

Syndrome respiratoire aigu sévère et autres coronavirus

Severe acute respiratory syndrome and other coronaviruses

Sébastien Hantz
François Denis

CHU Dupuytren,
laboratoire de
bactériologie-virologie-hygiène,
2, avenue Martin-Luther-King,
87042 Limoges cedex,
France
<sebastien.hantz@unilim.fr>

Résumé. Les coronavirus (CoV) forment une grande famille de virus à ARN parmi lesquels on retrouve des virus infectant les animaux et l'homme. Les premiers CoV humains (HCoV-229E et HCoV-OC43) ont été décrits dans les années 1960 chez des patients présentant un tableau de pneumopathie virale classique, ce qui limita l'intérêt que leur porta la communauté scientifique. Cependant, l'implication d'un nouveau CoV (syndrome respiratoire aigu sévère [SRAS]-CoV) dans une épidémie mondiale de syndrome de détresse respiratoire aigu sévère avec des capacités élevées de propagation au sein de la population a entraîné un vif regain d'intérêt pour ces virus en 2003. Au cours des années suivantes, deux autres CoV ont été identifiés : HCoV-NL63 en 2004 et HCoV-HKU1 en 2005. Les CoV humains (hors SRAS-CoV) sont ubiquitaires et circulent de façon épidémique avec une recrudescence hivernale. L'émergence du SRAS-CoV a permis de mettre en évidence les capacités de ces virus à franchir les barrières d'espèces et à s'adapter à leur nouvel environnement. Pour cela, ils disposent d'une grande plasticité de leur génome grâce à des mutations ponctuelles générées lors de la réplication, des délétions ou des recombinaisons. Le diagnostic de ces infections repose essentiellement sur la biologie moléculaire : le développement de la technologie multiplex permet d'intégrer ces virus dans le panel de détection de différents tests aux côtés des autres virus respiratoires. L'épidémie de SRAS-CoV a pu être rapidement maîtrisée par la mise en place de mesures sanitaires strictes et étendues au niveau mondial, qui restent à ce jour le meilleur moyen de prévention vis-à-vis de ces virus devant l'absence de vaccin et de traitement efficace.

Mots clés : coronavirus, syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS), épidémie

Abstract. The coronaviruses (CoV) are a large family of RNA viruses among which are many animal and human viruses. The first human CoV (HCoV-229E and HCoV-OC43) have been described in the 1960s in patients with classic viral pneumonia, which limited the interest that the medical scientific community brought them. However, the involvement of a novel CoV (severe acute respiratory syndrome [SARS]-CoV) in a global epidemic of SARS, with high capacities of spread within the population has led to a new interest for these viruses in 2003. Over the years, two other CoV were identified: HCoV-NL63 in 2004 and HCoV-HKU1 in 2005. The human CoV (excluding SARS-CoV) are ubiquitous and circulate in epidemic with winter resurgence. The emergence of SARS-CoV has highlighted the ability of these viruses to cross species barriers and adapt to their new environment. For this, they have a great plasticity of their genome through mutations generated during replication, deletions or recombinations. The diagnosis of these infections is mainly based on molecular biology: the development of multiplex technology allows the integration of these viruses in the panel detection of several assays along with other respiratory viruses. The outbreak of SARS-CoV was quickly mastered by the implementation of strict and globally expanded sanitary measures, which remain to this day the best prevention against these viruses due to lack of vaccine and effective treatment.

Key words: coronaviruses, severe acute respiratory syndrome (SARS), epidemic

Les coronavirus (CoV) sont responsables d'une grande variété de pathologies au sein du monde animal, des infections du tractus respiratoire ou digestif jusqu'à des atteintes neurologiques centrales mais uniquement retrouvées lors d'infections respiratoires chez l'homme. La description de ces virus chez l'homme remonte aux années 1960 principalement au cours d'infections res-

piratoires bénignes. L'intérêt que le monde scientifique, et surtout médical, leur a porté à cette époque est resté modeste, probablement dû à la conjonction de l'apparence bénigne des infections humaines et de la complexité de la biologie de ces virus. Cependant, l'émergence d'un nouveau CoV, responsable d'un syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) et évoluant sous forme épidémique

mtp

Tirés à part : S. Hantz

entre 2002 et 2003, a mobilisé la communauté scientifique mondiale qui a identifié en un temps record par des techniques de biologie moléculaire cet agent pathogène et mis en évidence son appartenance au genre *Coronavirus*. Depuis 2003, plus de 20 CoV ont été identifiés dont trois chez l'homme. De nombreuses études ont également pu mettre en évidence le réservoir de ces virus, notamment celui du SRAS. La multiplicité de ces travaux devra permettre de mieux comprendre la biologie de ces virus, les modalités de réponse du système immunitaire et, enfin, de pouvoir mettre en place des stratégies préventives (vaccins) ou curatives (antiviraux) efficaces face à ces pathogènes dont le fort potentiel évolutif, la diversité génétique importante et le très large spectre d'hôtes peuvent faire craindre l'émergence d'autres CoV en pathologie humaine. Nous aborderons successivement les différents CoV responsables d'infections chez l'homme, avec l'émergence du SRAS-CoV en 2002 ainsi que la découverte des derniers CoV humains (HCoV).

Origine des coronavirus

La description en microscopie électronique dans les années 1960 est à la base de la dénomination de ces virus, due à un aspect en couronne ou « *corona* » caractéristique des virus de cette famille. Ce critère morphologique est commun à des virus retrouvés tant chez l'homme que

chez l'animal. Tous ces virus partagent la même organisation de leur génome composé d'ARN et également leur stratégie de réplication. Les CoV sont des particules virales enveloppées et pléomorphes de 60 à 200 nm de diamètre. L'enveloppe virale porte des spicules en forme de massue de 20 nm de hauteur et constituées de la protéine de surface S (*figure 1*). Les autres glycoprotéines d'enveloppe sont la protéine M, la protéine E et, pour les CoV du groupe 2, l'hémagglutinine-estérase (HE). La capsid virale est de symétrie hélicoïdale, elle est constituée de la protéine N, qui est étroitement liée à l'ARN génomique.

Les membres de la famille des *Coronaviridae* sont classés en trois groupes (1, 2 et 3) sur la base de données sérologiques et, plus récemment, de leur homologie génomique (*figure 2*). Les CoV sont retrouvés dans un large éventail d'espèces animales, telles que chats, chiens, porcs, lapins, bovins, souris, rats, poulets, faisans, dindes, baleines, ainsi que les humains. Les CoV des groupes 1 et 2 infectent les mammifères, dont l'homme, tandis que les CoV du groupe 3 constituent un groupe de virus aviaires. La place du SRAS-CoV dans cette classification a été difficile à préciser et source de nombreuses discussions, certains souhaitant la création d'un quatrième groupe, les autres d'un deuxième groupe élargi. Finalement, cette dernière solution a été adoptée ; actuellement, le groupe 2 est subdivisé en 2a et 2b, ce dernier comprenant le SRAS-CoV ainsi que tous les virus « SRAS-CoV-like » ou *SARS-like*

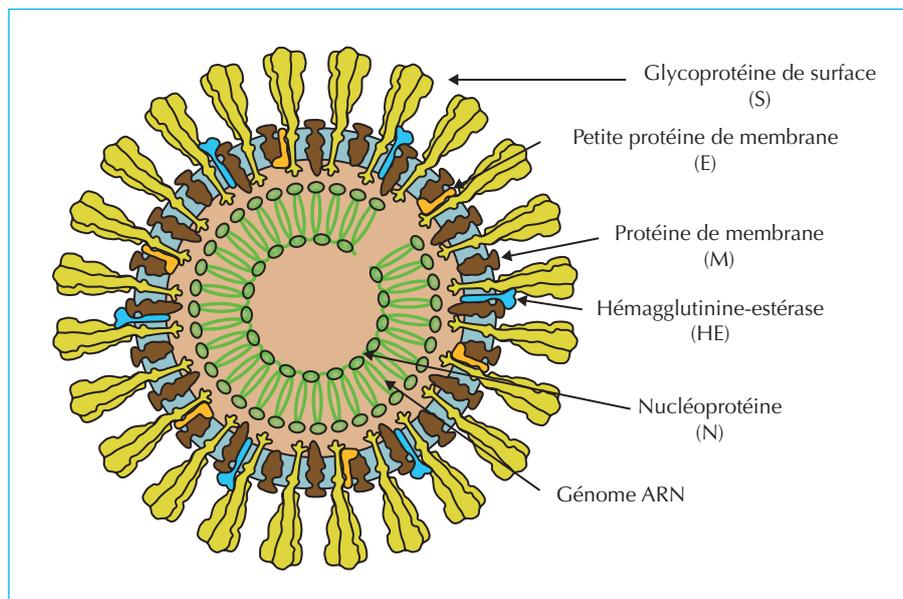


Figure 1. Modèle structural d'un coronavirus (d'après ViralZone, *Swiss Institute of Bioinformatics*). L'ARN génomique est lié à la protéine N pour former la nucléocapside. Les autres protéines structurales sont insérées dans l'enveloppe : protéines M et E de membrane et protéines S et hémagglutinine-estérase (HE) de surface (à noter que la protéine HE n'est présente que chez les coronavirus [CoV] de groupe 2).

