

Cecilie Elisabeth Sørli og Karoline S. Martinsen

Hvilken metode egner seg best for diagnostisering av COVID 19: RT-qPCR eller indirekte ELISA?

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Bente Alm

Mai 2020

Cecilie Elisabeth Sørli og Karoline S. Martinsen

Hvilken metode egner seg best for diagnostisering av COVID 19: RT-qPCR eller indirekte ELISA?

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Bente Alm
Mai 2020

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



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Kjære leser,

Denne bachelor oppgaven er skrevet av to studenter ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) og representerer vårt avsluttende arbeid i en bachelor i bioingeniørfag. Formålet med denne bacheloroppgaven var å se på de ulike analysemetodene for viruset SARS-CoV-2. Dette for å vurdere fordeler og ulemper opp mot hverandre, for å se hvilken metode som er mest ideell å bruke til diagnostisering av COVID 19.

Koronavirus-pandemien har gitt oss noen utfordringer, da en bachelor oppgave som egentlig var tiltenkt et praktisk forsøk ikke kunne gjennomføres. Vi har måttet omstrukturert oss og vært fleksible etterhvert som vi har jobbet med oppgaven.

Vi vil rette en stor takk til vår veileder Bente Alm, for hennes støtte og gode veiledning gjennom hele prosessen.

Sammendrag

Sykdommen COVID 19 som er forårsaket av viruset SARS- CoV-2, ble ved starten av 2020 spredd over hele verden. Ettersom den har og enda påvirker mange land, i tillegg til flere aspekter ved samfunnet, er den blitt betegnet som en global pandemi (4). For å oppnå bedre kontroll over dette virusutbruddet, er rask og presis diagnostisering helt essensielt. Oppgaven under beskriver derfor de ulike fordelene og ulempene ved deteksjon av viruset ved bruk av RT- qPCR, i forhold til påvisning av antistoff med indirekte ELISA teknikk, slik at en vurdering rundt hvilken metode som er mest ideelle kan bli tatt.

For å se på fordelene og ulempene ved metoden, vurderte vi ulike faktorer som; spesifisitet, sensitivitet og praktiske forhold rundt metodene. Metodenes sensitivitet viste et noe varierende resultat, i forhold til hvor i sykdomsforløpet man testet. Men begge metodene viste høy spesifisitet. Disse funnene tyder på at den ideelle strategi for diagnostisering av COVID 19 vil være en kombinert analysering, som avhenger av hvor i sykdomsforløpet man er. Disse konklusjonene ga et større bilde rundt forståelse av kompleksiteten rundt de ulike utfordringene man kan møte, når man skal velge den metoden som best egner seg i en slik situasjon, vi som et samfunn står ovenfor nå.

Abstract

The disease COVID 19 caused by the SARS-CoV-2 virus, was spread all over the world at the beginning of 2020. Due to its effect on many countries and several aspects of the society, it has been termed a global pandemic (4). To achieve better control of this virus outbreak, rapid and accurate diagnosis is essential. The assignment below therefore describes the various advantages and disadvantages by detection of the virus by RT- qPCR, relative to the detection of antibody by indirect ELISA technique, so that an assessment of the most ideal method could be taken.

In order to look at the advantages and disadvantages of the method, we considered various factors such as specificity, sensitivity, and convenience of the methods. Sensitivity showed a somewhat varying result, depending on the time of testing in the course of the disease, but both techniques showed high specificity. These findings suggested that the ideal strategy for diagnosing COVID 19 would be a combined analysis, which depends on where in the course of the disease the tested person is. These conclusions gave a bigger picture of understanding the complexity of the various challenges one might face, when choosing a method that best suits this situation, we as a society are facing right now.

Innholdsfortegnelse

Forord	1
Sammendrag	2
Abstract	2
1. Introduksjon	4
2. Teori	5
<i>2.1 SARS- CoV-2</i>	<i>5</i>
<i>2.2 Analysemetoder</i>	<i>7</i>
2.2.1 RT- qPCR	7
2.2.2 Indirekte ELISA	10
<i>2.3 Nøyaktighet ved metodene</i>	<i>12</i>
3. Metode	14
4. Resultat	15
5. Diskusjon	18
<i>5.1 Spesifisitet</i>	<i>18</i>
<i>5.2 Sensitivitet</i>	<i>20</i>
<i>5.3 Praktiske forhold</i>	<i>23</i>
6. Konklusjon	24
7. Referanser	25

1. Introduksjon

Utbrudd av flere tilfeller av pneumoni med ukjent opprinnelse ble registrert i Wuhan, Hubei, Kina desember 2019. Selv om symptomene lignet viral pneumoni, fikk man negative svar ved testing av ulike real-time polymerasekjedereaksjon (PCR) panel for kjente virus. Det ble derfor varslet om et nytt patogen. Gjennom sekvensering av en pasients bronko- alveolær lavage (BAL) væske, ble det kjent at det nye patogenet er et koronavirus. Viruset fikk først navnet 2019- novel coronavirus (2019- nCoV) og senere severe acute respiratory syndrome- coronavirus- 2 (SARS-CoV-2). Den nye pneumonien viruset forårsaker, ble kalt coronavirus disease 2019 (COVID 19) (4, 5).

På grunn av virusets evne til å spre seg raskt, erklærte verdens helseorganisasjon (WHO) COVID 19 for en pandemi den 11.mars (4). For å få kontroll på situasjonen er det viktig å fastslå hvem som er smittet, for å kunne hindre at disse ikke viderefører sykdommen ukontrollert. Forskning viser også at man kan være bærer av viruset, uten å vise symptomer (6). Om man ikke finner disse smittebærerne, vil de være en trussel for samfunnet. På grunn av et symptom bilde som er for generelt og ikke spesifikt nok til å alene fastslå COVID 19, er gode laboratorieundersøkelser essensielle for å stille diagnosen.

Real time revers transkriptase PCR (RT- qPCR) ble raskt utviklet for å kunne detektere viruset som forårsaker sykdommen. Litt senere kom metoder som kan påvise antistoffer mot viruset, slik som indirekte enzyme-linked immunosorbent assay (indirekte ELISA). Siden sykdommen påvirker store deler av samfunnet, er viktigheten av en viss kontroll rundt situasjonen stor. En slik kontroll kan komme av korrekte og hurtige måter å diagnostisere sykdommen.

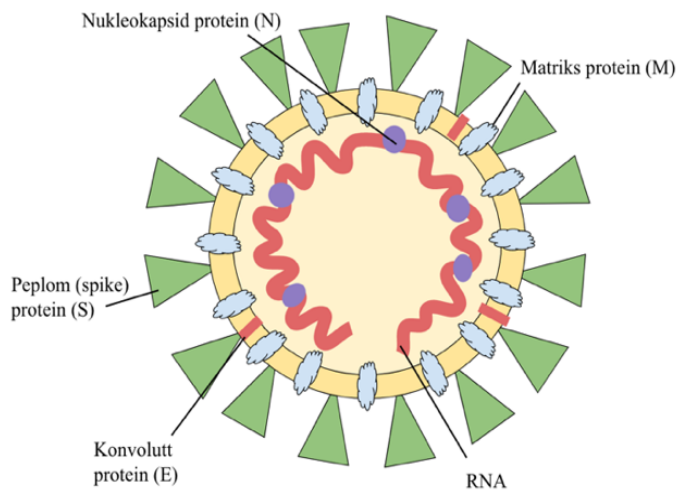
Problemstillingen for vår oppgave lyder derfor; *Hvilken metode vil være den ideelle for diagnostisering av COVID 19?* For å kunne besvare problemstillingen har vi valgt å se på de ulike fordelene og ulempene ved deteksjon av viruset ved RT- qPCR, i forhold til påvisning av antistoff ved bruk av indirekte ELISA.

2. Teori

2.1 SARS- CoV-2

Opphav og morfologi

SARS- CoV-2 ble kjent 10.januar som et koronavirus, og tilhører familien *coronaviridae* (7). Denne familien kan deles inn i alfa, beta, delta og gamma, der viruset tilhører gruppen betakoronavirus (8, 9). Viruset har i tillegg samme opprinnelse som de tidligere epidemiene Severe acute respiratory syndrome (SARS) i 2002-2003 og Middle east respiratory syndrome (MERS) i 2011, de er alle zoonoser (10). Arvemateriale til viruset er RNA og genomet har en størrelse på 29.9 kilobase (kb). Det koder for 27 proteiner, der 4 av dem er strukturelle proteiner, som vist i *figur 1*; peplom (spike) protein (S), små konvolutt protein (E), matriks protein (M) og nukleokapsid protein (N) (7, 11, 12).



