W.C., Uhl, S., Hoagland, D., Møller, R., Jordan, T.X., Oishi, K., Panis, M., Sachs, D., Wang, T.T., Schwartz, R.E., Lim, J.K., Albrecht, R.A., tenOever, B.R., 2020. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* 181, 1036-1045.e9. doi:10.1016/j.cell.2020.04.026
- Bloom, M.E., Race, R.E., Wolfenbarger, J.B., 1982. Identification of a nonvirion protein of Aleutian disease virus: mink with Aleutian disease have antibody to both virion and nonvirion proteins. *Journal of Virology* 43, 608–616. doi:10.1128/jvi.43.2.608-616.1982

- Boklund, A., Gortázar, C., Pasquali, P., Roberts, H., Nielsen, S.S., Stahl, K., Stegeman, A., Baldinelli, F., Broglia, A., van der Stede, Y., Adlhoch, C., Alm, E., Melidou, A., Mirinaviciute, G., 2021. Monitoring of SARS-CoV-2 infection in mustelids. *EFSA Journal* 19, 6459. doi:10.2903/j.efsa.2021.6459
- Bonami, F., Rudd, P.A., von Messling, V., 2007. Disease Duration Determines Canine Distemper Virus Neurovirulence. *Journal of Virology* 81, 12066–12070. doi:10.1128/jvi.00818-07
- Bosch, B.J., van der Zee, R., de Haan, C.A.M., Rottier, P.J.M., 2003. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *Journal of Virology* 77, 8801–8811. doi:10.1128/jvi.77.16.8801-8811.2003
- Boyd, R.L., Mangos, J.A., 1981. Pulmonary mechanics of the normal ferret. *Journal of Applied Physiology Respiratory Environmental and Exercise Physiology* 50, 799–804. doi:10.1152/jappl.1981.50.4.799
- Brahmajothi, M. v., Morales, M.J., Campbell, D.L., Steenbergen, C., Strauss, H.C., 2010. Expression and distribution of voltage-gated ion channels in ferret sinoatrial node. *Physiological Genomics* 42 A, 131–140. doi:10.1152/physiolgenomics.00049.2010
- Brian, D.A., Baric, R.S., 2005. Coronavirus genome structure and replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 287, 1–30. doi:10.1007/3-540-26765-4_1
- Brown, C.M., Slavinski, S., Ettestad, P., Sidwa, T.J., Sorhage, F.E., 2016. Compendium of animal rabies prevention and control, 2016. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 248, 505–517. doi:10.2460/javma.248.5.505
- Bublott, I., Wayne Randolph, R., Chalvet-Monfray, K., Joel Edwards, N., 2006. The surface electrocardiogram in domestic ferrets. *Journal of Veterinary Cardiology* 8, 87–93. doi:10.1016/j.jvc.2006.04.001
- Bueno, L., Fioramonti, J., More, J., 1981. Is there a functional large intestine in the ferret? *Experientia* 37, 275–277. doi:10.1007/BF01991652
- Butina, T. v., Denikina, N.N., Belikov, S.I., 2010. Canine distemper virus diversity in Lake Baikal seal (*Phoca sibirica*) population. *Veterinary Microbiology* 144, 192–197. doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.027
- Cameron, M.J., Kelvin, A.A., Leon, A.J., Cameron, C.M., Ran, L., Xu, L., Chu, Y.K., Danesh, A., Fang, Y., Li, Q., Anderson, A., Couch, R.C., Paquette, S.G., Fomukong, N.G., Kistner, O., Lauchart, M., Rowe, T., Harrod, K.S., Jonsson, C.B., Kelvin, D.J., 2012. Lack of Innate Interferon Responses during SARS Coronavirus Infection in a Vaccination and Reinfection Ferret Model. *PLoS ONE* 7, 45842. doi:10.1371/journal.pone.0045842
- Candel, F.J., Barreiro, P., Román, J.S., Abanades, J.C., Barba, R., Barberán, J., Bibiano, C., Canora, J., Cantón, R., Calvo, C., Carretero, M., Cava, F., Delgado, R., García-Rodríguez, J., del Castillo, J.G., de Villaumbrosia, C.G., Hernández, M., Losa, J.E., Martínez-Peromingo, F.J., Molero, J.M., Muñoz, P., Onecha, E., Onoda, M., Rodríguez, J., Sánchez-Celaya, M., Serra, J.A., Zapatero, A., 2020. Recommendations for use of antigenic tests in the diagnosis of acute SARS-CoV-2 infection in the second pandemic wave: Attitude in different clinical settings. *Revista Espanola de Quimioterapia* 33, 466–484. doi:10.37201/req/120.2020
- Castelruiz, Y., Blixenkrone-Møller, M., Aasted, B., 2005. DNA vaccination with the Aleutian mink disease virus NS1 gene confers partial protection against disease. *Vaccine* 23, 1225–1231. doi:10.1016/j.vaccine.2004.09.003
- Cavanagh, D., 1995. The Coronavirus Surface Glycoprotein, in: *The Coronaviridae*. Springer US, pp. 73–113. doi:10.1007/978-1-4899-1531-3_5

- Champoux, J.J., Drew, L.W., Neidhardt, F.C., Plorde, J. j., 2004. *Sherris Medical Microbiology* 4th edition, 4th ed. McGraw-Hill Publishing Company.
- Chan, K.F., Carolan, L.A., Druce, J., Chappell, K., Watterson, D., Young, P., Korenkov, D., Subbarao, K., Barr, I.G., Laurie, K.L., Reading, P.C., 2017. Pathogenesis, humoral immune responses and transmission between co-housed animals in a ferret model of human RSV infection. *Journal of Virology* 92, JVI.01322-17. doi:10.1128/jvi.01322-17
- Chan, K.H., Sridhar, S., Zhang, R.R., Chu, H., Fung, A.Y.F., Chan, G., Chan, J.F.W., To, K.K.W., Hung, I.F.N., Cheng, V.C.C., Yuen, K.Y., 2020. Factors affecting stability and infectivity of SARS-CoV-2. *Journal of Hospital Infection* 106, 226–231. doi:10.1016/j.jhin.2020.07.009
- Chau, N.V.V., Lam, V.T., Dung, Nguyen Thanh, Yen, L.M., Minh, N.N.Q., Hung, L.M., Ngoc, N.M., Dung, Nguyen Tri, Man, D.N.H., Nguyet, L.A., Nhat, Le Thanh Hoang, Nhu, L.N.T., Ny, Nguyen Thi Han, Hong, Nguyen Thi Thu, Kestelyn, E., Dung, Nguyen Thi Phuong, Xuan, T.C., Hien, T.T., Phong, Nguyen Thanh, Tu, T.N.H., Geskus, R.B., Thanh, T.T., Truong, Nguyen Thanh, Binh, N.T., Thuong, T.C., Thwaites, G., Tan, L. van, Dung, Nguyen Tanh, Loan, H.T., Truong, Nguyen Tanh, Phong, Nguyen Tanh, Hao, N. van, Tuy, D.B., Lan, N.P.H., Toa, P.T.N., Tao, T.N.P., Phuong, T.T.L., Uyen, L.T.T., Tam, T.T.T., Tat, B.T.T., Nhung, H.K., Tai, N.T., Vuong, V.T., Ty, D.T.B., Dung, L.T., Uyen, T.L., Tien, N.T.M., Tao, H.T.T., Tao, N.N., Vuong, H.N.T., Tao, P.N.P., Phuong, P.M., Tam, D.T.H., Joseph, D., Geskus, R., Twaites, G., van Doorn, H.R., Hien, H. van, Huy, H.L.A., Ha, H.N., Yen, H.X., Nuil, J. van, Day, J., Donovan, J., Lawson, K., Nhat, Le Tanh Hoang, Odette, S.L., Twaites, L., Rabaa, M., Choisy, M., Chambers, M., Rahman, M., Hoa, N.T., Nhien, N.T.T., Ny, Nguyen Ti Han, Tuyen, N.T.K., Dung, Nguyen Ti Phuong, Hong, Nguyen Ti Tu, Truong, N.X., Khanh, P.N.Q., Yen, P.L.K., Yacoub, S., Kesteman, T., Tuong, N.T.T., Tanh, T.T., Hang, V.T.T., Nga, L.H., 2020. The natural history and transmission potential of asymptomatic severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 infection. *Clinical Infectious Diseases* 71, 2679–2687. doi:10.1093/cid/ciaa711
- Chen, Z., Santos, C., Aspelund, A., Gillim-Ross, L., Jin, H., Kemble, G., Subbarao, K., 2009. Evaluation of Live Attenuated Influenza A Virus H6 Vaccines in Mice and Ferrets. *Journal of Virology* 83, 65–72. doi:10.1128/jvi.01775-08
- Cheng, V.C.C., Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Kwok, Y.Y., 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clinical Microbiology Reviews* 20, 660–694. doi:10.1128/CMR.00023-07
- Cherry, J.D., 2004. The chronology of the 2002-2003 SARS mini pandemic. *Paediatric Respiratory Reviews* 5, 262–269. doi:10.1016/j.prrv.2004.07.009
- Chivers, S.M., Einon, D.F., 1982. Effects of early social experience on activity and object investigation in the ferret. *Developmental Psychobiology* 15, 75–80. doi:10.1002/dev.420150111
- Chowell, G., Abdirizak, F., Lee, S., Lee, J., Jung, E., Nishiura, H., Viboud, C., 2015. Transmission characteristics of MERS and SARS in the healthcare setting: A comparative study. *BMC Medicine* 13, 1–12. doi:10.1186/s12916-015-0450-0
- Cittadini, A., Ishiguro, Y., Strömer, H., Spindler, M., Moses, A.C., Clark, R., Douglas, P.S., Ingwall, J.S., Morgan, J.P., 1998. Insulin-like growth factor-1 but not growth hormone augments mammalian myocardial contractility by sensitizing the myofilament to Ca²⁺ through a wortmannin-sensitive pathway: Studies in rat and ferret isolated muscles. *Circulation Research* 83, 50–59. doi:10.1161/01.RES.83.1.50

- Clapperton, B.K., Minot, E.O., Crump, D.R., 1988. An olfactory recognition system in the ferret *Mustela furo* L. (Carnivora: Mustelidae). *Animal Behaviour* 36, 541–553. doi:10.1016/S0003-3472(88)80025-3
- Cleary, S.J., Pitchford, S.C., Amison, R.T., Carrington, R., Robaina Cabrera, C.L., Magnen, M., Looney, M.R., Gray, E., Page, C.P., 2020. Animal models of mechanisms of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 pathology. *British Journal of Pharmacology* 177, 4851–4865. doi:10.1111/bph.15143
- Collie, M.H., Rushton, D.I., Sweet, C., Smith, H., 1980. Studies of influenza virus infection in newborn ferrets. *Journal of Medical Microbiology* 13, 561–571. doi:10.1099/00222615-13-4-561
- Cowling, B.J., Park, M., Fang, V.J., Wu, P., Leung, G.M., Wu, J.T., 2015. Preliminary epidemiological assessment of MERS-CoV outbreak in South Korea, may to june 2015. *Eurosurveillance* 20, 1–7. doi:10.2807/1560-7917.ES2015.20.25.21163
- Cox, R.M., Wolf, J.D., Plemper, R.K., 2021. Therapeutically administered ribonucleoside analogue MK-4482/EIDD-2801 blocks SARS-CoV-2 transmission in ferrets. *Nature Microbiology* 6, 11–18. doi:10.1038/s41564-020-00835-2
- Creech, C.B., Walker, S.C., Samuels, R.J., 2021. SARS-CoV-2 Vaccines. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 325, 1318–1320. doi:10.1001/jama.2021.3199
- Darnell, M.E.R., Plant, E.P., Watanabe, H., Byrum, R., St. Claire, M., Ward, J.M., Taylor, D.R., 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in vaccinated ferrets. *Journal of Infectious Diseases* 196, 1329–1338. doi:10.1086/522431
- Davies, N.G., Klepac, P., Liu, Y., Prem, K., Jit, M., Pearson, C.A.B., Quilty, B.J., Kucharski, A.J., Gibbs, H., Clifford, S., Gimma, A., van Zandvoort, K., Munday, J.D., Diamond, C., Edmunds, W.J., Houben, R.M.G.J., Hellewell, J., Russell, T.W., Abbott, S., Funk, S., Bosse, N.I., Sun, Y.F., Flasche, S., Rosello, A., Jarvis, C.I., Eggo, R.M., 2020. Age-dependent effects in the transmission and control of COVID-19 epidemics. *Nature Medicine* 26, 1205–1211. doi:10.1038/s41591-020-0962-9
- Davison, A., Birks, J.D.S., Griffiths, H.I., Kitchener, A.C., Biggins, D., Butlin, R.K., 1999. Hybridization and the phylogenetic relationship between polecats and domestic ferrets in Britain. *Biological Conservation* 87, 155–161. doi:10.1016/S0006-3207(98)00067-6
- Decaro, N., Lorusso, A., 2020. Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses. *Veterinary Microbiology* 244, 108693. doi:10.1016/j.vetmic.2020.108693
- di Teodoro, G., Valleriani, F., Puglia, I., Monaco, F., di Pancrazio, C., Luciani, M., Krasteva, I., Petrini, A., Marcacci, M., D'Alterio, N., Curini, V., Iorio, M., Migliorati, G., di Domenico, M., Morelli, D., Calistri, P., Savini, G., Decaro, N., Holmes, E.C., Lorusso, A., 2021. SARS-CoV-2 replicates in respiratory ex vivo organ cultures of domestic ruminant species. *Veterinary Microbiology* 252, 108933. doi:10.1016/j.vetmic.2020.108933
- Ding, N.Z., Xu, D.S., Sun, Y.Y., He, H. bin, He, C.Q., 2017. A permanent host shift of rabies virus from Chiroptera to Carnivora associated with recombination. *Scientific Reports* 7, 1–9. doi:10.1038/s41598-017-00395-2
- Ducatelle, R., Zwart, P., 1993. Handleiding voor bijzondere dieren 1993–3.
- Dudás-Györki, Z., Szabó, Z., Manczur, F., Vörös, K., 2011. Echocardiographic and electrocardiographic examination of clinically healthy, conscious ferrets. *Journal of Small Animal Practice* 52, 18–25. doi:10.1111/j.1748-5827.2010.01010.x
- Eccles, R., 2005. Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *Lancet Infectious Diseases* 5, 718–725. doi:10.1016/S1473-3099(05)70270-X

