

Ingeborg Koppen, Kristine Grønås og Inger Bye

# Fordeler og ulemper ved å bruke ELISA, kontra å bruke RT-qPCR i COVID-19-pandemien

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Ann-Kristin Tveten

Mai 2020



Ingeborg Koppen, Kristine Grønås og Inger Bye

# **Fordeler og ulemper ved å bruke ELISA, kontra å bruke RT-qPCR i COVID-19- pandemien**

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag  
Veileder: Ann-Kristin Tveten  
Mai 2020

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



**NTNU**

Kunnskap for en bedre verden



---

## Forord

Denne bacheloroppgaven er skrevet i forbindelse med avsluttende utdanning for bachelor i bioingeniørfag, ved NTNU Ålesund. Bacheloroppgaven ble utført i løpet av vårsemesteret 2020, og både innholdet og utførelsen har derfor blitt sterkt påvirket av situasjonen rundt COVID-19-pandemien, men vi er takknemlige for at vi på tross av situasjonen har fått fullført på normert tid. Perioden har vært lærerik, og vi har tydelig fått demonstrert viktigheten av bioingeniørens arbeid i en pandemisituasjon. Til slutt vil vi gjerne takke vår veileder Ann-Kristin Tveten, for faglig veiledning og konstruktive tilbakemeldinger underveis.

Ålesund, 19/05/2020

---

## Sammendrag

Utbruddet av det nye coronaviruset, SARS-CoV-2, i Wuhan og den påfølgende COVID-19-pandemien, har ført til et stort press på helsetjenester rundt om i verden. Nukleinsyre-amplifikasjonsteknikker (NAAT), slik som RT-qPCR, blir ansett som standarden for påvisning av SARS-CoV-2-infeksjon. Ideelt bør alle som er mistenkt smittet bli testet, men det enorme presset på helsetjenesten og behovet for å gjennomføre mange tester på kort tid, gjør det imidlertid vanskelig å gjennomføre. I tillegg er det også ulemper med NAAT, som kan føre til falske negative resultat. For å hjelpe til med testingen kan et alternativ være serologiske analyser, som f.eks. ELISA, som kan detektere antistoffene kroppen produserer ved en virusinfeksjon. Hensikten med denne bacheloroppgaven var derfor å undersøke fordeler og ulemper ved å bruke ELISA, kontra å bruke RT-qPCR i COVID-19-pandemien. For å svare på dette ble det tatt utgangspunkt i ti forskningsartikler som omhandlet temaet. Ut ifra disse artiklene var det klart at RT-qPCR var den mest spesifikke og sensitive analysen tidlig i et infeksjonsforløp, men siden virusmengden etter hvert synker, får man en tilsvarende nedgang i sensitiviteten til RT-qPCR lenger ut i infeksjonsforløpet. Mengden antistoff vil være svært lav, eller udetekterbar, tidlig i infeksjonsforløpet. Antistoffproduksjonen vil imidlertid etter hvert øke, og dermed øker også sensitiviteten til ELISA utover infeksjonsforløpet, men dette kan ta tid. For å detektere flere smittede i både akutt og rekonvalesent fase blir det derfor foreslått å kombinere RT-qPCR og ELISA. Det å påvise smittede tidligst mulig er spesielt viktig i en pandemi-situasjon, og derfor vil RT-qPCR fortsatt være den sikreste og høyst prioriterte analysen ved mistanke om SARS-CoV-2. Derimot kan ELISA brukes som et hjelpemiddel om en pasient er mistenkt smittet og/eller har symptomer på COVID-19, men som likevel får negativt RT-qPCR-resultat. Ved å se på forholdet mellom IgM og IgG vil også ELISA kunne gi informasjon om hvor i infeksjonsforløpet pasienten er, eller om en person tidligere har vært smittet. Senere, når pandemien flater ut, vil det være viktig å få et helhetlig bilde over hvor mange som har vært smittet, og da kan også ELISA være til hjelp.

---

## Abstract

The outbreak of the novel coronavirus, SARS-CoV-2, in Wuhan and the following COVID-19 pandemic, have led to a large strain on the health services around the globe. Nucleic acid amplification tests (NAAT), like RT-qPCR, are regarded as the standard for detection of SARS-CoV-2 infections. Ideally all suspected cases should be tested, but the huge strain on the health service and the need for analysing many samples on a short period of time, makes it difficult to accomplish. There are also disadvantages with NAAT, that can lead to false negative results. To help with the testing, an alternative can be serological assays like ELISA, which can detect antibodies produced by the immune system as a response to a viral infection. The objective in this bachelor's thesis was thus to investigate the advantages and disadvantages of using ELISA, versus using RT-qPCR in the COVID-19 pandemic. This was done by evaluating ten research papers that addressed the current topic. From these papers it was clear that RT-qPCR had the highest specificity and sensitivity in the early stages of the infection. However, since the viral load gradually decreases, a corresponding reduction of the RT-qPCR sensitivity will be seen in the later stages of the infection. The amount of antibodies will be low, or undetectable, in the early stages of the infection. However, the antibody production will eventually increase, and thus the sensitivity of ELISA also increases, but this can take time. In order to detect more infected cases, both in acute and convalescent phase, it is thus proposed to combine RT-qPCR and ELISA. Detecting infected cases in the early stages of the infection is especially important in a pandemic situation, and thus the RT-qPCR will still be the safest and most prioritised assay when suspecting a SARS-CoV-2 infection. However, ELISA can be used as an aid if a patient is suspected of being infected and/or has symptoms of COVID-19, but still has negative RT-qPCR results. By looking at the ratio of IgM and IgG, ELISA can provide information on where, in the course of the infection, a patient is, or if a person has previously been infected. Later, when the pandemic curve flattens out, it will be important to get a comprehensive view of the number of individuals that have been infected, and then ELISA can be useful.

# Innholdsfortegnelse

Forord . . . . .	i
Sammendrag . . . . .	ii
Abstract . . . . .	iii
Ordlister . . . . .	v
<b>1 Introduksjon</b>	<b>1</b>
1.1 Bakgrunn . . . . .	1
1.2 Motivasjon og problemstilling . . . . .	2
<b>2 Teori</b>	<b>4</b>
2.1 SARS-CoV-2 . . . . .	4
2.1.1 Morfologi og virusreplikasjon . . . . .	5
2.1.2 Patogenese . . . . .	6
2.2 RT-qPCR . . . . .	8
2.3 ELISA . . . . .	10
2.3.1 Forskjellige typer ELISA . . . . .	10
2.3.2 Diagnostisering av virus-sykdommer ved hjelp av ELISA . . . . .	12
2.4 Statistikk . . . . .	13
2.4.1 Spesifisitet . . . . .	13
2.4.2 Sensitivitet . . . . .	13
<b>3 Metode</b>	<b>14</b>
<b>4 Resultat</b>	<b>16</b>
<b>5 Diskusjon</b>	<b>18</b>
<b>6 Konklusjon</b>	<b>23</b>
6.1 Videre arbeid . . . . .	23
<b>Referanser</b>	<b>24</b>
<b>Figurliste</b>	<b>30</b>
<b>Tabelliste</b>	<b>31</b>



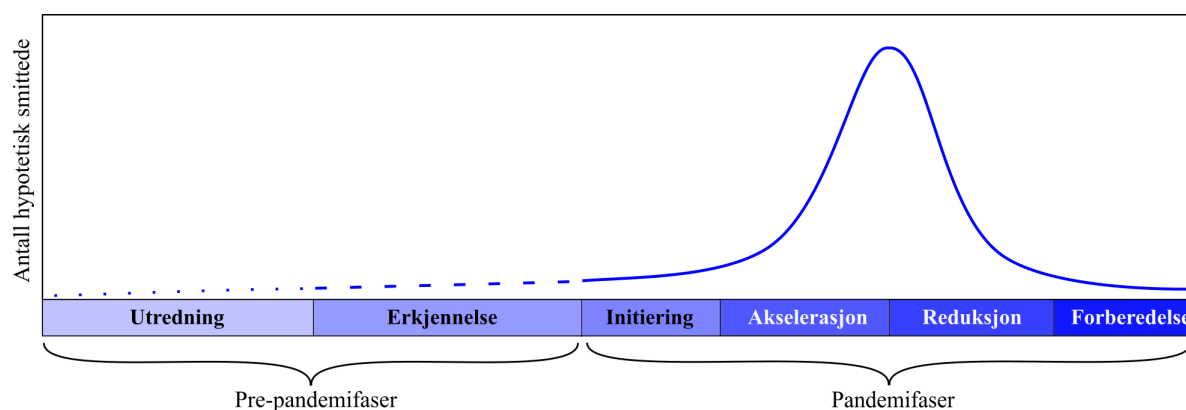
# Ordliste

<b>ACE2</b>	Angiotensin-converting enzyme 2
<b>AMV-RT</b>	Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase
<b>ARDS</b>	Acute respiratory distress syndrome
<b>BALF</b>	Bronchoalveolar lavage fluid
<b>cDNA</b>	Complementary DNA
<b>COVID-19</b>	Coronavirus disease 2019
<b>Ct</b>	Threshold cycle
<b>dsDNA</b>	Double-stranded DNA
<b>EIA</b>	Enzyme immunoassay
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>FRET</b>	Fluorescence resonance energy transfer
<b>ICT</b>	Immunochromatographic test
<b>IFA</b>	Immunofluorescent assay
<b>LOD</b>	Limit of detection
<b>MERS-CoV</b>	Middle East respiratory syndrome coronavirus
<b>MMLV-RT</b>	Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase
<b>NAAT</b>	Nucleic acid amplification test
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>qPCR</b>	Quantitative polymerase chain reaction
<b>RdRp</b>	RNA-dependent RNA polymerase
<b>RT-qPCR</b>	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
<b>SARS-CoV</b>	Severe acute respiratory syndrome coronavirus
<b>SARS-CoV-2</b>	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
<b>ssRNA</b>	Single-stranded RNA
<b>TMPRSS2</b>	Transmembranprotease serin 2