Figur 1 SARS- CoV-2 med oversikt over de ulike strukturene. Figuren er basert på (1)

Infeksjon

COVID 19 kan ha alt fra et mildt til mer alvorlig sykdomsforløp (4). De mest vanlige symptomene er feber og pustevansker, men den kan utvikle seg til alvorlig lungesvikt og i verste fall død. For at viruset skal forårsake sykdom må det komme inn i kroppen, noe det kan gjøre via blant annet luftveiene, som er den primære inngangsporten. Overføring av virus mellom mennesker skjer via kontakt- og dråpesmitte. Inkubasjonstiden har i de fleste tilfeller vist seg å være rundt 5-6 dager, men kan variere fra 0-14 dager (9, 13).

Når kroppen blir presentert for et nytt virus vil den prøve å bekjempe dette, ved blant annet produksjon av spesifikke antistoffer. Tiden det tar fra utviklingen av antistoff starter, til det er mulig å påvise det i serum kalles serokonversjonstid. Den spesifikke mekanismen i forhold til immunsystemets respons for SARS-CoV-2 er noe ukjent, da viruset er såpass nytt. Men studier fra SARS epidemien i 2002 har vist at det er mulig å detektere IgM antistoff i blod etter 3-6 dager og IgG antistoff etter 8 dager (5). Dette er viktig kunnskap når man skal se på ulike metoder for å diagnostisere COVID 19.

Virologi

I forhold til virologien til viruset er S- og N- genene viktige. N- genet koder for proteinet nukleokapsid, som er bundet til RNA, se *figur 1*. Det er dette proteinet som finnes i størst mengde hos viruset, og på grunn av sin mengde spiller det en viktig rolle i å starte en immunrespons hos verten. Nukleokapsid proteinet er involvert i blant annet transkripsjon og replikasjon av det virale RNAet, og påvirkningen av cellyklusen hos vertscellen. Når et virus infiserer en celle tar det over «maskineriet» i cellen, og lager sine egne proteiner i vertscellen (11). Disse proteinene blir degradert inni cellen og det dannes peptidfragmenter som kan bli presentert ved hjelp av humane leukocyt-antigen I- molekyler (HLA I), som sitter på utsiden av cellen. Peptidet som blir presentert kan bli gjenkjent av T-celler, som videre vil kunne sette i gang en immunrespons. På denne måten kan proteiner som finnes inni viruset (slik som N-proteinene), skape en immunrespons hos vertsorganismen (14).

S- genen koder for peplom proteinet. Dette er svært immunogent, da det sitter i membranen av viruset (se *figur 1*). Proteinene kan deles i 2 forskjellige domener, S1 og S2. S1 har en kuleformet struktur, der funksjonen går på å gjenkjenne reseptorer hos målcellen. Det reseptorbindende området (RBD) av S1 vil binde seg til strukturer de gjenkjenner; målreseptorer hos vertens celler. For SARS-CoV-2 er dette angiotensinkonverterende enzym 2 (ACE2), som sitter i membranen hos målcellen. Bindingen av RBD og ACE2 gjør at viruset kan fusjonere med vertscellenes membran. S2 domenet binder S1 delen sammen med membranen til viruset (7, 11).

Når viruset har infisert vertscellen gjennom ACE2 settes den virale replikasjonen i gang. Denne kan føre til apoptose av epitel og endotelceller, i tillegg til vaskulær lekkasje. Sekresjon av en rekke pro-inflammasjons cytokiner; interleukin 2, 7 og 10 (IL 2, 7 og 10), granulocyt stimulerende faktor (G-CSF), induserbart protein 10 (IP-10), monocyt kjemoattraktant protein 1 (MCP-1), makrofag inflammatorisk protein 1A (MIP-1A) og tumor nekrose faktor alpha (TNF α), kommer som følge av den vaskulære lekkasjen (10, 15). I følge *Asian Pacific journal of allergy and immunology* kan denne lekkasjen av cytokiner føre til viral sepsis og lungeskade som følge av betennelsen (10).

Patogenese

Viruset vil formere seg i ciliert epitel i de øvre luftveiene (13), men som nevnt over er ACE2 inngangsporten til viruset inn i målcellene hos verten. Dette er den samme reseptoren som SARS- coronavirus (SARS-CoV) bruker. Ifølge Hamming, Timens et.al's studie (15) gjennomført i etterkant av SARS utbruddet i 2002, ser man at denne reseptoren er representert i celler hos nesten alle kroppens organer. Dette gjelder også lungene. I lungene finnes reseptoren på de alveolære epitelcellene, de vaskulære endotelcellene, makrofager og de glatte muskelcellene i arteriene. Disse cellypene finner man i de nedre delene av det respiratoriske systemet (f.eks. lungene) og det er derfor tenkelig at dette er det primære stedet for infeksjonen (15, 16).

2.2 Analysemetoder

For å stille en diagnose kan det gjøres på bakgrunn av symptomer, eller fra svar på laboratorieprøver. Siden symptomene for COVID-19 ikke er spesifikke nok, kan ikke de alene gi svar på om man er syk eller ikke. Derfor er metoder som RT- qPCR, der man påviser viruset og indirekte ELISA der antistoff mot spesifikke proteiner hos viruset detekteres viktig.

2.2.1 RT- qPCR

For deteksjon av SARS-CoV-2 ved bruk av PCR- metode, blir ofte RT- qPCR brukt. Dette er en teknikk som tillater genmaterialet til RNA- virus og bli omdannet til cDNA ved hjelp av revers transkriptase. Det nydannede cDNA molekylet går videre inn i qPCR, for amplifisering og deteksjon (17).

Reaktanter

For å detektere viruset med RT- qPCR trenger man ulike komponenter. De viktigste er; prøvematerialet fra pasienten.

Her blir prøven tatt med en liten børste (swab) hvor målet er at det sitter virus og eller virusinfiserte celler på. Prøven tas fra svelg (oralt) og/eller nasofarynks (øvre luftveier), og blir oppbevart i en beholder med virustransportmedium. Virustransportmediet er viktig for å opprettholde levedyktigheten til eventuelle virus i prøven under transporten. I spesielle situasjoner kan BAL- væske som prøvemateriale være aktuelt, dette er materiale fra de nedre luftveiene (18).

For å omdanne RNA til et komplementært enkelttrådet DNA-molekyl, trengs enzymet revers transkriptase (19). Den videre dannelsen av ny komplementær DNA-tråd gjøres av DNA-polymerase. Begge polymerase enzymene bygger ny DNA-tråd ved bruk av deoksyribose nukleosid trifosfater (dNTP). For at polymerasene vet hvor på DNA/RNA tråden de skal binde seg og starte syntetiseringen trengs primere (20).

Primere er korte DNA sekvenser på 18-24 basepar. De velges med tanken om at de kun skal feste seg til den sekvensen på genmaterialet man ønsker å amplifisere, og at bindingene skal være gode. Bindinger dannes med en optimal temperatur, gjerne 5-7° C lavere enn smeltepunktet til primerne (21). Tilslutt i RT- qPCR trengs et molekyl som kan avgi et fluorescerende signal (se mer under avsnitt *Deteksjon av produkt*). Dette er grunnlaget for resultatet til metoden (22).

Trinnene i RT- qPCR

Viruset er som nevnt over, et virus med RNA som genmateriale. For å kunne detektere RNA fra viruset ved RT- qPCR må cellene først gjennom en lysering, denne prosessen kalles ekstraksjon (23). Når genmaterialet har blitt tilgjengelig kan det bli omdannet til DNA. Dette skjer gjennom 3 enzymatiske trinn, som inngår inn i revers transkriptase delen av RT- qPCR.

Disse 3 trinnene er;

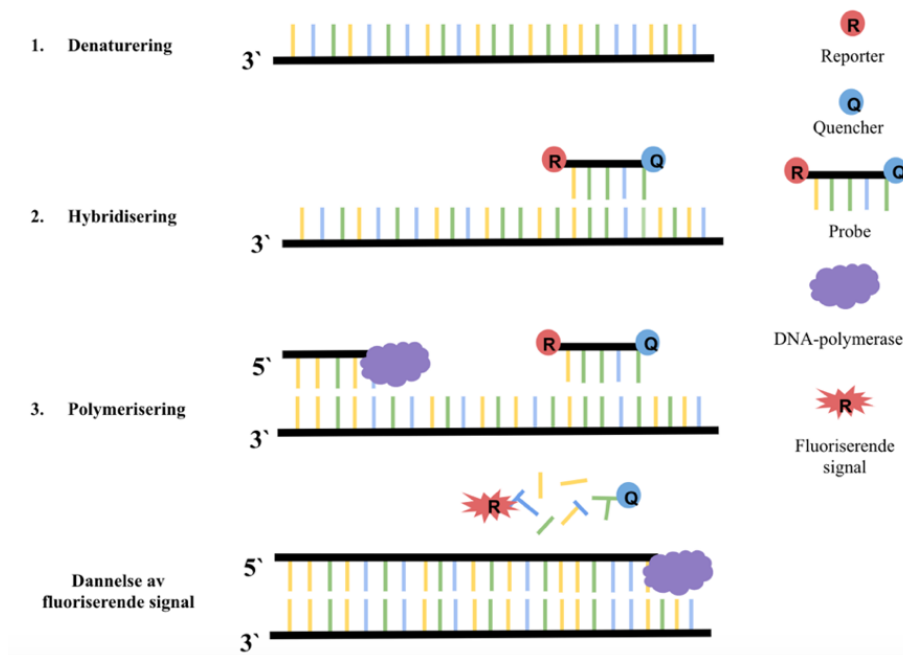
1. Syntetisering av RNA- molekylet til dens komplementære DNA- tråd, ved hjelp av enzymet revers transkriptase. Dette enkelt trådede DNA-molekylet kalles cDNA, og vil være festet sammen med det opprinnelige RNA- molekylet i en dobbelheliks.
2. Ribonuclease H, et domene på revers transkriptase fjerner RNA delen fra RNA-DNA dobbelhelixen. Dette gjør at vi får en fri cDNA tråd.
3. Tilslutt vil DNA-polymerase fullføre DNA-syntesen, og sluttproduktet blir et dobbeltrådet DNA- molekyl (24).

