

Arwa A. Awad, Naima A. Guled og  
Anniken Hansen

# Forskjeller mellom SARS-CoV-2 og Influenza A H1N1

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Sahar Olsen

Mai 2020



Arwa A. Awad, Naima A. Guled og  
Anniken Hansen

# **Forskjeller mellom SARS-CoV-2 og Influenza A H1N1**

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag  
Veileder: Sahar Olsen  
Mai 2020

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for biologiske fag Ålesund



Kunnskap for en bedre verden



## **Forord**

Denne oppgaven er skrevet av tre studenter ved NTNU Ålesund. Oppgaven handler om hvordan SARS-CoV-2 er forskjellig fra Influenza A H1N1 ut ifra måten de kobler seg på til celler. Det har vært utfordrende og spennende å skrive denne oppgaven. Vi har lært veldig mye om den nye pandemien, og vi vil gjerne takke vår veileder Sahar Olsen for veiledning i denne hektiske perioden.

# Sammendrag

## Norsk:

Vi har skrevet en oppgave som baserer seg på “review”-metoden, som går ut på å lete etter og å gjengi innhold i fra artikler fra et bestemt tema. Temaet vi har tatt for oss er; “hvorfors er situasjonen annerledes med SARS-CoV-2, (SARS-2), pandemien enn med andre virus pandemier?” Vi har valgt å sammenligne SARS-2 med Influenta A H1N1 viruset fra 2009, (IVApdm09), og tar utgangspunktet i virusfamiliene, virusenes struktur, virulensfaktorer, mottaker reseptorene og påvisningsmetoder. Hoved fokuset i oppgaven vår blir å handle om virusenes måte å koble seg til på vertsceller.

Vi har funnet mange aktuelle artikler via godkjente databaser, som f.eks. PubMed. Ved å benytte gode søkeord, lese igjennom artiklene, og sortering, var det lett å bruke de artiklene som var mest relevant.

Ut ifra all den informasjonen vi hadde hentet fra de faglige artiklene, fant vi ut at SARS-2 og IVApdm09 har sine likheter og forskjeller. SARS-2 sitt fusjonsantigen kalles for spike-protein, (S-protein), og har affinitet til ACE2-reseptor på humane celler. Influensavirus A H1N1 sitt antigen er hemagglutinin av type H1, og har affinitet til glykoproteiner på vertscellen, som inneholder sialinsyre. Begge virusene forårsaker sykdommer som infiserer hovedsakelig lungene og gir lignende symptomer.

## **English:**

We are writing a thesis based on the “review” method, which is to look for and reproduce content from articles from a specific topic. The theme we have addressed is; “why the situation is different with the COVID-19 pandemic than with other virus pandemics?” We have chosen to compare SARS-CoV-2 (SARS-2), with Influenza A H1N1 pd09 (IVApdm09). We initially take on families of the viruses, virus structure, virulence factors, host cell receptors and detection methods. Our main focus will be about how the virus connects to host cells.

We found many relevant articles through approved databases, such as PubMed. By the use of good keywords, reading though and sorting the articles, we manage to use the most relevant articles.

Based on all the gathered information we had from the articles, we found out that SARS-2 and IVApdm09 have their similarities and differences. The SARS-2's fusion antigen is the spike protein (S-protein), and it will bind to the ACE2-receptor of the host cell. Whereas the IVApdm09's antigen; hemagglutinin (HA), attaches to the glycoproteins which contain sialic acid, on the host cell. Both viruses cause diseases that mainly infect the lungs and gives similar symptoms.

# Innholdsfortegnelse:

<b>FORORD</b> .....	<b>1</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>2</b>
NORSK: .....	2
ENGLISH:.....	3
<b>1. INTRODUKSJON</b> .....	<b>6</b>
1.1 BAKGRUNN .....	6
1.2 ORDLISTE .....	7
<b>2. TEORI</b> .....	<b>8</b>
2.1 VIRUSFAMILIEN:.....	8
2.1.1 <i>Coronavirus familien:</i> .....	8
2.1.2 <i>Influenzavirus familien:</i> .....	9
2.2 HISTORIKK / NÅR DUKKET VIRUSENE OPP?.....	9
2.3 VIRUSENES STRUKTUR: .....	10
2.3.1 <i>Coronavirus struktur:</i> .....	10
2.3.2 <i>Influenza A virus:</i> .....	11
2.4 VIRULENSFAKTORER: .....	12
2.4.1 <i>“Spike” (S)-protein:</i> .....	12
2.4.2 <i>Hemagglutinin:</i> .....	12
2.5 MOTTAKER RESEPTORER:.....	13
2.5.1 <i>Siaa2-3Galβ1 og Siaa2-6Galβ1 Reseptorene:</i> .....	13
2.5.3 <i>Protein-reseptorer:</i> .....	15
2.6 BINDINGSMEKANISMENE:.....	15
2.6.1 <i>Influenza A H1N1pdm09</i> .....	15
2.6.2 <i>SARS-2</i> .....	16
2.7 SMITTEOVERFØRING.....	18
2.7.1 <i>COVID-19 og Kliniske symptomer:</i> .....	18
2.7.2 <i>Influenzasykdom og kliniske symptomer:</i> .....	18
2.8 PÅVISNINGSMETODER: .....	19
2.8.1 <i>PCR</i> .....	20
2.8.2 <i>Enzym immunoassey (EIA):</i> .....	20
<b>3. METODEBESKRIVELSE:</b> .....	<b>22</b>
<b>4. RESULTATER:</b> .....	<b>24</b>
4.1 TABELL 1: SØKEORD OM IVAPDM09: .....	24
4.2 TABELL 2: SØKEORD OM SARS-2 .....	25
4.4 TABELL 4: OVERSIKT OVER GENERELLE HOVEDPUNKT FOR FORSKJELLER OG LIKHETER MELLOM VIRUSENE: .....	27
4.5 TABELL 5: OVERSIKT OVER GENERELLE HOVEDPUNKT FOR EGENSKAPENE TIL ANTIGEN OG CELLE RESEPTORENE.....	28
4.6 TABELL 6: OVERSIKT OVER GENERELLE SYMPTOMER FOR COVID-19 OG .....	29
INFLUENZA .....	29
<b>5. DISKUSJON</b> .....	<b>30</b>



5.1 METODE DISKUSJON:.....	30
5.1.1 <i>Hvordan gikk vi frem?</i> .....	30
5.1.2 <i>Hvilke utfordringer oppstod underveis?</i> .....	30
5.1.3 <i>Vurderinger:</i> .....	31
5.2 SENTRALE FUNN:.....	31
5.2.1 <i>Forskjeller og likheter i struktur, symptomer</i> .....	31
5.2.2 <i>Bindingsprosessen, reseptorene og deres funksjoner:</i> .....	33
5.2.3 <i>Påvisningsmetoder, kort oppsummert:</i> .....	34
5.3 KONSEKVENSER FOR FAGOMRÅDET .....	34
5.4 KONKLUSJON .....	35
<b>6. REFERANSER:</b> .....	<b>36</b>

# 1. Introduksjon

## 1.1 Bakgrunn

I slutten av desember 2019 varslet de kinesiske offentlige helsemyndigheter om flere tilfeller av akutt respirasjonssyndrom i Wuhan, en by i Hubei-provinsen i Kina. Kinesiske forskere identifiserte et nytt koronavirus som den viktigste årsaken. Sykdommen har til nå fått navnet: “coronavirus disease 2019” (COVID-19), og viruset som forårsaker sykdommen ble døpt “Severe Acute Respiratory Syndrome- Coronavirus 2” (SARS-CoV-2). Dette er en ny stamme av coronavirus som ikke tidligere har blitt identifisert hos mennesker (1).

Den nåværende pandemien har gitt verden store utfordringer og mange menneskeliv har gått tapt. Til nå har det blitt registrert i underkant av 4 millioner tilfeller av COVID-19 på verdensbasis, og over 278000 døde i Europa (1). Det nye viruset har spredd seg over hele verden i rekordfart, hvor enkelte nasjoner som Spania og Italia har måttet stenge helt ned, på grunn av store antall av smittede og med sprengt kapasitet i helsevesenet.

I vår oppgave skal vi gi en generell sammenlikning av virusene som tidligere nevnt. De to virusene vi skal ta for oss er; IVApdm09, som skapte en pandemi i perioden 2009-2010, og det nylig oppdagede viruset; SARS-2, som ble utnevnt til en globalpandemi tidlig i 2020. Vi vil ta for oss noen av forskjellene om måten SARS-2 og IVApdm09 kobler seg til celler. Det er mye å diskutere og å ta tak i, så vi har derfor begrenset oss til to virulensfaktorer: SARS-2s spike-reseptor (S-reseptor) og IVApdm09 sitt hemagglutinin (HA). Vi vil også gå litt inn på hva slags type mottakerreseptorer virusene adhererer til på vertscellene; hvilke funksjoner de kan ha, symptomer som er relatert til virusene, samt smitteoverføring, familie og slektskap.

## 1.2 Ordliste

ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2
Ang	Angiotensin
Ang 1	Angiotensin-1
Ang 2	Angiotensin-2
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
CoV	Coronavirus
COVID-19	Coronavirus disease 2019
HA	Hemagglutinin
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IIV	Influenza virus A
IIV pdm09	Influenzavirus A H1N1 pdm09
MERS-CoV	Middle East respiratory syndrome coronavirus
SARS-CoV	Severe acute respiratory syndrome coronavirus
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2
NA	Neuraminidase
Pdm09	Pandemisk 2009
SARS-1	SARS-CoV
SARS-2	SARS-CoV-2
SARS-S	SARS-CoV S-protein
SARS-2-S	SARS-CoV-2 S-protein
S-protein	Spike glycoprotein
WHO	World Health Organization

## 2. Teori

I teoridelen tar vi for oss virusfamiliene, virusenes historikk, når disse pandemiene har dukket opp, smitteoverføring, virusenes struktur, virulensfaktorer, mottaker reseptorer, bindingsmekanismene og påvisningsmetoder.