- Elia, G., Decaro, N., Martella, V., Cirone, F., Lucente, M.S., Lorusso, E., di Trani, L., Buonavoglia, C., 2006. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 136, 171–176. doi:10.1016/j.jviromet.2006.05.004
- Enkirch, T., von Messling, V., 2015. Ferret models of viral pathogenesis. *Virology* 479, 259–270. doi:10.1016/j.virol.2015.03.017
- Ensley, P.K., Winkle, T. van, 1982. Treatment of Congestive Heart Failure in a Ferret (*Mustela putorius furo*). *The Journal of Zoo Animal Medicine* 13, 23. doi:10.2307/20094557
- Evans, H., Quoc An, N., 2014. Anatomy of the Ferret, in: *Biology and Diseases of the Ferret: Third Edition*. John Wiley & Sons, Inc, pp. 23–68.
- Everett, H.E., Lean, F.Z.X., Byrne, A.M.P., van Diemen, P.M., Rhodes, S., James, J., Mollett, B., Coward, V.J., Skinner, P., Warren, C.J., Bewley, K.R., Watson, S., Hurley, S., Ryan, K.A., Hall, Y., Simmons, H., Núñez, A., Carroll, M.W., Brown, I.H., Brookes, S.M., 2021. Intranasal infection of ferrets with sars-cov-2 as a model for asymptomatic human infection. *Viruses* 13, 113. doi:10.3390/v13010113
- Fehr, A.R., Perlman, S., 2015. Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis, in: *Coronaviruses: Methods and Protocols*. Springer New York, pp. 1–23. doi:10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Fenollar, F., Mediannikov, O., Maurin, M., Devaux, C., Colson, P., Levasseur, A., Fournier, P.E., Raoult, D., 2021. Mink, SARS-CoV-2, and the Human-Animal Interface. *Frontiers in Microbiology* 12, 663815. doi:10.3389/fmicb.2021.663815
- Fox, J.G., 2014. Taxonomy, History, and Use, in: *Biology and Diseases of the Ferret: Third Edition*. Wiley Blackwell, pp. 1–22. doi:10.1002/9781118782699.ch1
- Fox, J.G., Bell, J.A., Broome, R., 2014. Growth and Reproduction, in: *Biology and Diseases of the Ferret: Third Edition*. Wiley Blackwell, pp. 187–209. doi:10.1002/9781118782699.ch8
- Fox, J.G., Marini, R.P., 2014. *Biology and diseases of the ferret*, 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Fox, J.J., Broome, R., 2014. Housing and Management, in: *Biology and Diseases of the Ferret: Third Edition*. John Wiley & Sons, Inc, pp. 145–156.
- Garipis, N., Hoffmann, K.P., 2003. Visual field defects in albino ferrets (*Mustela putorius furo*). *Vision Research* 43, 793–800. doi:10.1016/S0042-6989(03)00015-4
- Garner, M.M., Ramsell, K., Morera, N., Juan-Sallés, C., Jiménez, J., Ardiaca, M., Montesinos, A., Teifke, J.P., Löhr, C. v., Evermann, J.F., Baszler, T. v., Nordhausen, R.W., Wise, A.G., Maes, R.K., Kiupel, M., 2008. Clinicopathologic features of a systemic coronavirus-associated disease resembling feline infectious peritonitis in the domestic ferret (*Mustela putorius*). *Veterinary Pathology* 45, 236–246. doi:10.1354/vp.45-2-236
- Gattinoni, L., Coppola, S., Cressoni, M., Busana, M., Rossi, S., Chiumello, D., 2020. COVID-19 does not lead to a “typical” acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 201, 1299–1300. doi:10.1164/rccm.202003-0817LE
- Gautam, A., Kaphle, K., Shrestha, B., Phuyal, S., 2020. Susceptibility to SARS, MERS, and COVID-19 from animal health perspective. *Open Veterinary Journal* 10, 164–177. doi:10.4314/ovj.v10i2.6
- Giner, J., Villanueva-saz, S., Tobajas, A.P., Pérez, M.D., González, A., Verde, M., Yzuel, A., García-garcía, A., Taleb, V., Lira-navarrete, E., Hurtado-guerrero, R., Pardo, J., Santiago, L., Paño, J.R., Ruíz, H., Lacasta, D., Fernández, A., 2021. Sars-cov-2 seroprevalence in household domestic ferrets (*Mustela putorius furo*). *Animals* 11, 1–11. doi:10.3390/ani11030667

- Girard, M.P., Tam, J.S., Assossou, O.M., Kieny, M.P., 2010. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine* 28, 4895–4902. doi:10.1016/j.vaccine.2010.05.031
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E. v., Donchenko, A.P., Blinov, V.M., 1989. Coronavirus genome: Prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. *Nucleic Acids Research* 17, 4847–4861. doi:10.1093/nar/17.12.4847
- Gortázar, C., Barroso-Arévalo, S., Ferreras-Colino, Elisa, Isla, J., de la Fuente, G., Rivera, B., Domínguez, L., de la Fuente, José, Sánchez-, J.M., Gortázar, S.C., Ferreras-Colino, E, de la Fuente, J, 2021. Natural SARS-CoV-2 infection in kept ferrets, Spain. *bioRxiv* 2021.01.14.426652. doi:10.1101/2021.01.14.426652
- Greene, C.E., 2006. Infectious diseases of the dog and cat. *Infectious diseases of the dog and cat*.
- Gretebeck, L.M., Subbarao, K., 2015. Animal models for SARS and MERS coronaviruses. *Current Opinion in Virology* 13, 123–129. doi:10.1016/j.coviro.2015.06.009
- Grzimek, B., Hutchins, M., 2011. Grzimek’s Animal Life Encyclopedia: Evolution.
- Guan, Y., Zheng, B.J., He, Y.Q., Liu, X.L., Zhuang, Z.X., Cheung, C.L., Luo, S.W., Li, P.H., Zhang, L.J., Guan, Y.J., Butt, K.M., Wong, K.L., Chan, K.W., Lim, W., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Peiris, J.S.M., Poon, L.L.M., 2003. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in Southern China. *Science* 302, 276–278. doi:10.1126/science.1087139
- Guarner, J., 2020. Three Emerging Coronaviruses in Two Decades: The Story of SARS, MERS, and Now COVID-19. *American Journal of Clinical Pathology* 153, 420–421. doi:10.1093/ajcp/aqaa029
- Guo, M., Wang, Y., Liu, J., Huang, Z., Li, X., 2019. Biosafety and data quality considerations for animal experiments with highly infectious agents at ABSL-3 facilities. *Journal of Biosafety and Biosecurity* 1, 50–55. doi:10.1016/j.jobb.2018.12.011
- Habas, K., Nganwuchu, C., Shahzad, F., Gopalan, R., Haque, M., Rahman, S., Majumder, A.A., Nasim, T., 2020. Resolution of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. doi:10.1080/14787210.2020.1797487
- Hammer, A.S., Quaade, M.L., Rasmussen, T.B., Fonager, J., Rasmussen, M., Mundbjerg, K., Lohse, L., Strandbygaard, B., Jørgensen, C.S., Alfaro-Núñez, A., Rosenstjerne, M.W., Boklund, A., Halasa, T., Fomsgaard, A., Belsham, G.J., Bøtner, A., 2021. SARS-CoV-2 transmission between mink (neovison vison) and Humans, Denmark. *Emerging Infectious Diseases* 27, 547–551. doi:10.3201/eid2702.203794
- Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M.L.C., Lely, A.T., Navis, G.J., van Goor, H., 2004. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *Journal of Pathology* 203, 631–637. doi:10.1002/path.1570
- Harris, L.M., 2015. Ferret wellness management and environmental enrichment. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice* 18, 233–244. doi:10.1016/j.cvex.2015.01.007
- Hartmann, K., 2005. Feline infectious peritonitis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* 35, 39–79. doi:10.1016/j.cvsm.2004.10.011
- Hasöksüz, M., Kiliç, S., Saraç, F., 2020. Coronaviruses and SARS-COV-2. *Turkish Journal of Medical Sciences* 50, 549–556. doi:10.3906/sag-2004-127
- Hemachudha, T., Laothamatas, J., Rupprecht, C.E., 2002. Human rabies: A disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *Lancet Neurology* 1, 101–109. doi:10.1016/S1474-4422(02)00041-8

- Hemida, M.G., Chu, D.K.W., Poon, L.L.M., Perera, R.A.P.M., Alhammadi, M.A., Ng, H.Y., Siu, L.Y., Guan, Y., Alnaeem, A., Peiris, M., 2014. Mers coronavirus in dromedary camel herd, Saudi Arabia. *Emerging Infectious Diseases* 20, 1231–1234. doi:10.3201/eid2007.140571
- Hillyer, E.V., 1994. Ferret preventive medicine and clinical techniques, *Proceedings of the North American Veterinary Conference.*, in: *Ferret Preventive Medicine and Clinical Techniques*.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T.S., Herrler, G., Wu, N.H., Nitsche, A., Müller, M.A., Drosten, C., Pöhlmann, S., 2020. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181, 271–280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052
- Holmes, K. v., 1999. CORONAVIRUSES (CORONAVIRIDAE), in: *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, pp. 291–298. doi:10.1006/rwvi.1999.0055
- Hoover, J.P., Baldwin, C.A., Rupprecht, C.E., 1989. Serologic response of domestic ferrets (*Mustela putorius furo*) to canine distemper and rabies virus vaccines. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 194, 234–238.
- Hossain, M.G., Javed, A., Akter, S., Saha, S., 2020. SARS-CoV-2 host diversity: An update of natural infections and experimental evidence. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 54, 175–181. doi:10.1016/j.jmii.2020.06.006
- Hou, H., Wang, T., Zhang, B., Luo, Y., Mao, L., Wang, F., Wu, S., Sun, Z., 2020. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clinical and Translational Immunology* 9, e1136. doi:10.1002/cti2.1136
- Hrapkiewicz, K., Colby, A.L., Denison, P., 2013. *Clinical Laboratory Animal Medicine: An Introduction*, 3rd ed.
- Huang, L., Woolf, J.H., Ishiguro, Y., Morgan, J.P., 1997. Effect of cocaine and methylecgonidine on intracellular Ca²⁺ and myocardial contraction in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 273. doi:10.1152/ajpheart.1997.273.2.h893
- Huang, S.S.H., Banner, D., Fang, Y., Ng, D.C.K., Kanagasabai, T., Kelvin, D.J., Kelvin, A.A., 2011. Comparative analyses of pandemic H1N1 and seasonal H1N1, H3N2, and influenza B infections depict distinct clinical pictures in ferrets. *PLoS ONE* 6, 27512. doi:10.1371/journal.pone.0027512
- Hurrell, D.G., Perreault, C.L., Miao, L., Ransil, B.J., Morgan, J.P., 1993. Cellular mechanism of the positive inotropic effect of hydralazine in mammalian myocardium. *British Journal of Pharmacology* 109, 667–672. doi:10.1111/j.1476-5381.1993.tb13625.x
- Hyde, D.M., Samuelson, D.A., Blakeney, W.H., Kosch, P.C., 1979. A correlative light microscopy, transmission and scanning electron microscopy study of the ferret lung. *Scanning Electron Microscopy VOL. 3*, 891–898.
- Imai, M., Iwatsuki-Horimoto, K., Hatta, M., Loeber, S., Halfmann, P.J., Nakajima, N., Watanabe, T., Ujie, M., Takahashi, K., Ito, M., Yamada, S., Fan, S., Chiba, S., Kuroda, M., Guan, L., Takada, K., Armbrust, T., Balogh, A., Furusawa, Y., Okuda, M., Ueki, H., Yasuhara, A., Sakai-Tagawa, Y., Lopes, T.J.S., Kiso, M., Yamayoshi, S., Kinoshita, N., Ohmagari, N., Hattori, S.I., Takeda, M., Mitsuya, H., Krammer, F., Suzuki, T., Kawaoka, Y., 2020. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117, 16587–16595. doi:10.1073/pnas.2009799117