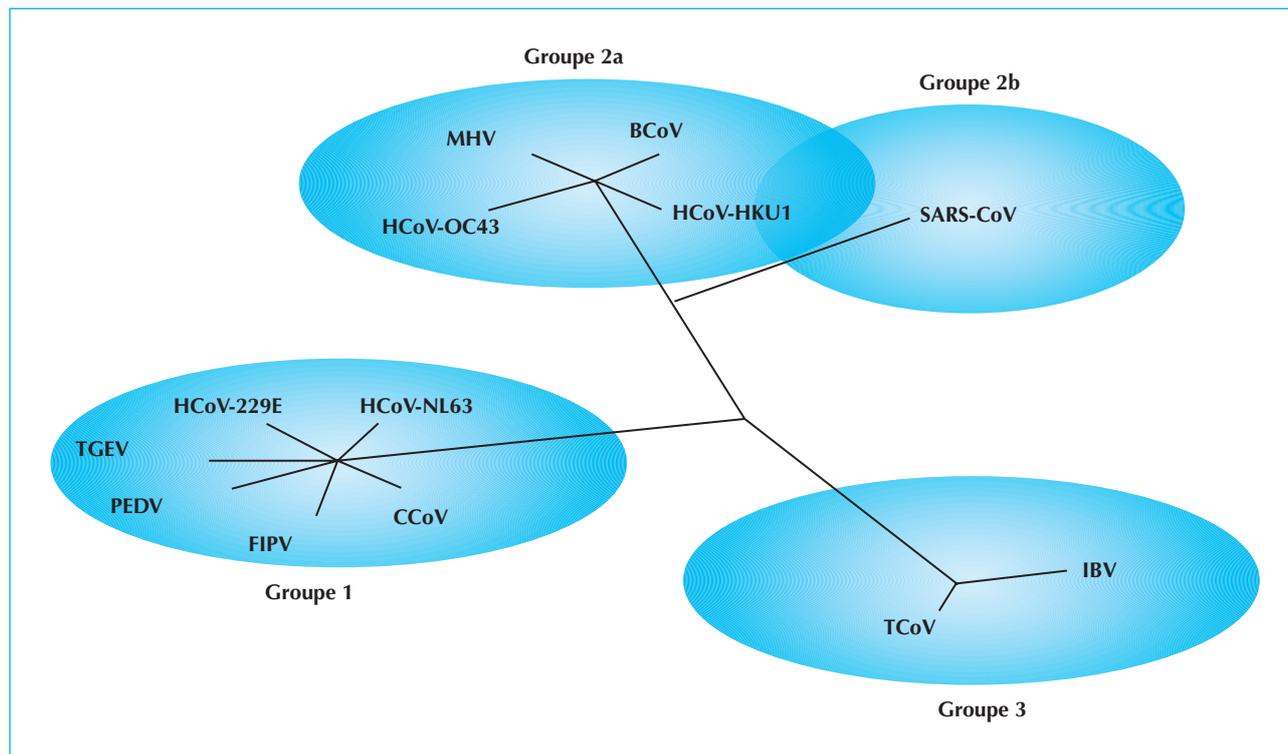


Figure 2. Classification des coronavirus (CoV). La famille des *Coronavirus* est divisée en trois groupes distincts. Les coronavirus du groupe 1 infectent les mammifères, dont l'homme, et incluent les coronavirus humains 229E (HCoV-229E) et NL63 (HCoV-NL63), le virus porcin entérique (TGEV), le virus porcin de la diarrhée épidémique (PEDV), le coronavirus canin (CCoV) et le coronavirus félin (FIPV). Les virus du groupe 2 incluent les coronavirus humains OC43 (HCoV-OC43) et HKU1 (HCoV-HKU1), le virus de l'hépatite murine (MHV) et le coronavirus bovin (BCoV) dans le groupe 2a et le coronavirus de SRAS (SRAS-CoV) dans le groupe 2b. Les espèces du groupe 3 constituent un groupe de virus aviaires parmi lesquels le coronavirus de la dinde (TCoV) et le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV).

coronavirus (SL-CoV) décrits chez les différentes espèces animales [1, 2].

Avant l'épidémie de SRAS, seuls deux CoV, HCoV-OC43 et HCoV-229E, ont été largement étudiés comme agents responsables d'infection des voies respiratoires chez les humains. En 2003, lors de l'épidémie de SRAS, a été mis en évidence le SRAS-CoV. Devant l'ampleur et la gravité de l'épidémie, de nombreuses équipes de recherche se sont mises à travailler sur ce nouvel agent pathogène et ont permis de contribuer à améliorer les connaissances sur les CoV. Plus récemment, deux CoV, HCoV-NL63 et HCoV-HKU1, ont été identifiés, respectivement aux Pays-Bas en 2004 et à Hong-kong en 2005 ; ils sont qualifiés de nouveaux CoV. HCoV-229E et HCoV-NL63 appartiennent au groupe 1, HCoV-OC43 et HCoV-HKU1 au groupe 2a et SRAS-CoV au groupe 2b.

Coronavirus HCoV-229E et HCoV-OC43

La première souche de HCoV (souche B814) a été isolée en culture chez un jeune garçon présentant un rhume classique [3]. En 1965, Tyrrell et Bynoe ont montré que ce virus pouvait se répliquer en culture cellulaire sur des

cellules trachéales d'embryon humain [4]. L'infection de ces cellules induisait un effet cytopathique modéré et une réduction de la mobilité ciliaire. Cependant, la preuve réelle de la réplication en culture cellulaire et la vérification du postulat de Koch ont été obtenues suite à l'inoculation de culture virale à des adultes volontaires sains. Ces volontaires ont développé un tableau de rhume commun classique. La fièvre était rarement observée, mais une importante sensation de malaise était souvent présente et il fut noté une rhinite avec d'abondantes sécrétions aqueuses. Ainsi, le nombre de mouchoirs jetables utilisés par jour fut utilisé comme indicateur de la sévérité de l'atteinte.

Peu de temps après, d'autres CoV ont été isolés chez l'homme, notamment la souche HCoV-229E [5]. L'inoculation de cette souche à des volontaires sains a conduit à l'observation des mêmes symptômes qu'avec la souche B814, dont il sera reparlé. En 1967, McIntosh *et al.* ont décrit de nouvelles souches de CoV, dont la souche HCoV-OC43, isolées d'employées du *National Institute of Health* (NIH) qui présentaient une infection respiratoire haute [6]. Le même type d'expérience a conclu à l'imputabilité de cette souche dans les infections

respiratoires observées précédemment. En outre, McIntosh *et al.* ont démontré que les anticorps d'une personne infectée par une souche HCoV-OC43 ne neutralisaient pas la souche HCoV-229E, apportant la première preuve que ces deux virus présentaient des épitopes antigéniques différents [7]. Ces données sérologiques ont ainsi contribué à la première classification des CoV. Les souches HCoV-229E et HCoV-OC43 étant les plus faciles à cultiver, les études menées entre les années 1960 et 1990 ont inclus uniquement ces dernières. Quant à la première souche isolée et identifiée, B814, elle fut malencontreusement perdue, rendant impossible d'autres investigations.

