

INMUNOPATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR SARS-COV2

IMMUNOPATHOGENESIS OF SARS-COV2 INFECTION

Siham Salmen Halabi¹

Resumen

El SARS-CoV-2 es el agente causal de COVID-19, que se caracteriza por presentar varias proteínas en su estructura, conocidas como la proteína espiga (S), membrana (M), envoltura (E) y de las nucleocápside (N), que algunas de ellas la S y la N, que en la actualidad tienen utilidad para el diagnóstico serológico y molecular. De ellas, la proteína S es objeto importante de estudio para el diseño de vacunas, debido a que participa en la unión a las células del hospedador, debido a su propiedad de unirse al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) presente principalmente en las células epiteliales de las vías respiratorias. Conocer estas características del virus ha permitido el desarrollo de estrategias diagnósticas que han ayudado en gran medida a detectar la infección activa, y diferenciar las distintas fases clínicas e incluso identificar aquellos que resolvieron la infección.

Palabras clave: COVID-19, SARS-Co-2, inmunopatogenia, enzima convertidora de angiotensina.

Abstract

SARS-CoV-2 is the causal agent of COVID-19, which is characterized by having several proteins in its structure, known as the spike protein (S), membrane (M), envelope (E) and the nucleocapsid (N), some of them S and N, which are currently useful for serological and molecular diagnosis. From them, the S protein is an important object of study for the design of vaccines, due to the fact that it participates in the union to the host cells, due to its property of binding to the receptor of the angiotensin 2 converting enzyme (ACE2) present mainly in the epithelial cells of the respiratory tract. Knowing these characteristics of the virus has allowed the development of diagnostic strategies that have greatly helped to detect the active infection, and differentiate the different clinical phases and even identify those that solved the infection.

Key words: COVID-19, SARS-Co-2, immunopathogenesis, angiotensin converting enzyme.

Fecha de recepción: 24.10.2020
Fecha de aceptación: 02.11.2020

¹ Médico Inmunólogo. Directora del Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina. **Universidad de Los Andes.** Email: salmensiham9@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El coronavirus es uno de los principales patógenos que ataca el sistema respiratorio humano y se ha caracterizado como agentes que tienen un gran impacto en la salud pública. Los CoV se han identificado previamente, en brotes anteriores de coronavirus (CoV) e incluyen el síndrome respiratorio agudo severo (SARS)-CoV y el síndrome respiratorio del Oriente Medio (MERS)-CoV. Recientemente, en diciembre de 2019, un grupo de pacientes fue hospitalizado en Wuhan, provincia de Hubei, China, con un diagnóstico inicial de neumonía de etiología desconocida, pero estaban epidemiológicamente vinculados a un marisco y a las prácticas crueles en los mercados de animales vivos [1]. Los hospitales locales identificaron un nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) y, el 30 de enero de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró que COVID-19 es una "emergencia de salud pública de importancia internacional" [2], ahora sobre la pandemia se está intensificando rápidamente, de hecho hasta la fecha (24/10/2020) en todo el mundo se han reportado más de 42.000.000 personas infectadas y más de 1.100.000 muertes.

Los coronavirus (CoV), una gran familia de virus de ARN monocatenario, pueden infectar a animales y también a seres humanos, y son responsables de enfermedades respiratorias, gastrointestinales, hepáticas y neurológicas [3]. CoVs es un virus de ARN, dividido en cuatro géneros: alfa-coronavirus, beta-coronavirus, gamma-coronavirus y delta-coronavirus [4]. Se han identificado seis coronavirus humanos (HCoV), alfa-CoVs HCoVs-NL63 y HCoVs-229E y beta-CoVs HCoVs-OC43, HCoVs-HKU1, (típicamente infectan solo el tracto respiratorio superior y causan síntomas relativamente menores), sin embargo, hay tres coronavirus: síndrome respiratorio agudo severo-CoV (SARS-CoV), síndrome respiratorio de Oriente Medio-CoV (MERS-CoV) y síndrome respiratorio agudo severo-CoV-2 (SARS-CoV-2) [5], puede replicarse en el tracto respiratorio inferior y causar neumonía, que puede ser mortal [6]. El SARS-CoV-2 se transmite principalmente a través de gotitas respiratorias, con una posible ruta de transmisión fecal-oral [7].