# Kapittel 1: Introduksjon

## 1.1 Bakgrunn

I desember 2019 dukket det opp en rekke tilfeller med lungebetennelser av ukjent årsak i byen Wuhan, i Hubei-provinsen i Kina [1]. 7. januar 2020 meldte kinesiske myndigheter at de hadde klart å isolere og identifisere en hittil ukjent type human Betacoronavirus av zoonotisk opprinnelse, som midlertidig ble navngitt 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) [2]. 11. februar 2020 ble viruset, på grunn av dens genetiske relasjon til SARS-CoV, gitt det offisielle navnet "severe acute respiratory syndrome coronavirus 2", forkortet som SARS-CoV-2. Infeksjonssykdommen som viruset fører til ble gitt navnet COVID-19, en forkortelse for "coronavirus disease 2019" [3]. 11. mars 2020 kunngjorde WHO's generaldirektør, Tedros Adhanom Ghebreyesus, at COVID-19-utbruddet kan kategoriseres som en pandemi [4]. Ifølge Centers Disease for Disease Control and Prevention (CDC) ser COVID-19-pandemien ut til å spre seg som influensa, og man kan derfor benytte seg av samme modell for å se hvordan pandemien vil utvikle seg [5]. Figur 1.1 viser hvordan man kan dele utviklingen til en pandemi inn i ulike faser. Den første fasen er utredningsfasen, hvor et nytt virus som man tror kan ha påvirkning på menneskelig helse, blir identifisert og utredet. Andre fase er erkjennelsesfasen, hvor man ser et økt antall smittede eller klynger av smittede, i tillegg til et økt potensiale for smitte mellom mennesker. Tredje fase er initieringsfasen, der det bekreftes både effektiv og vedvarende overføring fra person til person, og man går inn i en begynnende pandemibølge. Fjerde fase er akselerasjonsfasen, hvor man får en sterk økning i antall smittede. Femte fase er reduksjonsfasen, hvor man får en nedgang i antallet nye smittetilfeller. Sjette og siste fase er forberedelsesfasen, hvor pandemien har avtatt, men man forsetter å overvåke viruset for å forberede seg på en eventuelt ny smittebølge [6].



**Figur 1.1** Utviklingsforløpet til influensapandemier. Et lignende forløp antas ved COVID-19-pandemien. Figuren er tilpasset fra Holloway et al., ved CDC [6].

Coronavirus inngår i familien *Coronaviridae* og er et membrankledd, enkelttrådet RNA-virus [7]. I virusets overflate sitter det glykoprotein, kalt S-protein eller "spikes". I et elektronmikroskop vil disse S-proteinene se ut som en korona (fra det latinske ordet *corona*, som betyr krans eller krone) som omkranser viruset, og det er fra dette coronavirus har fått sitt navn [8, 9]. Det finnes en rekke forskjellige typer coronavirus, og disse kan klassifiseres inn i fire slekter:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  og  $\delta$  [10]. Fra før av er det seks kjente humane coronavirus (HCoV) som kan bli overført mellom mennesker:  $\alpha$ -coronavirusene HCoV-229E og HCoV-NL63, og  $\beta$ -coronavirusene HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV og MERS-CoV [10, 11]. HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 og HCoV-HKU1, forårsaker vanligvis milde, øvre luftveissymptomer. SARS-CoV og MERS-CoV er i motsetning svært patogene, og fører henholdsvis til infeksjonssykdommene SARS (severe acute respiratory syndrome) og MERS (Middle East respiratory syndrome). Ifølge WHO var det i perioden fra november 2002 til juli 2003 en dødsrate på 9,6% for SARS [12], og i perioden fra april 2012 til november 2019 var det en dødsrate på hele 34,4% for MERS [13]. Siden utbruddet i Wuhan startet har SARS-CoV-2 spredd seg til 216 land, områder eller territorier, med til sammen 4 696 849 registrerte smittetilfeller per 19. mai 2020 [14]. Sammenlignet med SARS og MERS har COVID-19 en lavere dødelighet, men på grunn av den store smittespredningen har antall dødsfall likevel vært mye større. Per 19. mai 2020 er det ifølge WHO registrert 315 131 dødsfall som følge av COVID-19 [14]. Det er vanskelig å si noe om dødsraten til COVID-19 da mange blir smittet uten at det blir registrert, enten ved at de har symptomer og likevel ikke blir testet, eller at de er asymptomatiske og derfor ikke vet at de er syke i det hele tatt.

## 1.2 Motivasjon og problemstilling

Ifølge WHO bør mistenkte smittetilfeller bli testet for SARS-CoV-2 med nukleinsyre-amplifikasjonsteknikker (NAAT), slik som kvantitativ revers transkripsjon PCR (RT-qPCR) [15]. I pandemisituasjonen vi befinner oss i nå, er det vanskelig å teste absolutt alle mistenkte smittetilfeller, og man må ofte heller prioritere å teste alvorlig syke, risikogrupper og helsearbeidere. Derfor er det et stort behov for økt testkapasitet og utvikling av andre analyser som kan påvise SARS-CoV-2 direkte, eller påvise en immunrespons på COVID-19 hos smittede. Med bakgrunn i dette har vi kommet frem til følgende problemstilling:

«Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) er en serologisk analyse som kan bli aktuell å ta i bruk for å påvise COVID-19. I en pandemisituasjon som vi befinner oss i nå, hvilke fordeler og ulemper vil ELISA kunne ha sammenlignet med RT-qPCR som brukes til å påvise SARS-CoV-2?»

For å avgrense oppgaven er et viktig poeng med problemstillingen at det fokuseres på fordeler og ulemper med RT-qPCR og ELISA i en pandemisituasjon. I en pandemi-situasjon vil det være et stort press på helsetjenesten og et enormt behov for mange tester

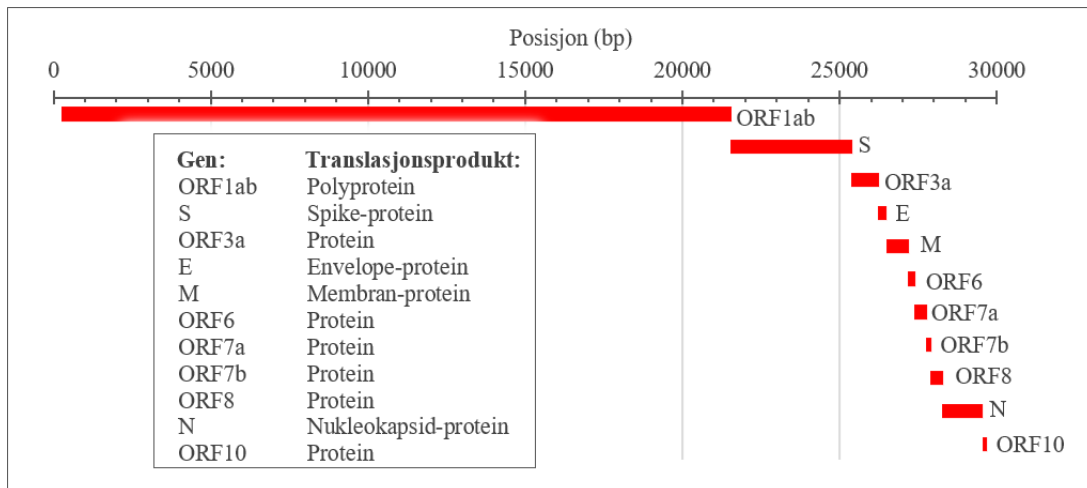
på kort tid. Et pandemiutbrudd vil derfor være høyst aktuelt for bioingeniører, og spesielt når det gjelder et nytt virus. Som Svein A. Liljebakk skrev i Bioingeniøren: "*Sjelden får man så tydelig demonstrert hvor viktige bioingeniørene og de medisinske laboratoriene er, som under et sykdomsutbrudd med en ny mikrobe*" [16].

# Kapittel 2: Teori

## 2.1 SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 er i likhet med andre coronavirus sfæriske og membrankledde [17, 18], og måler 100-160 nm i diameter [10, 19]. Genomet er usegmentert, enkelttrådet RNA i positiv retning (+ssRNA) [10, 17, 18]. Genomet til SARS-CoV-2 ble først kartlagt og publisert 10. januar 2020 [20] av Wu et al. [21], og tildelt accession nr. MN908947 i GenBank [22]. Den fylogeniske analysen av det komplette genomet til Wu et al. viste at SARS-CoV-2 var nærmest beslektet (89,1% lik nukleotididentitet) med en gruppe SARS-lignende coronavirus (Bat SL-CoV) i slekten Betacoronavirus og subslekten Sarbecovirus, som tidligere har blitt funnet i flaggermus i Kina. Det ble i tillegg påvist nært slektskap til SARS-CoV, som også er et medlem av Sarbecovirus [21]. I Genbank har det også blitt publisert en referansesekvens for SARS-CoV-2, med accession nr. NC\_045512, som er identisk med MN908947 [23]. Andre komplette, og delvis komplette, gensekvenser av SARS-CoV-2 har etter hvert blitt publisert i bl.a. Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/sars-cov-2-seqs/>) [22] og GISAID (<https://www.gisaid.org/epiflu-applications/next-hcov-19-app/>) [24]. Disse er kartlagt av forskjellige forskningsgrupper rundt om i verden, og viser små endringer og noen mutasjoner i genomet. Ved å benytte seg av genom publisert i Genbank, analyserte Khailany et al. 95 komplette genomsekvenser, hentet fra pasienter smittet med SARS-CoV-2 over hele verden. Hos de 95 genomene fant de 116 unike mutasjoner, hvor 101 var kodende og 15 var ikke-kodende mutasjoner [25]. Mutasjoner driver utviklingen til SARS-CoV-2, og kan bl.a. føre til at viruset unnslipper en opparbeidet immunitet hos et tidligere smittet individ, eller at immuniteten fra en fremtidig vaksine ikke fungerer. Mutasjoner kan derfor ha mye å si for alvorlighetsgraden og spredningen av SARS-CoV-2 fremover [25, 26].