- Ivey, E., Morrisey, J., 1999. Ferrets. Examination and preventive medicine. The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice 2, 471–494. doi:10.1016/S1094-9194(17)30133-0
- Jackson, A.C., 2008. Rabies. Neurologic Clinics 26, 717–726. doi:10.1016/j.ncl.2008.03.010
- Jakeman, K.J., Rushton, D.I., Smith, H., Sweet, C., 1991. Exacerbation of bacterial toxicity to infant ferrets by influenza virus: Possible role in sudden infant death syndrome. Journal of Infectious Diseases 163, 35–40. doi:10.1093/infdis/163.1.35
- Jayaraman, A., Pappas, C., Raman, R., Belser, J.A., Viswanathan, K., Shriver, Z., Tumpey, T.M., Sasisekharan, R., 2011. A single base-pair change in 2009 H1N1 hemagglutinin increases human receptor affinity and leads to efficient airborne viral transmission in ferrets. PLoS ONE 6, 17616. doi:10.1371/journal.pone.0017616
- Jepsen, J.R., D'Amore, F., Baandrup, U., Clausen, M.R., Gottschalck, E., Aasted, B., 2009. Aleutian mink disease virus and humans. Emerging Infectious Diseases 15, 2040–2042. doi:10.3201/eid1512.090514
- Ji, W., Wang, W., Zhao, X., Zai, J., Li, X., 2020. Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. Journal of Medical Virology 92, 433–440. doi:10.1002/jmv.25682
- Jiang, S., Hillyer, C., Du, L., 2020. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. Trends in Immunology 41, 355–359. doi:10.1016/j.it.2020.03.007
- Johnson-Delaney, C.A., 2014. Ferret Nutrition. Vet Clin North Am Exot Anim Pract 17, 449–470.
- Johnson-Delaney, C.A., 2005. The ferret gastrointestinal tract and Helicobacter mustelae infection. Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice 8, 197–212. doi:10.1016/j.cvex.2005.01.003
- Johnson-Delaney, C.A., Orosz, S.E., 2011. Ferret Respiratory System: Clinical Anatomy, Physiology, and Disease. Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice 14, 357–367. doi:10.1016/j.cvex.2011.03.001
- Judah, V., Nuttall, K., 2016. Exotic Animal Care and Management , Cengage Learning. Cengage Learning.
- Kauffman, C.A., Bergman, A.G., O'Connor, R.P., 1982. Distemper virus infection in ferrets: an animal model of measles-induced immunosuppression. Clinical and experimental immunology 47, 617–61725.
- Kaufman, L.W., 1980. Foraging cost and meal patterns in ferrets. Physiology and Behavior 25, 139–141. doi:10.1016/0031-9384(80)90194-8
- Kevadiya, B.D., Machhi, J., Herskovitz, J., Oleynikov, M.D., Blomberg, W.R., Bajwa, N., Soni, D., Das, S., Hasan, M., Patel, M., Senan, A.M., Gorantla, S., McMillan, J.E., Edagwa, B., Eisenberg, R., Gurumurthy, C.B., Reid, S.P.M., Punyadeera, C., Chang, L., Gendelman, H.E., 2021. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. Nature Materials 20, 593–605. doi:10.1038/s41563-020-00906-z
- Khanna, M., Kumar, P., Choudhary, K., Kumar, B., Vijayan, V.K., 2008. Emerging influenza virus: A global threat. Journal of Biosciences 33, 475–482. doi:10.1007/s12038-008-0066-z
- Kiefer, K., Johnson, D., 2006. What veterinarians need to know about ferrets. Exotic DVM Magazine 8, 38–43.
- Killingley, B., Nguyen-Van-Tam, J., 2013. Routes of influenza transmission. Influenza and other Respiratory Viruses 7, 42–51. doi:10.1111/irv.12080
- Kim, Y. il, Kim, D., Yu, K.M., Seo, H.D., Lee, S.A., Casel, M.A.B., Jang, S.G., Kim, S., Jung, W., Lai, C.J., Choi, Y.K., Jung, J.U., 2021a. Development of spike receptor-binding

- domain nanoparticles as a vaccine candidate against sars-cov-2 infection in ferrets. *mBio* 12, 1–13. doi:10.1128/mBio.00230-21
- Kim, Young il, Kim, S.G., Kim, S.M., Kim, E.H., Park, S.J., Yu, K.M., Chang, J.H., Kim, E.J., Lee, S., Casel, M.A.B., Um, J., Song, M.S., Jeong, H.W., Lai, V.D., Kim, Yeonjae, Chin, B.S., Park, J.S., Chung, K.H., Foo, S.S., Poo, H., Mo, I.P., Lee, O.J., Webby, R.J., Jung, J.U., Choi, Y.K., 2020. Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. *Cell Host and Microbe* 27, 704-709.e2. doi:10.1016/j.chom.2020.03.023
- Kim, Young il, Kim, S.M., Park, S.J., Kim, E.H., Yu, K.M., Chang, J.H., Kim, E.J., Casel, M.A.B., Rollon, R., Jang, S.G., Um, J., Song, M.S., Jeong, H.W., Kim, E.G., Kim, Yeonjae, Kim, S.Y., Park, J.S., Park, M.S., Kwon, G.Y., Yeo, S.G., Lee, S.A., Choi, Y.J., Jung, J.U., Choi, Y.K., 2021b. Critical role of neutralizing antibody for SARS-CoV-2 reinfection and transmission. *Emerging Microbes and Infections* 10, 152–160. doi:10.1080/22221751.2021.1872352
- Kirchdoerfer, R.N., Cottrell, C.A., Wang, N., Pallesen, J., Yassine, H.M., Turner, H.L., Corbett, K.S., Graham, B.S., McLellan, J.S., Ward, A.B., 2016. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature* 531, 118–121. doi:10.1038/nature17200
- Kiupel, M., Perpiñán, D., 2014. Viral Diseases of Ferrets, in: *Biology and Diseases of the Ferret: Third Edition*. John Wiley & Sons, Inc, pp. 439–518.
- Knuutila, A., Uzcátegui, N., Kankkonen, J., Vapalahti, O., Kinnunen, P., 2009. Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus in Finland. *Veterinary Microbiology* 133, 229–238. doi:10.1016/j.vetmic.2008.07.003
- Koopman, K.F., Corbet, G.B., Hill, J.E., 1981. A World List of Mammalian Species. *Journal of Mammalogy* 62, 860. doi:10.2307/1380617
- Koopmans, M., 2021. SARS-CoV-2 and the human-animal interface: outbreaks on mink farms. *The Lancet Infectious Diseases* 21, 18–19. doi:10.1016/S1473-3099(20)30912-9
- Kottwitz, J.J., Luis-Fuentes, V., Micheal, B., 2006. Nonbacterial thrombotic endocarditis in a ferret (*Mustela putorius furo*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 37, 197–201. doi:10.1638/04-083.1
- Kumlin, U., Olofsson, S., Dimock, K., Arnberg, N., 2008. Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism. *Influenza and other Respiratory Viruses* 2, 147–154. doi:10.1111/j.1750-2659.2008.00051.x
- Kutter, J.S., de Meulder, D., Bestebroer, T.M., Lexmond, P., Mulders, A., Richard, M., Fouchier, R.A.M., Herfst, S., 2021. SARS-CoV and SARS-CoV-2 are transmitted through the air between ferrets over more than one meter distance. *Nature Communications* 12, 1–8. doi:10.1038/s41467-021-21918-6
- Lackay, S.N., Kuang, Y., Fu, Z.F., 2008. Rabies in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. doi:10.1016/j.cvsm.2008.03.003
- Lamb, RA, 2001. Paramyxoviridae : the viruses and their replication. *Fields Virology*.
- Langlois, I., 2005. Viral diseases of ferrets. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice* 8, 139–160. doi:10.1016/j.cvex.2004.09.008
- Laothamatas, J., Wacharapluesadee, S., Lumlertdacha, B., Ampawong, S., Tepsumethanon, V., Shuangshoti, S., Phumesin, P., Asavaphatiboon, S., Woraprukjaru, L., Avihingsanon, Y., Israsena, N., Lafon, M., Wilde, H., Hemachudha, T., 2008. Furious and paralytic rabies of canine origin: Neuroimaging with virological and cytokine studies. *Journal of NeuroVirology* 14, 119–129. doi:10.1080/13550280701883857
- Larsen, H.D., Fonager, J., Lomholt, F.K., Dalby, T., Benedetti, G., Kristensen, B., Urth, T.R., Rasmussen, M., Lassaunière, R., Rasmussen, T.B., Strandbygaard, B., Lohse, L., Chaine, M., Møller, K.L., Berthelsen, A.S.N., Nørgaard, S.K., Sønksen, U.W., Boklund,

- A.E., Hammer, A.S., Belsham, G.J., Krause, T.G., Mortensen, S., Bøtner, A., Fomsgaard, A., Mølbak, K., 2021. Preliminary report of an outbreak of SARS-CoV-2 in mink and mink farmers associated with community spread, Denmark, June to November 2020. *Eurosurveillance* 26, 2100009. doi:10.2807/1560-7917.ES.2021.26.5.210009
- Lemon, K., de Vries, R.D., Mesman, A.W., Mcquaid, S., van Amerongen, G., Yuksel, S., Ludlow, M., Rennick, L.J., Kuiken, T., Rima, B.K., Geijtenbeek, T.B.H., Osterhaus, A.D.M.E., Duprex, W.P., de Swart, R.L., 2011. Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. *PLoS Pathogens* 7, 1001263. doi:10.1371/journal.ppat.1001263
- Lewington, J., 2007a. Ferret husbandry, medicine and surgery. *Ferret husbandry, medicine and surgery*.
- Lewington, J., 2007b. Classification, history and current status of ferrets, in: Lewington, John (Ed.), *Ferret Husbandry Medicine and Surgery*, 2nd Ed. Elsevier Limited, pp. 3–14.
- Lewington, J., 2007c. Nutrition, in: Lewington John H. (Ed.), *Ferret Husbandry Medicine and Surgery*, 2nd Ed. Elsevier Limited, pp. 57–85.
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J.H., Wang, H., Crameri, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B.T., Zhang, S., Wang, L.F., 2005. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310, 676–679. doi:10.1126/science.1118391
- Liberson, J., Newcomer, C.E., Ackerman, J.I., Murphy, J.C., Fox, J.G., 1983. Mastitis caused by hemolytic *Escherichia coli* in the ferret. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 183, 1179–1181.
- Lindeberg, H., 2008. Reproduction of the Female Ferret (*Mustela putorius furo*). *Reproduction in Domestic Animals* 43, 150–156. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01155.x
- Lipman, S.N., 1987. Clinical, functional and pathologic changes associated with a case of dilatative cardiomyopathy in a ferret. *Lab. Anim. Sci.* 37, 210–212.
- Lissenberg, A., Vrolijk, M.M., van Vliet, A.L.W., Langereis, M.A., de Groot-Mijnes, J.D.F., Rottier, P.J.M., de Groot, R.J., 2005. Luxury at a Cost? Recombinant Mouse Hepatitis Viruses Expressing the Accessory Hemagglutinin Esterase Protein Display Reduced Fitness In Vitro. *Journal of Virology* 79, 15054–15063. doi:10.1128/jvi.79.24.15054-15063.2005
- Llitjos, J.F., Leclerc, M., Chochois, C., Monsallier, J.M., Ramakers, M., Auvray, M., Merouani, K., 2020. High incidence of venous thromboembolic events in anticoagulated severe COVID-19 patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 18, 1743–1746. doi:10.1111/jth.14869
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W.J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E.C., Gao, G.F., Wu, G., Chen, W., Shi, W., Tan, W., 2020. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet* 395, 565–574. doi:10.1016/S0140-6736(20)30251-8
- Lucas, J., Lucas, A., Furber, H., James, G., Hughes, M.S., Martin, P., Chen, S., Mitchell, D.H., Love, D.N., Malik, R., 2000. *Mycobacterium genavense* infection in two aged ferrets with conjunctival lesions. *Australian Veterinary Journal* 78, 685–689. doi:10.1111/j.1751-0813.2000.tb10406.x
- Lugton, I.W., Wobeser, G., Morris, R.S., Caley, P., 1997. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in feral ferrets (*Mustela furo*) in New Zealand: II. Routes of infection and