SRAS coronavirus

En 2003, un nouveau CoV a été détecté chez des patients présentant un SRAS [8] et a été confirmé comme l'agent causal de ce syndrome [9]. Il a alors été dénommé SRAS-CoV. Des enquêtes sérologiques rétrospectives ont suggéré que la transmission inter-espèces du SRAS-CoV ou de variants issus de diverses espèces animales aux humains aurait pu se produire fréquemment dans les marchés vivants, sachant qu'une séroprévalence élevée a été détectée chez les marchands d'animaux qui n'avaient pas de SRAS notables [10]. Le rôle des civettes masquées dans la transmission du SRAS-CoV chez l'homme a d'abord été suspecté en 2003 quand un variant étroitement lié au SRAS-CoV a été détecté à partir de civettes masquées dans le marché Dongmen à Shenzhen, en Chine [11]. D'autres preuves épidémiologiques ont été obtenues lors d'une épidémie à petite échelle à la fin 2003 et début 2004, dans laquelle trois des quatre patients ont eu un contact direct ou indirect avec des civettes masquées [12, 13]. En plus des civettes masquées, d'autres espèces animales pourraient avoir été impliqués dans l'évolution et l'émergence du SRAS-CoV. Au moins sept espèces animales peuvent héberger le SRAS-CoV dans certaines circonstances, notamment le chien viverrin, le renard roux, le furet chinois, le vison, le porc, le sanglier et le rat des champs de riz [11].

L'analyse ultérieure de séquences a suggéré que les virus SRAS-CoV-like n'ont pas circulé parmi les marchés de civettes masquées pendant une longue période et, par conséquent, une enquête a été menée pour rechercher le véritable réservoir naturel pour le SRAS-CoV. En 2005, des CoV semblables au SRAS-CoV ont été trouvés chez des chauves-souris (genre *Rhinolophus*) par deux équipes de recherche indépendantes [14, 15]. Ces SRAS-CoV-like de chauves-souris partagent de 88 à 92 % d'homologie de séquence avec les isolats humains ou de civettes, mais avec des différences-clés trouvées dans la région codant la protéine de spicule (S) qui est essentielle pour déterminer le spectre d'hôtes et le tropisme tissulaire [16]. Les données suggèrent que des chauves-souris pourraient être le réservoir naturel d'un ancêtre proche du SRAS-CoV et que

les CoV semblent avoir utilisé un récepteur entièrement nouveau quand ils ont franchi les barrières d'espèces, des chauves-souris aux civettes masquées, puis aux humains (figure 3). L'hypothèse de la chauve-souris réservoir du SRAS-CoV est pertinente dans la mesure où ce mammifère est le plus répandu à la surface du globe et héberge déjà de nombreux virus pouvant infecter l'homme : virus Hendra, virus Nipah, virus de la rage (*Lyssavirus*). La civette masquée jouerait alors le rôle d'hôte intermédiaire dans la transmission du SRAS-CoV de la chauve-souris à l'homme.

Coronavirus HCoV-NL63 et HCoV-HKU1

En janvier 2003, une équipe hollandaise a mis en évidence un nouveau CoV dans un prélèvement respiratoire d'un nourrisson de sept mois, hospitalisé pour bronchiolite. Après avoir été observé en culture cellulaire sur lignée LLC-MK2, le virus a été détecté à l'aide d'une technique de biologie moléculaire innovante. Dénommé HCoV-NL63, l'analyse de la séquence de son génome a permis de le classer dans le groupe 1 [17]. Une deuxième équipe hollandaise découvrait peu de temps après le même virus, isolé à partir d'un surnageant de culture d'une lignée véro-E6, ensemencée avec un prélèvement respiratoire datant de 1988 et provenant d'un enfant de huit mois souffrant de pneumonie [18]. L'homologie de séquence entre les deux virus étant de 98,8 %, il était certain qu'il s'agissait de virus de la même espèce. Environ un an après, un troisième groupe a décrit le même virus, qu'ils dénommèrent « New Haven coronavirus » [19], bien que l'homologie de séquence avec le HCoV-NL63 soit comprise entre 94 et 100 %, cela traduisant donc l'appartenance à la même espèce [20].

Contrairement au HCoV-NL63, la souche HCoV-HKU1 ne fut découverte qu'une seule fois. En 2004, le génome de cette souche fut amplifié par PCR à l'aide d'amorces dégénérées à partir d'un prélèvement respiratoire d'un homme de 71 ans, porteur d'une bronchite chronique obstructive et admis à l'hôpital de Hong-kong pour toux et fièvre évoluant depuis deux jours. Le séquençage complet du génome a permis de classer ce nouveau CoV parmi le groupe 2 avec HCoV-OC43 [21].

Épidémiologie moléculaire

Le génome des CoV est une molécule d'ARN linéaire à polarité positive, non segmentée, directement infectieuse, de 27 à 31 000 nucléotides et dont l'organisation génomique est conservée parmi toutes les espèces de CoV.

L'importante plasticité du génome des CoV fait de ces virus des agents à fort potentiel évolutif. Les deux modes majeurs d'évolution des CoV sont les mutations et les recombinaisons. L'ARN génomique est répliqué par une ARN polymérase ARN-dépendante, dépourvue de

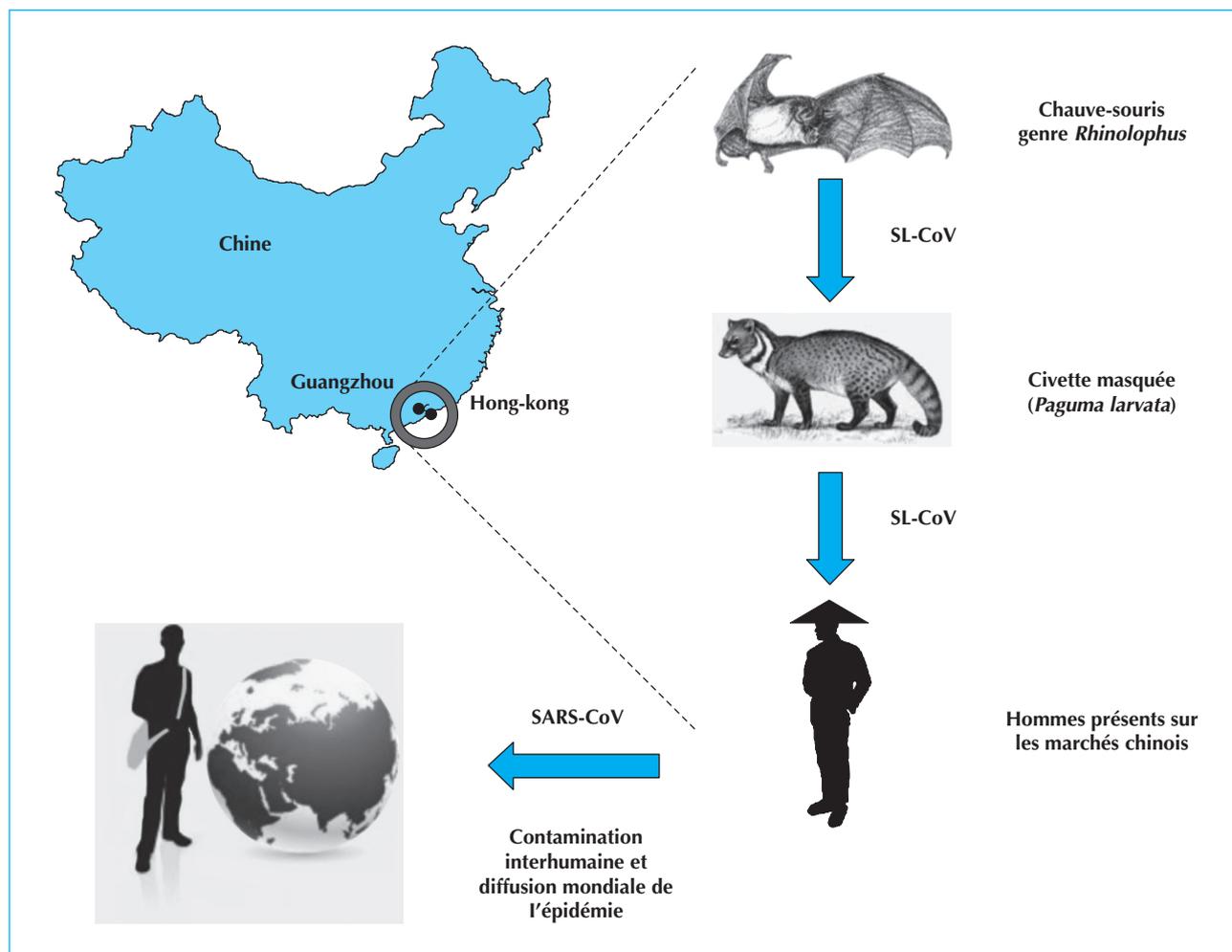


Figure 3. Épidémie de syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) de novembre 2002 à juillet 2003. L'épidémie a débuté dans le Sud-Ouest de la Chine dans la région de Guangzhou (Canton) à partir d'hommes contaminés sur des marchés d'animaux vivants, puis s'est propagée à Hong-kong, avant de se diffuser au niveau mondial. Le réservoir naturel serait la chauve-souris du genre *Rhinolophus* qui héberge des *SARS-like coronavirus* (SL-CoV). Ces SL-CoV ont également été retrouvés chez la civette masquée qui jouerait le rôle d'hôte intermédiaire à l'origine de la contamination de l'homme sur les marchés d'animaux vivants.

système de correction d'erreur, et générant de nombreux mutants. De ce fait, la population virale est hétérogène et possède une distribution en quasi-espèces. Cette distribution peut être vue comme une stratégie d'optimisation, disposant ainsi d'un réservoir de variants qui possèdent les capacités de s'adapter aux changements environnementaux [2].