### 2.1 Virusfamilien:

#### 2.1.1 *Coronavirus familien:*

Coronavirus tilhører familien Coronavirinae som er den største gruppen av virus under Nidovirales-ordenen. Coronavirinae er videre inndelt i fire grupper;  $\alpha$ ,  $\beta$ , gamma og delta coronavirus, (2). De humanpatogene coronavirusene er av  $\alpha$ - og  $\beta$ -coronavirus (3). SARS-2 er et  $\beta$ -coronavirus, denne gruppen inkluderer også Middle East Respiratory Syndrome virus (MERS CoV), og Severe Acute Respiratory coronavirus-1, (SARS-1), som alle fører til alvorlige respiratoriske sykdommer som MERS, SARS og COVID-19 (2).

Viruset ble opprinnelig sortert i grupper basert på serologi, men er nå inndelt fylogenetisk (4). Coronavirusene fikk dette navnet Corona-, fordi de har membranproteiner som gir inntrykk av at de ser ut som om de er omgitt av en piggete-krone i elektron mikroskopet (5). Coronavirus er et membrankledt virus med størrelse på omtrent 125nm i diameter. Virusets genom er enkelttrådet RNA med positiv polaritet og er omtrent 26-32kb stort (3). Det har nukleotider som koder for 7 proteiner. Det heliske nukleotidet er 7-9 nm i diameter. Coronavirus har i likhet med mange andre virus evne til mutasjon og rekombinasjon (6).

Flere medlemmer av familien Coronaviridae sirkulerer kontinuerlig i den menneskelige befolkningen og forårsaker vanligvis mild luftveissykdom. SARS-1 og MERS-CoV overføres fra dyr til mennesker og kan forårsake alvorlige luftveissykdommer hos mennesker (7). Noen forskere i fra Kina, (8), hadde funnet ut at genom-sekvensen til SARS-2 er ca. 96,2% identisk med flaggermus viruset; CoV RaTG13, men deler 79,5% identitet med SARS-1.

### 2.1.2 *Influenzavirus familien:*

Influenzavirus er et samlebegrep for en rekke virus som tilhører orthomyxovirusfamilien. Orthomyxoviridae er membrankledde virus med segmentert, negativt-enkeltrådet RNA-genom. Denne familien omfatter en rekke species med influensa A, B og C som kan være patogene for mennesker. Influenza virus av type A, har en spesiell måte å navngis på. Dette er fordi de muterer hyppig som igjen gjør at de kommer i et svært mangfold av sub-typer. Et eksempel er: Influenza A H1N1/California/04/09. Særlig fugl, regnes som hoved reservoaret hos influensa av type A, men viruset har også blitt funnet i gris (9). IVA H1N1pdm09 er et samlebegrep for de mange sub-typer av IVA H1N1 som oppstod under pandemien i 2009.

IVA har en veldig stor evne til å forandre seg. Dette gjør at sesong influensaen har forskjellig utfall fra år til år. Mekanismene rundt dette kalles for antigendrifting og antigen-shift.

Antigendrifting er punktmutasjoner i arvestoffet som endrer virusproteinenes aminosyre-sammensetting, dette fører til endrede egenskaper som igjen gjør at antistoffer fra tidligere influensa infeksjoner blir mindre effektivt (9). Antigen-shift på sin side er mutasjoner hvor viruset “bytter” membranproteinene fra for eksempel hvis IVA H1N1 og H2N3 hadde infisert en og samme celle, kunne de nye virusene f.eks. ha bli til IVA H2N1 (10).

## 2.2 Historikk / når dukket virusene opp?

Som tidligere nevnt ble SARS-2 oppdaget i Kina i slutten av 2019, og i løpet av årsskiftet 2019/2020, ble WHO informert av den kinesiske regjeringen om flere tilfeller av lungebetennelse med ukjent årsak. Viruset ble først navngitt som Wuhan Coronavirus eller “2019 novel Coronavirus”, (2019-nCov), av de kinesiske forskerne. Den internasjonale komiteen for taksonomi av virus (ICTV) utnevnte viruset som SARS-CoV-2 og sykdommen til COVID-19. I løpet av de første 50 dagene under pandemien, hadde viruset tatt livet av mer enn 1800 stykker og smittet mer enn 700.000 personer (2) .

I begynnelsen ble pasientene smittet med viruset i Kina fordi de har besøkt sjømatmarkedet der levende dyr ble solgt eller har brukt smittede dyr eller fugler som matkilde. Ytterligere undersøkelser avslørte at noen individer fikk infeksjonen selv om de har ikke besøkt

sjømatmarkedet. Dette indikerte viruset sitt evne til spredning fra menneske til menneske (11, 12).

Noen influensa-varianter blir zoonotiske og kan dermed spres fra dyr til mennesker. I 2009 begynte et nytt influensa A virus av type H1N1 å sirkulere. Dette viruset var uvanlig fordi det besitter en kombinasjon av gener som ikke tidligere har blitt observert i dyr eller mennesker. Selv om IVApdm09 likner mye på H1N1-virusene som finnes hos svin, ble viruset bare funnet i mennesker og sirkulerte ikke i svinebesetninger. I juni 2010 erklærte WHO at pandemien var over. Imidlertid fortsetter H1N1pdm09 influensaviruset å sirkulere rundt kloden sammen med sesonginfluensaen. Det vil sannsynligvis fortsette å gjøre det. Faktisk er IVApdm09 nå en av de sesongmessige influensastammene i sesonginfluensa-vaksinen (13).

## **2.3 Virusenes struktur:**

### *2.3.1 Coronavirus struktur:*

SARS-2 er et membrankledd virus, med en lipidmembran som omgir virusets kapsid (4). Kapsidet er en proteinkappe som omgir selve arvematerialet. På lipidmembranen er det glykoproteiner som gjør at viruset for egenskapen til å trenge inn i en celle (2, 3).

Coronavirus har fire viktige strukturelle proteiner; S-proteinet, membranprotein (M), "Envelope"-protein (E-protein) og nukleokapsid proteinet (N-protein). Alle de fire proteinene er kodet i 3'-enden av virusets genom. I 5'-enden er genene kodet for proteinene som er involvert i virusreplikasjonen (3). S-proteinet er et av hoved antigenene til Coronavirus og står for bindingen til cellereseptorer. S-proteinet bruker en N-terminal signal-sekvens for å få tilgang til ER (endoplastisk retikulum), og den er sterkt N-bundet glykosylert. Den formidler tilknytning til vertsreseptoren (4).

M-proteinet er det strukturelle proteinet som det finnes mest i viruset. Det er et lite protein med tre transmembran-domener og antas å gi viruset sin form. M-proteinet har et lite glykosylert N-terminal domene og et mye større C-terminal domene som strekker seg 6-8 nm inn i viruset (4).

Coronavirus sine E-protein er svært forskjellige fra hverandre, men har en felles arkitektur og finnes i små mengder på viruset. E-proteinet har et N-terminalt domen og et C-terminalt domen. Det viser det seg at den har en ionekanal-aktivitet og er med på å hjelpe til med frigjøringen av viruset. Funksjonen til E-proteinet er fremdeles ikke helt kartlagt, men mye tyder på at det er et transmembranprotein og at den mulig har andre funksjoner. For eksempel er ikke ione-aktiviteten nødvendig for replikasjonen, men viser seg å være nødvendig for patogenesen (4).

N-proteinet er det eneste proteinet som er til stede i nukleokapsidet. Den er sammensatt av to domener; et N-terminal og et C-terminal. Begge domene er i stand til å binde RNA in vitro og opprettholde virusets stabilitet. N-proteinet er også nødvendig for pakking av virus RNA og virus sammensetting (4).

### 2.3.2 *Influenza A virus:*

Virusene i denne speciesgruppen er kuleformet og har en diameter omkring 80-120 nm. Influenza virusets arvestoff er pakket som 8 RNA-segmenter viklet rundt nukleoproteinmolekyler, og har tildelt RNA-polymerase-molekyler for hvert av RNA-segmentene. Matriksproteinet (M1) er et strukturprotein som pakker inn arvestoffet og dekker innsiden av membranen. M1 er også forbundet med nukleokapsidet, HA og NA. Virus-komplekset er igjen omsluttet av en lipidmembran, som er avsnørt ifra cellens egen plasmamembran (9).

I virusets yttermembran finnes membranporeprotein (M2). Dette proteinet åpnes når miljøet utenfor viruset er surt. Dette fører til at pH-en ved viruset blir senket slik at det vil initiere bindingsprosessen mellom HA og endosomet. M2 er et poreprotein som fører til frikopling av nukleokapsidet fra matriksproteinet. Det bidrar også til frigjøring av nydannede viruspartikler fra plasmamembranen. På lipidmembranen sitter også de to viktige glykoproteinene hemagglutinin (HA), og neuraminidase (NA). Hemagglutinin er virusets viktigste antigen, og har som hoved oppgave å binde viruset til sialinsyre på celler, besørger binding og inntrenging i mottakelige celler. Neuraminidase er et enzym som bryter ned sialinsyre og vil da fri sette det nye viruset (9).

## 2.4 Virulensfaktorer:

### 2.4.1 "Spike" (S)-protein:

Coronavirus S-protein er en av de sentrale determinantene og er ansvarlig for reseptor binding og membranfusjon. Det er et stort glykoprotein (ca. 180 kDa) som er til stedet på virusets overflate. Det er en fremtredende trimer og den er sammensatt av to sub enheter S1 og S2. S1 inneholder en N-terminal som ofte binder seg til sialinsyre og en C-terminal som binder en spesifikk proteinholdig reseptor (14).