- excretion. *New Zealand Veterinary Journal* 45, 151–157. doi:10.1080/00480169.1997.36015
- Lunn, J.A., Martin, P., Zaki, Malik, 2005. Pneumonia due to *Mycobacterium abscessus* in two domestic ferrets (*Mustelo putorius furo*). *Australian Veterinary Journal* 83, 542–546. doi:10.1111/j.1751-0813.2005.tb13325.x
- Lv, H., Wu, N.C., Tsang, O.T.Y., Yuan, M., Perera, R.A.P.M., Leung, W.S., So, R.T.Y., Chan, J.M.C., Yip, G.K., Chik, T.S.H., Wang, Y., Choi, C.Y.C., Lin, Y., Ng, W.W., Zhao, J., Poon, L.L.M., Peiris, J.S.M., Wilson, I.A., Mok, C.K.P., 2020. Cross-reactive Antibody Response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV Infections. *Cell Reports* 31, 107725. doi:10.1016/j.celrep.2020.107725
- Mackay, I.M., Arden, K.E., 2015. MERS coronavirus: Diagnostics, epidemiology and transmission. *Virology Journal* 12, 1–21. doi:10.1186/s12985-015-0439-5
- Maclachlan, N.J., Dubovi, E., 2010. *Fenner's Veterinary Virology - 5th Edition*, 5th ed.
- Maher, J.A., DeStefano, J., 2004. The ferret: An animal model to study influenza virus. *Lab Animal* 33, 50–53. doi:10.1038/labani1004-50
- Mahmood, K., Bright, R.A., Mytle, N., Carter, D.M., Crevar, C.J., Achenbach, J.E., Heaton, P.M., Tumpey, T.M., Ross, T.M., 2008. H5N1 VLP vaccine induced protection in ferrets against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 influenza viruses. *Vaccine* 26, 5393–5399. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.084
- Marini R P, Adkins J A, Fox J G, 1989. Proven or potential zoonotic diseases of ferrets. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 195, 990–994.
- Marsh, G.A., McAuley, A.J., Au, G.G., Riddell, S., Layton, D., Singanallur, N.B., Layton, R., Payne, J., Durr, P.A., Bender, H., Barr, J.A., Bingham, J., Boyd, V., Brown, S., Bruce, M.P., Burkett, K., Eastwood, T., Edwards, S., Gough, T., Halpin, K., Harper, J., Holmes, C., Horman, W.S.J., van Vuren, P.J., Lowther, S., Maynard, K., McAuley, K.D., Neave, M.J., Poole, T., Rootes, C., Rowe, B., Soldani, E., Stevens, V., Stewart, C.R., Suen, W.W., Tachedjian, M., Todd, S., Trinidad, L., Walter, D., Watson, N., Drew, T.W., Gilbert, S.C., Lambe, T., Vasan, S.S., 2021. ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine candidate significantly reduces SARS-CoV-2 shedding in ferrets. *npj Vaccines* 6, 1–8. doi:10.1038/s41541-021-00315-6
- Martella, V., Elia, G., Buonavoglia, C., 2008. Canine Distemper Virus. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* 38, 787–797. doi:10.1016/j.cvsm.2008.02.007
- Martina, B.E.E., Haagmans, B.L., Kuiken, T., Fouchier, R.A.M., Rimmelzwaan, G.F., van Amerongen, G., Peiris, J.S.M., Lim, W., Osterhaus, A.D.M.E., 2003. SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature* 425, 915. doi:10.1038/425915a
- Martínez, J., Martorell, J., Abarca, M.L., Olvera, A., Ramis, A., Woods, L., Cheville, N., Juan-Sallés, C., Moya, A., Riera, A., Soto, S., 2012. Pyogranulomatous Pleuropneumonia and Mediastinitis in Ferrets (*Mustela putorius furo*) associated with *Pseudomonas luteola* Infection. *Journal of Comparative Pathology* 146, 4–10. doi:10.1016/j.jcpa.2011.03.014
- Martínez, J., Ramis, A.J., Reinacher, M., Perpiñan, D., 2006. Detection of feline infectious peritonitis virus-like antigen in ferrets. *Veterinary Record* 158, 523–523. doi:10.1136/vr.158.15.523-b
- Matulich, E., 1998. Seeing is believing: ferrets' eyes and vision. *Ferrets* 1, 26–31.
- McAloose, D., Laverack, M., Wang, L., Killian, M.L., Caserta, L.C., Yuan, F., Mitchell, P.K., Queen, K., Mauldin, M.R., Cronk, B.D., Bartlett, S.L., Sykes, J.M., Zec, S., Stokol, T., Ingerman, K., Delaney, M.A., Fredrickson, R., Ivančić, M., Jenkins-Moore, M., Mozingo, K., Franzen, K., Bergeson, N.H., Goodman, L., Wang, H., Fang, Y., Olmstead, C., McCann, C., Thomas, P., Goodrich, E., Elvinger, F., Smith, D.C., Tong, S., Slavinski, S.,

- Calle, P.P., Terio, K., Torchetti, M.K., Diel, D.G., 2020. From people to panthera: Natural sars-cov-2 infection in tigers and lions at the bronx zoo. *mBio* 11, 1–13. doi:10.1128/mBio.02220-20
- McAuley, A.J., Kuiper, M.J., Durr, P.A., Bruce, M.P., Barr, J., Todd, S., Au, G.G., Blasdel, K., Tachedjian, M., Lowther, S., Marsh, G.A., Edwards, S., Poole, T., Layton, R., Riddell, S.J., Drew, T.W., Druce, J.D., Smith, T.R.F., Broderick, K.E., Vasan, S.S., 2020. Experimental and in silico evidence suggests vaccines are unlikely to be affected by D614G mutation in SARS-CoV-2 spike protein. *npj Vaccines* 5, 1–5. doi:10.1038/s41541-020-00246-8
- McCray, P.B., Pewe, L., Wohlford-Lenane, C., Hickey, M., Manzel, L., Shi, L., Netland, J., Jia, H.P., Halabi, C., Sigmund, C.D., Meyerholz, D.K., Kirby, P., Look, D.C., Perlman, S., 2007. Lethal Infection of K18- hACE2 Mice Infected with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus . *Journal of Virology* 81, 813–821. doi:10.1128/jvi.02012-06
- McCullers, J.A., McAuley, J.L., Browall, S., Iverson, A.R., Boyd, K.L., Normark, B.H., 2010. Influenza enhances susceptibility to natural acquisition of and disease due to *Streptococcus pneumoniae* in ferrets. *Journal of Infectious Diseases* 202, 1287–1295. doi:10.1086/656333
- McLaren, C., Butchko, G.M., 1978. Regional T- and B- cell responses in influenza-infected ferrets. *Infection and Immunity* 22, 189–194. doi:10.1128/iai.22.1.189-194.1978
- Mitchell, M.A., Tully, T.N., 2009. *Manual of exotic pet practice*. Saunders, Elsevier.
- Moore, G.E., Glickman, N.W., Ward, M.P., Engler, K.S., Lewis, H.B., Glickman, L.T., 2005. Incidence of and risk factors for adverse events associated with distemper and rabies vaccine administration in ferrets. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226, 909–912. doi:10.2460/javma.2005.226.909
- Morgan, J.P., 2014. Use of the Ferret in Cardiovascular Research, in: *Biology and Diseases of the Ferret: Third Edition*. John Wiley & Sons, Inc, pp. 653–664.
- Munnink, B.B.O., Sikkema, R.S., Nieuwenhuijse, D.F., Molenaar, R.J., Munger, E., Molenkamp, R., van der Spek, A., Tolsma, P., Rietveld, A., Brouwer, M., Bouwmeester-Vincken, N., Harders, F., der Honing, R.H. van, Wegdam-Blans, M.C.A., Bouwstra, R.J., GeurtsvanKessel, C., van der Eijk, A.A., Velkers, F.C., Smit, L.A.M., Stegeman, A., van der Poel, W.H.M., Koopmans, M.P.G., 2021. Transmission of SARS-CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans. *Science* 371, 172–177. doi:10.1126/science.abe5901
- Munster, V.J., Feldmann, F., Williamson, B.N., van Doremalen, N., Pérez-Pérez, L., Schulz, J., Meade-White, K., Okumura, A., Callison, J., Brumbaugh, B., Avanzato, V.A., Rosenke, R., Hanley, P.W., Saturday, G., Scott, D., Fischer, E.R., de Wit, E., 2020. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *Nature* 585, 268–272. doi:10.1038/s41586-020-2324-7
- Neubauer, S., Ingwall, J.S., 1991. The isolated, buffer-perfused ferret heart: A new model for the study of cardiac physiology and metabolism. *Laboratory Animals* 25, 348–353. doi:10.1258/002367791780809995
- Newman, A., Smith, D., Ghai, R.R., Wallace, R.M., Torchetti, M.K., Loiacono, C., Murrell, L.S., Carpenter, A., Moroff, S., Rooney, J.A., Barton Behravesh, C., 2020. First Reported Cases of SARS-CoV-2 Infection in Companion Animals — New York, March–April 2020. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 69, 710–713. doi:10.15585/mmwr.mm6923e3