Dans certains cas, l'acquisition d'une mutation ou d'une délétion peut être à l'origine d'un changement de tropisme. En effet, compte tenu de la très grande taille de son génome, le virus peut tolérer l'apparition de délétions sans nuire au bon fonctionnement du cycle répliatif viral. Ce changement de tropisme a été décrit dans les années 1980 avec le CoV porcin entérique, qui après une délétion en phase de 672 nucléotides (224 acides aminés)

dans le gène codant la protéine S, a vu son tropisme entérique devenir respiratoire, conduisant ainsi à l'émergence du CoV porcin respiratoire.

Concernant la recombinaison génétique, phénomène fréquent chez les virus à ARN positif, elle semble favorisée chez les CoV, par le mode discontinu de la transcription. La recombinaison correspond à l'échange de matériel génétique, elle peut être homologue si elle a lieu entre deux génomes de CoV ou hétérologue si elle intéresse d'autres gènes viraux ou cellulaires. Par exemple, Herrewegh *et al.* ont montré que les CoV félins de type II sont le résultat d'une double recombinaison entre CoV félins de type I et CoV canins, faisant suite à un franchissement de barrière d'espèces dans le sens chien-chat [22]. L'ensemble de ces mécanismes d'évolution permet

de mieux comprendre comment le SRAS-CoV a pu être à l'origine d'une épidémie humaine mondiale et rend l'émergence d'une nouvelle souche virale chez l'homme possible à tout moment.

Épidémiologie de l'infection

Transmission

La transmission des CoV se fait essentiellement de façon directe par les gouttelettes de sécrétions oropharyngées ou gouttelettes de Pflügge. Leur propagation est favorisée par la toux chez un individu infecté et symptomatique. Ce mécanisme de transmission implique un contact proche entre individus. La dissémination aéroportée et la transmission indirecte manuportée semblent moins fréquentes pour les CoV en général à l'exception du SRAS-CoV. Cependant, l'ensemble de ces voies de transmission doit être pris en compte pour la prévention et le contrôle des épidémies. Ainsi, le lavage des mains et le port du masque en milieu de soins sont des mesures de prévention efficaces.

Épidémiologie clinique

Les durées d'incubation des infections à HCoV sont courtes : de l'ordre de trois jours pour les CoV classiques et de deux à dix jours pour le SRAS-CoV. Les durées d'excrétion virale dans les voies respiratoires sont moins bien connues, l'ARN des HCoV classiques est détectable pendant environ 14 jours dans les voies respiratoires [23]. L'ARN du SRAS-CoV peut être détecté par RT-PCR dans les sécrétions respiratoires, les selles et les urines des patients jusqu'à environ 30 jours après le début des signes cliniques. Cependant, l'isolement en culture de formes infectieuses n'a pas été possible à partir de ces prélèvements après trois semaines de maladie [24]. L'apparente dissociation des résultats moléculaires et cellulaires peut être le fait d'un manque de sensibilité des systèmes de culture ou de la neutralisation des formes infectieuses par l'immunité locale. Sur le plan clinique, le temps moyen à compter des premiers symptômes jusqu'au décès était de 23,7 jours (IC 95 % : 22,0-25,3 jours), alors que le temps moyen des premiers symptômes jusqu'à la guérison était de 26,5 jours (IC 95 % : 25,8-27,2 jours) [25].

Coronavirus hors SRAS-CoV

Les HCoV sont responsables d'un grand nombre d'infections respiratoires hautes (rhumes) et basses (bronchites, bronchiolites et pneumopathies) au cours de chaque hiver avec une prédominance de janvier à mai. Certains auteurs ont retrouvé près de 5 % de prélèvements positifs pour un des quatre CoV (HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-229E et HCoV-HKU1) au cours d'un suivi sur un an des infections respiratoires de l'enfant au Colo-

rado [26]. Les infections surviennent dès les premières années de vie mais, contrairement au VRS, des réinfections sont décrites tout au long de la vie. Les CoV sont retrouvés avec une fréquence équivalente à celle des virus parainfluenzae : ils se classent donc en quatrième ou cinquième position parmi les virus respiratoires derrière les rhinovirus, le VRS, le métapneumovirus humain et les virus de la grippe (figure 4) [27].

SRAS-CoV

En novembre 2002, une épidémie inhabituelle de pneumonie sévère d'origine inconnue survint à Foshan, province du Guangdong en Chine méridionale, avec un taux élevé de transmission chez les professionnels de santé [28]. Une étude virologique rétrospective, portant sur 55 patients admis dans un hôpital de Guangzhou (Canton) avec un tableau de pneumonie atypique entre le 24 janvier et le 18 février 2003, a permis l'isolement en culture cellulaire du SRAS-CoV dans les aspirations nasopharyngées de trois patients, tandis que 48 patients (87 %) avaient des anticorps positifs vis-à-vis du SRAS-CoV dans les sérums de convalescence. L'analyse génétique a montré que les trois isolats de SRAS-CoV de Guangzhou avaient la même origine que ceux d'autres pays, avec un cheminement phylogénétique correspondant à la propagation du SRAS dans les autres parties du monde [29].

La source de l'infection causant des épidémies secondaires de SRAS à Hong-kong et dans plusieurs autres pays fut un médecin de 64 ans, originaire de Chine méridionale, qui avait visité Hong-kong le 21 février 2003 et qui est décédé dix jours plus tard d'une pneumonie sévère [30]. Au moins 16 clients ou visiteurs de l'hôtel ont été infectés par ce médecin alors qu'ils étaient chez des amis ou résidaient sur le même étage de l'hôtel Métropole, où le médecin avait séjourné brièvement. Par l'intermédiaire de voyages aériens internationaux, ces visiteurs ont pu répandre l'infection au niveau mondial dans un délai très court. La forte infectiosité de cette maladie virale a été démontrée par le développement d'un SRAS nécessitant une hospitalisation chez 138 patients (dont beaucoup de personnels soignants) dans les deux semaines à la suite de l'exposition à un seul patient (un visiteur de l'hôtel Métropole), qui a été admis avec une pneumonie aiguë communautaire dans un service de médecine générale à l'hôpital Prince of Wales de Hong-kong. De plus, il y avait des arguments pour suggérer que le SRAS-CoV aurait pu se propager par voie aérienne au sein d'une communauté importante au Amoy Garden, un complexe résidentiel privé dans Hong Kong [31]. La charge virale décelée au niveau du nasopharynx chez les patients vivant dans des unités adjacentes d'un même bloc habité par le patient index au Amoy Garden était supérieure à celle observée chez les patients qui vivaient plus loin du patient index, cette dernière étant malgré tout détectable.