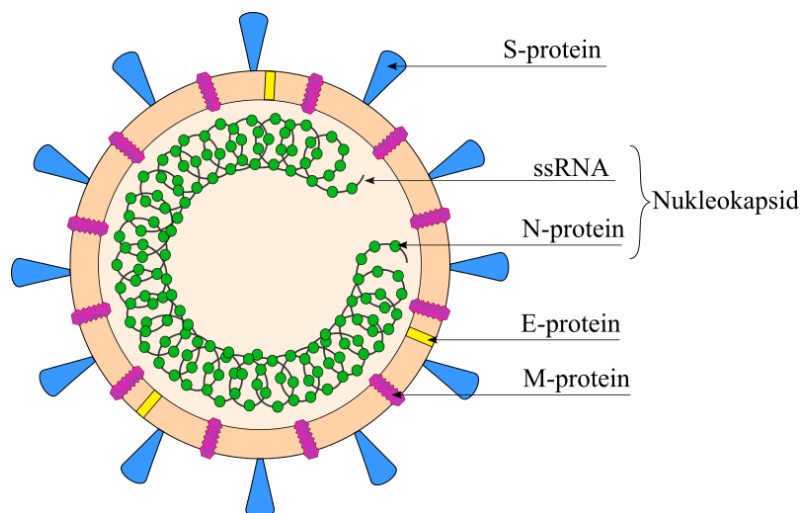
Genomet kartlagt av Wu et al. består av 29 903 basepar, som igjen utgjør en rekke ORFs (open reading frames) og gener [21]. En ORF er en kontinuerlig rekke med kodoner som begynner med et startkodon og slutter med et sluttkodon. Jo lengre en ORF er, desto mer sannsynlig er det en del av et gen som koder for et protein [27]. Figur 2.1 viser en illustrasjon av organiseringen av genomet til SARS-CoV-2. Første gen i rekken er ORF1ab, som utgjør omtrent to-tredjedeler av genomet. Den resterende én-tredjedelen av genomet koder for fire strukturelle hovedprotein: S-protein (spike protein), M-protein (membrane glycoprotein), E-protein (envelope protein) og N-protein (nucleocapside protein), i tillegg til en rekke protein av hittil ukjent betydning [21, 28]. Kartleggingen av genomet er viktig for kunne påvise viruset med molekylære analyser, som f.eks. RT-qPCR. Slike analyser er målrettet mot spesifikke gen eller nukleinsyresekvenser i genomet. Chu et al. har f.eks. utviklet to ulike RT-qPCR-analyser, hvor den ene detekterer en sekvens i ORF1ab-genet og den andre detekterer en sekvens i N-genet [11]. Analyseprinsippet til RT-qPCR er forklart i Kapittel 2.2.



**Figur 2.1** Organisering av genomet til SARS-CoV-2. Illustrasjonen er basert på arbeidet til Wu et al. [21] og referansesekvensen utgitt i Genbank (accession nr. NC\_045512.2) [23].

### 2.1.1 Morfologi og virusreplikasjon

Virusets overflate består av en dobbelt lipidmembran som er dannet av intracellulære membraner fra den infiserte cellen [29, 30]. Det er i denne membranen man finner de strukturelle proteinene: S-protein, M-protein og E-protein. N-proteinene befinner seg på innsiden av viruset, hvor proteinets hovedfunksjon er å pakke virusets genom, slik at de sammen danner et helisk formet nukleokapsid [31]. Figur 2.2 viser en skjematisk fremstilling av SARS-CoV-2, med de nevnte hovedproteinene og nukleinsyren ssRNA.



**Figur 2.2** Skjematisk fremstilling av SARS-CoV-2. En dobbelt lipidmembran som inneholder S-protein (spike protein), M-protein (membrane glycoprotein) og E-protein (envelope protein), omslutter det spiralformede nukleokapsidet. Nukleokapsidet består av N-protein (nucleocapsid protein) og +ssRNA. Figuren er tilpasset fra Stadler et al. [30].

Når et virus har entret en vertsorganisme er første trinn i virusreplikasjonen, adsorpsjon og påfølgende penetrasjon inn i en målcelle. For SARS-CoV-2 skjer dette, i likhet med andre coronavirus, ved at S-protein først binder seg til en cellulær reseptor, for deretter å bli aktivert av proteaser fra målcellen. Studier har vist at SARS-CoV-2, i likhet med SARS-CoV, er avhengig av reseptoren ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) [32, 33] og serinproteasen TMPRSS2 (transmembranprotease serin 2) [32]. Når S-proteinet har bundet seg til ACE2, spaltes S-proteinet av TMPRSS2, slik at det dannes en S2-subenhet. Denne subenheten aktiverer selve fusjoneringprosessen mellom viruset og målcellen, slik at viruset kommer seg inn i målcellen [32].

Når viruset har entret målcellen frigjøres nukleinsyren ut i cytoplasma, hvor hele replikasjonsprosessen finner sted [18]. Siden genomet til SARS-CoV-2 er av typen +ssRNA, er det orientert i en 5' til 3' retning, altså er det identisk med mRNA [9]. Dette gjør at nukleinsyren kan fungere som et mRNA, slik at translasjon kan begynne umiddelbart ved hjelp av ribosomene i cellens cytoplasma. I starten er translasjon av ORF1ab i 5'cap-enden viktigst. Da produseres det to store polyproteiner, pp1a og pp1ab [28]. Disse polyproteinene blir videre prosessert til 16 ikke-strukturelle proteiner (nsp1–nsp16) som sammen danner virusets replikasjon-transkripsjon-kompleks [28, 29, 34], som blant annet inkluderer enzymet RNA-avhengig RNA-polymerase (RdRp), også bare kalt RNA-replikase [9]. Replikasjon-transkripsjon-komplekset kan deretter bruke genomet som et templat for å produsere enkeltrådet RNA i negativ retning (-ssRNA, 3' til 5'-retning), som videre brukes som templat til å produsere store mengder mRNA. Produsert mRNA blir så brukt både som kopier av genomet og til å produsere store mengder virusproteiner via translasjon [9, 29, 34].

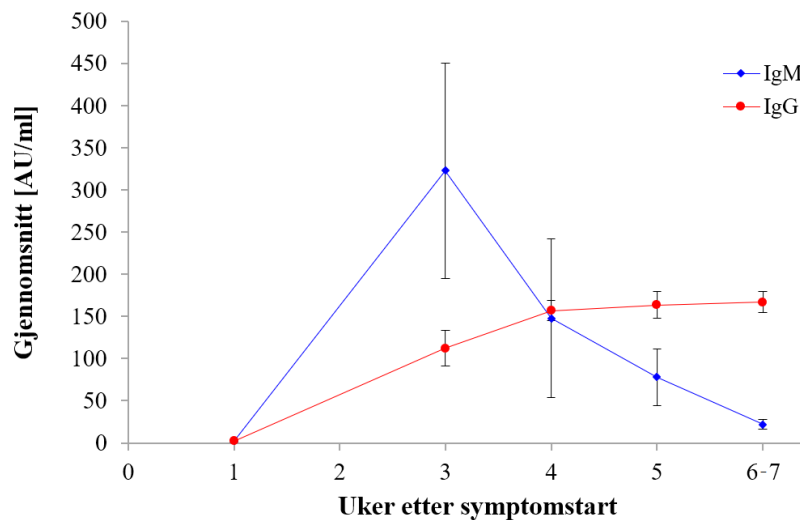
Etter en slik replikasjonsyklus befinner det seg masse strukturelle og ikke-strukturelle virusproteiner og kopier av virusgenomet som er klare for å samles til komplette SARS-CoV-2. De produserte strukturelle proteinene S-, M- og E-protein integreres inn i intracellulære membraner via endoplasmatisk retikulum (ER) og blir deretter fraktet videre i vesikler [35, 36]. Det oppkopierte genomet pakkes av N-proteiner, slik at det dannes helisk formet nukleokapsid [31]. Deretter integreres nukleokapsidene inn i vesiklene, hvor N-proteinene binder seg til M-proteinene [21, 35], og man får et ferdig SARS-CoV-2 virus som er klar for frigjøring fra vertscellen [35, 36]. Selve frigjøringen skjer ved at viruset transporteres til cellemembranen i vesikler og frigjøres via eksocytose [35].

### 2.1.2 Patogenese

SARS-CoV-2 infiserer en vert ved å komme i kontakt med slimhinner, både via dråpesmitte og kontaktsmitte [37]. Etter infeksjon kan man videre utvikle infeksjonssykdommen COVID-19. Symptomene på COVID-19 varierer, men hovedsymptomene er feber, hoste og tungpustethet. Andre vanlige symptomer er hodepine, slapphet, nedsatt lukte- og/eller smakssans [38]. Det har også blitt rapportert flere tilfeller med asymptomatisk tilfeller av COVID-19 [39, 40, 41]. COVID-19 fører ofte til viral pneumoni som kan detekteres ved

hjelp av CT. I en studie gjort av Fang et al., hadde 98% av pasientene ( $n=51$ ) med påvist SARS-CoV-2-infeksjon og pneumoni, abnormal CT [42]. Mattglassfortetning (ground-glass opacity), som er fortetninger i lungene som ikke "visker" ut lungens arkitektur, er ifølge Song et al. det vanligste abnormale CT-funnet i pneumoni forårsaket av SARS-CoV-2 [43]. COVID-19 kan også føre til mer alvorlige komplikasjoner som akutt lungesvikt-syndrom (ARDS), akutt hjertesjokk og sekundære infeksjoner som sepsis [44, 45]. Ifølge en studie utført av Huang et al. er ARDS hovedårsaken til dødsfall knyttet til COVID-19 [44]. Noen mennesker har høyere risiko for å utvikle alvorlige komplikasjoner, hvor de viktigste risikofaktorene er underliggende sykdom, alder og svekket immunforsvar [37].