Når dannelsen av et komplett DNA- molekyl er ferdig kan qPCR- delen starte. Det er en sanntids polymerase reaksjon, som gjør at man kan overvåke amplifiseringen av en målrettet DNA- sekvens. Før man kommer til deteksjonen må sekvensen gjennom 3 ulike trinn (en syklus) som vist i *figur 2*. De ulike trinnene foregår inne i en PCR- maskin, som regulerer temperatur etter ønsket program (20). En syklus gjentas ca. 30-40 ganger, avhengig av mengde genmateriale tilgjengelig i prøven fra start.

1. Først må det dobbeltrådet DNA- molekylet (templatet) bli varmet opp til 95° C, dette kalles *denaturering*. Dette gjøres for å bryte hydrogenbindingene mellom dobbelheliksen.
2. Neste trinn er *hybridisering*. Blandingen avkjøles til 55-60° C, slik at primerne kan binde seg til det komplementære området på hver sin DNA-tråd.
3. Til slutt skjer *polymeriseringen* ved en temperatur på 72° C. Her dannes ny DNA- tråd, ved hjelp av DNA polymerase som syntetiserer fra primerens start (25).

Deteksjon av produkt

Deteksjon av PCR-produktet som skjer etter hver syklus, kan gjøres ved TaqMan basert deteksjon. TaqMan er en spesifikk deteksjonsmetode, hvor man har en probe som er en kort basesekvens. I den ene enden er det bundet en reporter (R) og i den andre en quencher (Q), se *figur 2*. Reporteren er det fluoriserende molekylet, mens quencheren har som oppgave å hindre stråling fra reporteren i å nå ut. Så lenge reporter og quencher er nær hverandre, vil man ikke kunne måle fluorescenseemisjonen, men ettersom syntetisering av nytt DNA starter vil dette bli mulig. Dette fordi polymerasen vil skrive over sekvensen til proben, som resulterer i at både reporteren og quencheren frigjøres. Da vil fluorescenseemisjonen reporteren sender ut være mulig å detektere, siden quencheren ikke lenger vil hindre den. Dannelsen av DNA produkt er direkte proporsjonal med grad av emisjon (26, 27).



Figur 2 Prinsippet bak bruk av TaqMan probe til deteksjon av produktet ved RT- qPCR. Figuren er basert på (2).

Resultatet av RT- qPCR ses i form av en graf der x-aksen er tid og y-aksen er mengde DNA. Dette kan bli registrert med et kamera eller en detektor, slik at man underveis kan følge med på amplifiseringen av det ønskede genmaterialet. For å si noe om en prøve er positiv eller negativ for viruset, ser man på når grafen overstiger Cycle threshold (Ct)- verdien. Ct- verdien for en reaksjon er definert som nummeret på syklusen der fluorescens signalet fra PCR produktet overstiger bakgrunnsstøyen. Denne verdien er derfor omvendt proporsjonal med mengden mål nukleinsyre i prøven, jo lavere Ct nivå, jo større mengde målnukleinsyre i prøven (28).

2.2.2 Indirekte ELISA

Som nevnt over kan en sykdom eller nærmere bestemt kroppens immunrespons på sykdommen, detekteres ved bruk av serologiske metoder. Slike metoder bygger på ulike prinsipper for å påvise blant annet tilstedeværelsen av antistoffer i blodets serum. Et slik prinsipp er for eksempel interaksjon mellom antigen- antistoff (14). I diskusjonen om diagnosen COVID-19 kan stilles på bakgrunn av en serologisk metode, blir indirekte ELISA mye diskutert for å påvise antistoff mot spesifikke proteiner hos viruset.

Reaktanter

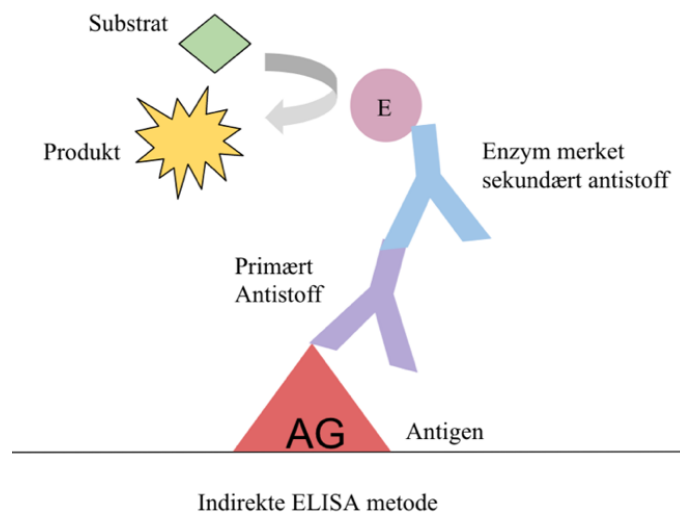
Analysen utføres på en mikrotiterplate. Dette er en plate med brønner, der brønnene er dekket med antigen (proteiner fra viruset som skaper immunrespons), se *figur 3*. Siden antigenene er festet til en fast overflate, kalles denne type ELISA: heterogent enzym immunoassay. Det spesifikke antigenet er valgt på bakgrunn av sin evne til å binde de antistoffene man ønsker å detektere, og de valgte antigenene er ofte rekombinante. Disse antigenene kan man masseprodusere i celler som er genmodifiserte til å uttrykke dem. Dette kan gjøres kunstig, ved å for eksempel transformere en bakterie med en vektor som uttrykker proteinet av interesse. Videre renses det ønskelige proteinet ut fra bakteriekulturen (14, 29).

Antistoffene som vil feste seg til de valgte antigene er et resultat av kroppens immunrespons mot viruset. Det er mulig å detektere ulike typer antistoff. De vanligste ved en virusinfeksjon er IgM, IgG og IgA. Ved indirekte ELISA blir de spesifikke antistoffene detektert via et sekundært antistoff. Disse sekundære antistoffene er fremstilt gjennom immunisering av forsøksdyr (ofte kanin), slik at man får dannet ønskelig antistoff i betydelig mengde. De sekundære antistoffene har bindingssteder mot det primære antistoffet, man ønsker å påvise. De er konjugert med et enzym, slik at man får en reaksjon som er mulig å detektere (14, 30).

Trinnene i indirekte ELISA

De ulike trinnene i indirekte ELISA utføres i en maskin som gjør det mulig å flytte mikrotiterplaten mellom vasking, reagens tilsetning og inkubasjon (31). Den kan i tillegg lese av resultatet. Metodens trinn er listet nedenfor, se i tillegg *figur 3*:

1. En prøve fra en pasient som antas å inneholde de spesifikke antistoffene (primærantistoff) tilsettes brønnene, og inkuberes slik at det kan skje en antigen-antistoff interaksjon. Denne bindingen vil holde antistoffene i brønnene.
2. Brønnene blir vasket, for å skylle vekk alt overflødig. Antistoffene man ønsker å detektere vil bli holdt igjen på grunn av interaksjonen med antigenene, mens alt ubundet blir vasket bort.
3. Sekundært antistoff konjugert med enzym tilsettes brønnene. Disse vil binde seg til epitopen på det primære antistoffet. Deretter inkuberes brettet på nytt.
4. Ny vask foretas for fjerne overskuddet av sekundært antistoff.
5. Substrat tilsettes tilslutt. De konjugerte enzymene vil kunne katalysere reaksjonen der substratet omdannes til et produkt. Dette produktet kan detekteres (30).



