

ĐẶC ĐIỂM SINH BỆNH HỌC VÀ CHẨN ĐOÁN XÉT NGHIỆM CORONAVIRUS

TS. HOÀNG XUÂN SỬ, TS. ĐINH THỊ THU HẰNG
PGS.TS. NGUYỄN THÁI SƠN, PGS.TS. HỒ ANH SƠN
GS.TS. HOÀNG VĂN LƯƠNG, GS.TS. ĐỖ QUYẾT
Học viện Quân y

TÓM TẮT: Coronaviruses là những thành viên thuộc phân họ Coronavirinae trong gia đình Coronaviridae, bộ Nidovirales. Cho đến nay, mới phát hiện ra Coronavirus lây nhiễm cho các loài động vật có xương sống và gây nên những bệnh đường hô hấp, tiêu hóa, hệ thần kinh ở người và động vật nói chung. Trước năm 2019, chỉ có 6 loài Coronavirus có thể lây nhiễm cho người, đồng thời gây ra các bệnh đường hô hấp, gồm: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HKU1, SARS-CoV và MERS-CoV. Trong đó, SARS-CoV và MERS-CoV có thể gây viêm đường hô hấp dưới và hội chứng viêm đường hô hấp cấp nặng; SARS-CoV gây dịch năm 2003 với tỉ lệ tử vong khoảng 8%; MERS-CoV gây dịch năm 2012 với tỉ lệ tử vong lên đến 35%. Chủng Coronavirus mới được tìm thấy ở Vũ Hán, Trung Quốc (SARS-CoV-2) là một loại mới và chưa được tìm thấy trước đây. Chủng SARS-CoV-2 gây nhiễm trùng đường hô hấp dưới và viêm phổi, nhìn chung có triệu chứng nhẹ hơn SARS-CoV và MERS-CoV, nhưng mức độ lây nhiễm lại rất nguy hiểm. Chúng tôi giới thiệu đặc điểm sinh bệnh học; kỹ thuật lấy bệnh phẩm, xử lý bệnh phẩm và chẩn đoán xét nghiệm SARS-CoV-2 để các đồng nghiệp tham khảo.

Từ khóa: Chủng Coronavirus mới, nhiễm trùng đường hô hấp, viêm phổi.

ABSTRACT: Coronaviruses are members of the subfamily Coronavirinae belonging to the family Coronaviridae, the order Nidovirales. So far, it has been reported that Coronavirus infects vertebrates and causes respiratory, digestive, and nervous system diseases in humans and animals. Before 2019, only 6 species of Coronavirus were known to infect humans and cause respiratory diseases, including: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HKU1, SARS-CoV and MERS-CoV. In particular, SARS-CoV and MERS-CoV can cause lower respiratory tract infection and severe acute respiratory syndrome; SARS-CoV caused an epidemic outbreak in 2003 with a mortality rate of 8%; MERS-CoV caused an epidemic in 2012 with a mortality rate up to 35%. The Coronavirus strain identified in Wuhan, China (SARS-CoV-2), a novel coronavirus is previously unknown. The SARS-CoV-2 strain causes lower respiratory tract infections and acute pneumonia, but it appears to be generally milder than SARS-CoV and MERS-CoV. We introduce a review of the pathobiology characteristics and guidelines for collecting, handling, processing clinical specimens and laboratory testing of SARS-CoV-2.

Keywords: Novel Coronavirus, respiratory infection, pneumonia

Chịu trách nhiệm nội dung: TS. Hoàng Xuân Sử, Email: hoangxuansu@vmmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 08/02/2020, chấp nhận đăng: 15/02/2020.

1. ĐẶC ĐIỂM SINH BỆNH HỌC NHIỄM CORONAVIRUS.