Når en person blir smittet med SARS-CoV-2 vil det settes i gang en immunrespons for å bekjempe infeksjonen. Dette innebærer blant annet stimulering av kroppens humorale og cellulære immunitet [28]. I likhet med andre akutte virusinfeksjoner utvikles en typisk antistoffproduksjon av IgM og IgG [46, 47]. Xiao et al. har gjennomført en studie som viser hvordan mengden av IgM og IgG forandrer seg over tid hos pasienter med bekreftet SARS-CoV-2-infeksjon [48]. Resultatet av denne studien er vist i Figur 2.3. Immunresponsen kan man påvise ved hjelp av serologiske tester, som f.eks. ELISA, som er videre forklart i Kapittel 2.3.



**Figur 2.3** Forandring av gjennomsnittsmengden av IgM- og IgG-antistoff [AU/ml] over tid som respons på SARS-CoV-2. Referanseverdien er  $<10$  AU/ml. Standardfeil er inkludert. Figuren er tilpasset fra Xiao et al. [48].



## 2.2 RT-qPCR

Revers transkripsjon polymerase kjedereaksjon (RT-PCR) er en av de mest sensitive metodene for deteksjon av RNA-produkter [49]. Metoden brukes i dag som et viktig verktøy innen molekylær diagnostikk [50]. I kvantitativ RT-PCR (RT-qPCR) kan deteksjonen av amplifikasjonsproduktene avleses underveis i analysen, og oppnås ved bruk av fluorescensmolekyler i amplifiseringsprosessen [51].

En vellykket RT-qPCR krever RNA med høy kvalitet som er fritt for blant annet nedbrutt RNA, DNA, proteiner og inhibitorer [50, 52]. Lav RNA-kvalitet kan påvirke kvantifisering i PCR-prosessen [49], mens inhibitorer kan interferere med enzymene revers transkriptase og DNA polymerase [50, 53]. Prøvematerialet må derfor gjennom en ekstraksjonsprosess før det kan amplifiseres [54]. Under ekstraksjonen vil nukleinsyrer fra prøvematerialet isoleres, og det fjernes elementer som kan forstyrre i PCR-prosessen [50, 52]. En optimal ekstraksjon av RNA danner et viktig grunnlag for analysen videre.

Før PCR-amplifisering kreves det en revers transkripsjon av RNA til et komplementært DNA (cDNA) [50]. cDNA-syntetiseringen katalyseres av enzymet revers transkriptase, og det kreves en primer for å initiere prosessen [55]. Primerene som brukes i revers transkripsjon er enten sekvensspesifikke, uspesifikke hexamer eller oligo-dT [49, 55]. Enzymet sørger for elongering av primeren som resulterer i dannelsen av cDNA, som videre brukes som templat i PCR [55]. De mest brukte revers transkriptase enzymene er avian myeloblastosis virus (AMV-RT) og moloney murine leukemia virus (MMLV-RT) [49, 50].

Prosessen fra cDNA-syntese til PCR-amplifikasjon kan enten skje som en to-trinns reaksjon hvor revers transkripsjon og PCR-amplifikasjon skjer i separate rør, eller som en ett-trinns reaksjon hvor begge reaksjonene foregår i ett rør [51]. Når både cDNA-syntetiseringen og PCR-amplifisering skjer i samme rør, kreves det bruk av gen-spesifikke primere for å hindre uspesifikk amplifisering [56, 57]. Derimot kan to-trinns metoden tillate bruk av uspesifikke hexamer eller oligo-dT primere i RT-reaksjonen [56].

PCR kan deles inn i tre viktige trinn: separasjon av dsDNA, primer annealing og forlengelse av primer [58, 59]. Det første som skjer er at temperaturen økes til rundt 95°C som gjør at dsDNA separeres fra hverandre [60]. Deretter vil temperaturen senkes til mellom 35°C og 40°C, som tillater primerene å feste seg til DNA-sekvenser [60]. Til slutt økes temperaturen til 72°C som er den optimale temperaturen for DNA polymerase til å forlenge primeren ved å legge til komplementære nukleotider fra 3'-enden på primeren [60]. Denne sykliske tre-trinnsprosessen gjentas vanligvis mellom 30 til 40 ganger [60]. I teorien vil hver amplifikasjonssyklus kunne gi dobbelt antall målsekvenser [57]. I noen tilfeller kan polymerasen amplifisere uspesifikke produkter fra primere som har bundet seg tilfeldig eller ved primer-dimer dannelse [57]. Ved bruk av en termostabil, hot-start DNA polymerase kan man hindre en del uspesifikke amplifiseringer [50], ettersom amplifikasjonen ikke starter før det første oppvarmingstrinnet i PCR-syklusen [57].

Ved å kombinere fluorescensmolekyl med amplifikasjonsprosessen gir det mulighet for å detektere amplifikasjonsproduktene i sanntid [49]. Det finnes ulike teknikker å generere fluorescens på, for eksempel DNA-bindende fluorofor, hydrolyseprober og hybridiseringsprober [59]. DNA-bindende fluorofor fungerer ved å emittere fluorescens når det bindes til dsDNA [51]. For hver PCR-syklus vil det dannes mer dsDNA som gjør at mer fluorofor kan bindes og emittere fluorescens [49, 51]. Denne metoden er ikke sekvensspesifikk og spesifisiteten av denne metoden er derfor avhengig av primeren [49]. Hybridiseringsprober og hydrolyseprober er derimot sekvensspesifikke som vil hybridiseres til PCR-produkter under amplifikasjonen [59]. Hydrolyseprober er en oligonukleotid som består av et reportermolekyl på 5'-enden og en quencher på 3'-enden [49, 51]. Så lenge proben er intakt vil quencher redusere fluorescensintensiteten fra reportermolekylet ved hjelp av FRET (fluorescence resonance energy transfer) [51]. FRET vil si overføring av energi mellom to fluoroforer [50], og i tilfellet med hydrolyseprober vil FRET-fenomenet sørge for at fluorescensemisitteringen blir sterkt redusert i nærheten av et annet fargestoff, ofte en quencher [51, 57]. Quencher sørger for å avgi energi som varme i stedet for fluorescens [58]. Under PCR-prosessen vil proben hydrolyseres mellom fluorofor og quencher-molekylet som resulterer i emittering av fluorescens [59]. Vanligvis er denne metodikken avhengig av DNA polymerase sin 5'-eksonukleaseaktivitet for å hydrolysere proben [49, 59]. Bruk av hybridiseringsprober går ut på at to fluorofor-prober hybridiseres i nærheten av hverandre for at fluorescens kan genereres [50]. Alternativt kan fluorofor plasseres på en probe og en primer [59]. Hybridiseringen vil føre til at fluoroforene kommer nært nok til at FRET oppstår, og i motsetning til hydrolyseprober vil FRET i dette tilfellet føre til at det emitteres fluorescens [50].

Avlesningen av qPCR kan deles inn i fire faser: den lineære grunnfasen, tidlig eksponentiell fase, eksponentiell fase og til slutt platåfase [51]. Den lineære fasen er starten på PCR, og fluorescenssignalene for hver syklus har ikke nådd over grunnlinjen enda [51]. Grunnlinjen dannes som regel gjennom de første 3–15 syklusene, og signaler under grunnlinjen reflekterer bakgrunnsstøyet i reaksjonen [57]. På bakgrunn av grunnlinjen vil det også dannes et terskelnivå som er betydelig høyere enn bakgrunnsstøyet (vanligvis 10 ganger standardavviket til grunnlinjen) [51, 61]. I tidlig eksponentiell fase vil fluorescenssignalet nå over terskelnivået hvor signalet er signifikant høyere enn bakgrunnssignalet [51]. Hvert fluorescenssignal som detekteres over terskelnivået blir vurdert som et reelt signal [61]. Punktet hvor fluorescenssignalet passerer terskelnivået etter gitt antall syklus er prøvens Ct-verdi [51]. Pasientprøver som inneholder større mengder templat i starten av reaksjonen vil kreve færre PCR-sykluser før fluorescenssignalet detekteres, og får dermed en lavere Ct-verdi [61]. Den optimale amplifikasjonsperioden er i den eksponentielle fasen, hvor antall PCR-produkt dobles for hver syklus [51]. Til slutt er platåfasen, hvor det begynner å bli begrenset med reaksjonskomponenter og kurven flates ut [51].

## 2.3 ELISA

Enzyme immunoassays, også kjent som EIAs er en rekke veldig sensitive immunologiske metoder. Disse metodene er mye brukt både innen forskning og medisin [62]. EIA har flere undergrupper, der en av dem er metoden enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [63]. ELISA blir brukt for å detektere og måle små mengder biologiske substanser, som f.eks. peptider, proteiner, antistoff og hormoner [64]. Metoden detektere disse substansene vha. antistoff-antigen-bindinger. Ut ifra hva man ønsker å detektere, velger man et antistoff/antigen som matcher med høy affinitet, og kobler et enzym til dette. Om substansen man ønsker å detektere er i prøven, vil det matchende antistoffet/antigenet koble seg til substansen. Ved å tilsette substrat, vil enzymet utløse et fargeomslag i prøven, som vil være mulig å måle ved hjelp av f.eks. et spektrofotometer [63, 65]. På denne måten kan man finne ut om prøven inneholder det ønskede substratet, og mengden av det [63].

I et laboratorium blir ELISA ofte gjennomført ved å bruke mikrotiteringsplater som består av mange brønner. Selve reaksjonene skjer da i de ulike brønnene [66]. En viktig del av ELISA er å "vaske" prøven underveis. Dette betyr at etter hvert som de ulike komponentene blir tilsatt i prøvebrønnen skylles brønnen for å bli kvitt ubundet materiale. På denne måten kommer fargeomslaget i løsningen kun fra de antistoff-antigen-reaksjonene man ønsker, og resultatet blir med dette mest mulig riktig [67].