Figur 3: ELISA metode. Beskrivelse av indirekte ELISA, og de ulike stegene i analyseprinsippet. Figuren er basert på (3)

Deteksjon av produkt

Deteksjonen av antistoff- antigen reaksjonen kan skje ved en optisk metode, f.eks. en mikrotiterplateleser. Her måles absorbansen måles ved en spesifikk bølgelengde. Produktet som dannes ved enzym reaksjonen sin evne til å absorbere ulike bølgelengder bestemmer den spesifikke bølgelengden. Absorbansen er proporsjonal med mengden antistoff festet til brønnene. Antistoff konsentrasjonen kan videre bestemmes ved å danne en standardkurve, der en cut-off verdi (en nedre deteksjonsgrense) skiller positive og negative prøvesvar. Cut-off verdien settes som en målesikkerhet, da sjansen for falskt positivt svar øker med avtagende konsentrasjon. Den bestemmer altså hvor lav konsentrasjon analysen har evne til å påvise (32, 33).

2.3 Nøyaktighet ved metodene

Nøyaktighet ved metodene er viktig for å undersøke i hvilken grad de gir uttrykk for den egentlig sanne verdien av det man ønsker svar på. Nøyaktighet avhenger av riktighet og presisjon (34, 35). Kunnskap om dette er viktig for å se på hvordan man skal vektlegge resultatet. For å studere hvor god en metode er i forhold til å gi ut et korrekt resultat, kan man se på begrepene sensitivitet og spesifisitet. Dette blir målt ut ifra en gullstandard.

Denne gullstandarden regnes som det korrekte og tallene for spesifisitet og sensitivitet blir derfor utregnet på bakgrunn av dens resultat. I diskusjon rundt dette er det tenkt at det er to mulige utfall, frisk og syk. En pasient vil dermed falle inn i 1 av 4 kategorier basert på gullstanderen og resultatet fra testen; falsk positiv, sann positiv, falsk negativ og sann negativ, se *tabell 1* (36).

Tabell 1 viser status for mulige utfall, ifølge resultat av test i henhold til gull standarden (37)

		Status ifølge gullstandard metoden	
		<i>Har sykdommen</i>	<i>Har ikke sykdommen</i>
Resultat fra test {	<i>Positiv</i>	Sann positiv	Falsk positiv
	<i>Negativ</i>	Falsk negativ	Sann negativ
		↑	↑
		Kolonne for bestemmelsen av sensitivitet	Kolonne for bestemmelse av spesifisitet

Sensitivitet

Sensitiviteten sier noe om sannsynligheten for at en person som er syk får et positivt svar. Den kan regnes ut ved:

$$\text{sensitivitet} = \frac{\text{sann positiv}}{\text{sann positiv} + \text{falsk negativ}}$$

En metodes sensitivitet vil påvirkes av blant annet falske negative svar. Har man en høy sensitivitet, vil man kunne oppnå få falske negative svar. Man vil klare å «finne» nesten alle som har sykdommen, og et negativt svar vil være med å utelukke diagnosen. Falske negative kan komme ved at det for eksempel tester for tidlig eller ved tekniske feil (36, 38).

Spesifisitet

Spesifisiteten sier noe om at en frisk person får korrekt prøveresultat, altså et negativt svar. Den kan regnes ut ved:

$$\text{spesifisitet} = \frac{\text{sann negativ}}{\text{sann negativ} + \text{falsk positiv}}$$

Falske positive svar vil kunne påvirke spesifisiteten. Så ved å ha en høy spesifisitet, vil man ha få falske positive. En test med høy spesifisitet har evnen til å korrekt skille ut de som ikke har sykdommen, og et positivt svar vil kunne bekrefte diagnosen. Falske positive svar kan komme ved for eksempel kryssreaktivitet eller på grunn av tekniske feil (36, 38).

Et mål ved utvikling av en metode er å oppnå både høy sensitivitet og spesifisitet, nærmest lik 100 %. Ofte vil sensitiviteten og spesifisiteten av en test gå på bekostning av hverandre. En endring i metodens deteksjonsgrense; cut- off verdien for indirekte ELISA og Ct- verdien for RT- qPCR, endrer sensitiviteten og spesifisiteten for en test. På grunn av dette kan det være viktig å tenke på hva hensikten med metoden er; om det er viktig med en høy sensitivitet eller spesifisitet (38, 39).

3. Metode

Vi anvendte databasen PubMed, og søket ble utført i perioden fra 17. mars til 24. april. Søket ble avgrenset på bakgrunn av språk, der norsk og engelsk ble valgt. I tillegg til ønske om kun artikler i fulltekst og publiseringer innen 1 år. Søkeordene som ble brukt var; SARS-CoV-2, detection, PCR, diagnosis, ELISA og immunoassay, se *tabell 2 og 3* for eksempel på fremgangsmåte ved søk. De ulike kombinasjonene som ble brukt var;

- (SARS- CoV- 2) AND (detection)
- (SARS- CoV- 2) AND (detection) AND (PCR)
- (SARS- CoV- 2) AND (detection) AND (ELISA)
- (COVID 19) AND (ELISA)
- (COVID 19) AND (Immunoassay)
- (COVID 19) AND (Diagnosis) AND (PCR)
- (COVID 19) AND (Diagnosis) AND (ELISA)

Tabell 2 eksempel på fremgangsmåte med søkeord og kombinasjoner, i tillegg til antall resultater.

Søkeord	Begrensninger	Resultat
(SARS- CoV-2)		2 709
	+ norsk og engelsk + publiseringer innen 1 år + full tekst	2 282
(SARS- CoV-2) AND (detection)		218
(SARS- CoV-2) AND (detection) AND (PCR)		69
(SARS- CoV-2) AND (detection) AND (ELISA)		8

Tabell 3 eksempel på fremgangsmåte med søkeord og kombinasjoner, i tillegg til antall resultater.

Søkeord	Begrensninger	Resultat
(COVID 19)		6 517
	+ norsk og engelsk + publiseringer innen 1 år + full tekst	5 426
(COVID 19) AND (diagnosis)		774
(COVID 19) AND (diagnosis) AND (PCR)		104
(COVID 19) AND (diagnosis) AND (ELISA)		7

Artiklenes relevans ble først vurdert på bakgrunn av overskrift og sammendrag, før vi valgte ut antatt aktuelle artikler (15 stykker) for å lese de nærmere. 4 artikler ble forkastet da de ikke hadde relevans til vår problemstilling. Videre ble artiklene undersøkt gjennom Oria, for å sjekke om de var fagfelleurdert. Der ble ytterligere en artikkel forkastet, da den ikke var blitt publisert i et fagfelleurdert tidsskrift.

4. Resultat

Valgte artikler vises i tabell 4. Av de 10 artiklene vi valgte beskriver 2 av dem studier av pasienter med bekreftet COVID-19, 2 er studier rundt påvisning av virus gjennom RT- qPCR, 4 av dem tar for seg deteksjon av antistoff ved bruk av indirekte ELISA og 2 ser på påvisning av virus gjennom ulike PCR metoder og deteksjon av antistoff.

Tabell 4 utvalgte artikler med overskrift, forfattere, sted for publisering, relevans for problemstilling og kort om hovedfunnene til hver artikkel.

Tittel	Forfatter	Publisert	Relevans	Resultat
RT- qPCR				
Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real- time RT- PCR (40)	Victor M Corman, Olfert Landt, Marco Kaiser, Richard Molenkamp, Adam Meijer, Dnaile KW Chu, et.al	Eurosurveillance, Januar 2020	En studie der de har laget en RT- qPCR metode for deteksjons av SARS- CoV-2.	Resultat viser en suksessfull utvikling av en RT- qPCR metode, uten å ha en fysisk virus- sekvens. De valgte prøber på bakgrunn av hva som passet best med sekvensene som var i genbanken for SARS relaterte koronavirus. De fant at bruk av E og RdRp genene for PCR analysene, hadde høyest sensitivitet.