Coronaviruses là những thành viên thuộc phân họ Coronavirinae trong gia đình Coronaviridae, bộ Nidovirales. Tên Coronavirus (CoV) có nguồn gốc từ tiếng Latin (nghĩa là vương miện), vì hình dạng của virus này khi soi dưới kính hiển vi điện tử giống như vương miện hoặc vành nhật hoa. Phân họ Coronavirinae gồm 4 giống Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus và Deltacoronavirus. CoV có hình cầu, đường kính trung bình từ 80-120 nm, hệ gen là ARN dương sợi đơn có kích thước khoảng 30 kb, kèm nucleocapsid đối xứng xoắn ốc. Bộ gen của CoV chứa ít nhất 6 khung đọc mở (ORF: open reading frames) trong đó khung đọc mở đầu tiên (ORF1a/b) chiếm khoảng 2/3 chiều dài bộ gen, mã hóa 16 protein không cấu trúc (nsp1-16),

ngoại trừ Gammacoronavirus thiếu nsp1. Hầu hết các protein phi cấu trúc nsp1-16 đã được báo cáo về tính đặc hiệu của chúng và vai trò trong việc nhân lên của CoV. Tuy nhiên, chức năng của một số nsps còn chưa được hiểu biết đầy đủ [1].

Các ORF khác nằm ở 1/3 của bộ gen gần đầu 3' mã hóa ít nhất 4 protein cấu trúc chính: gai (S), màng (M), protein vỏ (E) và protein nucleocapsid (N). Các protein này đóng vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp và sự lây nhiễm của CoV. Protein S (trọng lượng phân tử từ 128-160 kDa) đóng vai trò chìa khóa, giúp virus gắn vào thụ cảm thể của tế bào chủ. Protein M (trọng lượng từ 25-30 kDa) là thành phần chính tạo nên vỏ của virus. Protein E (trọng lượng từ 8-12 kDa) là một polypeptide có trong vỏ của virus. Protein N (trọng lượng từ 43-50 kDa) là một phosphoprotein gắn với ARN genome của virus [1].

Sự nhân lên của CoV trong tế bào chủ.

Khi virus xâm nhập vào vật chủ, protein S gắn vào thụ thể của nó trên bề mặt màng tế bào niêm mạc đường hô hấp của vật chủ. Đa số các *Coronavirus* sử dụng peptidase làm thụ thể tế bào của chúng. SARS-CoV và HCoV-NL63 sử dụng men chuyển angiotensin 2 (ACE2) làm thụ thể của chúng, còn MERS-CoV dùng dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) để làm thụ thể xâm nhập vào tế bào đường hô hấp của người. Sự thay đổi di truyền của virus làm thay đổi khả năng gắn kết thụ cảm thể và thay đổi vật chủ của chúng [2]. Nghiên cứu gần đây nhất cho thấy chủng virus nước này có receptor giống với SARS-CoV-2 [3].

Bước tiếp theo sau khi xâm nhập vào tế bào vật chủ là quá trình dịch mã gen sao chép từ ARN gen của virion. Đầu tiên, chúng tổng hợp ra sợi ARN thông tin để tổng hợp ra các protein cấu trúc và phi cấu trúc nhằm bảo đảm các hoạt động tiếp theo của virus. Tiếp đó, chúng tạo ra một sợi ARN âm đóng vai trò khuôn mẫu để tổng hợp tiếp các sợi ARN dương con. Sau quá trình sao chép và tổng hợp ARN thế hệ con, các protein cấu trúc virus S, E và M được chuyển vào lưới nội bào (ER: endoplasmic reticulum) và di chuyển vào khoang trung gian giữa mạng lưới nội chất và bộ máy Golgi (Reticulum-Golgi-ERGIC). Ở đó, bộ gen của virus được bao bọc bởi protein N thành các nucleocapsid. Protein M phối hợp với protein E tích hợp vào màng của ERGIC thành lớp vỏ virus gắn bọc lấy nucleocapsid tạo ra các hạt giống virus (VLP: virus like particles). Sau đó, protein S gắn vào lớp màng của VLP thành các hạt virion trưởng thành.

Sau khi lắp ráp xong, virion được vận chuyển đến bề mặt tế bào trong các túi hay bong bóng và được giải phóng bởi quá trình thoát bào (exocytosis). Trong một số trường hợp, protein S không được gắn vào màng virion đưa đến bề mặt tế bào nên không trình diện kháng nguyên để tạo miễn dịch. Điều này dẫn đến sự hình thành của các tế bào đa nhân khổng lồ, cho phép virus lây lan và tồn tại trong cơ thể người bị nhiễm bệnh mà không bị hệ miễn dịch phát hiện hoặc bị vô hiệu hóa bởi các kháng thể đặc hiệu.