- Niezgoda, M., Briggs, D.J., Shaddock, J., Dreesen, D.W., Rupprecht, C.E., 1997. Pathogenesis of experimentally induced rabies in domestic ferrets. *American Journal of Veterinary Research* 58, 1327–1331.
- Norbury, G.L., Norbury, D.C., Heyward, R.P., 1998. Space use and denning behaviour of wild ferrets (*Mustela furo*) and cats (*Felis catus*) . *New Zealand Journal of Ecology* 149–159.
- O'Malley, B., 2005. *Clinical Anatomy and Physiology of Exotic Species*, *Clinical Anatomy and Physiology of Exotic Species*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/B978-0-7020-2782-6.X5001-7
- Oran, D.P., Topol, E.J., 2020. Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection: A Narrative Review. *Annals of internal medicine* 173, 362–367. doi:10.7326/M20-3012
- Oreshkova, N., Molenaar, R.J., Vreman, S., Harders, F., Oude Munnink, B.B., van der Honing, R.W.H., Gerhards, N., Tolsma, P., Bouwstra, R., Sikkema, R.S., Tacken, M.G.J., de Rooij, M.M.T., Weesendorp, E., Engelsma, M.Y., Brusckke, C.J.M., Smit, L.A.M., Koopmans, M., van der Poel, W.H.M., Stegeman, A., 2020. SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. *Eurosurveillance* 25, 2001005. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005
- Oyarzun, S.E., Self, K., Valdes, E. v, Chavez, E.R., 1995. An Evaluation of the Nutritional Adequacy of the Feeding Program of the Black-Footed Ferret (*Mustela nigripis*) at the Metropolitan Toronto Zoo.
- Padoan, A., Bonfante, F., Cosma, C., di Chiara, C., Sciacovelli, L., Pagliari, M., Bortolami, A., Costenaro, P., Musso, G., Basso, D., Giaquinto, C., Plebani, M., 2021. Analytical and clinical performances of a SARS-CoV-2 S-RBD IgG assay: Comparison with neutralization titers. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 59, 1444–1452. doi:10.1515/cclm-2021-0313
- Park, M., Thwaites, R.S., Openshaw, P.J.M., 2020. COVID-19: Lessons from SARS and MERS. *European Journal of Immunology* 50, 308–311. doi:10.1002/eji.202070035
- Park, S. J., Yu, K.M., Kim, Y. il, Kim, S.M., Kim, E.H., Kim, S.G., Kim, E.J., Casel, M.A.B., Rollon, R., Jang, S.G., Lee, M.H., Chang, J.H., Song, M.S., Jeong, H.W., Choi, Y., Chen, W., Shin, W.J., Jung, J.U., Choi, Y.K., 2020. Antiviral efficacies of FDA-approved drugs against SARS-COV-2 infection in ferrets. *mBio* 11. doi:10.1128/mBio.01114-20
- Patel, D.R., Field, C.J., Septer, K.M., Sim, D.G., Jones, M.J., Heinly, T.A., Vanderford, T.H., McGraw, E.A., Sutton, T.C., 2021. Transmission and protection against re-infection in the ferret model with the SARS-CoV-2 USA-WA1/2020 reference isolate. *Journal of Virology*. doi:10.1128/jvi.02232-20
- Paterson, S., 2008. *Skin Diseases of Exotic Pets*.
- Pavlačík, L., Celer, V., Kajerová, V., Jekl, V., Knotek, Z., Literák, I., 2007. Monitoring of antibodies titre against canine distemper virus in ferrets vaccinated with a live modified vaccine. *Acta Veterinaria Brno* 76, 423–429. doi:10.2754/avb200776030423
- Pearson R C, Gorham J R, 1987. Ferrets in biomedical research. *Comparative Pathology Bulletin* 19, 1–6.
- Perera, K.D., Galasiti Kankanamalage, A.C., Rathnayake, A.D., Honeyfield, A., Groutas, W., Chang, K.O., Kim, Y., 2018. Protease inhibitors broadly effective against feline, ferret and mink coronaviruses. *Antiviral Research* 160, 79–86. doi:10.1016/j.antiviral.2018.10.015
- Perpiñán, D., Ramis, A., Tomás, A., Carpintero, E., Bargalló, F., 2008. Outbreak of canine distemper in domestic ferrets (*Mustela putorius furo*). *Veterinary Record* 163, 246–250. doi:10.1136/vr.163.8.246
- Persson, C.G.A., Gelfand, 2002. Mice are not a good model of human airway disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166, 6–8. doi:10.1164/rccm.2204001

- Piazza, S., Abitbol, M., Gnirs, K., Huynh, M., Cauzinille, L., 2014. Prevalence of deafness and association with coat variations in client-owned ferrets. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 244, 1047–1052. doi:10.2460/javma.244.9.1047
- Pilny, A.A., Hess, L., 2004. Ferrets: Wound healing and therapy. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice* 7, 105–121. doi:10.1016/j.cvex.2003.08.002
- Poole, T.B., 1974. Detailed analysis of fighting in polecats (*Mustelidae*) using ciné film. *Journal of Zoology* 173, 369–393. doi:10.1111/j.1469-7998.1974.tb04121.x
- Poole, T.B., 1973. The aggressive behaviour of individual male polecats (*Mustela putorius*, *M. furo* and hybrids) towards familiar and unfamiliar opponents. *Journal of Zoology* 170, 395–414. doi:10.1111/j.1469-7998.1973.tb01385.x
- Poole, T.B., 1972. Some behavioural differences between the European polecat, *Mustela putorius*, the ferret, *M. furo*, and their hybrids. *Journal of Zoology* 166, 25–35. doi:10.1111/j.1469-7998.1972.tb04073.x
- Powers, L. v., 2009. Bacterial and Parasitic Diseases of Ferrets. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice* 12, 531–561. doi:10.1016/j.cvex.2009.06.001
- Powers, L. v., Brown, S.A., 2012. Basic Anatomy, Physiology, and Husbandry, in: Quesenberry, K.E., Carpenter, J.W. (Eds.), *Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery* 3rd Ed. Saunders, Elsevier, pp. 1–12.
- Price, E.O., 2002. *Animal domestication and behavior*. Cabi.
- Pringle, C.R., 1999. Virus Taxonomy – 1999: The Universal System of Virus Taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. *Archives of Virology* 144, 421–429. doi:10.1007/s007050050515
- Pyle, N.J., 1940. Use of Ferrets in Laboratory Work and Research Investigations. *American Journal of Public Health and the Nations Health* 30, 787–796. doi:10.2105/ajph.30.7.787
- Qiu, W., Zheng, Y., Zhang, S., Fan, Q., Liu, H., Zhang, F., Wang, W., Liao, G., Hu, R., 2011. Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China. *Emerging Infectious Diseases* 17, 1541–1543. doi:10.3201/eid1708.101153
- Qiu, Y., Zhao, Y.B., Wang, Q., Li, J.Y., Zhou, Z.J., Liao, C.H., Ge, X.Y., 2020. Predicting the angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) utilizing capability as the receptor of SARS-CoV-2. *Microbes and Infection* 22, 221–225. doi:10.1016/j.micinf.2020.03.003
- Qiu, Z., Morgan, J.P., 1993. Differential effects of cocaine and cocaethylene on intracellular Ca²⁺ and myocardial contraction in cardiac myocytes. *British Journal of Pharmacology* 109, 293–298. doi:10.1111/j.1476-5381.1993.tb13569.x
- Qu, Y., Himmel, H.M., Campbell, D.L., Strauss, H.C., 1993. Effects of extracellular ATP on I(Ca), [Ca²⁺]_i, and contraction in isolated ferret ventricular myocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 264. doi:10.1152/ajpcell.1993.264.3.c702
- Quesenberry, K.E., Carpenter, J.W., 2011. *Ferrets, Rabbits, and Rodents: clinical medicine and surgery*. , 3rd ed, Ferrets, Rabbits, and Rodents. Elsevier. doi:10.1016/c2015-0-05982-2
- Rahalkar, M.C., Bahulikar, R.A., 2020. Lethal Pneumonia Cases in Mojiang Miners (2012) and the Mineshaft Could Provide Important Clues to the Origin of SARS-CoV-2. *Frontiers in Public Health* 8, 581569. doi:10.3389/fpubh.2020.581569
- Raj, V.S., Mou, H., Smits, S.L., Dekkers, D.H.W., Müller, M.A., Dijkman, R., Muth, D., Demmers, J.A.A., Zaki, A., Fouchier, R.A.M., Thiel, V., Drosten, C., Rottier, P.J.M., Osterhaus, A.D.M.E., Bosch, B.J., Haagmans, B.L., 2013. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 495, 251–254. doi:10.1038/nature12005

- Raj, V.S., Smits, S.L., Provacía, L.B., van den Brand, J.M.A., Wiersma, L., Ouwendijk, W.J.D., Bestebroer, T.M., Spronken, M.I., van Amerongen, G., Rottier, P.J.M., Fouchier, R.A.M., Bosch, B.J., Osterhaus, A.D.M.E., Haagmans, B.L., 2014. Adenosine Deaminase Acts as a Natural Antagonist for Dipeptidyl Peptidase 4-Mediated Entry of the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. doi:10.1128/JVI.02935-13
- Richard, M., Kok, A., de Meulder, D., Bestebroer, T.M., Lamers, M.M., Okba, N.M.A., Fentener van Vlissingen, M., Rockx, B., Haagmans, B.L., Koopmans, M.P.G., Fouchier, R.A.M., Herfst, S., 2020. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nature Communications* 11, 1–6. doi:10.1038/s41467-020-17367-2
- Richardson, L., Clark, T.W., Forrest, S.C., Campbell, T.M., 1987. Winter ecology of black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) at Meeteetse, Wyoming. *American Midland Naturalist* 117, 225–239. doi:10.2307/2425964
- Richman, D.D., Whitley, J.R., Hayden, G.F., 2009. *Clinical Virology*, 3rd Edition, 3rd ed.
- Riou, J., Althaus, C.L., 2020. Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), December 2019 to January 2020. *Eurosurveillance*. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.4.2000058
- Risi, E., 2014. Control of reproduction in ferrets, rabbits and rodents. *Reproduction in Domestic Animals* 49, 81–86. doi:10.1111/rda.12300
- Roberts, A., Deming, D., Paddock, C.D., Cheng, A., Yount, B., Vogel, L., Herman, B.D., Sheahan, T., Heise, M., Genrich, G.L., Zaki, S.R., Baric, R., Subbarao, K., 2007. A mouse-adapted SARS-coronavirus causes disease and mortality in BALB/c mice. *PLoS Pathogens* 3, 0023–0037. doi:10.1371/journal.ppat.0030005
- Robinson, N.P., Venning, L., Kyle, H., Widdicombe, J.G., 1986. Quantitation of the secretory cells of the ferret tracheobronchial tree. *Journal of Anatomy* VOL. 145, 173–188.
- Rockx, B., Kuiken, T., Herfst, S., Bestebroer, T., Lamers, M.M., Munnink, B.B.O., de Meulder, D., van Amerongen, G., van den Brand, J., Okba, N.M.A., Schipper, D., van Run, P., Leijten, L., Sikkema, R., Verschoor, E., Verstrepen, B., Bogers, W., Langermans, J., Langermans, J., Drosten, C., van Vlissingen, M.F., Fouchier, R., de Swart, R., Koopmans, M., Haagmans, B.L., 2020. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science* 368, 1012–1015. doi:10.1126/science.abb7314
- Rosenthal, K.L., 2015. Pet ferret basics and techniques, Atlantic Coast Veterinary Conference 2001, in: *VIN.Com*.
- Rosenthal, K.L., 2007. Antibiotic treatment protocols for small mammal bacterial diseases, in: *Proceedings of the North American Veterinary Conference*. Orlando (FL).
- Roy, V., Fischinger, S., Atyeo, C., Slein, M., Loos, C., Balazs, A., Luedemann, C., Astudillo, M.G., Yang, D., Wesemann, D.R., Charles, R., Lafrate, A.J., Feldman, J., Hauser, B., Caradonna, T., Miller, T.E., Murali, M.R., Baden, L., Nilles, E., Ryan, E., Lauffenburger, D., Beltran, W.G., Alter, G., 2020. SARS-CoV-2-specific ELISA development. *Journal of Immunological Methods* 484–485, 112832. doi:10.1016/j.jim.2020.112832
- Ruan, S., 2020. Likelihood of survival of coronavirus disease 2019. *The Lancet Infectious Diseases* 20, 630–631. doi:10.1016/S1473-3099(20)30257-7
- Rupprecht, C.E., Hanlon, C.A., Hemachudha, T., 2002. Rabies re-examined. *Lancet Infectious Diseases* 2, 327–343. doi:10.1016/S1473-3099(02)00287-6
- Ryan, K.A., Bewley, K.R., Fotheringham, S.A., Slack, G.S., Brown, P., Hall, Y., Wand, N.I., Marriott, A.C., Cavell, B.E., Tree, J.A., Allen, L., Aram, M.J., Bean, T.J., Brunt, E., Buttigieg, K.R., Carter, D.P., Cobb, R., Coombes, N.S., Findlay-Wilson, S.J., Godwin, K.J., Gooch, K.E., Gouriet, J., Halkerston, R., Harris, D.J., Hender, T.H., Humphries,