Molecular diagnosis of novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia (41)	Daniel K.W. Chu, Yang Pan, Samuel M. S. Cheng, Kanrie P.Y. Hui, Pavithra Krishnan, Yingzhi Liu, et.al	Clinical Chemistry, April 2020	Artikkelen beskriver studie der de har utviklet to real -time RT- qPCR analyser, for deteksjon av to ulike regioner (ORF1b og N) av SARS- CoV-2.	DNA- amplifiseringene av disse nyetablerte analysene ble funnet å være effektive. Amplifiseringseffektiviteten til ORF1b og N- genanalyser var henholdsvis 99.6% og 95.4%. Alle negative kontroller ble funnet negative. Basert på deteksjonsytelsen til N-genet ved RT- qPCR, blir den anbefalt til å brukes som screening test. Mens ORF1b analysen, blir anbefalt som en konfirmasjonstest.
ELISA				
Evaluation of nucleocapsid and spike protein- based ELISA's for detecting antibodies against SARS- CoV-2 (11)	Wanbing Liu, Lei Liu, Guomei Kou, Yaqiong Zheng, Yinjuan Ding Wenxu Ni, et.al	Journal of Clinical Microbiology, Mars 2020	Artikkelen evaluerte ulike indirekte ELISA metoder for deteksjon av antistoff mot SARS- CoV-2.	Resultatet fra testing viser følgende: - Økt positiv deteksjonsrate utover i sykdomsforløpet for IgM og IgG. Men IgM viste en synkende effekt etter dag 35 fra symptomutbrudd. - Det ses en generelt høy sensitivitet ved bruk av indirekte ELISA, fra dag 10 etter symptomutbrudd.
Antibody detection and dynamic characteristics in patients with COVID- 19 (32)	Fei Xiang, Xiaorong Wang, Xinliang He, Zhenghong Peng, Bohan Yang, Jianchu Zhang, et.al	Clinical Infectious Diseases, 2020	Utviklet indirekte ELISA for deteksjon av antistoffer mot SARS- CoV-2. Den serologiske metoden ble vurdert mot blant annet følgende vilkår; sensitivitet og spesifisitet.	Resultatet viser at antistoffer kan detekteres så tidlig som dag 4 etter symptomutbrudd. IgM økte raskt etter dag 9, mens for IgG var økningen raskest etter dag 11. Hos nesten alle pasienter med sykdommen, fant man antistoffer (IgG og IgM) etter dag 30 av sykdomsforløpet. Hos pasienter som hadde fått påvist SARS- CoV-2 gjennom RT- qPCR var sensitivitet og spesifisitet for IgM; 77.3 % og 100 %. For IgG var verdiene 83.3% og 95%. Hos pasienter som var mistenkt å ha COVID-19 var sensitivitet og spesifisitet for IgM; 87.5% og 100%. Og for IgG; 70.8% og 96.6%
Serological assay for SARS- CoV-2 infectious disease; benefits, limitations and perspectives (42)	Maria Infantino, Arianna Daminai, Francesca Li Gobbi, Valentina Grossi, Barbara Lari, Donatella Macchia, et. Al	The Israel Medical Association journal, April 2020	Oversikt og vurdering av tilgjengelig data om serologiske tester for SARS- CoV- 2.	Resultatet fremgår som en oversikt over fordeler og ulemper ved serologiske metoder, blant annet indirekte ELISA for SARS-CoV-2. Der ulike artiklers syn bli belyst, med den hensikt å øke kunnskap rundt temaet.

<p>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibody response in coronavirus disease 2019 patients (43)</p>	<p>Nisreen M.A. Okba, Marcel A. Müller, Wentao Li, Chunyan Wang, Corine H. Geurtsvan Kessel, Victor M. Corman, et.al</p>	<p>Emerging infectious diseases, 8. April 2020</p>	<p>Ulike validerings forsøk for deteksjon av virus nøytraliserende antistoff mot N-protein og ulike S-protein domener (S1-subenhet og RBD), ved bruk av ELISA. Artikkelen ser også på kryss-reaktivitet med antistoff mot MERS-CoV og SARS-CoV.</p>	<p>Funn ved deres validering viser: - S-protein analyser viser kryssreaktivitet med MERS-CoV, dette ses ikke ved S1-subenheten analyser. Tyder på at det er S2-subenhet som reagerer med MERS-CoV, men at S1 er spesifikk for SARS-CoV-2. - S1 viser kryssreaktivitet med SARS-CoV, men siden SARS-CoV 's spesifikke antistoff ikke har hvert detektert på lang tid, på grunn av deres avtagende effekt. Mener de det ikke vil forårsake falske positive svar. - Deteksjon av to ulike antistoff kan være nødvendig for å utelukke falske negative svar, da tidspunktet for serokonversjon ikke er gitt.</p>
<p>PCR og ELISA</p>				
<p>Eleven faces of coronavirus disease 2019 (44)</p>	<p>Xiang Dong, Yi-yuan Cao, Xiao-xia Lu, Jin-jin Zhang, Hui Du, You-qin Yan, et.al</p>	<p>Allergy, Mars 2020</p>	<p>Artikkelen presenterer 11 ulike pasienter med mistanke om COVID 19. Det gis beskrivelser rundt deres vei til bekreftet COVID 19 diagnose.</p>	<p>Pasient nr. 3 hadde flere negative RT-PCR resultat for SARS-CoV-2, men fikk bekreftet COVID 19 ved positiv test mot IgM og IgG antistoff. Flere av de andre pasientene hadde gjentatte negative PCR resultat, før de etterhvert testet positivt. Dette mener de tyder på lav sensitivitet for PCR metoden. Og de presenterer derfor et alternativ for bruk av deteksjon av SARS-CoV-2 spesifikk IgM respons, for å bekrefte at de negative PCR svarene er reelle negative.</p>
<p>Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes (45)</p>	<p>Wei Zhang, Rong-Hui Du, Bei Li, Xiao-Shuang Zheng, Xing-Lou Yang, Ben Hu, et. al</p>	<p>Emerging microbes and infections, Februar 2020</p>	<p>En studie som anvender RT-qPCR og indirekte ELISA teknikk for å se på ulike transmisjonsruter for viruset.</p>	<p>Artikkel viser til en anbefaling rundt bruk av serologiske metoder for å bekrefte en infeksjon med SARS-CoV-2. Dette på bakgrunn av de upålitelige resultatene med oral swab. De påviser også lav eller ingen deteksjon av antistoff ved dag 0 (første prøvetakningsdag). Men klar økning i virale antistoff (IgM og IgG) etter dag 5.</p>
<p>Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID 19) (46)</p>	<p>Li Guo, Lili Ren, Siyuan Yang, Meng Xiao, De Chang, Fan Yang, Charles S Dela Cruz, et. al</p>	<p>Clinical infectious diseases, 21. Mars 2020</p>	<p>Analysere antistoff (IgM, IgG og IgA) reaksjon i personer med SARS-CoV-2, ved bruk av indirekte ELISA. Og ser på en mulig analysere der man kombinerer antistoff deteksjon og påvisning av virus for diagnostisering av COVID-19.</p>	<p>Resultat fra antistoff reaksjonen i SARS-CoV-2 positive pasienter viser: -Median dag for deteksjon av IgG var 14 dager etter symptomutbrudd. - Median dag for deteksjon av IgM og IgA var 5 dager etter symptomutbrudd. De fremlegger også resultater på at RT-qPCR har en høyere deteksjons rate enn IgM indirekte ELISA før dag 5.5 (fra symptomutbrudd), mens etter dag 5.5 vil den være høyere for indirekte ELISA. Positiv deteksjons rate er 51.9%, med kun PCR. Men økes til 98.6% når man tester alle negative PCR resultat med IgM ELISA.</p>

Serological and molecular findings during SARS- CoV-2 infection: the first case study in Finland, January to February 2020 (47)	Anu Haveri, Teemu Smura, Suvi Kuivanen, Pamela Osterlund, Jussi Hepojoki, Niina Ikonen, et. al	Eurosurveillance, Mars 2020	Artikkelen beskriver den første infiserte personen i Finland, der man har brukt både PCR og deteksjon av antistoff til diagnostisering.	Resultatet viste at både IgM og IgG titrene var lave eller ikke detekterbare på dag 4 etter symptomutbrudd hos pasient, men økende fra dag 9-10. IgM og IgG antistoff var tilstede innen 2 uker fra symptomutbrudd. Viruset ble detektert fra dag 3 etter symptomutbrudd med RT- qPCR. Men etter dag 9 fikk man negative svar ved bruk av RT- qPCR.
---	--	-----------------------------	---	---

5. Diskusjon

Analysemetoder som RT- qPCR, der man påviser deler av det genetiske materialet til viruset og indirekte ELISA, der man detekterer antistoff dannet som følge av infeksjon av viruset, er blitt hurtig utviklet på grunn av en stor etterspørsel. En god metode for å diagnostisere COVID 19 spiller en viktig rolle i bekjempelsen og kontrollering av virusmitten. De to deteksjonsmetodene, RT- qPCR og indirekte ELISA har ulike fordeler og ulemper.

I denne oppgaven har vi brukt litteratursøk for å finne informasjon rundt det ønskede temaet. Dette har gitt oss muligheten til å spesifikt søke oss frem til litteratur, ved bruk av ulike kombinasjoner av ord og begrensninger rundt søket. Vi har valgt artikler som både tar opp bruk av RT- qPCR for påvisning av viruset og indirekte ELISA for deteksjon av antistoff, da dette gir et godt grunnlag for diskusjon rundt problemstillingen. På grunn av den kritiske situasjonen har det vært viktig med hurtig publisering av artikler rundt SARS-CoV-2, for å øke kunnskapen i samfunnet. Dette er forståelig, men kanskje ikke ønskelig i en ideell situasjon, da kravene til publisering har blitt senket. Det har gjort at artikler ikke alltid har gjennomgått den vurdering de vanligvis trenger for publisering. Det har derfor vært viktig at vi som lesere, har lest artiklene med et kritisk blikk i forhold til innholdet.