Cho đến nay, chỉ phát hiện ra CoV lây nhiễm cho những loài động vật có xương sống và gây nên những bệnh đường hô hấp, tiêu hóa và hệ thần kinh ở người và động vật nói chung. Trước năm 2019, có 6 chủng CoV được phát hiện có thể lây nhiễm cho người và gây ra các bệnh đường hô hấp, gồm: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HKU1 (gây ra viêm đường hô hấp trên nhẹ như bệnh cảm cúm thông thường; hiếm khi gây nhiễm trùng nặng ở trẻ sơ sinh, trẻ nhỏ hay người lớn tuổi) và SARS-CoV, MERS-CoV (gây viêm

đường hô hấp dưới và hội chứng viêm đường hô hấp cấp nặng; SARS-CoV gây dịch năm 2003 với tỉ lệ tử vong khoảng 8% và MERS-CoV gây dịch năm 2012 với tỉ lệ tử vong lên đến 35%). Chủng CoV được tìm thấy ở Vũ Hán, Trung Quốc là một loại mới, chưa được phát hiện trước đây. WHO đã đặt tên cho chủng virus mới này cái tên là SARS-CoV-2. Chủng SARS-CoV-2 gây nhiễm trùng đường hô hấp dưới và viêm phổi (WHO đặt tên là *Coronavirus disease 2019 - COVID-19*), nhưng nhìn chung, bệnh có triệu chứng nhẹ hơn so với bệnh gây ra bởi SARS-CoV và MERS-CoV.

Sức đề kháng của CoV.

Khác với hầu hết các virus đường hô hấp thông thường khác (chỉ có thể sống tối đa 5 giờ ngoài môi trường), CoV có sức đề kháng khá cao, có thể sống 24 giờ ngoài vật chủ trên bề mặt vật dụng, khiến mọi bề mặt đều có thể trở thành vật mang truyền virus. Điều này lý giải cho khả năng lây nhiễm cao của các chủng CoV gây bệnh. Các nghiên cứu chỉ ra rằng CoV bị bất hoạt nhanh bởi tia cực tím, nhiệt độ trên 65°C, các dung môi có tính kiềm hoặc axit (độ pH trên 12 hoặc dưới 3), formalin, glutaraldehyde, các dung dịch đậm như Trizole hay AVL buffer [4], [5].

Cho đến nay, chưa có nghiên cứu chính thức nào công bố về sức đề kháng và sự sống của chủng SARS-CoV-2 ở các điều kiện môi trường khác nhau. Tuy nhiên, do chủng SARS-CoV-2 cùng họ với “hai người anh” trước đây (SARS-CoV và MERS-CoV), nên SARS-CoV-2 có thể có sức đề kháng tương tự. Kết quả nghiên cứu đối với SARS-CoV cho thấy, ở điều kiện nhiệt độ phòng từ 22-25°C và độ ẩm tương đối 40-50%, virus có thể tồn tại được 5 ngày; còn ở điều kiện 4°C, virus tồn tại được 3 tuần. Trong mẫu phân và nước tiểu, ở nhiệt độ phòng, SARS-CoV vẫn tồn tại được ít nhất 1-2 ngày; còn trong mẫu phân của bệnh nhân nhiễm SARS-CoV thì tồn tại lâu hơn, tới 4 ngày [5]. Trong khi đó, MERS-CoV có thể tồn tại được 2 ngày ở điều kiện nhiệt độ 20°C và độ ẩm tương đối 40% [6]. Một nghiên cứu ở Hàn Quốc trong vụ dịch MERS-CoV cho thấy, có thể tìm thấy MERS-CoV ở cả các thiết bị y tế như nhiệt kế, máy X quang, cây treo dịch truyền, giường bệnh... Đặc biệt, ở người nhiễm bệnh, MERS-CoV có thể tồn tại đến 4 tuần [7]. Đây là cơ sở giúp cho việc đưa ra các biện pháp kiểm soát nhiễm khuẩn phù hợp và bất hoạt virus phục vụ xét nghiệm chẩn đoán SARS-CoV-2.

Đáp ứng miễn dịch với CoV.