La media del período de incubación es de unos 4-5 días antes del inicio de los síntomas, que en el 97,5% de los pacientes sintomáticos desarrollan síntomas en 11,5 días [8]. Los pacientes con COVID-19 suelen presentar fiebre y tos seca, y también dificultad para respirar, dolor muscular y articular, dolor de cabeza, mareos, diarrea, náuseas y tos con sangre [9]. Los síntomas graves de COVID-19 progresan a síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), en promedio 8 a 9 días después del inicio de los síntomas, mostrando dificultad para respirar y bajo nivel de oxígeno en sangre, y cuando hay infecciones bacterianas y fúngicas secundarias, un número creciente y se observa la tasa de muertes en todo el mundo [10]. La lesión pulmonar también puede progresar a insuficiencia respiratoria además de insuficiencia multiorgánica y coagulopatía asociada a COVID-19 (CAC) [11].

Así, el nuevo coronavirus, COVID-19, se ha convertido rápidamente en una amenaza global para la salud, los viajes y el comercio, y los países en desarrollo son más susceptibles debido a la debilidad de nuestros servicios de salud. Esta pandemia iniciada en China probablemente asociado a las prácticas crueles dirigidas contra los animales y los mercados de animales vivos, se ha extendido por todo el mundo, tocando regiones donde ha causado una devastación inimaginable. Para detener la transmisión, es importante utilizar pruebas de SARS-CoV-2 que permiten un diagnóstico rápido y preciso y el manejo oportuno de los pacientes infectados. Los métodos basados en ácidos nucleicos son sensibles pero propensos a falsos positivos, mientras que el método basado en anticuerpos tiene una sensibilidad ligeramente menor pero una precisión mayor y, por lo tanto, ambos métodos deben combinarse para una detección temprana y precisa. En nuestro país, los primeros casos se reportaron a principios de marzo de 2020, sin embargo, solo unas pocas regiones están preparadas para enfrentar este gran desafío, debido en parte a las serias deficiencias en nuestro sistema de salud y la falta de herramientas básicas para gestionar la PCR en tiempo real tecnología, por lo que existe una necesidad urgente de herramientas serológicas y moleculares simples, pero precisa y fácil de aplicar sin instrumentos sofisticados y económicos.

INMUNOPATOGENIA

La infección por SARS-CoV-2 y la destrucción de las células pulmonares desencadena una respuesta inmune local, reclutando macrófagos y monocitos que responden a la infección, liberan citocinas y activan las respuestas inmunitarias adaptativas de las células T y B. Los pacientes infectados con COVID-19 han mostrado un mayor número de leucocitos, hallazgos respiratorios anormales y niveles elevados de citocinas proinflamatorias en plasma, también se ha observado una velocidad de sedimentación globular elevada y dímero-D [12]. Se ha descrito además que el tropismo del SARS-CoV-2 depende del dominio de unión al receptor de la proteína de pico (RBD) podría usar la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor celular, similar al SARS-CoV, por lo tanto, el virus se dirige principalmente a las células epiteliales de las vías respiratorias (superior e inferior), las células epiteliales alveolares, las células endoteliales vasculares y los macrófagos del pulmón, todos los cuales expresan el receptor diana del huésped de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) [13].

La proteína spike (S) es importante para la unión a las células huésped y media la interacción con la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) [14], y se encuentra en la superficie de las partículas virales y se ha informado que es altamente inmunogénica [15]. La proteína S tiene dos subunidades: S1 y S2. S1 es un dominio de unión al receptor (RBD) [16]. El RBD se une a ACE2 como su receptor diana de la célula huésped, lo que inicia el proceso de infección y desencadena la endocitosis del virión SARS-CoV-2 y lo expone a proteasas endosomales y la subunidad S1 se escinde, luego la exposición de la subunidad S2 consiste en una fusión. péptido (FP) dentro del endosoma, que se inserta en la membrana del huésped y conduce a la fusión de la membrana y libera el paquete viral en el citoplasma del huésped [17]. En este proceso se requiere la serina proteasa celular TMPRSS2 para facilitar la entrada de la célula hospedadora [18].