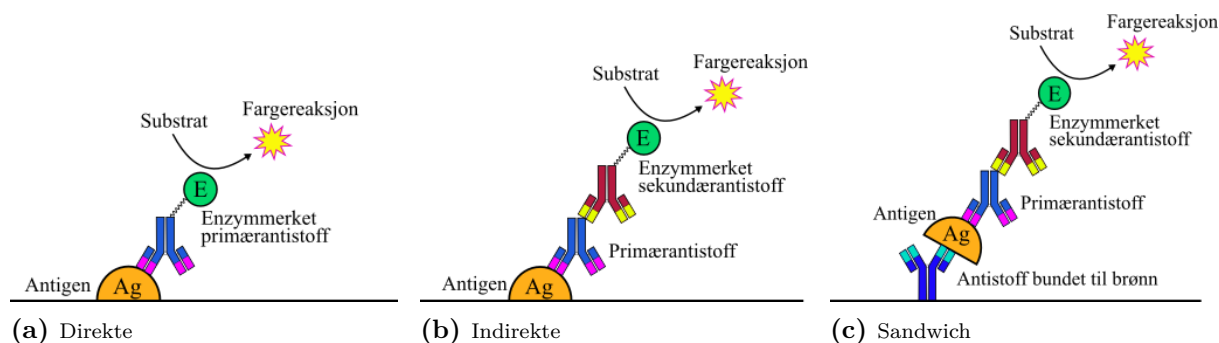
### 2.3.1 Forskjellige typer ELISA

Det finnes flere ulike typer ELISA. Disse har alle ulike fremgangsmåter, men analyseprinsippet bygger fremdeles på antistoff-antigen-bindinger og enzym-detektering. De mest vanlige er: direkte ELISA, indirekte ELISA, sandwich ELISA og kompetitiv ELISA [67]. I Figur 2.4 kan man se sluttproduktet og deteksjon av et målantigen i direkte, indirekte og sandwich ELISA. Navnene på de ulike typene ELISA er veldig beskrivende med tanke på fremgangsmåten de bruker. I direkte ELISA (Figur 2.4a) er et enzym koblet til primærantistoffet. Dette primærantistoffet fester seg direkte til målantigenet [67]. Fordelen med direkte ELISA er at metoden har få prosedyresteg. Dette skaper færre kilder til feil, gjør at metoden krever færre reagenser og generelt blir raskere og mer effektiv. En av ulempene med denne typen er at den har høyere forekomst av bakgrunnsstøy, som gjør direkte ELISA mindre spesifikk. Metoden blir også beskrevet som mindre fleksibel, da hvert målantigen må være bundet direkte til et enzymmerket primærantistoff [65, 68].

Ved indirekte ELISA (Figur 2.4b) trenger man to ulike antistoff for å detektere målantigenet. Enzymet er festet til sekundærantistoffet, og ikke primærantistoffet. Antistoffet med enzymet som lager en fargereaksjon i løsningen, fester seg dermed indirekte til målantigenet [67]. Det sekundære antistoffet øker signalforsterkningen, som gjør at denne typen ELISA får høyere sensitivitet. Indirekte ELISA har også høyere fleksibilitet siden det sekundærantistoffet kan binde seg til forskjellige primærantistoff. Ulempen med denne typen ELISA er at sekundærantistoffet kan koble seg direkte til målantigenet.

Dette vil skape bakgrunnsstøy i prøven, og kan påvirke resultatet negativt. Indirekte ELISA har også flere prosedyresteg, som gjør at analysen er mer tidkrevende [65, 68]. I sandwich ELISA (Figur 2.4c) blir det ønskede antigenet "fanget" mellom et antistoff som er festet i brønnveggen og et primærantistoff, som en sandwich. Her kan primærantistoffet ha et enzym koblet til seg (direkte sandwich), eller det kan (som vist i figuren) ha et sekundærantistoff med et enzym koblet til (indirekte sandwich) [67, 68]. Sandwich ELISA er beskrevet å være en veldig god metode. Den er rapportert å være hele 2–5 ganger så sensitiv som direkte og indirekte ELISA [67]. Måten de to antistoffene "fanger" antigenet på gir også metoden høy spesifisitet [65]. Ulempen med sandwich ELISA er at produksjonen av to antistoffer er mer kostbart sammenlignet med bare ett [65, 68].

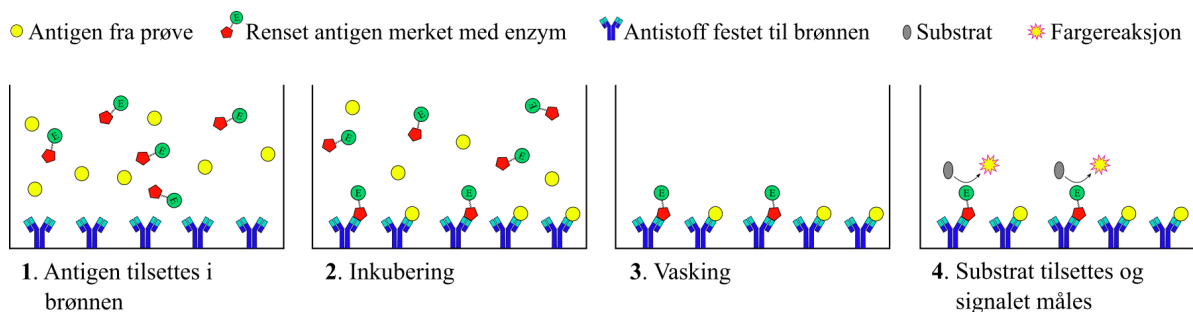
Ved direkte, indirekte og sandwich ELISA, får man et fargeomslag i prøven som et resultat. Styrken på fargeomslaget er direkte proporsjonalt med mengden målantigen. Om prøven inneholder store mengder målantigen, vil fargen i løsningen bli sterk. Om mengden målantigen er lav, vil fargen bli svak [66].



**Figur 2.4** Skjematisert fremstilling av antigenpåvisning ved hjelp av a) direkte, b) indirekte og c) sandwich ELISA. Antigenet fra prøven immobiliseres til brønnen og et enzymmerket antistoff bindes til antigenet. Deteksjonen av mengden antigen i prøven gjøres ved å tilsette et substrat som gir en fargereaksjon som kan måles. Figuren er tilpasset fra Thermo Fisher Scientific [69].

I Figur 2.5 er kompetitiv ELISA beskrevet trinnvis. Denne typen ELISA må ha et merket antigen som er helt likt målantigenet man ønsker å detektere. Merket vil si at det er koblet et enzym til det, så man kan detektere antigenet i løsningen. Brønnene som blir brukt har antistoff som matcher det merkede antigenet, bundet til brønnveggen. Før prøven tilsettes i brønnen, blandes den med de merkede antigenene. Når blandingen da tilsettes og inkuberes, vil målantigenene og de merkede antigenene konkurrere om å feste seg til antistoffene som er festet til brønnveggen. Videre vaskes brønnen, og substratet som gir en fargereaksjon i prøven tilsettes [68]. Med kompetitiv ELISA er avlesingen av fargeomslaget annerledes enn forklart tidligere i direkte, indirekte og sandwich ELISA. Her er mengden målantigen omvendt proporsjonal med styrken på fargeomslaget. Om prøven inneholder lite målantigener, vil fargeomslaget være sterkt, og om det er mye målantigener, vil fargeomslaget være svakt [67]. Figur 2.5 er et eksempel på det som kalles direkte kompetitiv ELISA. Det finnes også indirekte og sandwich kompetitiv ELISA [68]. Det at kompetitiv ELISA kan deles inn i flere undergrupper gjør metoden veldig fleksibel

og egnet til flere forskjellige analyser. Ut ifra hvilken undergruppe man velger å bruke, følger både fordelene og ulempene til undergruppene med [65, 68]. Bruker man f.eks. direkte kompetitiv ELISA vil man både få fordelene med at metoden er effektiv, men også ulempene med at den er lite fleksibel.



**Figur 2.5** Trinnvis fremstilling av direkte kompetitiv ELISA. Tilstedeværelsen av antigen i prøven gir en nedgang i det detekterte signalet, slik at mengden antigen i prøven er omvendt proporsjonal med signalstyrken. Figuren er tilpasset fra Aydin [67].

### 2.3.2 Diagnostisering av virus-sykdommer ved hjelp av ELISA

ELISA blir brukt som et diagnostisk verktøy innen medisin [65]. Metoden er i dag en utbredt analyse for å påvise ulike virus som f.eks. HIV, og hepatitt B og C [70]. Prøvematerialet som blir brukt for diagnostisering av en virusinfeksjon, er som oftest serum tatt vha. en blodprøve [63, 71]. Som nevnt tidligere kan ELISA detektere mange ulike substanser. Ved en virusinfeksjon kan denne metoden bli brukt til å detektere selve viruset, eller antistoffene (også kalt immunglobulinene) immunsystemet produserer når man blir utsatt for et virus [71]. Av de ulike immunglobulinene er man som oftest mest interessert i IgM og IgG. I starten av en virusinfeksjon vil kroppen begynne å produsere IgM. Økende IgM betyr at kroppen har oppdaget infeksjonen og har begynt å bekjempe den ved å aktivere komplementsystemet. Vel en uke etter at pasienten har blitt smittet vil kroppen begynne å produsere IgG. Etter en stund vil IgM-antistoffene forsvinne. IgG vil derimot øke til immunsystemet har begynt å få kontroll på infeksjon. Når infeksjonen er bekjempet vil mengden IgG avta og stabilisere seg på et lavere nivå, som et tegn på immunitet mot viruset [72]. Med dette kan ELISA detektere immunresponsen mot et spesifikt virus, men også finne ut hvor pasienter befinner seg i sykdomsforløpet: nylig smittet, midt i virusinfeksjonen eller immun mot viruset [71]. For at denne deteksjonen skal fungere, er man avhengig av at pasienten har et normalt fungerende immunforsvar, og ikke lider av f.eks. immunsvikt. Immunsvikt betyr at kroppens immunrespons er svekket eller fraværende. Kreftpasienter som får cellegift som svekker immunforsvaret er et eksempel på dette. Har man immunsvikt kan hvilken som helst del av immunforsvaret bli påvirket. Vanligvis går det hardest utover B- og T-lymfocytene, slik at de ikke fungerer normalt og dermed ikke produserer nok antistoff ved en eventuell infeksjonssykdom. Antistoff-deteksjon ved ELISA blir dermed vanskelig [73].