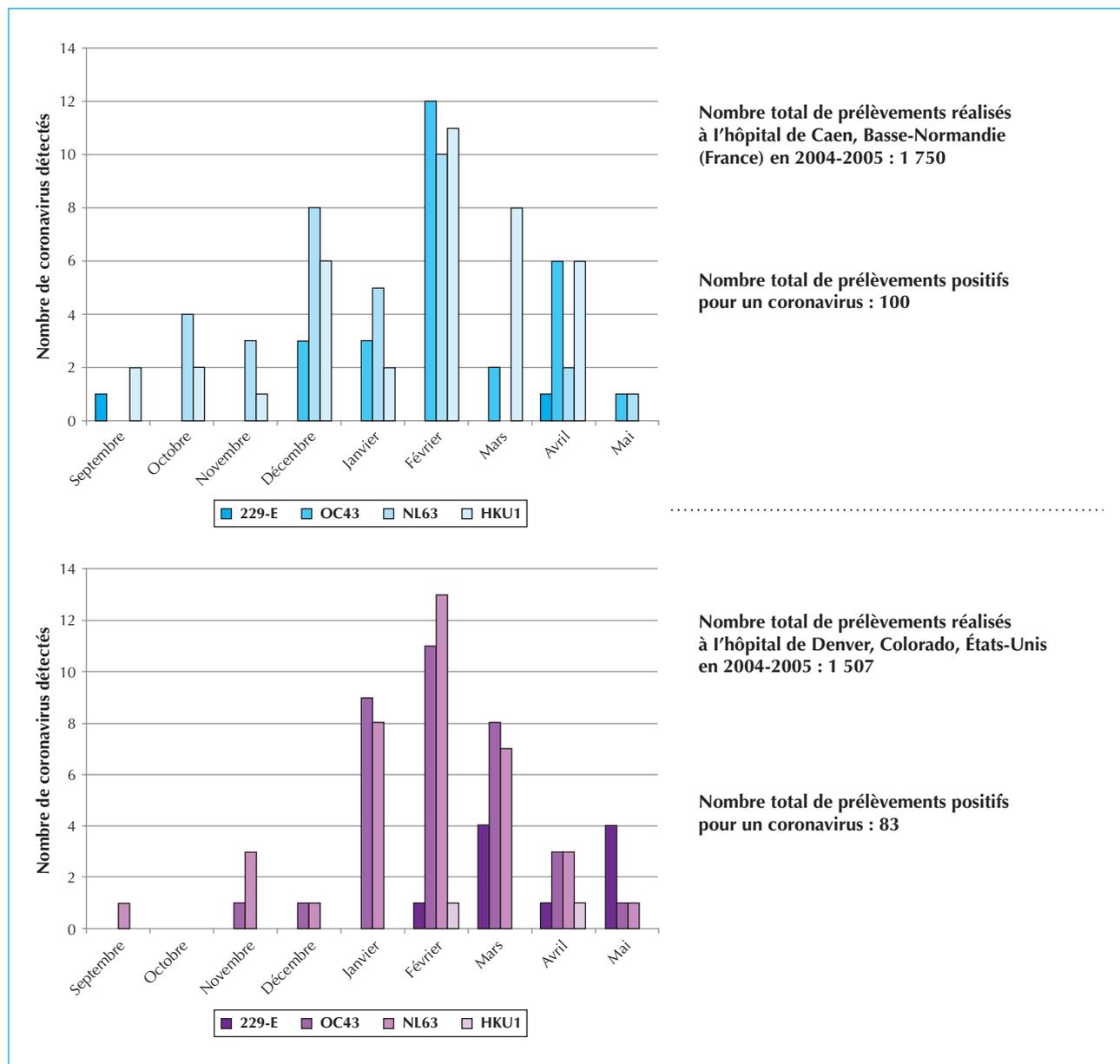


Figure 4. Comparaison de l'épidémiologie des coronavirus humains (HCoV) détectés à l'hôpital de Caen (France) et à celui de Denver (États-Unis) durant l'hiver 2004 à 2005 (d'après les données, respectivement, de [27] et de [26]).

Un pourcentage élevé de personnes hospitalisées a eu recours à des soins intensifs et beaucoup sont décédés. Le taux global de mortalité était d'environ 10 %, mais atteint près de 50 % chez les personnes âgées. De façon assez surprenante, la transmission du SRAS s'est arrêtée à la fin juin 2003, un peu plus de quatre mois après le début de la propagation mondiale à partir de l'hôtel Métropole à Hong-kong. Par la suite, trois cas d'infections acquises en laboratoire ont été décrites, un à Singapour, un à Taïwan et un en Chine en 2003 et 2004, ainsi qu'une réintroduction

à partir d'animaux dans la province du Guangdong, en Chine en décembre 2003 et janvier 2004. Aucun de ces cas incidents n'a conduit à une transmission secondaire suffisante d'humain à humain pour générer une menace d'épidémie mondiale récurrente. Cependant, l'infection acquise dans un laboratoire en Chine a entraîné une transmission communautaire limitée, qui a permis de souligner le risque potentiel pour la communauté d'une brèche dans les procédures de biosécurité des laboratoires travaillant sur le SRAS-CoV. Le contrôle rapide du SRAS-CoV lors

de l'épidémie mondiale de 2003 et la propagation limitée lors de réintroductions ultérieures résultent probablement à la fois des caractéristiques du virus et de l'efficacité des moyens de contrôle mis en place. Les caractéristiques de l'infection à SRAS-CoV qui ont facilité son contrôle comprennent :

- une très forte prévalence de maladies graves, rendant plus facile l'identification des cas et la localisation de la transmission ;
- un faible risque de transmission avant que le patient ne soit gravement malade et puisse être hospitalisé, diagnostiqué et placé en isolement.

Clinique et physiopathologie des infections à coronavirus

La présentation clinique majeure des infections à SRAS-CoV à l'admission comportait une fièvre persistante, des frissons, des myalgies, une toux sèche, des céphalées, des malaises et une dyspnée. Les expectorations productives, les maux de gorge, le rhume, les nausées et vomissements, les étourdissements et la diarrhée sont des caractéristiques moins fréquentes (*tableau 1*). La diarrhée aqueuse représentait un symptôme extrapulmonaire dominant chez 40 à 70 % des patients atteints du SRAS [32], les biopsies intestinales prélevées lors de colosco-

Tableau 1. Présentation clinique du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS).

Symptômes	Fréquence (%)
Fièvre persistante > 38 °C	99-100
Toux non productive	57-75
Myalgies	45-61
Frissons	15-73
Céphalées	20-56
Dyspnée	40-42
Malaises	31-45
Nausées et vomissements	20-35
Diarrhée	20-25
Maux de gorge	13-25
Étourdissements	4,2-43
Expectorations	4,9-29
Rhinorrhée	2,1-23
Arthralgies	10,4

pie ou d'autopsie ayant permis d'objectiver des signes de réplication virale active avec une perturbation minimale de l'architecture cellulaire intestinale. L'hépatite était également une complication fréquente de l'infection par le SRAS-CoV, avec 24 et 69 % des patients présentant une augmentation des alanines-aminotransférases (ALAT), respectivement à l'admission et au cours de la maladie. La gravité de l'atteinte hépatique était corrélée avec une évolution clinique défavorable [33]. Le SRAS-CoV a été également détecté dans le liquide céphalorachidien et le sérum de deux patients en état de mal épileptique, ces données suggérant qu'une symptomatologie neurologique aiguë sévère peut parfois accompagner le SRAS [34].

Les sujets âgés avaient plus souvent une présentation atypique avec une altération de l'état général, une baisse d'appétit, des chutes ou des fractures et parfois, un délire, sans la réaction fébrile typique (température > 38 °C). À l'inverse, les jeunes enfants (< 12 ans) ont souvent une évolution clinique bénigne similaire à d'autres infections virales des voies respiratoires supérieures tandis que les adolescents ont tendance à avoir une évolution clinique proche de celle des adultes [35]. Néanmoins, il n'y a pas eu de surmortalité rapportée chez les jeunes enfants et les adolescents atteints de SRAS [36]. À l'inverse, le SRAS pendant la grossesse induisait un sur-risque significatif de mortalité [37], observation similaire à celle retrouvée lors de la pandémie grippale de 2009 à 2010 avec la souche H1N1sw.

Une étude cas-témoins, portant sur 124 services médicaux dans 26 hôpitaux à Guangzhou et à Hong-kong, a identifié six facteurs de risque indépendants de propagation d'épidémies nosocomiales de SRAS (*tableau 2*) : une distance minimale entre les lits de moins de 1 m, une

Tableau 2. Facteurs de risque indépendants de propagation d'épidémies nosocomiales de syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) [38].

Facteurs de risque	Odds ratio (OR)
Distance minimum entre les lits < 1 m	OR = 6,98 (IC 95 % : 1,68-28,75 ; P 5 : 0,008)
Lavage et changement facilités pour l'équipe	OR = 0,12 (IC 95 % : 0,02-0,97 ; P 5 : 0,05)
Réanimation effectuée au sein du service	OR = 3,81 (IC 95 % : 1,04-13,87 ; P 5 : 0,04)
Personnel travaillant avec des symptômes	OR = 10,55 (IC 95 % : 2,28-48,87 ; P 5 : 0,003)
Patients avec SRAS nécessitant une oxygénothérapie	OR = 4,30 (IC 95 % : 1,00-18,43 ; P 5 : 0,05)
Patients avec SRAS nécessitant une ventilation non invasive à pression positive	OR = 11,82 (IC 95 % : 1,97-70,80 ; P 5 : 0,007)

réanimation effectuée au sein du service, un personnel travaillant tout en éprouvant les symptômes, des patients nécessitant une oxygénothérapie ou une ventilation non invasive à pression positive, alors que des installations pour se laver ou se changer pour le personnel a été un facteur protecteur [38].