El efecto de los virus citopáticos induce la muerte y lesión de las células y tejidos infectados por el virus como parte del ciclo de replicación del virus, en las células epiteliales de las vías respiratorias podría causar altos niveles de piroptosis ligada al

virus con fuga vascular asociada [19], probablemente desencadenante de la inflamación posterior respuesta. La IL-1 β , una citoquina importante liberada durante la piroptosis, se eleva durante la infección por SARS-CoV-2, mediante la activación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y los patrones moleculares asociados al daño (DAMP). Se produce una ola de inflamación local, que implica un aumento de la secreción de las citocinas y quimiocinas proinflamatorias, principalmente IL-6, IFN γ , MCP1 e IP-10 en los pacientes infectados con sangre, asociada a células T helper 1 (Th-1) polarizadas [20].

Se ha evidenciado niveles altos de citocinas y quimiocinas en sangre en pacientes con infección por COVID-19, estas incluyen que incluían IL1- β , IL1RA, IL7, IL8, IL9, IL10, IL-33, GCSF, GMCSF, IFN γ , IP10, MCP1, MIP1 α , MIP1 β , PDGFB, TNF α y VEGFA. Algunos de los casos graves admitidos en la unidad de cuidados intensivos mostraron niveles elevados de IL2, IL7, IL10, GCSF, IP10, MCP1, MIP1 α y TNF α , que se cree que promueven la gravedad de la enfermedad [20]. Como virus dirigido al sistema respiratorio era la neumonía grave, la ARNemia, combinada con la incidencia de opacidades en vidrio esmerilado y la lesión cardíaca aguda. Además, los niveles de IL-6 en estos pacientes incrementan con el tiempo y son relativamente más elevados en los no supervivientes, que en los pacientes que resuelven la infección [21].

El pico de carga viral en las muestras del tracto respiratorio puede ocurrir incluso antes del inicio de los síntomas de neumonía en las infecciones por SARS-CoV-2 [22]; sin embargo, un estudio de cohorte retrospectivo mostró que el ARN viral era detectable en los no sobrevivientes hasta el momento de la muerte, lo que sugiere una correlación entre la persistencia del virus y la mala evolución de la enfermedad [21]. En particular, el virus se encontró en los linfocitos T [23], macrófagos y células dendríticas derivadas de monocitos [24] y la muerte directa del virus de los linfocitos podría contribuir a la linfopenia observada en los pacientes [23], por lo que comprender los impulsores precisos de la disfunción inmunológica es crucial para orientar la aplicación de tratamientos inmunomoduladores adecuados. En conjunto, todo este mecanismo

conduce a un daño alveolar difuso, que incluye descamación de las células alveolares, formación de membranas hialinas y edema pulmonar. Las personas mayores y las personas con comorbilidades son más propensas a desarrollar una respuesta inmune disfuncional que causa patología y tampoco logra erradicar con éxito el patógeno, pero el mecanismo subyacente aún no está claro, aunque una razón puede ser un microambiente pulmonar envejecido que causa alteraciones en la maduración de las dendríticas la celular y la migración a los órganos linfoides y, por lo tanto, la activación defectuosa de las células T [26].

Las respuestas de las células T y B contra el SARS-CoV-2 se detectan en la sangre alrededor de una semana después del inicio de los síntomas de COVID-19. Las células T CD8 + son importantes para atacar y matar directamente las células infectadas por virus, mientras que las células T CD4 + son cruciales para cebar tanto las células T CD8 + como las células B. Las células T CD4 + también son responsables de la producción de citocinas para impulsar el reclutamiento de células inmunitarias, y son atraídas desde la sangre hacia el sitio infectado para controlar la infección viral. En pacientes con COVID-19, el aumento del agotamiento de las células T y la reducción de la diversidad funcional predicen una enfermedad grave [27]. Las células T específicas de coronavirus son claramente importantes para eliminar el virus y controlar el desarrollo de la enfermedad y deben considerarse en las estrategias de vacunación, sin embargo, queda por investigar si las respuestas de las células T por sí solas son capaces de prevenir la infección en entornos humanos. Este conocimiento será importante para el diseño de vacunas.