Det er to kritiske steg som må til for at Coronavirus entrer vertscellen. Det første steget er bindingen til mottakerreseptor på cellens overflate. Det andre steget er selve fusjonen med cellemembranen og frigjøring av virusets arvestoff i vertscelle cytoplasma slik at replikasjon kan settes i gang. Begge disse trinnene styres av virusets S-protein. S1 sub enheten har som ansvar for bindingen til vertscellerreseptoren, fordi den har et reseptor-binding-domene: (RBD), og subenheten S2 er den som får til membranfusjon med vertscellemembranen (15).

### 2.4.2 Hemagglutinin:

På IVA H1N1pdm09 yttermembran er det to signifikante protein som har viktige funksjoner: hemagglutinin og nevrominidase. Hemagglutinin (HA), er det reseptorbindende proteinet som sørger for at viruset fester med cellen. HA proteinet blir syntetisert som en forløper; HA0. Forløperen blir delt opp i to disulfid-bindende subenheter; HA1 og HA2, av vert cellens proteaser (16).

Ved binding til en reseptor celle, vil det sende signaler til cellen om endocytose av viruset. Det finnes flere varianter av HA, hvor bl.a. H2 og H3 er også humanpatogene varianter (17). Primært har HA proteinet 3 funksjoner; reseptor binding, antigen variasjon og fusjon med vertscellen. For at en fusjon mellom virus og vertscelle skal skje, må det være omtrent tre HA reseptorer til som binder seg til cellemembranen. For at HA reseptoren skal kunne fungere er den avhengig av pH verdien i endosom-miljøet synker (18).

På HA reseptoren er det lokasjoner hvor mutasjoner skjer ofte. Det kan være epitoper og bindingsteder med immunologiske egenskaper (17). HA reseptor proteinet er delt i to hoveddeler; stilkdomene og et hode-domene slik figur 1 viser. HA proteinets hode er mer



utsatt for forandringer enn stilken. Dette gjør at antistoffer som er spesifisert til å ha epitoper på stilk-domene egner seg bedre for vaksine (19).

## **2.5 Mottaker reseptorer:**

For at influensa viruset skal infisere en vertscelle benytter den HA, til å feste seg til glykoprotein reseptorer på vertscellens membran. Ved kontakt med antigen og reseptor initieres prosessen for infisering av cellen. Når viruset er klar til å dra for å infisere andre celler, bruker viruset neuraminidase (NA), til å kutte sialinsyre-galaktose- glykosidbindingen for å kunne løsrive seg fra cellen. Det er hovedsakelig penta sakkarider på cellens overflate som er hoved reseptorene for influensavirusene HA (20).

### *2.5.1 Sialinsyre-3Gal $\beta$ 1 og Sialinsyre-6Gal $\beta$ 1 Reseptorene:*

Sialinsyrer er forbindelser avledet fra neuraminsyre som tilhører en stor familie av komplekse ni-karbon sukker som vanligvis er bundet til andre karbohydrater gjennom  $\alpha$ -ketosidiske bindinger. Hos pattedyr finnes sialinsyrer i den ikke-reduserende enden av glykokonjugater (21), (komplekser av karbohydrater som er kovalent bundet til proteiner og lipider).

Influensavirus er de eldste og viktigste eksemplene på virus som gjenkjenner sialinsyrer som overflatemottaker for inntreden i vertsceller, og deres binding og forplantning gjennom interaksjon med disse reseptorene har blitt godt dokumentert (22).

Fugle- influensavirusstammer binder fortrinnsvis til sialinsyrer bundet til galaktose gjennom en  $\alpha$ 2-3 binding, mens humane influensavirusstammer fortrinnsvis fester seg til sialinsyrer bundet til galaktose gjennom en  $\alpha$ 2-6 binding (23). Det viser seg at Sialinsyre-6Gal $\beta$ 1 uttrykkes dominant på epitelcellene i øvre luftveier hos mennesker, hvorav Sialinsyre-3Gal $\beta$ 1 ble funnet på kubiske ikke-cilierte bronkiale celler mellom de respiratoriske bronkiolen og alveolen. Det er også et betydelig antall av celler som utgjorde alveoleveggen uttrykket også denne type reseptor (24).

I motsetning til andre humane virus, viste IVApdm09 en sterk bindingskraft for både  $\alpha$ 2-3 og  $\alpha$ 2-6 de to typene reseptorer under 2009-pandemien (20). Men enkelte species av IVApdm09 har forskjellige egenskaper Eksempler på dette er IVA/California/04/09. Denne subtypen av

IVApdm09 er den første sorten som ble identifisert under 2009 pandemien. Undersøkelser viste at dette viruset hadde lav HA-aviditet for  $\alpha$ 2-6 sialoglykojugater og svak NA-enzymatisk aktivitet ved katalysering  $\alpha$ 2-6 bundet glykaner. I forhold til en annen subtype: IVA/Nederland/602/09/, som viste en forbedret HA-binding til  $\alpha$ 2-6glykaner, men hadde en sterkt redusert NA-aktivitet (25).

Denne funksjonen kan forklare potensialet for en pandemi. Det tillot viruset av svineopprinnelse å binde seg til Sia $\alpha$ 2-6Gal (NAC) reseptorer i øvre luftveier, noe som lettere smitter fra menneske til menneske. På den annen side, tillot opprettholdelse av kapasiteten til å binde seg til Sia $\alpha$ 2-3Galp1- viruset å replikere i nedre luftveier. Dette kan forklare mange av de alvorlige tilfellene av influensa, som ga livstruende lungebetennelser observert selv hos unge voksne uten underliggende sykdommer (26).

#### 2.5.2 ACE2-reseptor:

“Angiotensin-converting enzyme 2”, er et enzym som sitter på overflaten av cellemembranen(27). ACE2 reseptor kan vi finne i celler på følgende organer; hjerte, nyrer, lunger, mage, tarmorganer (tynntarmen, tolvfingertarmen), og testikler. ACE2 antagoniserer aktiveringen av det klassiske RAS-systemet og beskytter mot organskader, den beskytter også mot hypertensjon, diabetes og hjerte-og karsykdommer. Hos mennesker er ACE2 til stede i alveolære epitelceller i lungene og tynntarmsepitelceller, så vel som i arterielle- og venøse endotelceller, arterielle glattmuskulatur i hjertet, og også i de øvre luftveier og epitel i huden har ACE2-uttrykk (28).

Renin-angiotensin-systemet (RAS) er et av de viktigste kontrollsystemene for blodtrykk og væskebalanse. Et av de viktigste biologiskaktive hormoner som er i RAS-systemet, er angiotensin (Ang 2). Ang 2 produseres ved sekvensiell spaltning av peptider avledet fra substratmolekylet angiotensinogen. Dette hormonet binder seg til spesifikke reseptorer og utløser et bredt spekter av biologiske handlinger som påvirker praktisk talt alle systemer i kroppen, inkludert hjerne, hjerte, nyre, muskulatur og immunsystem. Men en primær funksjon av RAS er sirkulasjonshomeostase, beskyttelse av kroppsvæskevolum og unormal aktivering av RAS kan bidra til utvikling av hypertensjon, hjertehypertrofi og hjertesvikt (29).

Lungevev har høy RAS-aktivitet og er det ledende stedet for Ang 2-syntese. Ang 2 er en effektiv vasokonstriktor i lungene. RAS aktiveres under hypoksi. Ang 2 kan ikke bare fremme vekstresponsen til vaskulære glatte muskelceller, men også direkte fremme vaskulær ombygging og forhindre lungebetennelse og shunts relatert til lungeskade (30). Ang 2 kan imidlertid også fremme forekomsten av lungeødem og svekke lungefunksjon (31).

### *2.5.3 Protein-reseptorer:*

Vertscellen har flere proteaser som er med på aktiveringen av SARS-2 -S. Transmembran protease serine 2 (TMPRSS2) er en type II transmembran protein. Den uttrykkes i cellene luftveiene og de er ofte med på aktiveringen av luftveisvirus. Både SARS-1 og MERS-CoV kan også bli aktivert av noen medlemmer i TMPRSS2 familien. Medlemmer av TMPRSS familien er membran bundet, og de finnes i celle overflaten. Både TMPRSS2 og ACE2 er viktig for aktiveringen av S-proteinet som fører til konformasjons-endringer, altså endringer i den tredimensjonale strukturen til proteinet, som igjen fører til initieringen av virusets entre inn i vertscellen (32).

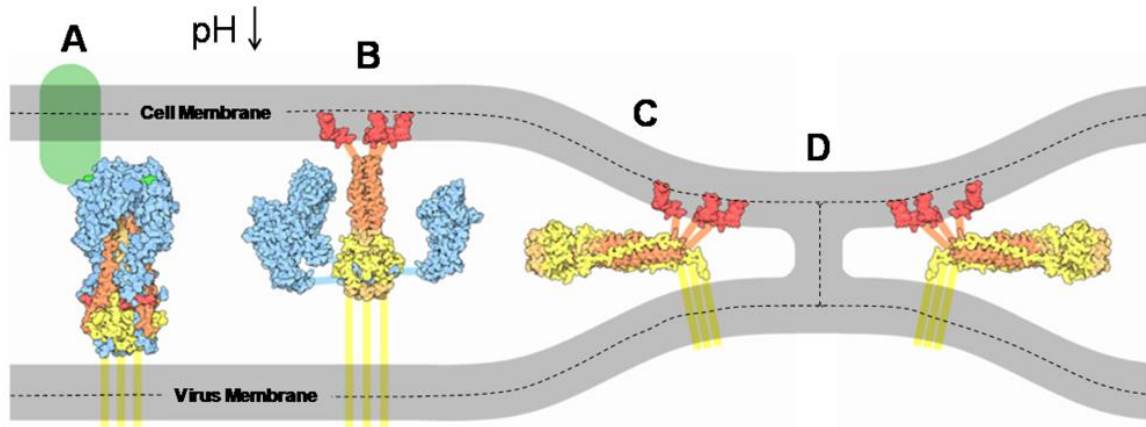
## **2.6 Bindingsmekanismene:**

Virusenes fusjonsproteiner blir sortert i strukturelle klasser. Det finnes foreløpig tre klasser av fusjonsproteiner. Både SARS-2 og IVApdm09 sine fusjonsproteiner (HA og S-protein), er klassifisert som klasse 1 fusjonsproteiner. Som klasse 1 fusjonsproteiner er HA og S-proteinet trimerer, som betyr at de er sammensatt av tre domener. Membrankappede virus kommer inn i cella via fusjon mellom virusets yttermembran og cellens plasmamembran (18).