5.1 Spesifisitet

Spesifisiteten til metodene er viktig for å forhindre et falskt positivt svar. Ved å gi ut et falskt positivt svar vil personer som egentlige er friske, kunne risikere unødvendig bekymring og behandling. Falske positive svar ved indirekte ELISA er ofte knyttet til kryssreaktivitet. For å forhindre dette er det viktig at antigenet festet til overflaten kun vil tiltrekke seg antistoffer på grunn av infeksjon med viruset, i dette tilfelle SARS- CoV- 2.

Antigene man har brukt i indirekte ELISA analyse er ofte N- og S-proteinene, eller deler av disse, på grunn av deres sterke immunogene egenskaper.

Guo, Ren, et al. sine studier indikerte en kryssreaksjon mellom SARS-CoV og SARS-CoV-2, ved bruk av rekombinant N-protein (rNP) som antigen. De peker på at denne kryssreaktivitet skyldes at N- genen for SARS-CoV-2 har en 90.5 % lik homolog sekvens med N-genet for SARS-CoV(46). Når det gjelder S- proteinet viser Okba, Müller et.al sine studier at S1- domenet på S-proteinet burde brukes som antigen i indirekte ELISA for SARS-CoV-2, da S-proteinet viser en større evne til kryssreaktivitet mellom de ulike koronavirusene. Dette er gjeldende selv om S1-domenet viser kryssreaktivitet med SARS-CoV (46). Det er også en større fordel å bruke kun deler av proteinet ved indirekte ELISA, fordi det er lettere å klonere opp mindre fragmenter i prokaryote celler (42).

Grunnen til at kryssreaktivitet med SARS-CoV ikke vil være noe problem, skyldes at antistoffene mot dette viruset ikke har blitt detektert på 17 år. Dette kommer frem i studier gjort av Okba, Müller, et.al. De understreker også at tidligere rapporter beskriver egenskaper hos antistoffer mot SARS-CoV som gjør at de avtar med tid. På grunn av denne egenskapen ble de ikke detekterbare i 21 av 23 serumprøver, 6 år etter infeksjon. De mener derfor at sjansen er liten for at antistoffer mot SARS-CoV er tilstede i den menneskelige populasjonen i dag. Det vil derfor ikke forårsake falske positive svar ved kryssreaksjoner med antigen brukt i indirekte ELISA, det målet er å detektere antistoffer mot SARS-CoV-2 (43).

På grunn av disse funnene om kryssreaktivitet for SARS-CoV-2 basert indirekte ELISA, har man fått en metode med høy spesifisitet, dette kommer frem i ulike artikler. Liu, Liu et. al fikk en spesifisitet på 100%, ved analysing av 100 friske donorer som alle fikk negativt prøvesvar ved indirekte IgM og IgG ELISA (11). Xiang, Wang, et.al (32) viser i sine studier at deteksjon av IgM antistoff har en spesifisitet på 100% og for IgG 95.0%.

Siden disse tallene bygger på påviste COVID-19 tilfeller fra RT- qPCR, viser det at ELISA teknikk (med deteksjon av IgM antistoff) har en like høy spesifisitet som RT- qPCR metoden. Studien sier ikke noe om spesifisiteten til den brukte RT- qPCR metoden.

Spesifisiteten til en RT- qPCR metode kan økes ut ifra valg av primere og prober. For at disse skal være spesifikke må primersekvensen eller produktet proben detekterer være unik for viruset, dette kan oppnås med bruk av TaqMan probe. Området på det geonomiske materiale primerne og proben binder seg til, kan heller ikke variere innen organismen. Corman og Landt et. al fant gjennom flere ulike forsøk at den spesifikke proben (kun til deteksjon av SARS-CoV-2) de utviklet, hadde en like god deteksjonsgrense som en probe designet for å detektere flere ulike koronavirus (40). Disse funnene viser til at RT- qPCR metoder for påvisning av SARS-CoV-2 med høy spesifisitet er mulig. Det samme ses gjennom Chu, Pan et.al sine studier, der de har oppnådd RT- qPCR metoder med 100 % spesifisitet (41).

5.2 Sensitivitet

Et annet område rundt metodenes nøyaktighet man må ta høyde for, er evnen til å gi falske negative svar, det vil si hvor sensitiv metodene er. En høy andel falske negative svar kan føre til at personer som er syke får beskjed om at de er friske, og kan derfor smitte folk videre. RT- qPCR metoden har vist å gi falske negative svar ved flere ulike studier, men ved bruk av indirekte ELISA har disse testet positivt, og dermed blitt «funnet». Guo og Ren et.al (46) har studert en familie der 2 av 6 fikk positivt RT- qPCR resultat, mens de resterende var negative. I kontrast bekreftet IgM ELISA en viral infeksjon med SARS- CoV-2 hos 5 av de 6. I tillegg ser man i studien av 11 forskjellige tilfeller av COVID 19 (44), at en av pasientene har flere negative RT- qPCR svar. Mens symptomene han opplevde tilsa en form for pneumoni. Etter at serologiske tester ble gjennomført, testet pasienten positivt for antistoff mot SARS-CoV-2 og fikk påvist COVID 19.

Den høye falske negative tendensen ved RT- qPCR kan ha sammenheng med når i sykdomsforløpet prøven er tatt, men informasjonen om tidspunkt for prøvetaking mangler i flere av artiklene. Resultat fra analyser gjort av Guo, Ren (46) viser en sensitivitet på >90% ved dag 1-3 fra symptomutbrudd, men at denne sensitiviteten avtar. Den er videre målt til <50% fra dag 14 av sykdomsforløpet. En annen forklaring på den lave sensitiviteten ved RT- qPCR kan være knyttet til feil rundt håndtering av prøvemateriale og hvor prøven er tatt fra.

Corman, Landt et.al peker på at menneskelige feil er en svakhet ved RT- qPCR metoden, da det er mange ulike trinn fra RNA blir ekstrahert fra viruset til DNA kan detekteres. Dette gir store sjanser for forurensning av både prøvemateriale og reagenser, noe som øker muligheten for feil prøvesvar (40).

Prøvematerialet brukt til RT- qPCR er som regel fra nasofarynks og eller munn (oral). Men fordi viruset formerer seg i de nedre delene av det respiratoriske systemet, vil ikke prøver fra disse områdene være ideelle. Infantino, Damiani, et. al mener prøver tatt fra de øvre respiratoriske veiene, kan gi falskt negativt svar tidlig i sykdomsforløpet, fordi infeksjonen har sin opprinnelse i de alveolære cellene (42). Dette vil derfor kunne resultere i at man ikke får med nok infisert prøvemateriale, som kan gi falske negative prøvesvar. En annen studie viser også til at deteksjon av viruset ved oral swab ikke er perfekt, da man ser en lav deteksjonsrate (45).

Selv om indirekte ELISA har vist evnen til å detektere falske negative svar gitt av RT- qPCR, vil dette være påvirket av når i sykdomsforløpet man tester. Påvisning av antistoff ved indirekte ELISA er avhengig av tiden det tar fra man blir infisert til antistoff kan detekteres i blodet. Tidlig i sykdomsforløpet har indirekte ELISA vist en lavere evne til deteksjon. 22% av pasientene med bekreftet infeksjon av SARS-CoV-2, fikk negativt svar (falsk negativ) med indirekte ELISA for IgM. Dette tall fra testing tidlig i sykdomsforløpet (46).

Når et nytt virus blir detektert hos mennesker, er det viktig med mye forskning rundt hvordan viruset påvirker verten. Selv om SARS-CoV-2 er et virus i familien *Coronaviridae*, som vi har mye kjennskap til, kan man ikke være 100 % sikker på at dette viruset oppfører seg likt som de andre i familien. Under SARS epidemien ble det sagt [(...) en sen serokonversjon hos de fleste SARS- pasienter reduserer verdien av serologiske tester under inkubasjonstiden og under de innledende fasene av SARS, derfor blir serologiske tester anbefalt som en bekreftelse av en SARS- CoV infeksjon.] (47, s. 5). Studier rundt SARS-Cov-2 infeksjon har vist et varierende resultat for når man først har klart å detektert antistoff mot SARS- CoV- 2. Antistoffer har blitt detekter alt fra dag 1 til dag 39 etter symptomutbrudd, varierende fra person til person (46). En større studie med flere testpersoner er nødvendig for å bedre fastslå en tid for når dannelsen av antistoff starter.

Ettersom antistoffer har vist seg å være stabile når de først har blitt detektert, har ikke eventuelle falske negative svar vært like høy ved indirekte ELISA, som for RT- qPCR. [De spesifikke sirkulerende antistoffene kan bli jevnt detektert, og derfor hindrer man falske negative (...)] (32, s.12). Dette gjelder spesielt i tilfellene hvor man har kombinert IgM og IgG ELISA, for å detektere et bredere spenn av immunresponsen. Denne kombinasjonen av antistoffer gjør også at antistoffene kan bli jevnt detektert utover i sykdomsforløpet fra de først har blitt påvist, fordi et bredere spekter av immunresponsen dekkes. Da minskes sjansen for falske negative svar, og muligheten for at smittede personer får feil prøvesvar går ned.