RESPUESTA INMUNE HUMORAL CONTRA COVID-19

La respuesta de las células B en pacientes con COVID-19 ocurren al mismo tiempo que las respuestas de las células T foliculares, aproximadamente una semana después del inicio de los síntomas [7], sin embargo, un grupo de pacientes no desarrollan anticuerpos de larga duración contra el SARS-CoV-2 [28], y se desconoce si estos pacientes son susceptibles a la reinfección [29]. Es probable que los anticuerpos sean eficaces contra el SARS-CoV-2; de hecho, se han aplicado muestras de suero de

convalecientes con resultados clínicos aparentemente buenos en COVID-19 [30]; sin embargo, la selección de anticuerpos terapéuticos candidatos debe incluir una consideración cuidadosa de posibles efectos secundarios no deseados. Los efectos secundarios descritos son productos de que los anticuerpos preexistentes frente a otros coronavirus pueden exacerbar las infecciones por SARS-CoV, a través de una exacerbación la citotoxicidad dependiente de anticuerpos [31]. Además, en modelos animales se ha descrito que en la infección por SARS-CoV, los anticuerpos neutralizantes de la proteína S pueden aumentar potencialmente la lesión pulmonar al incrementar la respuesta inflamatoria [32]. Aún más, se ha observado una correlación cuando el desarrollo de SDRA coincide con la seroconversión de IgG antiviral en el 80% de los pacientes [33], y los pacientes que desarrollaron anticuerpos neutralizantes contra la proteína S, en una etapa más temprana de la infección tienen una tasa más alta de enfermedad. Adicionalmente, los pacientes que fallecieron a causa de la infección tardaron sólo 14,7 días en alcanzar sus niveles máximos de actividad de anticuerpos neutralizantes, en contraposición a los 20 días de los pacientes que se recuperaron [34].

Funcionalmente, las proteínas estructurales principales, incluidas las proteínas de pico (S), membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N), también están bien anotadas [35]. La proteína S se encuentra en la superficie de las partículas virales y se ha informado que es altamente inmunogénica [15]. La proteína de membrana (M) (una glicoproteína transmembrana de tipo III) y la proteína de la envoltura (E) se encuentran entre las proteínas S en la envoltura del virus. La proteína N es una de las principales proteínas estructurales del virus y participa en la transcripción y replicación del ARN viral, el empaquetamiento del genoma encapsidado en viriones [36] y la interferencia con los procesos del ciclo celular de las células huésped [37]. Los coronavirus, incluido el SARS-CoV, la proteína N tiene una alta actividad inmunogénica y se expresa abundantemente durante la infección y tanto las proteínas S como las N pueden ser antígenos potenciales para el serodiagnóstico de COVID-19, al igual que se han desarrollado muchos métodos de diagnóstico para diagnosticar el SARS basados

en Proteínas S y / o N [15], [38]. Se ha reportado que el ELISA basado en rN y las muestras de plasma de pacientes con infecciones agudas del tracto respiratorio inferior (ALRTI), IgM e IgA fueron detectables en el día 5-10 después del inicio de los síntomas (PSO), respectivamente, mientras tanto, el anti-SARS-CoV -2 anticuerpos IgG fueron positivos en el día 14 PSO [39]. Sin embargo, otros estudios encuentran que la IgM puede detectarse en las muestras de los pacientes de 10 a 30 días después de la infección por SARS-CoV-2, mientras que la IgG aparece a partir del día 20 [40]. La IgM se manifiesta antes que la IgG, pero luego se debilita y desaparece. Sin embargo, la IgG puede persistir durante mucho tiempo después de la infección y potencialmente puede tener una función protectora, pero este problema aún se desconoce. Para el propósito de monitorear la cinética de los anticuerpos, los ensayos cuantitativos son preferibles a las pruebas cualitativas, incluso si los ensayos disponibles aún no han sido ampliamente validados, sin embargo, no está claro qué anticuerpos son óptimamente efectivos en el escenario de COVID-19 y cuáles de ellos son neutralizantes. También existe incertidumbre en cuanto a qué isotipo de anticuerpo (IgM, IgG o IgA) (único o combinado) es la mejor opción en estos diferentes contextos [41]. Además, el hallazgo de SARS-CoV-2 podría existir en pacientes que tienen IgG específica de virus durante un tiempo inesperadamente largo (36-50 días) y en pacientes con COVID-19 que no produjeron ninguna IgG específica de SARS-CoV-2. El SARS-CoV-2 eliminado con éxito después de 46 días de enfermedad, podría sugerir que la inmunidad innata podría ser lo suficientemente poderosa como para eliminar el SARS-CoV-2 [42].