L'évolution clinique des SRAS a généralement suivi une cinétique typique :

- la phase I (réplication virale) était associée à une augmentation de la charge virale et était caractérisée cliniquement par de la fièvre, des myalgies, et d'autres symptômes systémiques qui s'étaient généralement améliorés après quelques jour ;

- la phase II (lésions immunopathologiques) était caractérisée par la récurrence de la fièvre, une hypoxémie et la progression radiologique de la pneumonie avec des réductions de charge virale.

Le taux élevé de morbidité du SRAS a été conforté par l'observation que, même lorsque seuls 12 % du champ pulmonaire total étaient atteints sur les radiographies thoraciques, 50 % des patients nécessitaient une supplémentation en oxygène pour maintenir une oxygénation satisfaisante supérieure à 90 %, tandis qu'environ 20 % des patients développaient des syndromes de détresse respiratoire aiguë nécessitant une ventilation invasive [39]. Peiris *et al.* ont montré une diminution progressive de la charge virale dans le nasopharynx, les selles et l'urine 10 à 21 jours après l'apparition des symptômes confortant l'hypothèse que l'aggravation clinique en phase II a été très probablement le résultat des lésions pulmonaires immuno-induites à la suite d'une réponse exacerbée de l'hôte et ne pouvant pas être expliquée par une réplication virale incontrôlée [32].

Diagnostic biologique et essentiellement virologique des infections à coronavirus

Concernant les analyses biologiques standard, aucune anomalie n'est spécifique d'une infection à CoV hors SRAS. Le tableau est similaire à ceux des autres pneumopathies virales. Chez les patients atteints de SRAS, on retrouve fréquemment une lymphopénie, une augmentation des LDH et des CPK ainsi qu'une coagulation intravasculaire disséminée à bas niveau (thrombopénie, TCA allongé, augmentation des D-dimères) [40]. L'intensité de la lymphopénie a été associée à des issues cliniques péjoratives [41]. Cependant, une étude rétrospective à Toronto a révélé que toutes les variables de laboratoire ont montré une faible capacité discriminatoire pour distinguer les SRAS des autres causes de pneumopathie aiguë communautaire [42]. Le diagnostic de l'infection repose donc essentiellement sur la recherche directe du pathogène.

Étant donné qu'il n'existe pas de technique sérologique disponible sur le marché pour la détection des anticorps anti-HCoV, les seules données sérologiques publiées ont été réalisées avec des trousse « maison » utilisant le principe ELISA ou l'immunofluorescence indirecte pour détecter des anticorps de classe IgG, IgM et IgA dirigés contre la protéine de nucléocapside N du SRAS-CoV. Selon les études, l'apparition des anticorps varie de 10 à 16 jours après le début des symptômes et cela quelle que soit la classe d'Ig étudiée, sans précocité des IgM par rapport aux IgG [43, 44]. La persistance des anticorps a été évaluée au cours d'une étude longitudinale à l'aide d'une collection de sérums itératifs de patients ayant présenté un SRAS, prélevés de J0 à J240 après le début de la symptomatologie clinique. Les Ig de classe IgG sont encore détectées sur les sérums à J240, alors que les sérologies IgA et IgM se sont négativées aux environs de J170 (figure 5).

La recherche des HCoV « classiques » se fait essentiellement dans le cadre d'infections respiratoires, sur des prélèvements de type aspiration ou écouvillonnage nasal, aspiration trachéale, sécrétions bronchiques ou lavage broncho-alvéolaire. Ainsi, le diagnostic virologique des infections à HCoV est avant tout un diagnostic direct basé sur la biologie moléculaire. En effet, bien que la plupart d'entre eux aient été isolés à partir de prélèvements en cultures cellulaires, les HCoV classiques sont très difficilement cultivables. Il n'existe pas de réactifs disponibles validés pour le diagnostic direct et permettant la détection des antigènes viraux par immunofluorescence ou méthode immuno-enzymatique. Les premières méthodes de biologie moléculaire reposaient sur des techniques « maison » de détection de l'ARN des CoV réalisée par RT-PCR, suivie ou non d'une hybridation moléculaire. Plusieurs techniques ont été publiées, les amorces sont choisies en général dans les gènes codant les protéines de structure M ou N [45]. Par la suite, des techniques RT-PCR permettant la détection simultanée des différents CoV, en utilisant des amorces consensus dégénérées définies dans le gène le plus conservé entre les différents types (gène *ORF1a/b*) ont été mises au point [46]. Plus récemment, devant la multiplicité des agents pathogènes impliqués dans les infections respiratoires, des RT-PCR multiplex ont été développées pour détecter plus de 20 pathogènes. Le RespiFinder® SMART 22 (Eurogentec) est un test qui repose sur une PCR multiplex qui peut détecter et différencier 16 virus à ARN, deux virus à ADN, ainsi que quatre bactéries dans un seul test. Le RespiFinder® SMART 22 combine la sensibilité et la spécificité de la technologie MultiFinder avec la facilité d'utilisation et l'accessibilité de la PCR en temps réel. Ce kit permet de détecter distinctement les quatre HCoV responsables d'infections respiratoires chez l'homme dans un délai de six à dix heures après réception du prélèvement. Un kit similaire a été développé par la firme Argène : le MWS r-gene™. Son principe diffère sensiblement de la PCR multiplex RespiFinder®, car il repose

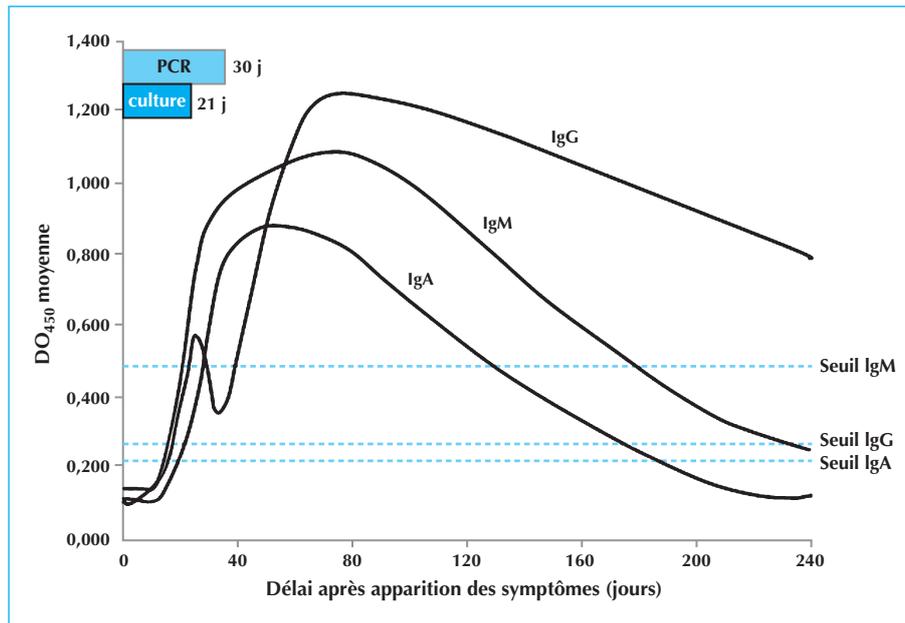


Figure 5. Cinétique de détection des différents marqueurs chez des patients atteints d'un syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS). Le SRAS-CoV est détectable en culture cellulaire et en PCR dès l'apparition des symptômes jusqu'à respectivement 21 et 30 jours après. Les anticorps (IgM, IgA et IgG) n'apparaissent qu'entre 10 et 16 jours en moyenne après le début des symptômes selon les études et sont encore détectables plus de 240 jours après l'infection pour les IgG (figure adaptée de [44]).

sur l'amplification du génome des agents pathogènes par duplex (deux familles de virus ou de bactéries différents), nécessitant la réalisation de six PCR en parallèle, permettant ainsi la détection de 36 pathogènes (7 virus à ARN, 2 virus à ADN avec les différents sous-types et 3 bactéries). Cependant, le gain en nombre de pathogènes détectés est contrebalancé par une détection groupée des différents membres d'une famille virale. Ainsi, les quatre HCoV sont détectés par cette trousse mais sans distinction. Néanmoins, le temps d'analyse global est inférieur à cinq heures avec cette trousse. Parallèlement, des techniques basées sur l'utilisation de puces à ADN sont apparues sur le marché. La technique CLART® PneumoVir (Genomica) permet de détecter simultanément 17 types et sous-types de virus respiratoires mais seulement un seul type de CoV (HCoV-229E).