Phản ứng miễn dịch đóng vai trò quan trọng để kiểm soát và loại bỏ nhiễm CoV. Tuy nhiên, đáp ứng miễn dịch không được điều chỉnh có thể dẫn đến bệnh lý miễn dịch và giảm quá trình trao đổi

khí ở phổi. Một sự hiểu biết sâu hơn về sự tương tác giữa các CoV và hệ thống miễn dịch tự nhiên của vật chủ có thể làm sáng tỏ sự phát triển và sự tồn tại của phản ứng viêm trong phổi và hy vọng có thể làm giảm nguy cơ viêm phổi do CoV. Cho đến nay, hiểu biết về bệnh học của nhiễm CoV vẫn chưa đầy đủ. Tuy nhiên, khi nghiên cứu đặc điểm bệnh học trong nhiễm SARS-CoV và MERS-CoV cho thấy, mất kiểm soát đáp ứng miễn dịch dẫn đến tổn thương nhu mô phổi, giảm chức năng và công năng của phổi [8]. Đầu tiên, đáp ứng miễn dịch tự nhiên xác định nhiễm virus thông qua các receptor nhận dạng mẫu phân tử (pattern recognition receptors: PRRs) liên quan đến mầm bệnh gồm toll-like receptor (TLR), RIG-I-like receptor (RLR), NOD-like receptor (NLR), C-type lectin-like receptors (CLM) và các receptor phân tử tự do trong bào tương (như cGAS, IFI16, STING, DAI...). Khi virus xâm nhập vào vật chủ, PRR ban đầu nhận ra axit nucleic của virus, thu thập protein tín hiệu, kích hoạt IRF3 và IRF7 trước khi được chuyển dịch vào trong nhân và thúc đẩy tổng hợp IFN type I; sau đó, kích hoạt con đường dẫn tín hiệu JAK-STAT, thúc đẩy sự biểu hiện của gen kích thích IFN (ISG) [9]. Bên cạnh đó, IFN type I hạn chế sự phát tán của virus, điều hòa đáp ứng miễn dịch, thúc đẩy quá trình thực bào kháng nguyên virus. Mặc dù SARS-CoV và các CoV khác nhạy cảm với IFN- α/β , những virus này vẫn là tác nhân gây bệnh cao. Được biết, protein N của SARS-CoV hoạt động như một chất đối kháng protein trốn thoát miễn dịch và đáp ứng interferon của vật chủ [10]. Trong khi đó, tế bào tua DCs (Dendritic cells) đóng một vai trò quan trọng trong cả đáp ứng miễn dịch tự nhiên và thích ứng. DCs đóng vai trò là các tế bào trình diện kháng nguyên mạnh nhất trong cơ thể, chúng kích thích hiệu quả, hoạt hóa tế bào lympho T và tế bào lympho B, do đó kết hợp miễn dịch tự nhiên và miễn dịch thích ứng [11].

Trong đáp ứng miễn dịch tế bào, các tế bào T bao gồm tế bào T CD4+ và các tế bào T CD8+, đóng một vai trò quan trọng chống virus bằng cách cân bằng trong việc chiến đấu chống lại mầm bệnh và nguy cơ phát triển bệnh tự miễn hoặc phản ứng viêm quá mức. Tế bào T CD4+ thúc đẩy sản xuất kháng thể đặc hiệu với virus, kích hoạt các tế bào B phụ thuộc tế bào T [12]. Tuy nhiên, tế bào T CD8+ gây độc tế bào có thể tiêu diệt tế bào bị nhiễm virus. Các tế bào T CD8+ chiếm khoảng 80% tổng số tế bào viêm thâm nhập trong khoang kẽ phổi ở bệnh nhân nhiễm SARS-CoV; đóng một vai trò quan trọng trong thải trừ CoV trong các tế bào bị nhiễm virus và gây tổn thương miễn dịch [13]. Các nghiên cứu chỉ ra rằng, sự thiếu hụt các tế bào T CD8+ không ảnh hưởng và trì hoãn sự nhân lên của virus tại thời điểm nhiễm với SARS-CoV [14]. Sự thiếu hụt các

tế bào T CD4+ có liên quan đến việc giảm sự huy động tế bào lympho đến phổi cũng như sản xuất kháng thể trung hòa và cytokine, dẫn đến một viêm phổi kẽ qua trung gian miễn dịch và làm chậm quá trình thải SARS-CoV khỏi phổi. Thêm vào đó, các tế bào T CD4 hỗ trợ giúp sản xuất các cytokine tiền viêm thông qua con đường truyền tín hiệu NF- κ B [15]. Các cytokine IL-17 tuyển dụng tế bào bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính đến vị trí viêm; kích hoạt các dòng thác cytokine và chemokine khác, chẳng hạn như IL-1, IL-6, IL-8, IL-21, TNF- α và MCP-1... [8].