DIAGNÓSTICO DEL NUEVO CORONAVIRUS DE 2019

Se han publicado varios métodos para detectar el virus, con diferente sensibilidad y especificidad, y tasas de falsos negativos y falsos positivos relativamente elevadas debido a posibles errores en el proceso de muestreo y análisis [43]. Los métodos basados en ácidos nucleicos son sensibles pero propensos a falsos positivos; mientras tanto, el método basado en anticuerpos tiene una sensibilidad ligeramente menor pero una mayor precisión. Por lo tanto, se sugiere combinar los dos métodos para mejorar la precisión de detección de COVID-19. La RT-PCR cuantitativa en tiempo real

(RT-qPCR) es una de las técnicas más utilizadas para la detección del SARS-CoV2, que tiene una alta sensibilidad y una detección rápida. Comparando la eficiencia de detección de RT-qPCR en hisopos de garganta, hisopos nasales y muestras de esputo, se encontró que las tasas positivas de muestras de esputo, hisopos nasales y muestras de garganta fueron 74,4-88,9%, 53,6-73,3% y 44,2%, respectivamente. Lo que sugiere que las muestras recolectadas de las vías respiratorias inferiores aumentan la precisión del diagnóstico [44]. Aunque los métodos basados en ácidos nucleotídicos son los recomendados por muchos grupos y la OMS, algunos expertos han informado recientemente que la sensibilidad de la detección de ácidos nucleicos en el SARS-CoV-2 es baja, incluso tan baja como 42,10%. En algunos casos de detección basada en ácidos nucleotídicos, aparecerá un resultado positivo después de repetidas pruebas negativas. Los frotis nasofaríngeos o faríngeos son negativos muchas veces, pero finalmente, los resultados positivos se detectan en muestras de esputo o muestras de líquido de lavado respiratorio [43]. Además, existen varias limitaciones en las detecciones basadas en ácidos nucleotídicos, como un tiempo de respuesta prolongado, una operación compleja, equipos costosos y técnicos capacitados [45]. Por lo tanto, muchos expertos sugieren utilizar la detección de anticuerpos específicos como complemento para la detección de ácidos nucleicos. Hasta la fecha, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el ensayo inmunocromatográfico de oro coloidal (GICA) y el inmunoensayo por quimioluminiscencia (CLIA) son los métodos más utilizados para la detección del SARS-CoV-2. Como se informó, los métodos basados en anticuerpos dirigidos a IgG e IgM inducidos por las proteínas N y S recombinantes del SARS-CoV-2 son consistentes con los resultados obtenidos por el ensayo basado en ácidos nucleicos [46]

Además, un informe reciente mostró que el nivel de IgA en el suero del paciente se correlaciona positivamente con la gravedad del COVID-19 [47], lo que indica que el IgA sérico también se puede utilizar como marcador biológico para la identificación del COVID-19. Por lo tanto, combinada con la detección de ácido nucleico, la detección de anticuerpos específicos del virus puede reducir significativamente los "falsos

negativos" de la infección por SARS-CoV-2 a nivel clínico. Un método de detección prometedor basado en ácidos nucleotídicos es la amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa (RT-LAMP) [48], la RT-LAMP se realiza en un solo paso en condiciones isotérmicas de 63 ° C y los resultados se obtienen en 15- 40 minutos, apuntando al gen ORF1ab, pico (S), envoltorio (E) y / o N del SARS-CoV-2. El ensayo puede detectar el virus en la garganta y los hisopos nasales, con un LOD en la muestra de aproximadamente 5-10 copias de ARN y un 99-100% de concordancia con el RT-qPCR comercial. El resultado de RT-LAMP se puede evaluar usando turbidímetro en tiempo real, electroforesis o fluorescente, que es más rápido y conveniente para el diagnóstico clínico de SARS-CoV-2. Además, para proporcionar una prueba molecular rápida y altamente sensible para el punto de atención, como el hogar, la clínica y los puntos de entrada, una amplificación isotérmica de dos etapas (COVID-19 Penn-RAMP) basada en la amplificación de la polimerasa recombinasa (RPA)) a 38 ° C y LAMP a 63 ° C fue desarrollado por Mohamed et al [48]. Recientemente se ha informado que RT-LAMP dirigido al gen N del SARS-CoV-2 puede detectar específicamente los ARN virales del SARS-CoV-2 pero no tiene reactividad cruzada con los coronavirus relacionados, así como con los virus de la influenza infecciosa humana y otras enfermedades respiratorias. -causando virus [49].