Bien que le SRAS-CoV ait été isolé sur cellules Vero, la culture cellulaire n'est pas une technique appropriée pour la détection de cet agent infectieux, de part sa croissance parfois difficile en culture et de part le fait qu'il nécessite une manipulation en laboratoire de haute sécurité microbiologique (niveau 3) suite à sa classification par l'OMS dans la classe 3. Le diagnostic direct repose donc sur la biologie moléculaire. À ce jour, deux trousse commerciales sont disponibles et reposent sur une RT-PCR en temps réel utilisant des amorces situées dans le gène codant la polymérase virale : (RealArt HPA Coronavirus LC kit, Artus et Light Cycler SRAS-CoV quantification kit,

Roche). Actuellement, hors contexte épidémique de SRAS, la majorité des laboratoires de virologie ne disposent pas de ces kits. En outre, ils devront être réévalués en cas de résurgence de ce virus car ils ont été développés à partir des souches circulant en 2003, le SRAS-CoV ayant pu acquérir entre-temps des mutations pouvant entraîner une moins bonne détection des souches. Divers prélèvements (respiratoires, selles, sang...) pouvant être utilisés. Cette maladie évoluant sur plusieurs semaines, la répétition et le choix du prélèvement sont importants. Après une détection variable de l'ARN viral la première semaine suivant le début des signes cliniques (40 à 50 % de positivité dans les prélèvements respiratoires), on retrouve de l'ARN viral la deuxième semaine dans 70 à 80 % des prélèvements respiratoires et dans 80 à 90 % des prélèvements de selles. La détection moléculaire serait possible jusqu'au 40^e à 50^e jour [24].

Traitement et prévention des infections à coronavirus

Prise en charge thérapeutique

La prise en charge des infections à CoV doit naturellement s'envisager selon la gravité de la symptomatologie observée tout en sachant qu'il n'existe aucun traitement spécifique des infections à HCoV. Les infections

respiratoires dues aux CoV hors SRAS-CoV présentent une évolution généralement sans complication chez l'individu immunocompétent, ne justifiant alors d'aucune prise en charge particulière. L'infection de patients immunodéprimés (transplantés principalement) peut provoquer des formes plus sévères justifiant une hospitalisation, voire une prise en charge en unité de soins intensifs, mais ces cas restent très peu fréquents. Quant aux infections dues au SRAS-CoV, de nombreux patients ont été traités par corticoïdes et ribavirine avant même l'identification du virus, devant l'absence de réponse clinique aux antibiotiques et à l'oseltamivir (Tamiflu®) [32]. La ribavirine a été utilisée du fait de son activité antivirale à large spectre *in vitro*, bien que son véritable mécanisme d'action ne soit toujours pas élucidé. Toutefois, il est maintenant démontré que la ribavirine ne possède aucune activité significative *in vitro* contre le SRAS-CoV [47]. Les corticoïdes ont, quant à eux, constitué le principal traitement. Pendant la phase II de l'évolution clinique, lorsque les patients développaient une pneumonie avec hypoxémie, l'administration intraveineuse de bolus de méthylprednisolone (MP) a permis une régression des lésions pulmonaires induites par les cytokines [48]. Le rationnel pourrait être que la progression de la maladie pulmonaire serait médiée par la réponse inflammatoire de l'hôte, les corticostéroïdes réduisant considérablement les concentrations d'IL-8, de MCP-1 et d'interféron (IFN)- γ , cinq à huit jours après le traitement, chez 20 adultes atteints de SRAS [49]. L'utilisation de bolus de MP pendant la progression clinique a été associée à une amélioration clinique avec une résolution de la fièvre et des opacités pulmonaires dans les deux semaines. Toutefois, une analyse rétrospective a montré que l'utilisation de bolus de MP était associée à un risque accru de mortalité à 30 jours (*odds ratio* (OR) ajusté : 26,0 ; IC 95 % : 4,4-154,8) [50]. Cependant, cette étude rétrospective ne pouvait pas établir si une relation causale existait entre l'utilisation du MP et un risque accru de mortalité, comme les cliniciens étaient plus enclins à donner des bolus de MP chez les patients présentant les atteintes les plus sévères. Au final, l'efficacité relative de ces deux traitements (ribavirine et MP), pris ensemble ou séparément, demeure controversée.

À noter que de nombreuses voies thérapeutiques sont en cours de développement parmi lesquels IFN, inhibiteurs de protéases, inhibiteurs d'entrée, de fusion et ARN interférents. À ce jour, certaines molécules ont montré un impact sur la répllication des CoV *in vitro*, mais la validation clinique reste à mettre en place.

Développement d'un vaccin

Différentes approches vaccinales ont été étudiées (virus inactivé, vecteur viral, vaccin recombinant) pour induire une protection à la fois humorale et cellulaire. Les vaccins à virus entier inactivé sont immunogènes et

protecteurs dans des modèles animaux. Cependant, cette approche nécessite la production d'une grande quantité de virus infectieux dans une installation de confinement de niveau 3, ce qui n'est pas facilement disponible pour les fabricants de vaccins. La protéine S du SRAS-CoV étant responsable de la liaison au récepteur et de la fusion membranaire, elle est une cible prioritaire pour le développement de vaccins sous-unitaires. Dès 2003, une étude utilisant un vaccin vecteur adénovirus a montré une induction d'une forte réponse immunitaire spécifique du SRAS-CoV chez le macaque rhésus, laissant espérer un développement rapide d'un vaccin CoV. Délivrée sous forme de vaccin à ADN, ou exprimés dans un virus de la vaccine atténué ou des systèmes de baculovirus recombinants, la protéine S permet l'induction d'anticorps neutralisants et une réponse cellulaire T. Un vaccin ADN codant le gène S pourrait induire la production d'anticorps IgG spécifiques contre le SRAS-CoV chez la souris, avec un taux de séroconversion de 75 % après trois doses vaccinales [51]. Les protéines S recombinantes qui présentent une bonne antigénicité et la capacité de liaison aux récepteurs sont également de bons candidats pour développer un vaccin SRAS. Un virus de la vaccine recombinant atténué, Ankara, exprimant la protéine S du SRAS-CoV peut induire une immunité protectrice chez la souris [52]. Plus récemment, un vaccin à base de pseudoparticules virales (VLP), composées de la protéine S du SRAS-CoV et de la protéine M1 du virus de la grippe aviaire produit en système baculovirus, a permis d'induire des taux élevés d'anticorps neutralisants et réduit le taux de mortalité de 100 % chez les souris infectées [53].

Cependant, malgré les essais vaccinaux encourageants des dernières études, l'utilisation de la protéine S entière comme vaccin demeure préoccupante, car des réponses immunitaires inadaptées causant des dommages hépatiques ont été rapportées chez les animaux vaccinés [54]. Antérieurement, des effets délétères avec le vaccin dirigé contre le CoV félin avaient déjà été rapportés et seraient en relation avec l'apparition d'anticorps facilitants et de mécanismes immunopathologiques [55]. Les vaccins basés sur une protéine S partielle ou d'autres protéines de structure du SRAS-CoV sont en cours d'exploration. Le plus grand défi pour le développement durable du vaccin, le SRAS-CoV ne circulant plus chez l'homme, demeure les modifications antigéniques de la souche réémergente, pouvant conduire à une inefficacité du vaccin.

Conclusion

Les épidémies récentes d'infection à CoV (SRAS) sont le résultat d'émergences réussies. La notion de « barrière » inter-espèces est fragile et peut être facilement franchie lorsqu'il y a des contacts étroits entre animaux et hommes

et que les agents infectieux, tels les CoV, sont très variables, très adaptables grâce à de simples mutations qui modifient le tropisme ou à la suite de recombinaisons génétiques.

Toute émergence doit être détectée précocement grâce à une surveillance mondiale et à une mobilisation immédiate d'équipes performantes capables de détecter rapidement les agents émergents, à l'aide notamment des outils de biologie moléculaire, chez les patients mais aussi parmi les réservoirs animaux potentiels. Les mesures sanitaires internationales doivent être prises pour limiter la diffusion de ces agents potentiellement très dangereux.

À noter que la culture virale reste le *gold standard*, l'isolement des souches restant essentielle pour les études génétiques, du tropisme, de la sensibilité aux antiviraux et la mise au point de vaccins.

La SRAS est un exemple d'une émergence rapidement comprise et contrôlée, mais il doit aussi inciter à la modestie car ces CoV ou d'autres familles virales peuvent émerger ou réémerger à tout moment.

Conflits d'intérêts : aucun.