## 2.4 Statistikk

Når kvaliteten til laboratorieanalyser skal evalueres, er det ulike parametre å ta hensyn til. To av de mest sentrale er spesifisitet og sensitivitet, hvor begge kan uttrykkes diagnostisk eller analytisk. Både høy spesifisitet og høy sensitivitet er ønsket ved en analyse, men som regel er den ene viktigere enn den andre, avhengig av den kliniske situasjonen [74].

### 2.4.1 Spesifisitet

Diagnostisk spesifisitet er andelen av en populasjon uten den aktuelle sykdommen det testes for, som analysen med riktighet påviser som negativ. Denne andelen kan uttrykkes vha. formelen [74]:

$$\text{Spesifisitet} = \frac{TN}{(TN + FP)}, \quad (2.1)$$

hvor  $TN$  er antall sanne negative, dvs. antall individ som analysen med riktighet har påvist som negativ.  $FP$  er antall falske positive, dvs. antall individ som ikke har sykdommen, men som analysen feilaktig har påvist som positiv.

Analytisk spesifisitet er analysens evne til å kun identifisere målsubstansen og ikke forveksle den med lignende substanser [75]. I MIQE Guidelines beskriver Bustin et al. en PCR-analyse med høy analytisk spesifisitet, som en analyse som klarer å detektere den bestemte målsekvensen, og ikke andre, uspesifikke sekvenser som også er tilstede i prøven [76].

### 2.4.2 Sensitivitet

Diagnostisk sensitivitet er andelen av en populasjon med en spesifikk sykdom, som analysen med riktighet påviser som positiv. Denne andelen kan uttrykkes vha. formelen [74]:

$$\text{Sensitivitet} = \frac{TP}{(TP + FN)}, \quad (2.2)$$

hvor  $TP$  er antall sanne positive, dvs. antall individ med den aktuelle sykdommen som analysen klarer å påvise.  $FN$  er antall falske negative, dvs. antall individ med den aktuelle sykdommen, men som analysen ikke klarer å påvise. Deteksjonrate brukes noen ganger som et synonym på diagnostisk sensitivitet [77].

Analytisk sensitivitet er den minste mengden av målsubstansen i en prøve som kan måles nøyaktig av analysen [75, 76]. Ofte uttrykkes analytisk sensitivitet som analysens deteksjonsgrense, eller "limit of detection" (LOD), som vil si konsentrasjonen som kan detekteres med rimelig sikkerhet, ofte 95% sannsynlighet [76].

# Kapittel 3: Metode

Som tidligere nevnt er hensikten med denne bacheloroppgaven å undersøke fordeler og ulemper ved å bruke ELISA til å påvise COVID-19 i en pandemisituasjon, kontra å bruke RT-qPCR til påvisning av SARS-CoV-2. For å kunne svare på dette har vi gjort systematiske søk i de nettbaserte søkemotorene Science Direct, PubMed og Google Scholar for å finne et utvalg passende forskningsartikler. Søkene besto av kombinasjoner av søkeordene: "SARS-CoV-2", "COVID-19", "Serology", "Enzyme-linked immunosorbent assay", "ELISA", "Quantitative RT-PCR", "RT-PCR" og "RT-qPCR".

**Tabell 3.1** Liste over 10 utvalgte forskningsartikler.

ID	Forfatter (årstall)	Tittel	Tidsskrift	Ref.
1	Guo et al. (2020)	Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19)	Clinical Infectious Diseases	[46]
2	Lv et al. (2020)	Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient	Clinica Chimica Acta	[78]
3	Corman et al. (2020)	Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR	Eurosurveillance	[79]
4	Zhang et al. (2020)	Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes	Emerging Microbes & Infections	[80]
5	Wu et al. (2004)	Serologic and Molecular Biologic Methods for SARS-associated Coronavirus Infection, Taiwan	Emerging infectious diseases	[81]
6	Zhou et al. (2020)	A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin	Nature	[33]
7	Yu et al. (2020)	Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients	Clinical Infectious Diseases	[41]
8	Zhao et al. (2020)	Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019	Clinical Infectious Diseases	[82]
9	Chan et al. (2020)	Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay validated <i>in vitro</i> and with clinical specimens	Journal of Clinical Microbiology	[83]
10	Xiang et al. (2020)	Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients with COVID-19	Clinical Infectious Diseases	[84]

De utvalgte artiklene er listet opp i Tabell 3.1. For å finne forskningsartikler om SARS-CoV-2 ble ofte søket snevret inn ved å justere innstillingene til kun å vise artikler som har blitt publisert i 2020, men siden SARS-CoV-2 deler så mange likheter med SARS-CoV er det også tatt med en eldre forskningsartikkel publisert i 2004, som handler om SARS.

Siden COVID-19-pandemien så nylig har begynt, og fortsatt er under utvikling, har det blitt gjort mange studier på kort tid. På grunn av dette korte tidsperspektivet er det mange artikler som enda ikke har blitt "peer-reviewed", det vil si at de ikke har gjennomgått en fagfelle vurdering som kvalitetskontroll. For å prøve å unngå publikasjoner med eventuelle feil i metode og resultat har vi derfor valgt å kun benytte oss av forskningsartikler som er peer-reviewed, selv om dette gjør at man kanskje også utelukker ny og bra forskning. Ved å kun benytte seg av artikler som er peer-reviewed vil derimot omfanget av aktuelle artikler bli mindre, og på denne måten hjelpe til med å snevre inn utvelgelsesprosessen. I tillegg har vi valgt å ta med en supplerende publikasjon: "*Laboratory testing for coronavirus diseases (COVID-19) in suspected human cases*", av WHO [15]. Dette er WHO's midlertidige laboratorieveiledning for testing av SARS-CoV-2, gjeldene fra og med 19. mars 2020.



# Kapittel 4: Resultat

De utvalgte forskningsartiklene i Tabell 3.1 omhandler deteksjon av SARS-CoV-2 (eller SARS-CoV hos Wu et al.) ved hjelp av RT-qPCR, og/eller deteksjon av immunresponsen mot viruset ved hjelp av serologiske analyser som ELISA. Ut ifra den aktuelle problemstillingen, så er de viktigste funnene fra hver enkelt forskningsartikkel listet opp i Tabell 4.1. I tabellen er også aktuell analyse og testpopulasjon oppgitt.

**Tabell 4.1** Analyse, testpopulasjon og funn hos de utvalgte forskningsartiklene.

ID	Forfatter	Analyse og testpopulasjon	Funn	Ref.
1	Guo et al.	RT-qPCR og ELISA. 140 pasienter, hvor 82 på forhånd var bekreftet og 58 var mistenkte tilfeller med SARS-CoV-2.	Rett etter symptomdebut ga RT-qPCR høyest deteksjonsrate, men etter 5,5 dager ble deteksjonsraten til IgM ELISA høyere. Ved å kombinere IgM ELISA med RT-qPCR ble den positive deteksjonsraten signifikant økt fra 51,9% til 98,6%, sammenlignet med kun RT-qPCR.	[46]
2	Lv et al.	RT-qPCR. 1 pasient gjentagende testet for SARS-CoV-2.	Pasient med symptomer på COVID-19 ble testet med halsprøve, men fikk negativt RT-qPCR-resultat på dag 3 og 8 etter innleggelse. På dag 9 og 10 viste RT-qPCR positivt for N-gen. Dag 16 viste positivt for både N-gen og ORF1ab-gen. Testen ble negativ igjen på dag 19 og 20.	[78]
3	Corman et al.	RT-qPCR. 297 prøver, påvist med forskjellige luftveisvirus.	Utviklet probe mot E- og RdRp-gen. Probe mot E-gen viste 3,9 RNA kopier/reaksjon, mens RdRp-gen viste 3,6 RNA kopier/reaksjon (95% deteksjonssannsynlighet). Probe mot E-gen skilte ikke mellom SARS-CoV-2 og SARS-CoV, mens probe mot RdRp-gen var spesifikk mot SARS-CoV-2. Ingen av probene ga kryssreaksjoner med andre typer humane coronavirus eller andre luftveisvirus.	[79]
4	Zhang et al.	RT-qPCR og ELISA. 16 pasienter, på forhånd bekreftet smittet med SARS-CoV-2.	10 dager etter sykehusinnleggelse ble 50% av oralprøvene og 25% av analprøvene påvist positive vha. RT-qPCR. 50% og 81% av serumprøvene ble påvist positive for henholdsvis IgM og IgG vha. ELISA. 5 dager senere gikk antall påviste, positive oralprøver ned til 25%, mens positive analprøver økte til 37,5%. Antall IgM- og IgG-positive prøver økte videre til henholdsvis 81% og 100%.	[80]
5	Wu et al.	RT-qPCR og ELISA. 537 pasienter, antatt som sannsynlig smittet med SARS-CoV.	Med nøytraliseringsstest som referanse, ble sensitiviteten og spesifisiteten for RT-qPCR og ELISA funnet å være henholdsvis: 52,2% og 78,1% for RT-qPCR, og 98,2% og 98,7% for ELISA.	[81]

Tabell 4.1 (fortsettelse).