### *2.6.1 Influenza A H1N1pdm09*

Influenza virus entrer cellen via endosomer og er avhengig av en lav pH for å initiere fusjonsprosessen (18). Ved reseptorbinding må HA først gå under et forberedelses steg; proteolytisk spalting. Da vil glykoproteinet endre formasjon, slik at fusjonspeptidet fremtrer. Membranfusjonen skjer fra innsiden av endosomet, ved at pH-en synker inne i endosomet. Dette medfører til en endring i HA sin tredimensjonale struktur slik at fusjonspeptidene vises, som videre leder til membranfusjonen. Eksponeringen av lav pH er også viktig for leveransen

av virusets RNA fra matriks protein (M1), via matriks protein 2 (M2), som er en ionekanal på virusets yttermembran (33).



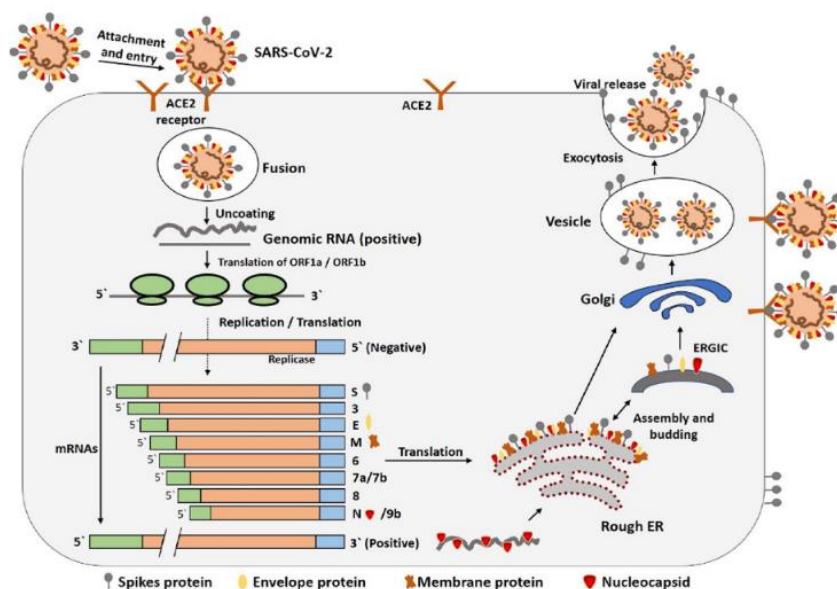
Figur 1: Illustrasjonen viser startfasen av bindings og fusjonsprosessen mellom virus og celle. A) Her binder virusets HA seg til et glykoprotein (grønn) som inneholder sialinsyre på målcellen. B) Ved reduksjon av pH i endosomet vil HA<sub>2</sub>, (gul/orange), gjennomgå en konformell endring av struktur slik at fusjonspeptidene, (rød), blir festet til målcellemembranen. C) Videre endring i strukturen fører til at de ytterste laget fra de motstående membranene til å formere en stilk (hemifusjon). D) Det antas at det er flere HA<sub>2</sub> domener som jobber sammen for poredannelsen, som skjer når stilk formasjonen kollapser, (ikke vist i bildet), (33).

### 2.6.2 SARS-2

I likhet med SARS-1 binder virusets S-protein på overflaten av SARS-2 til ACE2-reseptoren på celleoverflaten til vertscellen for å lette viruset kommer inn i vertscellen. Deretter frigjøres viruset RNA inn i cellen. Videre skjer RNA-replikasjonen og det dannes RNA-replikase-transkriptase-kompleks. Gjennom transkripsjon og replikasjon danner komplekset negative RNA tråder som vil bli oversatt til virusets strukturelle proteiner senere. De strukturelle proteinene og RNA samles i cytoplasma og vil gjennom golgiapparatet sendt som endosomer til plasmamembranen hvor nye virus partikler frigjøres fra infiserte celler ved eksocytose for å infisere andre celler. Hvert infiserte celle lager tusenvis av nye virus partikler som sprer seg videre til bronkiene og til slutt når alveolene, og andre organer som da forårsaker

lungebetennelse. Vevene som uttrykker ACE2-reseptor er målorganene for SARS -2 invasjon (34).

Coronaviruset livssyklus begynner når S-proteinet binder seg til ACE2-reseptoren. Etter reseptor bindingen, vil konformasjon som fører til fusjon med cellemembranen slik at viruset kommer inn via endocytose. Virusets RNA frigjøres så inn i vertscellen, og syntesen av RNA til polproteinene pp1a og 1ab starter. Viruset inneholder enzymet replikase; RNA-avhengig RNA polymerase som lager nye kopier av virus-RNA. Ny syntetisert RNA fungerer både som templat for produksjon av mer virus-RNA og produksjon av mRNA, som til slutt omsettes til funksjonelle virus proteiner. Virus proteinene og virusets RNA blir deretter samlet, og satt sammen til virus i ER og golgiapparatet, for så å bli transportert via vesikler og frigjort ut av cellen, (2), se figur 3.



Figur 3: Figuren illustrer SARS-2 livssyklus (2).

Ifølge artikkelen:” SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor”(7) viser det seg at SARS-2 sitt S-protein (SARS-2-S) og SARS-1 sitt S-protein (SARS-S) formidlet samme celler. Forskerne ville se om SARS-2-S har aminosyrerester som er nødvendige for interaksjon med SARS-S-reseptoren ACE2. Deres sekvensanalyser avdekket at SARS-2 har likheter med SARS-1-relaterte virus fra flaggermus (SARSr-CoV), som ikke alle brukte ACE2 til vertscelleinnføring. Analyse av reseptorbindingsmotivet (RBM), en del av

reseptorbindingsdomene (RBD) som tar kontakt med ACE2 avslørte at de fleste aminosyrerester som var essensielle for ACE2-binding ved SARS-S, ble bevart i SARS-2-S. I kontrast var de fleste av disse restene fraværende fra S-proteiner fra SARS-CoV som tidligere ikke har funnet å bruke ACE2 til oppføring (8).

Når viruset kommer inn i alveolære epitelceller fører den til at det utløses sterk immunrespons, noe som kan resultere i cytokin storm syndrom og lunge vevsskader. Cytokin storm syndrom også kjent som hypercytokinanemi, er en lidelse som er preget av ukontrollert produksjon av proinflammatoriske cytokiner og er viktig årsak til “acute respiratory distress syndrom” (ARDS) og organsvikt i mange organer (35).

## **2.7 Smitteoverføring**

### *2.7.1 COVID-19 og Kliniske symptomer:*

COVID-19 sprer seg primært gjennom luftveiene og overføring av viruset skjer ved dråpesmitte, luftveissekresjoner og direkte kontakt med slimhinner. Inkubasjonsperioden er på mellom 1–14 dager, basert på nåværende epidemiologisk undersøkelser. COVID-19 er også smittsom i løpet av latenstid (8).

De vanligste kliniske symptomer er feber, hoste, tretthet, sputum utskillelse, puste vansker, sår hals og hodepine. Noen pasienter fikk en del mage-tarm symptomer som diaré og oppkast. Feber og hoste er de dominerende symptomene, mens symptomer i øvre luftveier og mage-tarm symptomer er sjeldne (36). Ofte hos friske mennesker er det også rapportert at de har vært asymptomatiske. Basert på den nåværende informasjonen hadde de fleste pasienter en god prognose, mens noen få pasienter var i kritisk tilstand, spesielt eldre og personer med kroniske underliggende sykdommer som tidligere nevnt. Komplikasjonene inkluderte ARDS, arytmi, sjokk, akutt nyreskade, akutt hjerteskkade, leverfunksjon og sekundær infeksjon (8).

### *2.7.2 Influensasykdom og kliniske symptomer:*

Influenzavirus (IV) sprer seg fra person til person ved dråpesmitte som kan komme inn i luftveiene. Inkubasjonstiden er på 1-4 dager. Infeksjonen kan være asymptomatisk eller kan forårsake sykdom som varierer fra mild øvre luftveisinfeksjon til livstruende pneumoni. Hvert

10. - 40. år har det vært en influensa A-virus pandemi fordi det et eller annet sted har oppstått en IVA-subtype som store deler av verdens befolkning har manglet immunitet mot (6).

En studie fra Kina viser til at pasienter infisert med IVApdm09 har fått følgende kliniske symptomer: feber for mer enn 3 dager, alvorlig hoste med pussete sputum, blodige sputum eller smerter i brystet, rask pust, pustevansker og leppe cyanose, endret mental status, som langsom respons, hypersomni (over soving), dysfori og kramper, kraftig oppkast, diaré og tegn på dehydrering, tegn på lungebetennelse, raskt forhøyede nivåer av hjerteenzymer slik som kreatinkinase og kreatinkinase-MB og forverring av tidligere kroniske sykdommer (37). Rundt de virusinfiserte områdene oppstår det, ødem, bronkospasme og det skjer en infiltrasjon av leukocytter som bidrar til de kliniske symptomene (9).