REFERENCIAS

- [1] I. I. Bogoch, A. Watts, A. Thomas-Bachli, C. Huber, M. U. G. Kraemer, and K. Khan, "Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel," *J. Travel Med.*, 2020, doi: 10.1093/jtm/taaa008.
- [2] W. Wang, J. Tang, and F. Wei, "Updated understanding of the outbreak of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in Wuhan, China," *J. Med. Virol.*, 2020, doi: 10.1002/jmv.25689.
- [3] S. R. Weiss and J. L. Leibowitz, "Coronavirus pathogenesis," in *Advances in Virus Research*, 2011.

- [4] D. Yang and J. L. Leibowitz, "The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends," *Virus Research*. 2015, doi: 10.1016/j.virusres.2015.02.025.
- [5] A. M. Zaki, S. Van Boheemen, T. M. Bestebroer, A. D. M. E. Osterhaus, and R. A. M. Fouchier, "Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia," *N. Engl. J. Med.*, 2012, doi: 10.1056/NEJMoa1211721.
- [6] Y. Chen, Q. Liu, and D. Guo, "Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis," *Journal of Medical Virology*. 2020, doi: 10.1002/jmv.25681.
- [7] M. Z. Tay, C. M. Poh, L. Rénia, P. A. MacAry, and L. F. P. Ng, "The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention," *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, doi: 10.1038/s41577-020-0311-8.
- [8] S. A. Lauer *et al.*, "The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application," *Ann. Intern. Med.*, 2020, doi: 10.7326/M20-0504.
- [9] W. J. Guan *et al.*, "Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China," *N. Engl. J. Med.*, 2020, doi: 10.1056/NEJMoa2002032.
- [10] B. Zhang *et al.*, "Clinical characteristics of 82 death cases with COVID-19," *medRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.02.26.20028191.
- [11] N. Tang, D. Li, X. Wang, and Z. Sun, "Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia," *J. Thromb. Haemost.*, 2020, doi: 10.1111/jth.14768.
- [12] H. A. Rothan and S. N. Byrareddy, "The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak," *Journal of Autoimmunity*. 2020, doi: 10.1016/j.jaut.2020.102433.
- [13] H. Xu *et al.*, "High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial

- cells of oral mucosa," *Int. J. Oral Sci.*, 2020, doi: 10.1038/s41368-020-0074-x.
- [14] G. A. Roth *et al.*, "Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017," *Lancet*, 2018, doi: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
- [15] P. C. Y. Woo *et al.*, "Relative rates of non-pneumonic SARS coronavirus infection and SARS coronavirus pneumonia," *Lancet*, 2004, doi: 10.1016/S0140-6736(04)15729-2.
- [16] P. Zhou *et al.*, "A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin," *Nature*, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- [17] S. Liu *et al.*, "Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: Implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors," *Lancet*, 2004, doi: 10.1016/S0140-6736(04)15788-7.
- [18] M. Hoffmann *et al.*, "SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor," *Cell*, 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
- [19] M. Yang, "Cell Pyroptosis, a Potential Pathogenic Mechanism of 2019-nCoV Infection," *SSRN Electron. J.*, 2020, doi: 10.2139/ssrn.3527420.
- [20] C. Huang *et al.*, "Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China," *Lancet*, 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- [21] F. Zhou *et al.*, "Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study," *Lancet*, 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
- [22] J. Y. Kim *et al.*, "Viral load kinetics of SARS-CoV-2 infection in first two patients in Korea," *J. Korean Med. Sci.*, 2020, doi: 10.3346/jkms.2020.35.e86.