ID	Forfatter	Analyse og testpopulasjon	Funn	Ref.
6	Zhou et al.	RT-qPCR og ELISA. 7 pasienter med alvorlig lungebetennelse, antatt som sannsynlig smittet med SARS-CoV-2.	Utviklet probe mot S-genet til SARS-CoV-2, som skiller SARS-CoV-2 fra alle andre humane coronavirus. Oralprøver og BALF ble tatt og analysert med RT-qPCR, som resulterte i 6 positive BALF-prøver og 5 positive oralprøver. Til sammen ga dette påvisning av SARS-CoV-2 hos samtlige pasienter. 20 dager etter symptombegynnelse ble 5 av 7 testet for IgM og IgG vha. ELISA. Alle 5 var da sterkt positive for IgG, i tillegg var 3 stk. IgM-positive.	[33]
7	Yu et al.	RT-qPCR. 76 pasienter, på forhånd bekreftet smittet med SARS-CoV-2.	Prober mot ORF1ab-gen og N-gen ble testet. Av totalt 323 prøver ble 95 positive for begge gen, 67 ble kun positiv for ett gen, mens 161 ble negativ. Virusmengden i sputumprøvene var $17429 \pm 6920$ kopier/test, i halsprøvene var det $2552 \pm 1965$ kopier/test og nasalprøvene $651 \pm 501$ kopier/test. Sputumprøvene i tidlig og progressiv fase hadde en viral mengde på $46800 \pm 17272$ , mens i rekonvalesent fase var den $1252 \pm 1027$ .	[41]
8	Zhao et al.	ELISA. 173 pasienter, på forhånd påvist smittet med SARS-CoV-2.	I perioden 0–7 dager etter symptomdebut hadde RT-qPCR en sensitivitet på 66,7%. Etter dag 7 var ELISA mest sensitiv. I perioden 8–14 dager etter symptomdebut lå sensitiviteten for IgM og IgG på 73,3% og 54,1%, mens i perioden 15–39 dager etter symptomdebut lå sensitiviteten for IgM og IgG på 94,3% og 79,8%. Alle pasientene ble også testet for når antistoffresponsen var mulig å detektere. For IgM ble det funnet en sterk økende serokonversjon fra dag 12, mens for IgG ble økningen funnet fra dag 14.	[82]
9	Chan et al.	RT-qPCR. 15 pasienter, på forhånd bekreftet smittet med SARS-CoV-2.	Totalt 273 pasientprøver ble samlet fra 15 pasienter. Prober mot RdRp/Hel-gen viste lavest LOD med 11,2 RNA kopier/reaksjon, mens probe mot N-gen viste 21,3 RNA kopier/reaksjon (95% konfidensintervall). Hverken probe mot N- eller RdRp/Hel-gen viste kryssreaksjoner med andre humane coronavirus (HCoV-HKU1 ble ikke testet), og heller ikke andre luftveispato gener.	[83]
10	Xiang et al.	ELISA. 85 pasienter, på forhånd bekreftet smittet med SARS-CoV-2.	66 av pasientene ble tatt serumprøver av i perioden 13–29 dager etter symptomdebut. Sensitiviteten til IgM- og IgG-ELISA ble i denne tidsperioden 77,3% og 83,3%. Videre ble 29 av pasientene testet for å se når antistoffresponsen var mulig å detektere. For IgM ble det funnet en sterkt økende serokonversjon fra dag 9, mens ved IgG ble økningen funnet fra dag 11.	[84]

## Kapittel 5: Diskusjon

I vår problemstilling ønsker vi å se på fordeler og ulemper ved å bruke ELISA, kontra å bruke RT-qPCR til å påvise en SARS-CoV-2-infeksjon. ELISA detekterer antistoffene immunforsvaret vårt produserer ved en infeksjon, mens RT-qPCR detekterer selve viruset SARS-CoV-2. Et viktig aspekt av problemstillingen er at sammenligningen av de to analysene skal gjøres med hensyn til at vi befinner oss i en pandemisituasjon, og dette vil påvirke vurderingen av analysenes spesifisitet og sensitivitet.

Ettersom SARS-CoV-2 viser en svært lik nukleotididentitet til Bat SL-CoV, og nært slektskap til SARS-CoV (Kapittel 2.1), kan det potensielt bli vanskelig å skille dem fra hverandre i en RT-qPCR-analyse. Det kan føre til at RT-qPCR får en svekket analytisk spesifisitet i deteksjonen av SARS-CoV-2. I studien til Corman et al. ble det utviklet prober mot E-gen og RdRp-gen på genomet til SARS-CoV-2. Sett bort ifra SARS-CoV, viste ingen av de humane coronavirus kryssreaktivitet i analysene, heller ikke et bredt utvalg av luftveisvirus ga falsk positiv amplifikasjon. Proben mot E-gen skilte ikke mellom SARS-CoV-2 og SARS-CoV, mens RdRp-gen var spesifikk for SARS-CoV-2 [79]. I studien til Chan et al. var proben rettet mot RdRp/Hel- og N-gen, som heller ikke viste kryssreaksjoner med andre humane coronavirus (HCoV-HKU1 ble ikke testet), og heller ikke andre luftveispatogener [83]. Det vil si at både studien til Corman et al. og Chan et al. viser at bruk av riktig probe i RT-qPCR-analysen gir en svært spesifikk deteksjon av SARS-CoV-2.

Til deteksjon av antistoff mot SARS-CoV-2 med ELISA, har Guo et al. benyttet seg av rensset rNP (rekombinant N-protein) som antigen, men på grunn av den store likheten mellom N-proteinet til SARS-CoV-2 og SARS-CoV, ble det funnet en sterk kryssreaktivitet mellom de to [46]. Zhang et al. og Zhou et al. benyttet seg av et tidligere utviklet N-protein fra bat SARSr-CoV Rp3 (SARS-relatert coronavirus fra flaggermus) som antigen for IgM- og IgG-ELISA, da denne typen coronavirus deler 92% aminosyreidentitet med N-proteinet til SARS-CoV-2. Dette antigenet deler imidlertid også over 90% aminosyreidentitet med SARS-CoV, og dette gjør at man heller ikke i disse studiene klarer å skille mellom SARS-CoV-2 og SARS-CoV [33, 80].

Selv om både ELISA og noen prober i RT-qPCR-analysen viste kryssreaktivitet mellom SARS-CoV-2 og SARS-CoV, er lav spesifisitet et problem som er aller størst ved bruk av ELISA. SARS-epidemien har imidlertid ikke vært aktiv siden perioden 2002–2003, i tillegg til at den har førte til langt færre smittede enn hva COVID-19-pandemien hittil har ført til. Sannsynligheten for at en person som tester positivt er smittet med SARS-CoV-2 er derfor langt større enn sannsynligheten for at personen er smittet med SARS-CoV. Siden vi nå befinner oss i en pandemisituasjon vil det være viktigere å unngå falske negative resultat, enn det er å unngå falske positive resultat. ELISA kan dermed være et hjelpemiddel for å oppdage og isolere flere smittede, og på denne måten hjelpe til

med å senke smittespredningen. Etter hvert som pandemisituasjonen går over vil det derimot være viktigere å kunne skille SARS-CoV-2 (COVID-19) fra SARS-CoV (SARS) og andre coronavirus i rutinediagnostikk, og da vil RT-qPCR som er en mer spesifikk analysemetode være et bedre valg.

Analysemetoder med høy sensitivitet er essensielt for rask og pålitelig diagnostikk i en pandemisituasjon. For å unngå falske negative prøveresultater bør analysemetodene RT-qPCR og ELISA vise en god sensitivitet. I studien til Chan et al. ble det utviklet prober mot RdRp/Hel- og N-gen på genomet til SARS-CoV-2, som begge viste lav LOD med RT-qPCR. I studien til Corman et al. ble det utviklet prober mot RdRp-gen og E-gen, som viste enda bedre analytisk sensitivitet (med lavere LOD) enn Chan et al. (Tabell 4.1). Både Corman et al. og Chan et al. viser dermed at RT-qPCR-analysen i utgangspunktet er en svært sensitiv analyse for deteksjon av SARS-CoV-2. På tross av dette har RT-qPCR likevel i noen tilfeller vist lav diagnostisk sensitivitet i deteksjonen av SARS-CoV-2. Denne problematikken blir diskutert i studien til Yu et al. som mener analysemetoden har begrensninger når prøvematerialet inneholder lav virusmengde. Yu et al. undersøkte blant annet hvilket prøvemateriale som viste høyest virusmengde, og når i infeksjonsforløpet virusmengden var størst. Ifølge studien viste sputumprøver høyest virusmengde, og hadde signifikant høyere virusmengde i tidlig og progressiv fase sammenlignet med rekonvalesent fase (Tabell 4.1). Det vil si at for å unngå falske negative prøveresultat bør prøvematerialet, dersom mulig, innhentes i tidlig og/eller progressiv fase i infeksjonsforløpet. Yu et al. konkluderer med at så lenge prøvematerialet inneholder tilstrekkelig mengder virus så er RT-qPCR en pålitelig og sensitiv analysemetode for deteksjon av SARS-CoV-2. Studien til Zhang et al. viste en tendens hvor man utover i infeksjonsforløpet så en økning av antall positive prøver tatt analt, samtidig som en nedgang i antall positive prøver tatt oralt. Det vil si at selv om pasienter har testet negativt med prøver tatt oralt, er det en mulighet for at de fortsatt kan være viremisk ved å skille ut virus fekalt.

For RT-qPCR vil sensitiviteten til analysen også være avhengig av hvor man har innhentet prøvematerialet, og at det har blitt innhentet på korrekt måte. Ifølge WHO's laboratorieveiledning skal minimum øvre respiratorisk prøvemateriale bli innhentet, og det skal da være prøvemateriale fra både nasopharynx og oropharynx [15]. Dette er en begrensning med studiene til blant annet Wu et al. og Guo et al., som kun bruker prøvemateriale fra hals (oropharynx) til RT-qPCR-analysen, noe som vil øke sannsynligheten for falske negative resultat. Når antallet falske negative øker kan man se, ut ifra Ligning (2.2), at dette fører til at analysens diagnostiske sensitivitet synker. Ifølge WHO's laboratorieveiledning er også nedre respiratorisk prøvemateriale ønskelig, dvs. sputum og/eller endotrakeal aspirat eller bronkoalveolær skylling (BALF) hos pasienter med mer alvorlig luftveissykdom [15]. Eksempler på fordelene med nedre respiratorisk prøvemateriale finner vi i studiene til Yu et al. og Zhou et al. Som tidligere nevnt fant Yu et al. at virusmengden var størst i sputumprøvene, sammenlignet med prøver tatt fra hals og nese. I studien til Zhou et al.,

ble 6 av 7 BALF-prøver påvist som positive ved hjelp av RT-qPCR (Tabell 4.1). Zhou et al. hadde en svært liten testpopulasjon, og studien har derfor lav statistisk signifikans, men den gir likevel en god indikasjon om at bruken av BALF-prøver øker sensitiviteten til RT-qPCR. Det er med andre ord en fordel om man innhenter prøvemateriale både fra øvre og nedre luftveier for å unngå at en smittet pasient får falskt negativt resultat.