2. CHẨN ĐOÁN XÉT NGHIỆM.

Trong hầu hết các trường hợp nhiễm CoV thông thường, bệnh sẽ tự khỏi, nên việc chẩn đoán virus là không cần thiết. Tuy nhiên, khi có dịch CoV nghiêm trọng, như nhiễm MERS-CoV, SARS-CoV và SARS-CoV-2, chẩn đoán xét nghiệm virus là rất quan trọng. Việc xác định các ca bệnh được khẳng định bằng xét nghiệm virus học sẽ hướng dẫn các biện pháp can thiệp y tế công cộng để kiểm soát dịch bệnh. Thêm vào đó, việc chẩn đoán xét nghiệm virus học giúp cung cấp cơ sở dữ liệu cho việc nghiên cứu truy tìm nguồn gốc virus, sự tiến hóa của virus, sự nhạy cảm của virus với vật chủ, chế tạo sinh phẩm xét nghiệm và theo dõi điều trị.

Mẫu bệnh phẩm:

- Dùng tăm bông dacron lấy mẫu dịch mũi họng (2 tăm bông cho 2 bệnh phẩm); sau đó, cho vào tube 3 ml chứa môi trường bảo quản bệnh phẩm.
- Có thể lấy dịch súc họng, dịch hút nội khí quản, dịch rửa phế quản và đờm.
- Bệnh phẩm máu: lấy 3-5 ml máu tĩnh mạch, cho vào tube có chống đông EDTA, bảo quản ở nhiệt độ 4°C.
- Bệnh phẩm được bảo quản, đóng gói và vận chuyển đến phòng xét nghiệm theo quy định của WHO và Bộ Y tế.
- Đối với bệnh phẩm chưa bắt hoạt, phải được xử lý trong tủ an toàn sinh học cấp II (BSC-II). Có thể sử dụng phương pháp bất hoạt bằng nhiệt độ ở điều kiện 60°C trong thời gian 60 phút hoặc bằng hóa chất (như Trizole, AVL buffer) và ủ trong thời gian 10 phút. Bệnh phẩm đã được bất hoạt có thể xử lý trong phòng an toàn sinh học cấp II (BSL-2) cho xét nghiệm chẩn đoán phân tử. Các loại bệnh phẩm sau khi xét nghiệm phải được xử lý theo quy định.

- Nhân viên lấy mẫu và xử lý bệnh phẩm phải sử dụng các trang thiết bị bảo hộ cá nhân thích hợp (kính bảo vệ mắt, khẩu trang y tế, áo choàng dài tay, găng tay, ủng). Nếu mẫu được thu thập với quy trình tạo khí dung, nhân viên phải đeo khẩu trang bảo vệ (như N95), được chứng nhận NIOSH, FFP2 tiêu chuẩn EU hoặc tương đương.

Kĩ thuật xét nghiệm:

Hiện nay, kĩ thuật realtime RT-PCR với các cặp mồi và probe đặc hiệu cho SARS-CoV-2 là công cụ xét nghiệm hiệu quả nhất chẩn đoán nhiễm virus. Ngày 17/01/2020, WHO phối hợp với Viện virus học (Đại học Berlin Charite) đã công bố quy trình xét nghiệm SARS-CoV-2 bằng kĩ thuật real-time RT-PCR. Kĩ thuật này có độ nhạy 3,8 copies/phản ứng. Tiếp theo, CDC Trung Quốc, Hong Kong, Thái Lan, CDC Hoa Kỳ đều công bố quy trình chẩn đoán xét nghiệm SARS-CoV-2 bằng kĩ thuật real-time RT-PCR [16].