- H.E., Hunter, L., Ho, C.M.K., Kennard, C.L., Leung, S., Longet, S., Ngabo, D., Osman, K.L., Paterson, J., Penn, E.J., Pullan, S.T., Rayner, E., Skinner, O., Steeds, K., Taylor, I., Tipton, T., Thomas, S., Turner, C., Watson, R.J., Wiblin, N.R., Charlton, S., Hallis, B., Hiscox, J.A., Funnell, S., Dennis, M.J., Whittaker, C.J., Catton, M.G., Druce, J., Salguero, F.J., Carroll, M.W., 2021. Dose-dependent response to infection with SARS-CoV-2 in the ferret model and evidence of protective immunity. *Nature Communications* 12, 1–13. doi:10.1038/s41467-020-20439-y
- Saad, M., Omrani, A.S., Baig, K., Bahloul, A., Elzein, F., Matin, M.A., Selim, M.A.A., Mutairi, M. al, Nakhli, D. al, Aidaroos, A.Y.A., Sherbeeni, N. al, Al-Khashan, H.I., Memish, Z.A., Albarrak, A.M., 2014. Clinical aspects and outcomes of 70 patients with Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: A single-center experience in Saudi Arabia. *International Journal of Infectious Diseases* 29, 301–306. doi:10.1016/j.ijid.2014.09.003
- Sato, J.J., Hosoda, T., Wolsan, M., Tsuchiya, K., Yamamoto, M., Suzuki, H., 2003. Phylogenetic relationships and divergence times among mustelids (Mammalia: Carnivora) based on nucleotide sequences of the nuclear interphotoreceptor retinoid binding protein and mitochondrial cytochrome b genes. *Zoological Science* 20, 243–264. doi:10.2108/zsj.20.243
- Sawatzki, K., Hill, N.J., Puryear, W.B., Foss, A.D., Stone, J.J., Runstadler, J.A., 2021. Host barriers to SARS-CoV-2 demonstrated by ferrets in a high-exposure domestic setting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118. doi:10.1073/PNAS.2025601118
- Schildgen, O., Simon, A., Williams, J., 2007. Animal models for human Metapneumovirus (HMPV) infections. *Veterinary Research* 38, 117–126. doi:10.1051/vetres:2006051
- Schlottau, K., Rissmann, M., Graaf, A., Schön, J., Sehl, J., Wylezich, C., Höper, D., Mettenleiter, T.C., Balkema-Buschmann, A., Harder, T., Grund, C., Hoffmann, D., Breithaupt, A., Beer, M., 2020. SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. *The Lancet Microbe* 1, e218–e225. doi:10.1016/S2666-5247(20)30089-6
- Schoemaker, N.J., 2002. Hyperadrenocorticism in Ferrets.
- Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., Geng, Q., Auerbach, A., Li, F., 2020. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* 581, 221–224. doi:10.1038/s41586-020-2179-y
- Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liu, P., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Tan, W., Wu, G., Chen, H., Bu, Z., Bu, Z., 2020. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science* 368, 1016–1020. doi:10.1126/science.abb7015
- Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N., Kawaoka, Y., 2006. Influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440, 435–436. doi:10.1038/440435a
- Shuai, L., Zhong, G., Yuan, Q., Wen, Z., Wang, C., He, X., Liu, R., Wang, J., Zhao, Q., Liu, Y., Huo, N., Deng, J., Bai, J., Wu, H., Guan, Y., Shi, J., Tian, K., Xia, N., Chen, H., Bu, Z., 2021. Replication, pathogenicity, and transmission of SARS-CoV-2 in minks. *National Science Review* 8, 2021. doi:10.1093/nsr/nwaa291
- Sieber, P., Platzer, M., Schuster, S., 2018. The Definition of Open Reading Frame Revisited. *Trends in Genetics* 34, 167–170. doi:10.1016/j.tig.2017.12.009
- Sit, T.H.C., Brackman, C.J., Ip, S.M., Tam, K.W.S., Law, P.Y.T., To, E.M.W., Yu, V.Y.T., Sims, L.D., Tsang, D.N.C., Chu, D.K.W., Perera, R.A.P.M., Poon, L.L.M., Peiris, M., 2020.

- Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature* 586, 776–778. doi:10.1038/s41586-020-2334-5
- Smith, H., Sweet, C., 1988. Lessons for human influenza from pathogenicity studies with ferrets. *Reviews of Infectious Diseases* 10, 56–75. doi:10.1093/clinids/10.1.56
- Smith, W., Stuart-harris, C.H., 1936. Influenza Infection of Man from the Ferret. *Lancet* 121–3.
- Staton, V.W., Crowell-Davis, S.L., 2003. Factors associated with aggression between pairs of domestic ferrets. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 222, 1709–1712. doi:10.2460/javma.2003.222.1709
- Stephensen, C.B., Welter, J., Thaker, S.R., Taylor, J., Tartaglia, J., Paoletti, E., 1997. Canine distemper virus (CDV) infection of ferrets as a model for testing Morbillivirus vaccine strategies: NYVAC- and ALVAC-based CDV recombinants protect against symptomatic infection. *Journal of Virology* 71, 1506–1513. doi:10.1128/jvi.71.2.1506-1513.1997
- Stepien, R.L., Benson, K.G., Forrest, L.J., 1999. Radiographic measurement of cardiac size in normal ferrets. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 40, 606–610. doi:10.1111/j.1740-8261.1999.tb00886.x
- Stout, A.E., André, N.M., Jaimes, J.A., Millet, J.K., Whittaker, G.R., 2020. Coronaviruses in cats and other companion animals: Where does SARS-CoV-2/COVID-19 fit? *Veterinary Microbiology*. doi:10.1016/j.vetmic.2020.108777
- Stout, A.E., Guo, Q., Millet, J.K., de Matos, R., Whittaker, G.R., 2021. Coronaviruses associated with the superfamily musteloidea. *mBio* 12, 1–14. doi:10.1128/mBio.02873-20
- Sun, K., Gu, L., Ma, L., Duan, Y., 2021. Atlas of ACE2 gene expression reveals novel insights into transmission of SARS-CoV-2. *Heliyon* 7, e05850. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05850
- Svitek, N., Rudd, P.A., Obojes, K., Pillet, S., von Messling, V., 2008. Severe seasonal influenza in ferrets correlates with reduced interferon and increased IL-6 induction. *Virology* 376, 53–59. doi:10.1016/j.virol.2008.02.035
- Swennes, A.G., Fox, J.J., 2014. Bacterial and Mycoplasmal Diseases , in: *Biology and Diseases of the Ferret: Third Edition*. John Wiley & Sons, Inc, pp. 519–552.
- Tang, N., Bai, H., Chen, X., Gong, J., Li, D., Sun, Z., 2020. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 18, 1094–1099. doi:10.1111/jth.14817
- Tanner, P.A., Tseggai, T., Rice Conlon, J.A., 2000. Minimum protective dose (MPD) and efficacy determination of a recombinant canine distemper virus vaccine in ferrets, in: *Proceedings of 81st Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases*. Chicago.
- Taylor, D.R., 2014. The Ferret in Viral Respiratory Disease Research, in: *Biology and Diseases of the Ferret: Third Edition*. John Wiley & Sons, Inc, pp. 629–640.
- Tekes, G., Thiel, H.J., 2016. Feline Coronaviruses: Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis, in: *Advances in Virus Research*. Academic Press Inc., pp. 193–218. doi:10.1016/bs.aivir.2016.08.002
- Theel, E.S., Slev, P., Wheeler, S., Couturier, M.R., Wong, S.J., Kadkhoda, K., 2020. The role of antibody testing for sars-cov-2: Is there one? *Journal of Clinical Microbiology*. doi:10.1128/JCM.00797-20
- Thomson, A.P.D., 1951. A History of the Ferret. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* VI, 471–480. doi:10.1093/jhmas/vi.autumn.471

- Threats, I. of M. (US) F. on M., Knobler, S., Mahmoud, A., Lemon, S., Mack, A., Sivitz, L., Oberholtzer, K., 2004. Learning from SARS: preparing for the next disease outbreak., Learning from SARS. National Academies Press. doi:10.17226/10915
- To, K.K.W., Hung, I.F.N., Chan, J.F.W., Yuen, K.Y., 2013. From SARS coronavirus to novel animal and human coronaviruses. *Journal of Thoracic Disease* 5, S103. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2013.06.02
- Tré-Hardy, M., Wilmet, A., Beukinga, I., Favresse, J., Dogné, J.M., Douxfils, J., Blairon, L., 2021. Analytical and clinical validation of an ELISA for specific SARS-CoV-2 IgG, IgA, and IgM antibodies. *Journal of Medical Virology* 93, 803–811. doi:10.1002/jmv.26303
- Tully, T., Mitchell, MA., 2001. “Ferrets” in: A Technician’s Guide to Exotic Animal Care, in: A Technician’s Guide to Exotic Animal Care. AAHA Press, Lakewood (CO), pp. 81–112.
- Tynes, V. v., 2010. Behavior of Exotic Pets. John Wiley & Sons.
- Udugama, B., Kadhiresan, P., Kozlowski, H.N., Malekjahani, A., Osborne, M., Li, V.Y.C., Chen, H., Mubareka, S., Gubbay, J.B., Chan, W.C.W., 2020. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS nano* 14, 3822–3835. doi:10.1021/acsnano.0c02624
- Ulrich, L., Wernike, K., Hoffmann, D., Mettenleiter, T.C., Beer, M., 2020. Experimental Infection of Cattle with SARS-CoV-2. *Emerging infectious diseases* 26, 2979–2981. doi:10.3201/eid2612.203799
- van den Brand, J.M.A., Stittelaar, K.J., van Amerongen, G., Reperant, L., de Waal, L., Osterhaus, A.D.M.E., Kuiken, T., 2012. Comparison of temporal and spatial dynamics of seasonal H3N2, pandemic H1N1 and highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections in ferrets. *PLoS ONE* 7, e42343. doi:10.1371/journal.pone.0042343
- van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D.H., Holbrook, M.G., Gamble, A., Williamson, B.N., Tamin, A., Harcourt, J.L., Thornburg, N.J., Gerber, S.I., Lloyd-Smith, J.O., de Wit, E., Munster, V.J., 2020. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *New England Journal of Medicine* 382, 1564–1567. doi:10.1056/nejmc2004973
- van Riel, D., Munster, V.J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R.A.M., Osterhaus, A.D.M.E., Kuiken, T., 2007. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *American Journal of Pathology* 171, 1215–1223. doi:10.2353/ajpath.2007.070248
- Vastenburger, M.H.A.C., Boroffka, S.A.E.B., Schoemaker, N.J., 2004. Echocardiographic measurements in clinically healthy ferrets anesthetized with isoflurane. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 45, 228–232. doi:10.1111/j.1740-8261.2004.04040.x
- Vinegar, A., Sinnott, E.E., Kosch, P.C., Miller, M.L., 1985. Pulmonary physiology of the ferret and its potential as a model for inhalation toxicology. *Laboratory Animal Science* 35, 246–250.
- von Messling, V., Milosevic, D., Cattaneo, R., 2004. Tropism illuminated: Lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14216–14221. doi:10.1073/pnas.0403597101
- von Messling, V., Springfield, C., Devaux, P., Cattaneo, R., 2003. A Ferret Model of Canine Distemper Virus Virulence and Immunosuppression. *Journal of Virology* 77, 12579–12591. doi:10.1128/jvi.77.23.12579-12591.2003
- Vos, A., Müller, T., Cox, J., Neubert, L., Fooks, A.R., 2004. Susceptibility of ferrets (*Mustela putorius furo*) to experimentally induced rabies with European bat lyssaviruses (EBLV).

- Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health 51, 55–60. doi:10.1111/j.1439-0450.2004.00730.x
- Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R.S., Li, F., 2020. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *Journal of Virology* 94. doi:10.1128/jvi.00127-20
- Wang, J., Paik, G., Morgan, J.P., 1991. Endothelin 1 enhances myofilament Ca²⁺ responsiveness in aequorin-loaded ferret myocardium. *Circulation Research* 69, 582–589. doi:10.1161/01.RES.69.3.582
- Wang, L., Mitchell, P.K., Calle, P.P., Bartlett, S.L., McAloose, D., Killian, M.L., Yuan, F., Fang, Y., Goodman, L.B., Fredrickson, R., Elvinger, F., Terio, K., Franzen, K., Stuber, T., Diel, D.G., Torchetti, M.K., 2020. Complete Genome Sequence of SARS-CoV-2 in a Tiger from a U.S. Zoological Collection. *Microbiology Resource Announcements* 9. doi:10.1128/mra.00468-20
- Weiss, C.A., Scott, M. v., 1997. Clinical Aspects and Surgical Treatment of Hyperadrenocorticism in the Domestic Ferret: 94 Cases (1994-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association* 33, 487–493. doi:10.5326/15473317-33-6-487
- Whary, M.T., 2014. Physiology of the Ferret, in: *Biology and Diseases of the Ferret: Third Edition*. John Wiley & Sons, Inc, pp. 81–122.
- WHO/2019 nCoV/Surveillance/2020.2, 2020. Surveillance case definitions for human infection with novel coronavirus (nCoV), interim guidance, 15 January 2020.
- Willard, T., 2002. Exotic animal nutrition-ferrets. *Exotic DVM Magazine* 4, 36–37.
- Williams, B.H., Kiupel, M., West, K.H., Raymond, J.T., Grant, C.K., Glickman, L.T., 2000. Coronavirus-associated epizootic catarrhal enteritis in ferrets. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217, 526–530. doi:10.2460/javma.2000.217.526
- Williams, B.H., Marini, R.P., Fox, G.J., 2012. Ferrets: Epizootic Catarrhal Enteritis, in: *Clinical Veterinary Advisor: Birds and Exotic Pets*. Elsevier Inc., pp. 451–452. doi:10.1016/B978-1-4160-3969-3.00206-7
- Williams, E.S., 2008. *Infectious Diseases of Wild Mammals*, 3rd ed.
- Wilson, S.C., Eybatov, T.M., Amano, M., Jepson, P.D., Goodman, S.J., 2014. The role of canine distemper virus and persistent organic pollutants in mortality patterns of Caspian SEALS (*Pusa caspica*). *PLoS ONE* 9, e99265. doi:10.1371/journal.pone.0099265
- Wise, A.G., Kiupel, M., Garner, M.M., Clark, A.K., Maes, R.K., 2010. Comparative sequence analysis of the distal one-third of the genomes of a systemic and an enteric ferret coronavirus. *Virus Research* 149, 42–50. doi:10.1016/j.virusres.2009.12.011
- Wise, A.G., Kiupel, M., Maes, R.K., 2006. Molecular characterization of a novel coronavirus associated with epizootic catarrhal enteritis (ECE) in ferrets. *Virology* 349, 164–174. doi:10.1016/j.virol.2006.01.031
- Woo, P. C. Y., Lau, S.K.P., Lam, C.S.F., Lau, C.C.Y., Tsang, A.K.L., Lau, J.H.N., Bai, R., Teng, J.L.L., Tsang, C.C.C., Wang, M., Zheng, B.-J., Chan, K.-H., Yuen, K.-Y., 2012a. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *Journal of Virology* 86, 3995–4008. doi:10.1128/jvi.06540-11
- Woo, P. C.Y., Lau, S.K.P., Li, K.S.M., Tsang, A.K.L., Yuen, K.Y., 2012b. Genetic relatedness of the novel human group C betacoronavirus to Tylonycteris bat coronavirus HKU4 and Pipistrellus bat coronavirus HKU5. *Emerging Microbes and Infections* 1. doi:10.1038/emi.2012.45

- Wu, S., Zhong, G., Zhang, Jun, Shuai, L., Zhang, Z., Wen, Z., Wang, B., Zhao, Z., Song, X., Chen, Y., Liu, R., Fu, L., Zhang, Jinlong, Guo, Q., Wang, C., Yang, Y., Fang, T., Lv, P., Wang, J., Xu, J., Li, J., Yu, C., Hou, L., Bu, Z., Chen, W., 2020. A single dose of an adenovirus-vectored vaccine provides protection against SARS-CoV-2 challenge. *Nature Communications* 11, 1–7. doi:10.1038/s41467-020-17972-1
- Wu, Z., McGoogan, J.M., 2020. Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 323, 1239–1242. doi:10.1001/jama.2020.2648
- Yalden, D., Harris, S., 2008. *Mammals of the British Isles: Handbook*, 4th edition. Mammal Society.
- Yang, Y., Du, L., Liu, C., Wang, L., Ma, C., Tang, J., Baric, R.S., Jiang, S., Li, F., 2014. Receptor usage and cell entry of bat coronavirus HKU4 provide insight into bat-to-human transmission of MERS coronavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 12516–12521. doi:10.1073/pnas.1405889111
- Yoshikawa, Y., Ochikubo, F., Matsubara, Y., Tsuruoka, H., Ishii, M., Shirota, K., Nomura, Y., Sugiyama, M., Yamanouchi, K., 1989. Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Veterinary Microbiology* 20, 193–205. doi:10.1016/0378-1135(89)90043-6
- Yu, X., Yang, R., 2020. COVID-19 transmission through asymptomatic carriers is a challenge to containment. *Influenza and other Respiratory Viruses* 14, 474–475. doi:10.1111/irv.12743
- Zaack, L.M., Scheibner, D., Sehl, J., Müller, M., Hoffmann, D., Beer, M., Abdelwhab, E.M., Mettenleiter, T.C., Breithaupt, A., Finke, S., 2021. Light sheet microscopy-assisted 3d analysis of sars-cov-2 infection in the respiratory tract of the ferret model. *Viruses* 13, 529. doi:10.3390/v13030529
- Zamoto, A., Taguchi, F., Fukushi, S., Morikawa, S., Yamada, Y.K., 2006. Identification of ferret ACE2 and its receptor function for SARS-coronavirus, in: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York, pp. 519–522. doi:10.1007/978-0-387-33012-9_93
- Zappulli, V., Ferro, S., Bonsembiante, F., Brocca, G., Calore, A., Cavicchioli, L., Centelleghes, C., Corazzola, G., de Vreese, S., Gelain, M.E., Mazzariol, S., Moccia, V., Rensi, N., Sammarco, A., Torrigiani, F., Verin, R., Castagnaro, M., 2020. Pathology of coronavirus infections: A review of lesions in animals in the one-health perspective. *Animals*. doi:10.3390/ani10122377
- Zhang, L., Jackson, C.B., Mou, H., Ojha, A., Peng, H., Quinlan, B.D., Rangarajan, E.S., Pan, A., Vanderheiden, A., Suthar, M.S., Li, W., IZard, T., Rader, C., Farzan, M., Choe, H., 2020. SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nature Communications* 11, 1–9. doi:10.1038/s41467-020-19808-4
- Zhang, L., Yan, X., Fan, Q., Liu, H., Liu, X., Liu, Z., Zhang, Z., 2020. D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 18, 1324–1329. doi:10.1111/jth.14859
- Zhang, Q., Zhang, H., Gao, J., Huang, K., Yang, Y., Hui, X., He, X., Li, C., Gong, W., Zhang, Y., Zhao, Y., Peng, C., Gao, X., Chen, H., Zou, Z., Shi, Z.L., Jin, M., 2020. A serological survey of SARS-CoV-2 in cat in Wuhan. *Emerging Microbes and Infections* 9, 2013–2019. doi:10.1080/22221751.2020.1817796

- Zhang, T., Wu, Q., Zhang, Z., 2020. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Current Biology* 30, 1346-1351.e2. doi:10.1016/j.cub.2020.03.022
- Zhao, J., Yuan, Q., Wang, H., Liu, W., Liao, X., Su, Y., Wang, X., Yuan, J., Li, T., Li, J., Qian, S., Hong, C., Wang, F., Liu, Y., Wang, Z., He, Q., Li, Z., He, B., Zhang, T., Fu, Y., Ge, S., Liu, L., Zhang, J., Xia, N., Zhang, Z., 2020. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients with Novel Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases* 71, 2027–2034. doi:10.1093/cid/ciaa344
- Zhao, Y., Wang, J., Kuang, D., Xu, J., Yang, M., Ma, C., Zhao, S., Li, J., Long, H., Ding, K., Gao, J., Liu, J., Wang, H., Li, H., Yang, Y., Yu, W., Yang, J., Zheng, Y., Wu, D., Lu, S., Liu, H., Peng, X., 2020. Susceptibility of tree shrew to SARS-CoV-2 infection. *Scientific Reports* 10, 16007. doi:10.1038/s41598-020-72563-w
- Zou, L., Ruan, F., Huang, M., Liang, L., Huang, H., Hong, Z., Yu, J., Kang, M., Song, Y., Xia, J., Guo, Q., Song, T., He, J., Yen, H.-L., Peiris, M., Wu, J., 2020. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *New England Journal of Medicine* 382, 1177–1179. doi:10.1056/nejmc2001737

7. SITOGRAFIA

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>

<https://www.ferret.org › events › colors › colorchart>

<https://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/virus-structure>

<https://www.uniprot.org/uniprot/P16288>

<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/rabies>

https://ec.europa.eu/food/animals/pet-movement/eu-legislation/non-commercial-non-eu_en

<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/232250/WER7835_310-311.PDF

https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers#tab=tab_1

http://www.salute.gov.it/portale/news/p3_2_1_1_1.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dal_ministero&id=4067

[https://www.who.int/news/item/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news/item/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov))

https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200131-sitrep-11-ncov.pdf?sfvrsn=de7c0f7_4

https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200301-sitrep-41-covid-19.pdf?sfvrsn=6768306d_2

<https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>

<https://www.info.gov.hk/gia/general/202002/28/P2020022800013.htm>

<https://www.info.gov.hk/gia/general/202012/04/P2020120400629.htm>

https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/SA_One_Health/sars-cov-2-animals-us

<https://www.gov.uk/government/publications/ferret-and-other-mustelinae-register>

<https://www.pfma.org.uk/pet-population-2018>

https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/20160222_informeestudioparapublicar_tcm30-104720.pdf

https://www.salute.gov.it/anagcaninapublic_new/AdapterHTTP

www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=37289

<https://www.avma.org/resources-tools/animal-health-and-welfare/covid-19/depth-summary-reports-naturally-acquired-sars-cov-2>

8. ALLEGATI

Allegato 1 – Descrizione del progetto

Indagine sierologica in furetti durante il periodo pandemico da SARS-CoV-2

La comparsa di SARS-CoV-2 nel dicembre 2019 (Zhu et al. 2020) ha generato la situazione pandemica che tuttora stiamo vivendo. SARS-CoV-2 è un virus a RNA, responsabile di una forma respiratoria acuta di varia gravità, con decorso da lieve o asintomatico fino a grave o fatale (Oran and Topol 2020). Questo virus appartiene al genere *Betacoronavirus*, famiglia *Coronaviridae*, assieme ai virus responsabili di SARS e MERS (Lu et al. 2020), con i quali condivide anche la natura zoonotica (Dhama et al. 2020). L'origine di SARS-CoV-2 viene infatti correntemente ricercata all'interno di serbatoi animali, come il pipistrello e il pangolino proposti inizialmente (Zhang, Wu, and Zhang 2020), i quali ospiterebbero coronavirus simili, da cui SARS-CoV-2 potrebbe essere originato, per poi effettuare il salto di specie in ospiti intermedi e verso l'uomo, per continuare la propria evoluzione acquisendo caratteristiche che ne abbiano determinato l'adattamento alla nostra specie (Andersen et al. 2020), con le note conseguenze pandemiche.

Fin dai primi studi sulla suscettibilità di varie specie al virus, è emerso come furetti e visoni fossero tra gli animali più suscettibili (Hobbs and Reid 2020; Kim et al. 2020; Shi et al. 2020). Il furetto si è confermato infatti un buon modello animale anche per COVID-19, come già era stato per altre infezioni respiratorie nell'uomo (Influenza A e virus respiratorio sinciziale umano) (Enkirch and von Messling 2015), mentre gli allevamenti di visoni sono stati pesantemente colpiti dalla circolazione di SARS-CoV-2 con qualche caso di trasmissione uomo-animale-uomo (Munnink et al. 2021), che ha costretto vari paesi a procedere con l'abbattimento degli animali.

Il ruolo zoonotico di SARS-CoV-2 è emerso anche a seguito delle svariate segnalazioni di positività in animali domestici come cani e gatti (Gaudreault et al. 2020; Sit et al. 2020), appartenenti a persone malate di COVID-19. In questi casi, la stretta convivenza tra uomo e animale ha sottolineato la direzionalità, altrimenti spesso trascurata, della trasmissione del patogeno dal proprietario al "pet", con riscontri per ora limitati alla sieroconversione degli animali esposti o a qualche blanda forma respiratoria.

In virtù di queste evidenze e della suscettibilità del furetto a SARS-CoV-2, confermata dalle infezioni sperimentali, questo progetto vuole valutare la presenza di anticorpi contro SARS-CoV-2 in furetti domestici, a seguito del periodo di elevata circolazione virale.