Det er en forhøyet risiko i følge av pandemisk H1N1-influensa blant eldre, spedbarn, gravide kvinner, personer med kroniske lidelser, immunsuppresjon eller forsinket innleggelse på sykehus. For eksempel Gravide kvinner har blitt rapportert å ha økt risiko for pandemisk influensa. Sammenhengen mellom graviditet og den pandemien av H1N1-influensa viser at pasienter eller klinikere kan ønske å unngå antiviral behandling på grunn av bekymring for fosteret (37).

## **2.8 Påvisningsmetoder:**

Det finnes mange påvisnings metoder for å finne ut om en pasient er smittet eller ikke, samt og å identifisere virus. Ut ifra hvilket utgangspunkt man tar, som for eksempel ved forskning eller diagnostikk av pasienter, må en tenke på hva slags prøvemateriale en trenger for hvilke analyseprinsipp en bruker. En må ha i tankene at virus er intracellulære patogener, og en vil derfor bruke levende celler ved å benytte bruk av cellekultur for multiplikasjon og replikasjon av fort voksende virus (38). Særlig gjelder dette ved forskning, hvor en har behov for å holde viruset "i live" over en lengre periode. Ved klinisk diagnostikk derimot, er en mer interessert i å finne ut om en pasient er smittet eller ikke, og hvilket patogen en er smittet av, for å kunne gi riktig diagnose og behandling. Så derfor er ikke cellekulturer nødvendig, men en vil heller benytte e-swab og andre former for penselprøvetagnings utstyr.

### 2.8.1 PCR

En av de mest brukte metodene for diagnostik er PCR (polymerase-chain-reaction). Dette er en molekylær diagnostisk teknikk, som i hovedsak går ut på å kopiere en bestemt sekvens av DNA (eller RNA) i en prøve. Når det gjelder RNA-virus er; reverse transkriptase PCR (RT-PCR), typen av PCR-metode som benyttes. Dette er fordi med denne metoden blir RNA-et konvertert til cDNA. Med dette kan arvematerialet bli amplifisert med en større suksess rate. RT-PCR kan gjøres på to måter; ett-trinns RT-PCR og to trinns RT-PCR (39).

Ved ett-trinns RT-PCR, er begge enzymene tilsatt i samme buffer, og primerene er både brukt for revers transkripsjon og DNA-amplifikasjon. Ved to trinns RT-PCR, blir den reverse transkriptasen utdøvd først, vanligvis med tilfeldige hexamerer (eller en poly-dT oligonukleotid), for priming av poly-A halen på mRNA-et. Etter den reverse transkriptasen, kommer det andre PCR-trinnet utført på cDNA med spesifikke primere (39).

### 2.8.2 Enzym immunoassay (EIA):

Ved EIA er det 2 generelle tilnærminger for diagnostisering av sykdommer eller tilstander; testing for spesifikke antigen eller testing for antigen-spesifikke antistoff. Noen EIA-prosedyrer gir diagnostisk informasjon og måling av antistoff for å detektere pasientens immunstatus. Et eksempel kan være å detektere det totale mengden av IgG og IgM. ELISA er en type EIA metode, som er konstruert for å detektere antigener eller antistoffer ved å produsere et enzym-trigget farge forandring.

Når immunoassays mangler tilstrekkelig spesifisitet, eller sensitivitet, kan molekylære tester som inkluderer hybridisasjon og amplifikasjon metoder gjøre en forskjell. Molekylære metoder har tatt over for serologiske tester for hurtig diagnoser for mange forskjellige infeksjøs sykdommer.

Det finnes omkring 28 typer av molekyliske-influensa-tester som er klarert for bruk av FDA (US Food and Drug Administration), dette er tester som laboratoriene bruker benytter i et vidt spekter for testing av influensa (38).

Hurtige EIA-tester går fort, (i løpe av noen timer), men har ofte dårlige diagnostisk sensitivitet og lave positive prediktive verdier til sammenlikning med kultur baserte metoder



og molekylære metoder. Direkte fluorescens-antistoff deteksjons tester (DFA) for virus antigen på sentrifugerte cellulære materialer fra nasopharynx e-swab, aspirater, eller vaskede prøver demonstrerer en høyere rate av deteksjon enn hurtige antigen tester og kan gi resultater rimelig fort, i området fra 2 til 4 timer. Men deteksjonsratene er lavere for antigen deteksjons metoder enn for NAAT-tester (40).

### 3. Metodebeskrivelse:

Her vil vi gi en beskrivelse av metodene vi har brukt for å besvare problemstillingen vår.

Vi startet med å gå inn på NTNUs universitets nettbibliotek for å finne en søkemotor. Av tidligere oppgaver og erfaringer har PubMed og NCIB vært gode kilder til artikler. Primært er det disse søkemotorene som har blitt brukt. Vi fikk også et tips via et søkekurs om at Oria var en god søkemotor, som vi også har brukt for å finne artikler. Vi søkte med søkeord som kunne være innenfor det temaet og problemstillingen som vi hadde valgt, for å finne aktuelle artikler som kunne hjelpe oss for å finne relevant informasjon. I tillegg har vi begrenset søket med begrensingsfunksjon som finnes på søkemotorene. For eksempel, vi har valgt artikler kun på engelsk språket og artikler fra de siste 10 årene. Når det gjaldt definisjoner på enkelte ord, ble google benyttet som søkemotor.

Hos enkelte artikler var det linker til andre artikler som hadde liknende temaer eller problemstillinger i fagområdet vi var ute etter. For å se om artiklene er godkjente eller holder høyt akademisk nivå ble publiseringskanaler som DBH ([dbh.nsd.uib.no](http://dbh.nsd.uib.no)), DOI ([doi.org](http://doi.org)) og DOJA ([doja.org](http://doja.org)) brukt.

Første runde av gjennomlesningen av kilder så vi på hvilke artikler som kunne være relevant, noen var mer relevant en andre mens noen måtte velges bort. Vi innså at problemstillingen vi hadde ble for stor og måtte begrense den til å bli enda mer spesifikk.

I andre runde fant vi andre kilder som passet bedre med vår problemstilling, enkelte kilder som vi var avis artikler var mer for inspirasjon enn fakta-skriving. Mediene i disse månedene har tett fulgt utviklingen av COVID-19 pandemien, men er ikke å regne som pålitelige kilder. Gjennom de første ukene fant vi kilder samt, kladdet teori og innledningen.

Vi har valgt å ta med en ordliste med forkortelser, fordi begrepene som er lange og av engelsk opphav, og for å gjøre teksten mer leservennlig.

Vi utarbeidet tabeller som ga oversikt over søkeordene vi hadde benyttet og fakta vi hadde funnet i artiklene om de forskjellige virusene og dette er presentert under resultater. Etter hvert sorterte ut hvilke kilder som var mer relevant enn andre. Vi benyttet også pensumbøker

innen biokjemi, mikrobiologi og cellebiologi for å få en helhetlig forståelse av de forskjellige molekylene og deres funksjoner.

Underveis søkte vi etter nye artikler mens vi jobbet med å skrive. Selv om vi ikke benyttet alle artiklene, var også de vi ikke benyttet med på å hjelpe oss med å få kunnskap om temaene.

## 4. Resultater:

### 4.1 Tabell 1: Søkeord om IVApdm09:

Tabell 1: Viser en oversikt over søkeordene brukt til søk for IVApdm09:

	Søkeord:
<b>IVApdm09</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Influenza A(H1N1)pdm09,</li><li>• Sia<math>\alpha</math>2-3Gal<math>\beta</math>1- Receptor,</li><li>• Sia<math>\alpha</math>2-6Gal<math>\beta</math>1- Receptor</li><li>• HA-reseptor,</li><li>• NA-reseptor,</li><li>• H1N1,</li><li>• Sialic acid receptors,</li><li>• Influenza pandemi,</li><li>• Transmission of influenza h1n1,</li><li>• Antigenic characterization of influenza a h1n1, Hemagglutinin receptor,</li><li>• Glykoprotein hemagglutinin,</li><li>• Sialoglycoconjugates,</li><li>• NAC-reseptorer,</li><li>• Replikation influenza</li></ul>

#### 4.2 Tabell 2: Søkeord om SARS-2

Tabell 2: Viser en oversikt over søkeordene brukt til søk for SARS-2:

	<b>Søkeord:</b>
<b>SARS-2</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Receptorbinding of ACE2 characteristics,</li><li>• Coronavirus disease 2019,</li><li>• SARS-CoV-2,</li><li>• COVID-19,</li><li>• Coronavirus, ACE2,</li><li>• Entry (inngang), detection,</li><li>• SARS,</li><li>• Severe acute respiratory syndrome Coronavirus,</li><li>• SARS,</li><li>• SARS-CoV-2 spike protein,</li><li>• Nidovirales,</li><li>• Coronavirus,</li><li>• Positive RNA viruses,</li><li>• SARS-CoV,</li><li>• MERS-CoV</li><li>• Coronaviruses</li><li>• Origin,</li><li>• Outbreak</li><li>• Spread</li><li>• ACE-Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers</li></ul>

### 4.3 Tabell 3: Søkeord om definisjoner, betegnelser og figurer

Tabell 3: Viser en oversikt over søkeordene brukt til søk for definisjoner, betegnelser og figurer:

	<b>Søkeord:</b>
<b>Definisjoner og betegnelser:</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Real-time reverse transcription-PCR mRNA,</li><li>• Renin-Angiotensin System,</li><li>• Antigen shift,</li><li>• Antigen drift,</li><li>• Fusion mechanism,</li><li>• Fusion protein</li><li>• Class 1 viral fusion proteins</li><li>• Virus entry</li></ul>
<b>Figur søk:</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Spike protein initiation of cell fusion</li><li>• Hemagglutinin initiation of cell fusion</li><li>• Spike protein</li><li>• Hemagglutinin</li></ul>