Ngoài ra, có thể sử dụng kĩ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS: Next Generation Sequencing). Đây là kĩ thuật đầu tiên được các nhà khoa học Trung Quốc sử dụng để phát hiện SARS-CoV-2 và cung cấp trình tự gen đầy đủ của chủng này, giúp các phòng xét nghiệm có dữ liệu thông tin thiết kế các mồi và probe cho kĩ thuật real-time RT-PCR. Tuy nhiên, kĩ thuật giải trình tự gen thế hệ mới cho kết quả muộn, lại đòi hỏi đầu tư trang thiết bị hiện đại, đồng bộ và yêu cầu có chuyên gia nhiều kinh nghiệm phân tích kết quả.

Nuôi cấy COVID-19 hoặc các phân tích xét nghiệm trên virus sống phải được thực hiện trong phòng an toàn sinh học cấp III (BSL-3) [17]. Hiện nay, có thể nuôi cấy phân lập SARS-CoV-2 trên dòng tế bào Vero-E6 hoặc tế bào biểu mô đường hô hấp, phục vụ cho nghiên cứu, phát triển các sinh phẩm chẩn đoán, chế tạo vaccine và xây dựng mô hình gây bệnh thực nghiệm, cho đánh giá thử nghiệm tiền lâm sàng các thuốc kháng virus điều trị nhiễm COVID-19.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Chen Y, Liu Q, Guo D (2020) "Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis", *J Med Virol.*, 2020 Jan 22.
2. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al (2020), "Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding", *Lancet Lond Engl.*, 2020 Jan 30.
3. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al (2020), "A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin", *Nature*, 2020 Feb 3;1-4.
4. Chan K.H, Peiris J.S.M, Lam S.Y, Poon L.L.M, Yuen K.Y, Seto W.H (2011), "The Effects of Temperature and Relative Humidity on the Viability of the SARS Coronavirus", *Adv Virol.*, 2011;734690.
5. Darnell M.E.R, Subbarao K, Feinstone S.M, Taylor D.R (2004), "Inactivation of the CoV that induces severe acute respiratory syndrome", *SARS-CoV. J Virol Methods*, 2004 Oct; 121 (1): 85-91.
6. Van Doremalen N, Bushmaker T, Munster V.J (2013), "Stability of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) under different environmental conditions", *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.*, 2013 Sep 19; 18(38).
7. Bin S.Y, Heo J.Y, Song M-S, Lee J, Kim E-H, Park S-J, et al (2016), "Environmental Contamination and Viral Shedding in MERS Patients During MERS-CoV Outbreak in South Korea", *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.*, 2016 Mar 15; 62 (6): 755-60.
8. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al (2020), "Coronavirus Infections and Immune Responses", *J Med Virol.*, 2020 Jan 25;
9. Ma D.Y, Suthar M.S (2015), "Mechanisms of innate immune evasion in re-emerging RNA viruses", *Curr Opin Virol.*, 2015 Jun;12:26-37.
10. Lu X, Pan J, Tao J, Guo D (2011), "SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN- β response by targeting initial step of IFN- β induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism", *Virus Genes.*, 2011 Feb; 42 (1): 37-45.
11. Wu L, Dakic A (2004), "Development of dendritic cell system", *Cell Mol Immunol*, 2004 Apr; 1 (2): 112-8.
12. Cecere T.E, Todd S.M, Leroith T (2012), "Regulatory T cells in arterivirus and coronavirus infections: do they protect against disease or enhance it?", *Viruses*, 2012 May; 4 (5): 833-46.
13. Maloir Q, Ghysen K, von Frenckell C, Louis R, Guiot J (2018), "Acute respiratory distress revealing antisynthetase syndrome", *Rev Med Liege.*, 2018 Jul; 73 (7-8): 370-5.
14. Channappanavar R, Fett C, Zhao J, Meyerholz DK, Perlman S (2014), "Virus-specific memory CD8 T cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection", *J Virol.*, 2014 Oct; 88 (19): 11034-44.
15. Manni M.L, Robinson K.M, Alcorn J.F (2014), "A tale of two cytokines: IL-17 and IL-22 in asthma and infection", *Expert Rev Respir Med.*, 2014 Feb; 8 (1): 25-42.
16. Corman V.M, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, et al (2020), "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR", *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.*, 2020 Jan; 25 (3).
17. *Clinical Specimens: Novel Coronavirus 2019*[CDC [Internet]. [cited 2020 Feb 3]. Available from:<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html> □