I studien utført av Dong og Cao et.al hadde de flere tilfeller der pasienter med tidligere påvist COVID 19 via PCR fikk to gjentatte negative RT- qPCR svar, og ble derfor meldt som ikke smittsomme. Senere ble de testet på nytt med et positivt RT- qPCR resultat (44). Dette kan være et resultat av dårlig prøvetaking eller reinfeksjon. Sjansen for reinfeksjon er vanskelig å si noe om, da man ikke vet med sikkerhet om man oppnår immunitet ved gjennomgått infeksjon med SARS-CoV-2. Slike tilfeller vil være en trussel for et samfunn som prøver å kontrollere smitten, da disse pasientene går «fritt» med mulighet til å smitte andre.

Hvilken type antistoff man detekterer vil ha betydning for hva man ønsker å bruke resultatet til, da de ulike antistoffene, de som er mest diskutert er IgM og IgG, vil gi ulik informasjon rundt immunresponsen. IgM er det antistoffet som øker raskets ved en infeksjon og indirekte ELISA som detekterer IgM vil derfor beskrive en akuttinfeksjon. Videre vil IgG følge etter, det er dette antistoffet som sirkulerer lengst i kroppen og kan derfor blant annet vise til en gjennomført infeksjon (48). Indirekte ELISA kan derfor gi oss evnen til å se på nåtids situasjonen av en infeksjon, men samtidig si noe om hva som har skjedd; om man har hatt en infeksjon. RT- qPCR kan på den andre siden kun gi et bilde av situasjonen her og nå; har man viruset i kroppen eller ikke. Evnen til å avdekke om folk har gjennomgått en infeksjon vil være en viktig indikator, for å få en oppfatning av omfanget rundt pandemien.

Indirekte ELISA har som nevnt over vist evne til å detektere falske negative svar fra RT- qPCR, men at sensitiviteten vil kunne variere noe etter når i sykdomsforløpet man er ved utføring av testen. Indirekte ELISA har vist en bedre sensitivitet senere i sykdomsforløpet, [deteksjonsraten med RT- qPCR var høyere enn ved IgM indirekte ELISA metode før dag 5,5 av symptomutbrudd, men deteksjons effektiviteten med IgM indirekte ELISA var høyere enn med RT-qPCR etter dag 5,5.] (46, s. 14). Guo, Ren, et. al så i samme studie på en situasjon der man kombinerer RT- qPCR med indirekte ELISA, noe som økte RT- qPCR sensitiviteten fra 51.9% til 98.6%, disse tallene er uavhengig av hvor i sykdomsforløpet pasienten har kommet (46).

En oppfatning om at RT- qPCR har en høyere sensitivitet i starten av sykdomsforløpet, mens den for indirekte ELISA er lavest i starten og økende utover i sykdomsforløpet kan ses i flere studier. Haveri, Smura, et.al detekterte viruset ved RT- qPCR fra dag 3 etter symptomutbrudd (prøver ble ikke tatt før denne dagen), og frem til dag 4. Etter dette var RT- qPCR svar negative. Derimot viste serologiske prøver en økning av antistoff fra dag 9. Denne økningen ble sett både ved IgM og IgG (47). Liu, Liu, et.al fant at sensitiviteten for indirekte ELISA var høyest etter mer enn 10 dager etter symptomutbrudd.

5.3 Praktiske forhold

Ulike parametere i forhold til metodenes nøyaktighet er viktig for å se på hvilken metode som er best egnet, men også de praktiske områdene rundt de ulike metodene spiller en viktig rolle. RT- qPCR er en metode som er tidkrevende, da et oppsett kan ta 2-3.t før man får et svar (42). Infantino, Damiani, et. al peker også på at RT- qPCR er arbeidskrevende, kompleks, kostbar og at metoden krever bruk av laboratorier som har nødvendig utstyr (inneslutningsnivå 3, BSL3) for å opprettholde biosikkerheten.

Nødvendigheten av sikkerhetsutstyr for å opprettholde biosikkerheten er der, fordi man jobber med viruset direkte. Fordi viruset smitter via kontakt- og dråpesmitte er sjansen for infisering tilstede under utføring av metoden. Dersom tilstrekkelig utstyr ikke er tilstede, kan dette bli kostbart. Utilstrekkelig tilgang på reagens som følge av dårlige forsyninger på grunn av en global pandemi, kan også resultere i lavere effektivitet med RT- qPCR (11, 42).

På den andre siden krever ikke indirekte ELISA arbeid i et like sikkert miljø, noe som gjør analysen mer tilgjengelig. Grunnen til at opprettholdelsen av biosikkerhet rundt indirekte ELISA ikke er like viktig, er fordi den ofte er bygget opp rundt rekombinant protein. Ikke direkte virus slik som ved RT- qPCR, og smittefaren er derav lavere (42). Analysen stiller heller ikke like høye krav til maskiner som RT- qPCR, noe som gjør den mer tilgjengelig til bruk i flere ulike situasjoner, enn bare i kvalifiserte laboratorium.

6. Konklusjon

Hovedfunnene ved vår oppgave viser at begge metodene, RT- qPCR og indirekte ELISA, har en høy spesifisitet. Dette ses på bakgrunn av at det er påvist at man kan se bort i fra eventuelle kryssreaksjoner. Derimot ses det en ulik sensitivitet ved metodene, som avhenger av hvor i sykdomsforløpet man er. RT- qPCR har en høyere sensitivitet i starten, mens ELISA har en høyere sensitivitet ved senere tidspunkt.

På bakgrunn av disse funnene vil den ideelle strategi for diagnostisering av COVID 19 kunne være en kombinert analysering. Der man vurderer hvor langt man har kommet i sykdomsforløpet når valg av metode skal tas. Videre forskning rundt kinetikken til viruset og immunresponsen for COVID 19 er viktig, der man har en større andel testpersoner tilgjengelig enn det som ses ved dagens forskning.

7. Referanser

1. Peiris J, Guan Y, Yuen K. Severe acute respiratory syndrome. *Nature Medicine Supplement*; 2004.
2. Roy J, Jain N, Singh G, Das B, Mallick B. The principle of TaqMan probe-based qRT-PCR. *AGO-Driven Non-coding RNAs* 2019.
3. Thermo Fisher Scientific. Diagram of common ELISA formats (direct vs. sandwich assays). [thermofisher.com](https://www.thermofisher.com).
4. Tjernshaugen A, Hiis H, Bernt JF, Braut GS. Koronavirus-pandemien i 2020 snl.no: Store Medisinske Leksikon 2020 [oppdatert 17.april. Tilgjengelig fra: https://sml.snl.no/koronavirus-pandemien_i_2020.
5. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. *Journal of medical virology* [Internett]. 2020 [Hentet 2020 28.mars]. Tilgjengelig fra: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.25727>.
6. Utbruddsgruppa ved Folkehelseinstituttet. Covid-19-epidemien: risikovurdering og respons i Norge- andre versjon. Folkehelseinstituttet 2020.
7. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS nano* [Internett]. 2020 [Hentet 2020 5.april]:[14 s.]. Tilgjengelig fra: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsnano.0c02624>.
8. Yu F, Du L, Ojcius DM, Pan C, Jiang S. Measures for diagnosing and treating infections by a novel coronavirus responsible for a pneumonia outbreak originating in Wuhan, China. *Microbes and Infection* [Internett]. 2020 [Hentet 2020 29.mars]:[4 s.]. Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457920300253?via%3Dihub>.
9. Steen IL, Roland P-DH. Koronavirus (SARS CoV-2)- bakgrunn og informasjonskilder RELIS.no 2020 [oppdatert 27. februar. Tilgjengelig fra: <https://relis.no/content/5088/Koronavirus-SARS-CoV-2---bakgrunn-og-informasjonskilder>.
10. Prompetchara E, Ketloy C, Palaga T, Prompetchara E. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pacific journal of allergy and immunology* [Internett]. 2020.
11. Liu W, Liu L, Kou G, Zheng Y, Ding Y, Ni W, et al. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-based ELISAs for detecting antibodies against SARS-CoV-2. *Journal of clinical microbiology* [Internett]. 2020 [Hentet 2020 5.april]:[25 s.]. Tilgjengelig fra: <https://jcm.asm.org/content/jcm/early/2020/03/27/JCM.00461-20.full.pdf>.
12. Sino Biological. Human Coronavirus Sinobiological.com: Sino Biological Inc.; 2020 [Tilgjengelig fra: <https://www.sinobiological.com/research/virus/human-coronavirus>.
13. Degre M, Hovig B. Coronaviridae. In: Rollag H, editor. *Medisinsk mikrobiologi*. 3.utg: Gyldendal Norsk Forlag; 2008. p. 312-3.
14. Lea T. *Immunologi og immunologiske teknikker*. 3. utg. ed: Fagbokforlaget; 2006.
15. Hamming I, Timens W, Bulthuis M, Lely A, Navis G, Van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *Journal of Pathology* [Internett]. 2004:[631-7 pp.]. Tilgjengelig fra: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/path.1570>.
16. Fu Y, Cheng Y, Wu Y, Fu Y. Understanding SARS-CoV-2-Mediated Inflammatory Responses: From Mechanisms to Potential Therapeutic Tools. *Virologica Sinica*