Con la collaborazione dei veterinari clinici, sarà quindi vagliata la disponibilità dei proprietari di furetti ad utilizzare un'aliquota di siero ottenuta contestualmente a monitoraggi clinici programmati sul proprio animale, a fini di ricerca scientifica. Ai proprietari sarà illustrato il presente progetto e sarà richiesta la sottoscrizione di un consenso informato all'utilizzo del materiale biologico prelevato dall'animale e dei relativi dati anamnestici.

Assieme al siero verranno richiesti i dati di segnalamento del furetto e informazioni cliniche come la presenza di sintomi al momento del prelievo o nell'ultimo anno, specialmente se in concomitanza con eventuali episodi di COVID-19 avvenuti nel nucleo familiare o di contatti con persone positive. Tutte le informazioni verranno gestite in forma anonima e nel rispetto della privacy. Il siero verrà processato per la ricerca di anticorpi contro SARS-CoV-2 mediante un kit sierologico ELISA a doppio antigene multispecie, già in uso in un altro progetto di ricerca e, successivamente, i campioni positivi saranno testati con metodiche differenti per conferma diagnostica.

La valutazione della sierconversione nei furetti domestici e l'eventuale correlazione con forme cliniche rilevate negli animali permetteranno di raccogliere ulteriori elementi a carico della suscettibilità di questo animale e del rischio che i focolai domestici di COVID-19 possono comportare per i nostri "pets". La raccolta di dati contribuirà alla descrizione di questo virus e delle sue implicazioni, aumentando le conoscenze scientifiche riguardo le dinamiche di infezione in ambiente domestico, ponendo le basi per linee guida volte a gestire il rischio sanitario per i nostri animali.

Referenze

- Andersen, Kristian G., Andrew Rambaut, W. Ian Lipkin, Edward C. Holmes, and Robert F. Garry. 2020. "The Proximal Origin of SARS-CoV-2." *Nature Medicine* 26(4):450–52.
- Dhama, Kuldeep, Shailesh Kumar Patel, Khan Sharun, Mamta Pathak, Ruchi Tiwari, Mohd Iqbal Yattoo, Yashpal Singh Malik, Ranjit Sah, Ali A. Rabaan, Parmod Kumar Panwar, Karam Pal Singh, Izabela Michalak, Wanpen Chaicumpa, Dayron F. Martinez-Pulgarin, D. Katterine Bonilla-Aldana, and Alfonso J. Rodriguez-Morales. 2020. "SARS-CoV-2 Jumping the Species Barrier: Zoonotic Lessons from SARS, MERS and Recent Advances to Combat This Pandemic Virus." *Travel Medicine and Infectious Disease* 37:101830.
- Enkirch, T., and V. von Messling. 2015. "Ferret Models of Viral Pathogenesis." *Virology* 479–480:259–70.
- Gaudreault, Natasha N., Jessie D. Trujillo, Mariano Carossino, David A. Meekins, Igor Morozov, Daniel W. Madden, Sabarish V. Indran, Dashzeveg Bold, Velmurugan Balaraman, Taeyong Kwon, Bianca Libanori Artiaga, Konner Cool, Adolfo Garcia-Sastre, Wenjun Ma, William C. Wilson, Jamie Henningson, Udeni B. R. Balasuriya, and Juergen A. Richt. 2020. "SARS-CoV-2 Infection, Disease and Transmission in Domestic Cats." *Emerging Microbes and Infections* 9(1):2322–32.
- Hobbs, Emma C., and Tristan J. Reid. 2020. "Animals and SARS-CoV-2: Species Susceptibility and Viral Transmission in Experimental and Natural Conditions, and the Potential Implications for Community Transmission." *Transboundary and Emerging Diseases*.
- Kim, Young Il, Seong Gyu Kim, Se Mi Kim, Eun Ha Kim, Su Jin Park, Kwang Min Yu, Jae Hyung Chang, Eun Ji Kim, Seunghun Lee, Mark Anthony B. Casel, Jihye Um, Min Suk Song, Hye Won Jeong, Van Dam Lai, Yeonjae Kim, Bum Sik Chin, Jun Sun Park, Ki Hyun Chung, Suan Sin Foo, Haryoung Poo, In Pil Mo, Ok Jun Lee, Richard J. Webby, Jae U. Jung, and Young Ki Choi. 2020. "Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets." *Cell Host and Microbe* 27(5):704-709.e2.
- Lu, Roujian, Xiang Zhao, Juan Li, Peihua Niu, Bo Yang, Honglong Wu, Wenling Wang, Hao Song, Baoying Huang, Na Zhu, Yuhai Bi, Xuejun Ma, Faxian Zhan, Liang Wang, Tao Hu, Hong Zhou, Zhenhong Hu, Weimin Zhou, Li Zhao, Jing Chen, Yao Meng, Ji Wang, Yang Lin, Jianying Yuan, Zhihao Xie, Jinmin Ma, William J. Liu, Dayan Wang, Wenbo Xu, Edward C. Holmes, George F. Gao, Guizhen Wu, Weijun Chen, Weifeng Shi, and Wenjie Tan. 2020. "Genomic Characterisation and Epidemiology of 2019 Novel Coronavirus: Implications for Virus Origins and Receptor Binding." *The Lancet* 395(10224):565–74.
- Munnink, Bas B. Oud., Reina S. Sikkema, David F. Nieuwenhuijse, Robert Jan Molenaar, Emmanuelle Munger, Richard Molenkamp, Arco Van Der Spek, Paulien Tolsma, Ariene Rietveld, Miranda Brouwer, Noortje Bouwmeester-Vincken, Frank Harders, Renate Hakze Van Der Honing, Marjolein C. A. Wegdam-Blans, Ruth J. Bouwstra, Corine GeurtsvanKessel, Annemiek A. Van Der Eijk, Francisca C. Velkers, Lidwien A. M. Smit, Arjan Stegeman, Wim H. M. Van Der Poel, and Marion P. G. Koopmans. 2021. "Transmission of SARS-CoV-2 on Mink Farms between Humans and Mink and Back to Humans." *Science* 371(6525):172–77.
- Oran, Daniel P., and Eric J. Topol. 2020. "Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection: A Narrative Review." *Annals of Internal Medicine* 173(5):362–67.
- Shi, Jianzhong, Zhiyuan Wen, Gongxun Zhong, Huanliang Yang, Chong Wang, Baoying Huang, Renqiang Liu, Xijun He, Lei Shuai, Ziruo Sun, Yubo Zhao, Peipei Liu, Libin Liang, Pengfei Cui, Jinliang Wang, Xianfeng Zhang, Yuntao Guan, Wenjie Tan, Guizhen Wu, Hualan Chen, Zhigao Bu, and Zhigao Bu. 2020. "Susceptibility of Ferrets, Cats, Dogs, and Other Domesticated Animals to SARS-Coronavirus 2." *Science* 368(6494):1016–20.
- Sit, Thomas H. C., Christopher J. Brackman, Sin Ming Ip, Karina W. S. Tam, Pierra Y. T. Law, Esther M. W. To, Veronica Y. T. Yu, Leslie D. Sims, Dominic N. C. Tsang, Daniel K. W. Chu, Ranawaka A. P. M. Perera, Leo L. M. Poon, and Malik Peiris. 2020. "Infection of Dogs with SARS-CoV-2." *Nature* 586(7831):776–78.
- Zhang, Tao, Qunfu Wu, and Zhigang Zhang. 2020. "Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak." *Current Biology* 30(7):1346-1351.e2.
- Zhu, Na, Dingyu Zhang, Wenling Wang, Xingwang Li, Bo Yang, Jingdong Song, Xiang Zhao, Baoying Huang, Weifeng Shi, Roujian Lu, Peihua Niu, Faxian Zhan, Xuejun Ma, Dayan Wang, Wenbo Xu, Guizhen Wu, George F. Gao, and Wenjie Tan. 2020. "A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019." *New England Journal of Medicine* 382(8):727–33.

Allegato 2 – Modulo per la raccolta del consenso informato

Dichiarazione di consenso per la conservazione e l'utilizzo di materiale biologico e dati clinico/anamnestici per finalità di ricerca

Gentile cliente,

durante la visita dal Veterinario possono essere effettuati prelievi di materiale biologico sul suo animale (sangue, urine, altri fluidi corporei, campioni per esami citologici o istologici) per il monitoraggio dello stato di salute o per approfondimenti diagnostici. Spesso non è necessario utilizzare l'intero campione e poiché questo materiale è molto utile per la ricerca scientifica, Le chiediamo, con il presente modulo di consenso informato, l'autorizzazione a conservare i campioni prelevati e ad utilizzarli, assieme ai dati clinici e anamnestici del paziente, a fini di ricerca scientifica.

Consenso

Il sottoscritto/a _____, con la presente acconsente:

- alla conservazione dei campioni/dati relativi all'animale di mia proprietà fino ad eventuale revoca dell'autorizzazione;
- all'utilizzo dei campioni/dati relativi all'animale di mia proprietà nell'ambito di progetti di ricerca scientifica, purché in forma anonima.

Conferma di:

- aver ricevuto informazioni esaustive sulla raccolta e sull'utilizzo di campioni/dati relativi all'animale di mia proprietà, per finalità di ricerca;
- di aver avuto la possibilità di porre domande e di aver ricevuto risposte soddisfacenti in merito alle finalità della ricerca;
- di essere stato/a informato/a che il mio consenso è volontario e che pertanto la mia decisione di prestare o negare il consenso non comporterà per me alcun vantaggio o svantaggio.

Cognome e nome del/della proprietario/a: _____

Data di nascita: _____ Località, data: _____

Firma giuridicamente valida: _____

Ho provveduto ad informare il/la paziente circa la natura, il significato e le finalità della ricerca e del fatto che è libero/a di revocare il suo consenso in qualsiasi momento senza dover fornire alcuna motivazione. Località, data: _____

Timbro e firma del veterinario: _____

Allegato 3 – Questionario per la raccolta di segnalamento e anamnesi

Questionario n.: _____ Data: _____
Comune di residenza del proprietario: _____

Informazioni riguardanti l'animale

Nome dell'animale: _____

1- Com'è entrato in possesso del furetto?

2- Qual è l'età dell'animale, e da quanto ne è in possesso?

3- Sesso Maschio Femmina

4- Stato riproduttivo Intero Sterilizzato Con impianto

5- È stato vaccinato? SI NO

6- Ha accesso ad aree esterne (Giardino/passeggiate)? SI NO

7- Convive con altri animali? (se sì, specificare quali?) SI NO

8- Nell'ultimo anno, sono stati introdotti nuovi animali nell'ambiente? SI NO

9- Nell'ultimo anno, l'animale ha manifestato sintomatologia/comportamenti anormali?

10- Al momento del prelievo, l'animale presenta sintomatologia/comportamenti anormali?

Informazioni riguardanti il nucleo familiare

11- All'interno del vostro nucleo familiare sono stati riscontrati casi di COVID-19?

SI NO Se sì quando?

12- Siete a conoscenza di possibili contatti a rischio COVID-19 per il vostro nucleo familiare?

SI NO Se sì quando?

13- All'interno del vostro nucleo familiare, si sono manifestate sindromi simil-influenzali?

SI NO Se sì quando?

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio innanzitutto il mio relatore, la Dr.ssa Claudia Maria Tucciarone, per tutto il sostegno che ha saputo fornirmi in questi mesi, per essersi dimostrata una fonte pressoché inesauribile di informazioni, per l'infinita pazienza che mi ha dimostrato, nonché per il suo lato umano, per essere comunque sempre riuscita a strapparmi qualche risata anche nei momenti più stressanti.

Ringrazio il mio correlatore, il Prof. Michele Drigo, per aver supervisionato l'intero progetto ed aver sempre saputo fornire indicazioni precise e dettagliate.

Ringrazio il mio correlatore, il Dr. Marco Bedin, perché senza di lui questo progetto non esisterebbe, e per essersi prodigato nel portarlo avanti, contattando e reclutando altri colleghi.

Ringrazio la mia compagna, Manuela Sandias, per essere sempre stata al mio fianco, per avermi dedicato il suo tempo, rileggendo questo elaborato innumerevoli volte, per avermi consigliato e sempre sostenuto, per tutto ciò che abbiamo passato insieme, ma soprattutto per essere la mia persona.

Ringrazio i miei genitori, i parenti, gli amici e i compagni di università, nonché chiunque mi abbia sostenuto, e probabilmente sopportato, in mille modi diversi durante questo percorso.

Grazie, di cuore.