- [23] J. Gu *et al.*, "Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS," *J. Exp. Med.*, 2005, doi: 10.1084/jem.20050828.
- [24] M. Yilla *et al.*, "SARS-coronavirus replication in human peripheral monocytes/macrophages," *Virus Res.*, 2005, doi: 10.1016/j.virusres.2004.09.004.
- [25] S. Perlman and A. A. Dandekar, "Immunopathogenesis of coronavirus infections: Implications for SARS," *Nature Reviews Immunology*. 2005, doi: 10.1038/nri1732.
- [26] K. Q. Kam *et al.*, "A Well Infant with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) with High Viral Load," *Clin. Infect. Dis.*, 2020, doi: 10.1093/cid/ciaa201.
- [27] H. Y. Zheng *et al.*, "Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients," *Cellular and Molecular Immunology*. 2020, doi: 10.1038/s41423-020-0401-3.
- [28] CGTN, "No Title," *Expert Recover. coronavirus patients are still prone to reinfection. YouTube <https://www.youtube.com/watch?v=GZ99J7mlaIQ> (2020).*
- [29] N. W.-J. Positive, "No Title," *Japanese man tests <https://www3.nhk.or.jp/>, coronavirus again. NHK (2020).*, *Nhkworld/en/news/20200315_13/*, 2020.
- [30] Xinhua., "No Title," *China puts 245 COVID-19 patients Conval. plasma Ther. Xinhuanet http://www.xinhuanet.com/english/2020-02/28/c_138828177.htm (2020).*, 2020.
- [31] Z. Y. et al. Yang, "Evasion of antibody neutralization in emerging severe acute respiratory syndrome coronaviruses," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 102, pp. 797–801, 2005.
- [32] L. et al Liu, "Anti- spike IgG causes severe acute lung injury by skewing

- macrophage responses during acute SARS- CoV infection,” *JCI Insight* <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123158>, 2019.
- [33] J. S. et al. Peiris, “Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus- associated SARS pneumonia: a prospective study,” *Lancet*, vol. 361, pp. 1767–1772, 2003.
- [34] L. et al. Zhang, “Antibody responses against SARS coronavirus are correlated with disease outcome of infected individuals,” *J. Med. Virol*, vol. 78, no. 1–8, 2006.
- [35] R. Lu *et al.*, “Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding,” *Lancet*, 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
- [36] C. K. Chang *et al.*, “Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein,” *J. Biomed. Sci.*, 2006, doi: 10.1007/s11373-005-9035-9.
- [37] L. Cui *et al.*, “The Nucleocapsid Protein of Coronaviruses Acts as a Viral Suppressor of RNA Silencing in Mammalian Cells,” *J. Virol.*, 2015, doi: 10.1128/jvi.01331-15.
- [38] J. C. Huang *et al.*, “Detection of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in human serum using a localized surface plasmon coupled fluorescence fiber-optic biosensor,” *Biosens. Bioelectron.*, 2009, doi: 10.1016/j.bios.2009.07.012.
- [39] L. Guo *et al.*, “Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19),” *Clin. Infect. Dis.*, 2020, doi: 10.1093/cid/ciaa310.
- [40] et al. Tan W, Lu Y, Zhang, J, “Viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19,” *medRxiv 2020.*, 2020.
- [41] et al. Lippi G, Salvagno G, Pegoraro M, “Assessment of immune response to SARS-CoV-2 with fully-automated MAGLUMI 2019-nCoV IgG and IgM chemiluminescence immunoassays,” *Clin Chem Lab Med*, 2020.

- [42] B. Wang *et al.*, "Long-term Coexistence of SARS-CoV-2 with Antibody Response in COVID-19 Patients.," *J. Med. Virol.*, 2020, doi: 10.1002/jmv.25946.
- [43] R. Zhang and J. M. Li, "The way to reduce the "false negative results" of 2019 novel coronavirus nucleic acid detection," *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2020, doi: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2020.0008.
- [44] Y. Yang *et al.*, "Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections," *medRxiv*. 2020, doi: 10.1101/2020.02.11.20021493.
- [45] X. Cai *et al.*, "A Peptide-based Magnetic Chemiluminescence Enzyme Immunoassay for Serological Diagnosis of Corona Virus Disease 2019 (COVID-19)," *medRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.02.22.20026617.
- [46] Z. Li *et al.*, "Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis," *J. Med. Virol.*, 2020, doi: 10.1002/jmv.25727.
- [47] H. Ma *et al.*, "COVID-19 diagnosis and study of serum SARS-CoV-2 specific IgA, IgM and IgG by a quantitative and sensitive immunoassay," *medRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.04.17.20064907.
- [48] M. El-Tholoth, H. H. Bau, and J. Song, "A Single and Two-Stage, Closed-Tube, Molecular Test for the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) at Home, Clinic, and Points of Entry," *ChemRxiv*, 2020, doi: 10.26434/CHEMRXIV.11860137.V1.
- [49] Y. H. Baek *et al.*, "Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2," *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, doi: 10.1080/22221751.2020.1756698.