#### 4.4 Tabell 4: Oversikt over generelle hovedpunkt for forskjeller og likheter mellom virusene:

Tabell 4: Viser en oversikt over de generelle hovedpunkt i forskjeller/likheter mellom SARS-2 og IVApdm09, som vi har funnet gjennom kilder:

Generelt om SARS-2	Generelt om IVApdm09
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nidovirales ordenen.</li> <li>• Coronaviridae familien.</li> <li>• Beta-coronavirus.</li> <li>• Sortert etter fysiologisk klynging.</li> <li>• Virusets størrelse ca.125nm.</li> <li>• Membrankledd.</li> <li>• Positiv-enkeltrådet RNA.</li> <li>• Genomets størrelse ca.26-32kb.</li> <li>• Koder for 7 proteiner.</li> <li>• Er 96,2% identisk med CoV-RaTG13 og 79,5% identisk med SARS-1.</li> <li>• Har fire strukturelle protein; S, E, M, N.</li> <li>• Forårsaker milde til alvorlige respiratoriske symptomer.</li> <li>• RNA- et kan direkte "oversettes".</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Articulavirales ordenen.</li> <li>• Ortomyxovirus familien.</li> <li>• Influenza A species.</li> <li>• Sortert etter overflateprotein; eks. H1N1.</li> <li>• Virusets størrelse omtrent fra 80-120nm.</li> <li>• Membrankledd.</li> <li>• Negativt-segmentert-enkeltrådet RNA.</li> <li>• 8 segmentert RNA.</li> <li>• Har et polymerase enzym for hvert av RNA segmentene</li> <li>• Hyppig mutasjoner; antigen shift/drift.</li> <li>• Har fire strukturelle protein; HA, NA, M1 og M2.</li> <li>• Det negative ladede RNA må gå gjennom en revers translasjon til å bli et positivt ladet RNA for replikasjon og translasjon. Ved bruk av enzymet RdRp.</li> </ul>

#### 4.5 Tabell 5: Oversikt over generelle hovedpunkt for egenskapene til antigen og celle reseptorene

Tabell 5: Viser en oversikt over generelle hovedpunkt for egenskapene til antigen og celle reseptorene:

<b>SARS-2-S-protein:</b>	<b>Hemagglutinin (H1):</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Type 1 transmembran protein.</li> <li>• Membran fusjon.</li> <li>• Inneholder to subenheter S1 og S2.</li> <li>• Klasse 1 fusjons protein.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Avhengig av pH for å initiere binding til membran.</li> <li>• Kan mutere/byttes ut ofte via antigen shift/drift.</li> <li>• Membran fusjon.</li> <li>• Hoveddeler: stilk og hodet.</li> <li>• Fester seg til sialinsyre i glykoproteiner.</li> <li>• Klasse 1 fusjons protein.</li> </ul>
<b>ACE2-reseptor:</b>	<b>Sia<math>\alpha</math>2-3Gal<math>\beta</math>1-og Sia<math>\alpha</math>2-6Gal<math>\beta</math>1- reseptorene:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transmembran protein.</li> <li>• Finnes på celler i hjerte, lunger, nyrer, testikler og på mage-tarmorganer.</li> <li>• Katalyserer spalting av ang 1.</li> <li>• Høy affinitet for ang 2- er med på å opprettholde homeostasen for blodtrykk.</li> <li>• Er vevsspesifikk; lunge, hjertet, testikler, o.a. organer.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glykokonjugat som inneholder sialinsyre.</li> <li>• Sialinsyre er det hemagglutinin fester seg til på glykoproteiner.</li> <li>• Sia<math>\alpha</math>2-3Gal<math>\beta</math>1- Reseptor, uttrykkes i alveolene og kan uttrykkes i noen deler av øvre luftveier.</li> <li>• Sia<math>\alpha</math>2-6Gal<math>\beta</math>1- Reseptor, uttrykkes dominant i øvre luftveier.</li> <li>• Har med celle-celle kommunikasjon å gjøre.</li> </ul>



#### 4.6 Tabell 6: Oversikt over generelle symptomer for COVID-19 og

#### Influenza

Tabell 6: Viser en oversikt over symptomene for influensa og COVID-19

<b>COVID-19 symptomer:</b>	<b>Influenza pdm09 symptomer:</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Tørr hoste</li><li>• Hodepine</li><li>• Pustevansker</li><li>• Feber</li><li>• Diare</li><li>• Kan utvikles til pneumonia</li><li>• Forvirring/ nedsatt allmenntilstand</li><li>• Komplikasjoner:</li><li>• Kan utvikle Akutt respiratorisk distress syndrom (ARDS)</li><li>• Akutt nyreskade</li><li>• Akutt hjerteskanade</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Feber</li><li>• Hodepine</li><li>• Slimhoste</li><li>• Rennende nese</li><li>• Oppkast</li><li>• Diaré</li><li>• Kan utvikle primær-virus pneumonia</li><li>• Sekundær bakteriell pneumonia</li></ul>

## 5. Diskusjon

### 5.1 Metode diskusjon:

#### 5.1.1 Hvordan gikk vi frem?

I de første to ukene la vi en plan for hvordan vi skulle jobbe, samt at vi ble enige om innholdet i første utkastet av problemstillingen. Deretter skulle vi lete etter artikler og andre kilder, for å kunne tilegne kunnskap om de forskjellige virusene. Vi så også etter andre relevante kilder som vi kunne benytte i oppgaven vår. Som gruppe ble vi enige om å dele oss i to, på den måten kunne vi dele ansvaret for å fordype oss i hvert vårt virus. Etterhvert som vi begynte skrivingen, kunne vi både lese hva vi hadde skrevet, samt å ha tilgang til artiklene vi hadde funnet om hvert virus. Med dette kunne vi også oppdatere oss for begge virusene.

Prosjektplanen vår inneholdt vårt valgte tema: (*hvorfor er situasjon annerledes med Corona/ COVID-19 enn med f.eks. influensa virus pandemier?*). Vi lagde flere forslag for mulige problemstillinger ut ifra temaet vårt, og en tabell som hadde en oversikt over hvordan skal vi jobbe for hver enkelt uke. Hver uke hadde vi et gruppemøte hvor vi diskuterte hvordan uka hadde gått, og hvor langt vi har kommet på oppgaven. Under gruppemøtene ble vi enige om hva vi skulle spørre veilederen vår på det neste veiledningsmøtet. Vi har benyttet Microsoft Teams for å kommunisere sammen og med veilederen vår.

#### 5.1.2 Hvilke utfordringer oppstod underveis?

Av det innholdet vi først fant, var det vanskelig å få definert en problemstilling med tanke på hvordan oppgaven skulle skrives i lys av et bioingeniørfaglig ståsted. Hva kunne være meningsfylt for videre forskning? Flere ganger gjennom innhentes- og skriveprosessen ble problemstillingen modifisert, og spesifisert.

I startfasen på oppgaven var det vanskelig å finne nyttig informasjon. Dette skyldtes at det var svært begrenset av artikler av SARS-2 i den perioden. Det var en god del fremmede begreper som vi måtte lese oss opp i. Når det gjaldt influensa virusene var det mange forskjellige virus under samme samlebegrep. Det som skilte mange IVApdm09 virusene var enkelte punkt mutasjoner i deres genom som utgjorde variasjoner i membranproteinene hemagglutinin- og

neuvramidase, og kunne gi enkelte av pdm09 virusene litt andre egenskaper. Noen influensa pdm09 species hadde HA en høyere aviditet til  $\alpha$ 2-6 bindende sialinsyre reseptorer, mens NA-enzymatiske aktivitet var sterkt redusert, (eks: IVA/Nederland/602/09/). Og andre species hadde en lav HA aviditet og svak enzymaktivitet fra NA (eks: IVA/California/04/09).

I starten var det ikke så lett på finne aktuelle artikler på det som særlig gjaldt SARS-2, mye fordi det var og fremdeles er et ukjent virus som er under forskning. For hver dag under pandemiperioden har forskere funnet ut noe nytt for hver dag. Nykommen litteratur om IVA, var vanskelig å finne, ettersom mange artikler var eldre enn 5 år. Derfor måtte vi å søke på litt eldre litteratur.

Alle artiklene som vi har brukt var på engelsk, så det var en stor utfordring for oss å forstå de medisinske begrepene, oversette de til norsk og formulere informasjonen, slik at det skulle bli enkelt og lett for leseren å forstå. Det var mye vi måtte sette oss inn i, med tanke på kompleksiteten til mekanismene bak membranfusjonen.

### *5.1.3 Vurderinger:*

Etter at vi fant en problemstilling så kunne vi gå gjennom artiklene og skille mellom relevante og ikke relevante artikler i forhold til problemstillingen vår. Underveis ble nye kilder lagt til og andre skiftet ut etter relevans for oppgaven. Enkelte kilder som ikke ble brukt, ga oss en pekepinn og inspirasjon til hva mer vi kunne søke på og få skrive om. Vi måtte hele tiden ta vurderinger om hva vi ville ha med i teksten og hva som måtte kuttes ut.

## **5.2 Sentrale funn:**

### *5.2.1 Forskjeller og likheter i struktur, symptomer*

COVID-19 og influensa smitter fra menneske til menneske via kontakt og dråpesmitte. Smitten fra person til person skjer først og fremst gjennom nærkontakt med infiserte personer eller med infiserte objekter. Ved smitte via infiserte objekter overføres smitten i kroppen ved at man tar på objektet for så å ta seg i ansiktet og på munnen. Kontakten med slimhinnene, gjør at viruset entrer inn i kroppen. Begge sykdommene presenterer symptomer som feber, hoste, tretthet, slim utskillelse, nedsatt allmenntilstand, og sår hals, er vanlig for de fleste som

har blitt smittet av sykdommene. Pustevansker er mer utbredt hos COVID-19 pasienter, mens hodepine er noe mer vanlig hos influensa syke. Eldre (over 65år) og personer med kroniske underliggende sykdommer er å antas som mest utsatt for COVID-19, som også gjelder for influensa. I influensa pandemien i 2009, gikk det derimot mest utover den yngre generasjonen. Det ble da diskutert om dette skyldtes at de eldre hadde vært utsatt for liknende virus tidligere.