Références

- Gonzalez JM, Gomez-Puertas P, Cavanagh D, Gorbalenya AE, Enjuanes L. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family *Coronaviridae*. *Arch Virol* 2003 ; 148 : 2207-35.
- Vabret A, Dina J, Brison E, Brouard J, Freymuth F. Human coronaviruses. *Pathol Biol (Paris)* 2009 ; 57 : 149-60.
- Kendall EJ, Bynoe ML, Tyrrell DA. Virus isolations from common colds occurring in a residential school. *Br Med J* 1962 ; 2 : 82-6.
- Tyrrell DA, Bynoe ML. Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *Br Med J* 1965 ; 1 : 1467-70.
- Hamre D, Procknow JJ. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966 ; 121 : 190-3.
- McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967 ; 57 : 933-40.
- McIntosh K, Kapikian AZ, Hardison KA, Hartley JW, Chanock RM. Antigenic relationships among the coronaviruses of man and between human and animal coronaviruses. *J Immunol* 1969 ; 102 : 1109-18.
- Peiris JS, Lai ST, Poon LL, *et al.* Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003 ; 361 : 1319-25.
- Drosten C, Gunther S, Preiser W, *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 1967-76.
- Xu HF, Wang M, Zhang ZB, *et al.* An epidemiologic investigation on infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus in wild animals traders in Guangzhou. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2004 ; 38 : 81-3.
- Guan Y, Zheng BJ, He YQ, *et al.* Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 2003 ; 302 : 276-8.
- Wang M, Yan M, Xu H, *et al.* SARS-CoV infection in a restaurant from palm civet. *Emerg Infect Dis* 2005 ; 11 : 1860-5.
- Song HD, Tu CC, Zhang GW, *et al.* Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 2430-5.
- Lau SK, Woo PC, Li KS, *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 14040-5.
- Li W, Shi Z, Yu M, *et al.* Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 2005 ; 310 : 676-9.
- Shi Z, Hu Z. A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus. *Virus Res* 2008 ; 133 : 74-87.
- van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, *et al.* Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004 ; 10 : 368-73.
- Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, *et al.* A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 6212-6.
- Esper F, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. *J Infect Dis* 2005 ; 191 : 492-8.
- van der Hoek L, Berkhout B. Questions concerning the New Haven coronavirus. *J Infect Dis* 2005 ; 192 : 350-1 (author reply 353-4).
- Woo PC, Lau SK, Chu CM, *et al.* Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005 ; 79 : 884-95.
- Herrewegh AA, Smeenk I, Horzinek MC, Rottier PJ, de Groot RJ. Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J Virol* 1998 ; 72 : 4508-14.
- van Elden LJ, van Loon AM, van Alphen F, *et al.* Frequent detection of human coronaviruses in clinical specimens from patients with respiratory tract infection by use of a novel real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 2004 ; 189 : 652-7.
- Chan KH, Poon LL, Cheng VC, *et al.* Detection of SARS coronavirus in patients with suspected SARS. *Emerg Infect Dis* 2004 ; 10 : 294-9.
- Leung GM, Hedley AJ, Ho LM, *et al.* The epidemiology of severe acute respiratory syndrome in the 2003 Hong Kong epidemic: an analysis of all 1755 patients. *Ann Intern Med* 2004 ; 141 : 662-73.
- Dominguez SR, Robinson CC, Holmes KV. Detection of four human coronaviruses in respiratory infections in children: a one-year study in Colorado. *J Med Virol* 2009 ; 81 : 1597-604.
- Vabret A, Dina J, Gouarin S, *et al.* Human (non-severe acute respiratory syndrome) coronavirus infections in hospitalised children in France. *J Paediatr Child Health* 2008 ; 44 : 176-81.
- Zhao Z, Zhang F, Xu M, *et al.* Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. *J Med Microbiol* 2003 ; 52 : 715-20.

29. Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, *et al.* Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet* 2003 ; 362 : 1353-8.
30. Lee N, Hui D, Wu A, *et al.* A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 1986-94.
31. Yu IT, Li Y, Wong TW, *et al.* Evidence of airborne transmission of the severe acute respiratory syndrome virus. *N Engl J Med* 2004 ; 350 : 1731-9.
32. Peiris JS, Chu CM, Cheng VC, *et al.* Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 2003 ; 361 : 1767-72.
33. Chan HL, Kwan AC, To KF, *et al.* Clinical significance of hepatic derangement in severe acute respiratory syndrome. *World J Gastroenterol* 2005 ; 11 : 2148-53.
34. Lau KK, Yu WC, Chu CM, Lau ST, Sheng B, Yuen KY. Possible central nervous system infection by SARS coronavirus. *Emerg Infect Dis* 2004 ; 10 : 342-4.
35. Hon KL, Leung CW, Cheng WT, *et al.* Clinical presentations and outcome of severe acute respiratory syndrome in children. *Lancet* 2003 ; 361 : 1701-3.
36. Bitnun A, Allen U, Heurter H, *et al.* Children hospitalized with severe acute respiratory syndrome-related illness in Toronto. *Pediatrics* 2003 ; 112 : e261.
37. Wong SF, Chow KM, Leung TN, *et al.* Pregnancy and perinatal outcomes of women with severe acute respiratory syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2004 ; 191 : 292-7.
38. Yu IT, Xie ZH, Tsoi KK, *et al.* Why did outbreaks of severe acute respiratory syndrome occur in some hospital wards but not in others? *Clin Infect Dis* 2007 ; 44 : 1017-25.
39. Hui DS, Wong PC, Wang C. SARS: clinical features and diagnosis. *Respirology* 2003 ; 8 (suppl.): S20-4.
40. Hui DS, Sung JJ. Severe acute respiratory syndrome. *Chest* 2003 ; 124 : 12-5.
41. Wong RS, Wu A, To KF, *et al.* Haematological manifestations in patients with severe acute respiratory syndrome: retrospective analysis. *BMJ* 2003 ; 326 : 1358-62.
42. Muller MP, Tomlinson G, Marrie TJ, *et al.* Can routine laboratory tests discriminate between severe acute respiratory syndrome and other causes of community-acquired pneumonia? *Clin Infect Dis* 2005 ; 40 : 1079-86.
43. Hsueh PR, Huang LM, Chen PJ, Kao CL, Yang PC. Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus. *Clin Microbiol Infect* 2004 ; 10 : 1062-6.
44. Woo PC, Lau SK, Wong BH, *et al.* Longitudinal profile of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies against the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in patients with pneumonia due to the SARS coronavirus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004 ; 11 : 665-8.
45. Vabret A, Mouthon F, Mourez T, Gouarin S, Petitjean J, Freymuth F. Direct diagnosis of human respiratory coronaviruses 229E and OC43 by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2001 ; 97 : 59-66.
46. Moes E, Vijgen L, Keyaerts E, *et al.* A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC Infect Dis* 2005 ; 5 : 6.
47. Tan EL, Ooi EE, Lin CY, *et al.* Inhibition of SARS coronavirus infection *in vitro* with clinically approved antiviral drugs. *Emerg Infect Dis* 2004 ; 10 : 581-6.
48. Ho JC, Ooi GC, Mok TY, *et al.* High-dose pulse versus nonpulse corticosteroid regimens in severe acute respiratory syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 ; 168 : 1449-56.
49. Wong CK, Lam CW, Wu AK, *et al.* Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clin Exp Immunol* 2004 ; 136 : 95-103.
50. Tsang OT, Chau TN, Choi KW, *et al.* Coronavirus-positive nasopharyngeal aspirate as predictor for severe acute respiratory syndrome mortality. *Emerg Infect Dis* 2003 ; 9 : 1381-7.
51. Yang ZY, Kong WP, Huang Y, *et al.* A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature* 2004 ; 428 : 561-4.
52. Bisht H, Roberts A, Vogel L, *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 6641-6.
53. Liu YV, Massare MJ, Barnard DL, *et al.* Chimeric severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) S glycoprotein and influenza matrix 1 efficiently form virus-like particles (VLPs) that protect mice against challenge with SARS-CoV. *Vaccine* 2011 ; 29 : 6606-13.
54. Weingartl H, Czub M, Czub S, *et al.* Immunization with modified vaccinia virus Ankara-based recombinant vaccine against severe acute respiratory syndrome is associated with enhanced hepatitis in ferrets. *J Virol* 2004 ; 78 : 12672-6.
55. Vennema H, de Groot RJ, Harbour DA, *et al.* Early death after feline infectious peritonitis virus challenge due to recombinant vaccinia virus immunization. *J Virol* 1990 ; 64 : 1407-9.