- [Internett]. 2020 [Hentet 2020 1.april]. Tilgjengelig fra: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s12250-020-00207-4.pdf>.
17. Carter M, Shieh J. Chapter 10 - Molecular Cloning and Recombinant DNA Technology. Guide to Research Techniques in Neuroscience. Second Edition ed: Elsevier Inc; 2015. p. 219-37.
 18. Folkehelseinstituttet. Prøvetaking- praktisk gjennomføring fhi.no: Folkehelseinstituttet; 2020 [oppdatert 7.mai 2020. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/coronavirus/helsepersonell/provetaking/?term=&h=1>.
 19. Børresen-Dale A-L. Revers transkriptase snl.no: Store medisinske Leksikon; 2020 [oppdatert 30.januar 2020. Tilgjengelig fra: https://sml.snl.no/revers_transkriptase
 20. Institutt for biovitenskap. PCR Uio.no: Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet; 2011 [oppdatert 14.mars 2020. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html>.
 21. Hanssen RE, Gjennestad RS. Etablering av real-time PCR for påvisning av eksfoliativ toksin A og B [Bacheloroppgave]. ntnuopen.ntnu.no: NTNU; 2019.
 22. Institutt for biovitenskap. DNA polymerase Uio.no: Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet; 2011 [oppdatert 17.januar 2020. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/d/dnapo.html>.
 23. Oslo universitetssykehus. DNA- analyser Oslo-universitetssykehus.no: Oslo universitetssykehus; 2019 [oppdatert 18.april 2020. Tilgjengelig fra: <https://oslo-universitetssykehus.no/fag-og-forskning/nasjonale-og-regionale-tjenester/rechtsmedisinske-fag/rechtsgenetikk/straffesaker/dna-analyser>.
 24. Ha C-E, Bhagavan NV. DNA replication, repair, and mutagenesis. Essentials of Medical Biochemistry : With Clinical Cases. Burlington: Elsevier Science; 2011. p. 401-17.
 25. Fykse EM, Skogan G, Olsen JS. Påvisning av biologiske stridsmidler ved bruk av real-time PCR [Rapport]. Kjeller: FFI.no; 2004 [cited 2020 10.mai]. Tilgjengelig fra: <https://publications.ffi.no/nb/item/asset/dspace:3114/04-04247.pdf>.
 26. Thermo Fisher. TaqMan vs. SYBR Chemistry for Real- Time PCR thermofisher.com: Thermo Fisher Scientific; [Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html>.
 27. Thermo Fisher. How TaqMan Assays Work Thermo Fisher Scientific: thermofisher.com; [Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>.
 28. Wisconsin veterinary diagnostic laboratory. What does CT mean?2018. Tilgjengelig fra: <https://www.wvdl.wisc.edu/wp-content/uploads/2018/05/What-does-CTmeanfinalhandoutJanuary2014.pdf>.
 29. Craggs S. Native versus recombinant antigens- which is the right choice? Pivotal Scientific: The international Biotechnology consultancy; 2019 [Tilgjengelig fra: <https://pivotalscientific.com/scientific-library/native-versus-recombinant-antigens-which-is-the-right-choice/>.
 30. Burtis CA, Brun DE. Immunochemical Techniques. In: Sawyer BG, editor. Tietz Fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics 7.utg ed. Missouri: Elsevier saunders; 2015. p. 236-52.
 31. Held P. Automated ELISA Liquid Handling with the EL406™ Combination Washer Dispenser biotek.com: BioTek; 2009 [oppdatert 15.januar 2009. Tilgjengelig fra:

- <https://www.biotech.com/resources/application-notes/automated-elisa-liquid-handling-with-the-el406-combination-washer-dispenser-semi-automation-of-elisa-process/>.
32. Xiang, F, Wang, X, He, X, Peng, Z, Yang, B, Zhang, J, et al. Antibody detection and dynamic characteristics in patients with COVID-19. Infectious Diseases Society of America [Internett]. 2020 [Hentet 2020 23.april]:[23 s.]. Tilgjengelig fra: <https://academic.oup.com/cid/article/doi/10.1093/cid/ciaa461/5822173>.
 33. Simonsen T, Aarbakke J. Faktorer som påvirker analyseresultatet. Illustrert farmakologi. 3.utg ed: Fagbokforlaget; 2010.
 34. Braut GS. Nøyaktighet snl.no: Store Medisinske leksikon; 2009 [oppdatert 14.mai 2019]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/nøyaktighet>.
 35. Sykehuset Telemark. Vurdering av prøvesvar Sthf.no Sykehuset i Telemark; 2017 [oppdatert 22. februar 2018]. Tilgjengelig fra: <https://www.sthf.no/helsefaglig/laboratorietjenester/laboratoriehandboka/vurdering-av-provesvar#analysekvalitet>.
 36. Lydersen S. Hva er sannsynligheten for riktig resultat av en diagnostisk test?2017 [Hentet 2020 10.mai]; (18.utg):[3 s.]. Tilgjengelig fra: <https://tidsskriftet.no/2017/10/medisin-og-tall/hva-er-sannsynligheten-riktig-resultat-av-en-diagnostisk-test>.
 37. Trevethan R. Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Plabilities, and Pitfalls in Research and Practice2017. Tilgjengelig fra: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2017.00307/full>.
 38. Burtis CA, Burns DE. Clinical evaluation of methods. In: Sawyer BG, editor. Tietz Fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostic 7.utg ed. Missouri: Elsevier Saunders; 2015. p. 33-9.
 39. Health news review. Understanding medical tests: sensitivity, specificity, and positive predictive value Healthnewsreview.org: Health news review,; 2018 [Tilgjengelig fra: <https://www.healthnewsreview.org/toolkit/tips-for-understanding-studies/understanding-medical-tests-sensitivity-specificity-and-positive-predictive-value/>].
 40. Corman V, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu D, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Eurosurveillance [Internett]. 2020 [Hentet 2020 17.mars]:[8 s.]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6988269/>.
 41. Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, Hui KPY, Krishnan P, Liu Y, et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. Clinical chemistry [Internett]. 2020 [Hentet 2020 17.mars]:[7 s.]. Tilgjengelig fra: <https://academic.oup.com/clinchem/article/66/4/549/5719336>
 42. Infantino M, Damiani A, Gobbi FL, Grossi V, Lari B, Macchia D, et al. Serological Assays for SARS-CoV-2 Infectious Disease: Benefits, Limitations and Perspectives. The Israel Medical Association journal [Internett]. 2020 [Hentet 2020 24.april]:[8 s.]. Tilgjengelig fra: <https://www.ima.org.il/FilesUploadPublic/IMAJ/0/423/211570.pdf>.
 43. Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, Geurtsvankessel CH, Corman VM, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients. Emerging infectious diseases [Internett]. 2020 [Hentet 2020 20.april]:[11 s.]. Tilgjengelig fra: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/7/20-0841_article.
 44. Dong X, Cao Y-Y, Lu X-X, Zhang J-J, Du H, Yan Y-Q, et al. Eleven faces of coronavirus disease 2019. Allergy [Internett]. 2020 [Hentet 2020 20.mars]:[27 s.]. Tilgjengelig fra: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/all.14289>.

45. Zhang W, Du R-H, Li B, Zheng X-S, Yang X-L, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerging microbes & infections* [Internett]. 2020 [Hentet 2020 20.mars]:[4 s.]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7048229/>.
46. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* [Internett]. 2020 [Hentet 2020 1.april]:[28 s.]. Tilgjengelig fra: <https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciaa310/5810754>.
47. Haveri A, Smura T, Kuivanen S, Österlund P, Hepojoki J, Ikonen N, et al. Serological and molecular findings during SARS-CoV-2 infection: the first case study in Finland, January to February 2020. *Eurosurveillance* [Internett]. 2020 [Hentet 2020 1.april]:[6 s.]. Tilgjengelig fra: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.11.2000266>.
48. Kvam M. Immunsystemet- immunforsvaret nhi.no: Norsk helseinformatikk [oppdatert 4.april 2017]. Tilgjengelig fra: <https://nhi.no/kroppen-var/funksjoner/immunsystemet/?page=all>.