Siden både influensa og COVID-19 har mange likheter, er det vanskelig å skille sykdommene uten testing. Mediene har i løpet av tiden som har gått spekulert i andre symptomer for COVID-19 som for eksempel utslett og hjernehinnebetennelse. Det er også registret at mange COVID-19 pasienter har høyt blodtrykk, som kan være et resultat av at SARS-2 binder seg til ACE2 reseptoren som har med regulering av blodtrykk.

Det har vært spekulasjoner om at hjerte pasienter burde slutte med blodtrykksmedisinene sine, fordi det kan fremme mengden av ACE2 reseptorer på cellenes overflate. Dette vil dermed gi SARS-2 viruset større sjanse for infisering av celler, (41). Dette har ennå ikke blitt bevist. Og det diskuteres også om hypoteser på at medisinene kanskje heller kunne ha en beskyttende effekt, ved at ACE-blokkere hindrer synteseringen av Ang 2 som er en (42) .

I strukturen er begge virusene sfæriske med en yttermembran hvor antigenene sitter. Ut ifra det vi har funnet ut, har SARS-2 og IVA pdm09 forskjellige strukturproteiner som har veldig like oppgaver. Av andre forskjeller, er at IVA pdm09 hadde et segmentert genom, mens SARS-2 hadde en sammenhengende RNA-tråd med forskjellige ladninger. Dette er et av utgangspunktene for at virusene hadde forskjellige replikasjonsmekanismer.

IVA pdm09 og SARS-2 er fra forskjellige virus familier. IVA pdm09 sitt genom er av enkelttrådet negativ ladd RNA, mens SARS -2 er enkelttrådet positivt ladd RNA-virus. Dette gjør at IVA må gjennomgå en litt mer kompleks translasjon og replikasjonsfase, ved at viruset benytter et eget enzym; RdRp, (RNA-dependent RNA polymerase), for å omgjøre sitt negative RNA, til positivt ladd RNA og dermed bli mer kompatibelt for translasjon. I motsetning til SARS-2 som allerede har et positivt RNA og kan da direkte” oversettes” til virus proteiner.

IVA har også segmenter arvematerialet sitt i 8 deler, hvorav hver del er har hvert sitt RNA-polymerase kompleks. Hos SARS-2, ser det ut til at genomet er en helhetlig tråd, som er pakket sammen av proteiner.

En av de metodene man bruker for å påvise den nye coronavirus er PCR-metoden. Den er pålitelig, men det tar flere timer for å få svar. Materialet man bruker er sekret fra luftveiene.

Serologiske tester som ELISA-metoden blir også brukt for å påvise virus. Den går ut på antigen/antistoff påvisning. Det er viktig å merke at man danner ikke antistoff tidlig i sykdomsforløpet, og da er PCR bedre egnet til å detektere viruset tidlig.

### *5.2.2 Bindingsprosessen, reseptorene og deres funksjoner:*

ACE2 er et transmembranprotein som har enzymatiske egenskaper. Og viser seg å uttrykkes sterkt i alveolære epitelceller, noe som forklarer den høye risikoen for pneumonia. ACE2 har en høy affinitet til angiotensin 2, et molekyl som er med på reguleringen av blodtrykket.

Sialin-6-galactose-1 er et glykoprotein med sialinsyre. Til nå vet vi at glykoproteinkomplekser og liknende på cellenes overflate er sentrale i kommunikasjonen mellom cellene, men vi har ennå ikke fått kartlagt og forstått hva de forskjellige strukturenes funksjoner. Det vi fant var at IVA H1N1pdm09 benyttet denne type reseptor for å entre cellen og at viruset var avhengig av pH for å kunne starte fusjonsprosessen til endosomet. Dette løser den med å åpne et av den membranproteinene; M2. M2 proteinet åpnes når miljøet utenfor viruset er surt, dette fører til at pH-en ved viruset blir senket slik at det vil initiere bindingsprosessen mellom HA og endosomets membran.

S- protein og hemagglutinin er av klasse 1 fusjons proteiner så de har nesten samme mekanismer for initiering av fusjonen mellom virusenes og cellens membraner. S-proteinet binder seg til ACE2-reseptoren som er i celleoverflaten og ved hjelp av proteaser som TMPRSS2 kommer den inn i cellen via endocytose. Det er mye som er ukjent ved bindingsprosessen bak SARS-2, men mye tyder på at bindingsmekanismene kan være ganske lik SARS-1.

HA-proteinet binder seg til sialinsyre holdige glykoproteiner som finnes på cellemembranen hos vertscellen. Noe som gjorde IVApdm09 spesiell var at den både kunne binde seg til

sialinsyrer via  $\alpha$ 2-6 og  $\alpha$ 2-3 bindinger. En egenskap som gjør at viruset kan ha alt fra milde luftveissymptomer til alvorlig pneumoni.  $\alpha$ 2-3 bindingene var mest funnet i alveoleceller, mens  $\alpha$ 2-6 var uttrykt dominant i de cilierte cellene i øvre luftveier. Mye er usikkert om hvilke spesifikke funksjoner glykoproteinene har. Men grovt fortalt er de sentral for celle-celle kommunikasjon, samt reseptorer for hormoner og lignende.

### *5.2.3. Påvisningsmetoder, kort oppsummert:*

En av de mest brukte metodene for påvisning av det nye Coronaviruset er PCR-metoden. Det baserer seg på et enkelt prinsipp, ved å tilsette enzymer, primere og genmaterialet i en mastermix. Mastermixen vil gjennomgå sykluser med temperaturendringer slik at forholdene skal bli optimale for replikasjon. Resultatet er økt mengde med spesifikke tråder av RNA som kan identifisere viruset. Den er pålitelig, men det kan flere timer for å få svar. Materialet man bruker er sekret fra luftveiene. Serologiske tester som ELISA-metoden blir også brukt for å påvise virus. Den går ut på antigen/antistoff påvisning. Det er viktig å merke at man danner ikke antistoff tidlig i sykdomsforløpet, og da er PCR bedre egnet til å detektere viruset tidlig

## **5.3 Konsekvenser for fagområdet**

Bioingeniører har en særdeles viktig rolle i slike pandemier. De skal blant annet ta prøver av pasienter, ikke minst skal de gjenkjenne og påvise smitte. I disse uvanlige tider er laboratorienes kapasitet og evne til omstilling viktig når det står om liv og helse.

Allerede er hurtigtester klare og under utvikling, men fremdeles kan ikke noen av hurtig testene brukes for utelukkning av infeksjon. Dvs. at en negativ test betyr nødvendigvis ikke at en pasient ikke er smittet. Og ennå er det slik at for å ta en hurtig test må det gå minst 14 dager etter sykdomsutbrudd.

Det er mye arbeid som gjenstår med å forstå og kartlegge alle prosessene som skjer både utenfor og inne i cellene og deres samarbeid med andre celler. I tillegg til de konsekvensene som forkommer under ved virusinfeksjoner. Det trengs mer forskning på cellereseptorenes funksjoner i kroppen og hvilke innvirkninger de har, og mer forskning på selve viruset og virus proteiner.

Resultatene vi har funnet har viktige betydninger og innvirkninger for bioingeniør fagområdet generelt og det trengs mer forskning for å kunne si noe mer og videre bekrefte de funnene i oppgaven

#### **5.4 Konklusjon**

Virusene har sine likheter og forskjeller, men hvordan SARS-2 er forskjellig fra Influenza A H1N1 pdm09 ut ifra måten de kobler seg til celler på? Virusene har veldig like mekanismer for tilkobling til cellen. Begge av de initierende fusjonsproteinene; HA og S-proteinet er klassifisert i samme strukturelle gruppe, som kan tilsi at de har likheter i hvordan de initierer membranfusjon på. Virusene er tilpasset til hver sin reseptor og er avhengig av forskjellige mekanismer for at infiseringen av cellen skal skje. Både SARS-2 og IVApdm09 kan gi mange like symptomer både milde og alvorlige. SARS-2 er under forskning og dets egenskaper er fremdeles ikke er fullstendig kartlagt.

## 6. Referanser:

1. European Centre for Disease Prevention and Control [Internett]. [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu): European Centre for Disease Prevention and Control; 2020 [updated 16.05.2020; cited 2020 06.05]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19-pandemic>.
2. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. J Adv Res [Internet]. 2020 Jul [cited 2020 23.04]; 24:[91-8 pp.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7113610/pdf/main.pdf>.
3. Halvor R, ; Fredrik, Müller,; Tone, Tjønum (red). Coronavirus og norovirus. In: Grete B, Kro, editor. Medisinsk Mikrobiologi. 4 ed. St. Olavs plass 0130 Oslo: Gyldendal Norsk Forlag; 2019. p. 311-4.
4. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. Methods Mol Biol [Internet]. 2015 [cited 2020 20.03]; 1282:[1-23 pp.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4369385/>.
5. Hunt DR. VIROLOGY - CHAPTER TWENTY FIVE CORONA VIRUSES: COLDS, SARS, MERS AND COVID-19 [Internett]. <http://www.microbiologybook.org/2020> [updated 25.04. 2020; cited 2020 28.04]. Available from: <http://www.microbiologybook.org/virol/coronaviruses.htm>
6. Miklos D, ; Berit, Hovig,; Halvor, Rollag(red). Luftveisvirus. In: Hallvor R, editor. Medisinsk mikrobiologi 3ed. St. Olavs plass 0130 Oslo: Gyldendal Norsk Forlag; 2008. p. 297-316.
7. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Kruger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell [Internet]. 2020 16.04 [cited 2020 18.04]; 181(2):[271-80 e8 pp.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102627/>.
8. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. Mil Med Res [Internet]. 2020 Mar 13 [cited 2020 07.04]; 7(1):[11 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7068984/>.
9. Hallvor RF, Müller,; Tone, Tønjum (red). Orthomyxovirus. In: Olav H, editor. Medisinsk mikrobiologi. 4 ed. St.Olavs plass 0130 Oslo: Gyldendal Norsk forlag; 2019. p. 295-300.
10. AGENSEGENSKAPER [Internett]. Universitet i Oslo; 2020 [cited 2020 10.05]. Available from: <http://meddev.uio.no/elaring/lcms13/indremedisin/infeksjonsmedisin/nl-influenzavirus.xml?menuItemIndex=11>.
11. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. N Engl J Med [Internet]. 2020 Mar 26 [cited 2020 23.04]; 382(13):[1199-207 pp.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7121484/>.
12. Parry J. China coronavirus: cases surge as official admits human to human transmission. BMJ [Internet]. 2020 [cited 2020 23.04]; 368:[236 p.]. Available from: <https://www.bmj.com/content/bmj/368/bmj.m236.full.pdf>.
13. Dr Margaret H, ; Dr Richard, Hunt. VIROLOGY - CHAPTER THIRTEEN INFLUENZA VIRUS (ORTHOMYXOVIRUS) [Internett].



- <http://www.microbiologybook.org>; 2020 [updated October 30, 2016; cited 2020 23.04]. Available from: <http://www.microbiologybook.org/mhunt/flu.htm>.
14. Jaimes JA, André NM, Chappie JS, Millet JK, Whittaker GR. Phylogenetic Analysis and Structural Modeling of SARS-CoV-2 Spike Protein Reveals an Evolutionary Distinct and Proteolytically Sensitive Activation Loop. *J Mol Biol* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2020 25.03]; 432(10):[3309-25 pp.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7166309/>.
  15. Millet JK, Whittaker GR. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res* [Internet]. 2015 16.04 [cited 2020 12.04]; 202:[120-34 pp.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4465284/>.
  16. Tete SM, Krammer F, Lartey S, Bredholt G, Wood J, Skrede S, et al. Dissecting the hemagglutinin head and stalk-specific IgG antibody response in healthcare workers following pandemic H1N1 vaccination. *NPJ Vaccines* [Internet]. 2016 [cited 2020 16.04]; 1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5707877/>.
  17. Tapia R, Torremorell M, Culhane M, Medina RA, Neira V. Antigenic characterization of novel H1 influenza A viruses in swine. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Mar 11 [cited 2020 20.04]; 10(1):[4510 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7066140/>.
  18. Harrison SC. Viral membrane fusion. *Virology* [Internet]. 2015 May [cited 2020 05.05]; 479-480:[498-507 pp.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4424100/>.
  19. Kirkpatrick E, Qiu X, Wilson PC, Bahl J, Krammer F. The influenza virus hemagglutinin head evolves faster than the stalk domain. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Jul 11 [cited 2020 28.03]; 8(1):[10432 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6041311/>.
  20. Childs RA, Palma AS, Wharton S, Matrosovich T, Liu Y, Chai W, et al. Receptor-binding specificity of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus determined by carbohydrate microarray. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2009 Sep [cited 2020 18.04]; 27(9):[797-9 pp.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3771066/>.
  21. Cabral MG, Piteira AR, Silva Z, Ligeiro D, Brossmer R, Videira PA. Human dendritic cells contain cell surface sialyltransferase activity. *Immunology letters* [Internet]. 2010 [cited 2020 23.04]; 131(1):[89-96 pp.]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165247810000775?via%3DIihub>.
  22. Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol* [Internet]. 2009 Oct [cited 2020 25.04]; 19(5):[507-14 pp.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7127376/>.
  23. Kumlin U, Olofsson S, Dimock K, Arnberg N. Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism. *Influenza Other Respir Viruses* [Internet]. 2008 Sep [cited 2020 23.04]; 2(5):[147-54 pp.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4941897/>.
  24. Uprasertkul M PP, Sangsiriwut K, et al. Influenza A H5N1 Replication Sites in Humans. *Emerging Infectious Diseases*, 2005 [cited 2020 01.05]; 11:[1036-41. pp.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3371815/>.
  25. Xu R, Zhu X, McBride R, Nycholat CM, Yu W, Paulson JC, et al. Functional balance of the hemagglutinin and neuraminidase activities accompanies the emergence of the 2009 H1N1 influenza pandemic. *J Virol* [Internet]. 2012 Sep [cited 2020 12.04]; 86(17):[9221-32 pp.]. Available from: <https://jvi.asm.org/content/jvi/86/17/9221.full.pdf>.
  26. Maestri A, Sortica VA, Tovo-Rodrigues L, Santos MC, Barbagelata L, Moraes MR, et al. Siaalpha2-3Galbeta1- Receptor Genetic Variants Are Associated with Influenza

- A(H1N1)pdm09 Severity. PLoS One [Internet]. 2015 [cited 2020 29.04]; 10(10):[e0139681 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4593567/>.
27. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme–related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research* [Internet]. 2000 [cited 2020 23.04]; 87(5):[e1-e9 pp.]. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/01.RES.87.5.e1>.
28. Cheng H, Wang Y, Wang G-Q. Organ-protective effect of angiotensin-converting enzyme 2 and its effect on the prognosis of COVID-19. *Journal of Medical Virology* [Internet]. 2020 [cited 2020 27.04]; n/a(n/a). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.25785>.
29. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotso M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol* [Internet]. 2014 Jul [cited 2020 10.05]; 4(3):[1201-28 pp.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4137912/>.
30. Kiely DG, Cargill RI, Wheeldon NM, Coutie WJ, Lipworth BJ. Haemodynamic and endocrine effects of type 1 angiotensin II receptor blockade in patients with hypoxaemic cor pulmonale. *Cardiovascular Research* [Internet]. 1997 [cited 2020 02.05]; 33(1):[201-8 pp.]. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(96\)00180-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(96)00180-0).
31. Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* [Internet]. 2005 Jul 7 [cited 2020 01.05]; 436(7047):[112-6 pp.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7094998/>.
32. Astuti I, Ysrafil. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab Syndr* [Internet]. 2020 [cited 2020 05.05]; 14(4):[407-12 pp.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7165108/>.
33. Hamilton BS, Whittaker GR, Daniel S. Influenza virus-mediated membrane fusion: determinants of hemagglutinin fusogenic activity and experimental approaches for assessing virus fusion. *Viruses* [Internet]. 2012 [cited 2020 20.04]; 4(7):[1144-68 pp.]. Available from: [https://res.mdpi.com/d\\_attachment/viruses/viruses-04-01144/article\\_deploy/viruses-04-01144.pdf](https://res.mdpi.com/d_attachment/viruses/viruses-04-01144/article_deploy/viruses-04-01144.pdf).
34. Cao YC, Deng QX, Dai SX. Remdesivir for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 causing COVID-19: An evaluation of the evidence. *Travel Med Infect Dis* [Internet]. 2020 Apr 2 [cited 2020 10.05]:[101647 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7151266/>.
35. Li H, Liu SM, Yu XH, Tang SL, Tang CK. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): current status and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2020 Mar 29 [cited 2020 08.05]:[105951 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7139247/>.
36. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* [Internet]. 2020 Feb 7 [cited 2020 04.05]; 323(11):[1061-9 pp.]. Available from: [https://jamanetwork.com/journals/jama/articlepdf/2761044/jama\\_wang\\_2020\\_oi\\_200019.pdf](https://jamanetwork.com/journals/jama/articlepdf/2761044/jama_wang_2020_oi_200019.pdf).
37. Ren Y-y, Yin Y-y, Li W-q, Lin Y, Liu T, Wang S, et al. Risk factors associated with severe manifestations of 2009 pandemic influenza A (H1N1) infection in China: a case–control study. *Virology Journal* [Internet]. 2013 2013/05/15 [cited 2020 06.05]; 10(1):[149 p.]. Available from: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-149>.

38. Mary L, Turgeon. TEST FOR VIRUSES (VIROLOGY). Liinné & Ringsrud's Clinical Laboratory Science: Concepts, Procedures, and Clinical Applications. 8 ed. 3251 Riverport Lane, St. Louis, Missouri 63043: Elsevier; 2020. p. 530-2.
39. Nader R, ; Andrea, Rita, Horvath,; Carl, T, Witter, et.al. Molecular Techniques. In: Carl T, Witter,; G, Mike, Makrigiorgos, editor. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 8 ed. 3251, Riverport Lane, St.Louis, Missouri 63043: Elsevier Inc 2019; 2019. p. 936-60.
40. Nader R, ; Andrea, Rita, Horvath,; Carl, T, Witter, et.al. Molecular Applications. In: Frederick S, Nolte,; D, Hunter, Best,; Todd, William, Kelley,; et al editor. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 3251, Riverport Lane, St.Louis, Missouri 63043: Elsevier Inc 2019; 2019. p. 961-87.
41. Fang L, Karakiulakis G, Roth M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? Lancet Respir Med [Internet]. 2020 04 [cited 2020 15.05]; 8(4):[e21 p.]. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7118626/>.
42. Position Statement of the ESC Council on Hypertension on ACE-Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers [Internet]. Internet: European Society of Cardiology; 2020 [updated 13.03.2020; cited 2020. Available from:  
[https://www.escardio.org/Councils/Council-on-Hypertension-\(CHT\)/News/position-statement-of-the-esc-council-on-hypertension-on-ace-inhibitors-and-ang](https://www.escardio.org/Councils/Council-on-Hypertension-(CHT)/News/position-statement-of-the-esc-council-on-hypertension-on-ace-inhibitors-and-ang).