I WHO's veiledning for laboratorietesting av SARS-CoV-2, er det satt krav for vurdering av mistenkte COVID-19-tilfeller i områder hvor det enda ikke er bekreftet smitte. For at diagnosen kan bekreftes i et området uten kjente smittetilfeller, må det være et positivt NAAT-resultat for minst to ulike målsekvenser på virusgenomet, hvor ett av målsekvensene må være spesifikk for SARS-CoV-2. Alternativt kan virusgenomet sekvenseres [15]. I studien til Lv et al. påpekes det at dersom to ulike gen i pasientprøven må være positive for at diagnosen kan stilles, kan det føre til at flere pasienter får en forsinket eller i verste fall utelatt diagnose. For å senke andelen falske negative prøver, og dermed øke sensitiviteten, har WHO godtatt at analyser med kun én påvist målsekvens likevel kan klassifiseres som positiv i områder hvor det allerede er påvist smitte.

I studien til Wu et al. fra 2004, ble det vist at RT-qPCR var den mest sensitive metoden i de to første ukene etter symptomdebut, med høyest positiv deteksjonsrate for SARS-CoV. Etter hvert som infeksjonsforløpet gikk over i rekonvalesent fase ble derimot deteksjon av antistoff viktigere enn deteksjon av viralt RNA. Ved å bruke nøytraliseringstest som referansemetode fant de også at ELISA (sammenlignet med IFA og ICT) var den beste serologiske metoden til å detektere kroppens antistoffrespons mot SARS-CoV [81]. Et lignende situasjonsbilde for SARS-CoV-2 blir fremstilt av studiene til Guo et al. og Zhao et al. Både Guo et al. og Zhao et al. fant at RT-qPCR var den mest sensitive metoden, med høyest deteksjonsrate for SARS-CoV-2, frem til henholdsvis 5,5 dager og 7 dager etter symptomdebut. Etter disse tidspunktene var deteksjon av IgM-antistoff med ELISA den mest sensitive metoden [46, 82]. Guo et al. undersøkte også utviklingen i forholdet mellom IgM- og IgG-antistoff. I studien til Guo et al., kunne man hos noen pasienter se en økning i antistoff i perioden 0–7 dager etter symptomdebut, men mengden antistoff var ikke stor nok til å gi en god sensitivitet. Videre i denne studien, ble det funnet en signifikant økning i både IgM og IgG i perioden 8–14 dager etter symptomdebut. Deretter ble det ikke registrert videre økning i mengden IgM i perioden 15–21 dager etter symptomdebut. Mengden IgG derimot, fortsatte å øke og nådde en platåfase på dag 21 [46]. Dette funnet stemmer overens med teorien (Kapittel 2.3.2) om produksjonen av IgM- og IgG-antistoff som en respons på virusinfeksjon. Som vist i studien til Yu et al. er virusmengden størst i akutfase, før den avtar mer og mer etter hvert som infeksjonsforløpet går over i rekonvalesent fase [41]. Denne nedgangen i mengden virus samtidig som antistoffproduksjonen øker utover infeksjonsforløpet, forklarer funnene til både Guo et al. og Zhao et al., hvor sensitiviteten til IgM- og IgG-ELISA etter hvert forbigår RT-qPCR [46, 82]. Man ser med dette betydningen av deteksjon av antistoff i rekonvalesensfasen.

Siden sensitiviteten til RT-qPCR og ELISA blir avgjort ut ifra hvilken dag i infeksjonsforløpet man utfører prøvetaking på, kan serokonversjonen til IgM og IgG mot SARS-CoV-2 være av interesse. Serokonversjon er tiden det tar for et spesifikt antistoff å bli produsert og detekterbart i blodet. Ved å vite hvilken dag de ulike antistoffene er mulig å detektere i en serumprøve, kan man vite når ELISA blir aktuell som en alternativ metode for å diagnostisere pasienter med COVID-19. Både Zhao et al. og Xiang et al. har prøvd å finne et svar på dette. I Tabell 4.1 kan vi se at Zhao et al. fant sterkt økende serokonversjon fra dag 12 for IgM, og fra dag 14 for IgG [82], mens Xiang et al. fant sterkt økende serokonversjon fra dag 9 for IgM, og fra dag 11 for IgG [84]. Det at immunforsvaret vårt bruker så lang tid på å danne antistoff kan være et problem. Pasienter som er smittet, men ikke får en diagnose, kan dermed smitte mange andre mennesker i denne perioden. I pandemisituasjonen vi befinner oss i vil dette føre til ytterligere smittespredning. Dette er kanskje den største utfordringen med å bruke ELISA til å detektere antistoff.

En annen utfordring med ELISA er deteksjon av antistoff hos pasienter med immunsvikt, som nevnt i Kapittel 2.3.2. Slike pasienter vil ikke klare å produsere nok antistoff, og det er derfor en stor risiko for falskt negativt resultat ved bruk av ELISA. Immunsvekkede pasienter er i risikozonen for å få en kraftig reaksjon på SARS-CoV-2, og vil trolig være avhengig av tidlig og riktig behandling for å overleve. En falsk negativ test kan i denne sammenhengen gi fatale konsekvenser. Dermed er ikke ELISA riktig metode å bruke for pasienter med immunsvikt. For å diagnostisere slike pasienter, må selve viruset detekteres, og da er RT-qPCR en mye bedre metode. I en pågående pandemi, er det ekstra viktig at disse pasientene blir diagnostisert og tidligst mulig får begynne på en eventuell behandling.

Om man ser på sensitiviteten som er diskutert tidligere, ser man at både Guo et al. og Zhao et al. fant ut at RT-qPCR-analysene ga best resultat tidlig i infeksjonsforløpet, mens ELISA ga best resultat senere [46, 82]. I Figur 1.1 ble de ulike pandemifasene presentert. Med tanke på hvor mange land viruset har spredd seg til, kan man si at vi har passert pre-pandemifasene, og befinner oss nå i selve pandemifasene. Noen land er hardere rammet enn andre, men smittespredning er fortsatt et stort problem generelt i verden (per 19. mai 2020). For å stoppe smittespredning er vi avhengig av at de smittede blir oppdaget før de smitter andre. Sammenlignet med ELISA er RT-qPCR mest spesifikk, og tidlig i infeksjonsforløpet også mest sensitiv. RT-qPCR er dermed den viktigste diagnostiske metoden i pandemifasene. Likevel er det viktig å nevne at det å stoppe smittespredning ikke bare handler om å oppdage de smittede, men også sørge for at de som alt er smittet blir isolert og ikke sluppet ut igjen i samfunnet før de er helt friske. Dette blir poengtert av Zhang et al., og de foreslår derfor at pasienter som er innlagt på sykehus med COVID-19, bør testes med ELISA før utskrivelse [80]. Som forklart i teorien kan man ved å se på mengden IgM- og IgG-antistoffer i blodet, få en oversikt over hvor pasienter er i infeksjonsforløpet. Siden ELISA har bedre sensitivitet senere i infeksjonsforløpet, kan denne serologiske metoden være en sikrere indikasjon på om pasienter faktisk er helt frisk.

Når vi i fremtiden kommer til slutten av pandemien, til reduksjons- og forberedelsesfasen, blir trolig analyseresultatene til ELISA mer interessante. ELISA detekterer antistoffene mot SARS-CoV-2 som immunforsvaret produserer ved en infeksjon. Antistoffene kan i disse fasene fortelle oss hvor mange som er smittet og hvor mange som tidlige har vært smittet. ELISA kan også trolig bli brukt til å se på en mulig immunitet. Dette er noe som kan bli viktig dersom det kommer en ny smittebølge. RT-qPCR er likevel den metoden som tidligst kan diagnostisere COVID-19, og vil nok fortsatt være den metoden som er best egnet om noen er mistenkt smittet, selv i slutfasen av en pandemi.

Når man skal vurdere analyseprinsippene opp imot hverandre, så er smitterisikoen for helsepersonell ved prøvetaking noe som kan være aktuelt og ta med i vurderingen. Her vil prøvetaking fra luftveiene til RT-qPCR utgjøre en mye større risiko for helsepersonell som tar prøven, enn hva risikoen er ved blodprøvetaking til antistoffdeteksjon med ELISA. Det er derfor svært viktig at man har helsepersonell som har fått god opplæring i prøvetaking og smittevern. En annen faktor som kan være en ulempe for RT-qPCR er mangelen på reagenser og kapasitet. På dette området har det imidlertid skjedd stor framgang den siste tiden, f.eks. har en forskningsgruppe ved NTNU lagd en lysisbuffer og utviklet magnetiske nanopartikler for ekstraksjon av nukleinsyre [85]. I områder der testkapasiteten til RT-qPCR likevel er lav, for eksempel pga. mangel på reagenser, utstyr og fagpersonell, så kan bruk av serologiske analyser som ELISA være til hjelp.

I studien til Lv et al. følger de en pasient med symptomer på COVID-19. Pasienten ble innlagt og behandlet som en COVID-19-pasient, selv om RT-qPCR-resultatene var negative. Ikke før dag 9 etter innleggelse, fikk pasienten et positivt RT-qPCR-resultat. Selv om RT-qPCR beskrives som gullstandarden for diagnostisering av COVID-19, påpeker Lv et al. at en negativ RT-qPCR-analyse alene ikke er nok til å si at en pasient er frisk [78]. Dette blir også bekreftet av WHO som sier at en eller flere negative resultat ikke utelukker muligheten for en SARS-CoV-2-infeksjon [15]. Lv et al. forklarer videre i sin studie viktigheten av å se på både pasientens kliniske tilstand, blodprøveresultater og CT-resultater før en diagnose blir satt [78].

Som nevnt tidligere er det forskjell på sensitiviteten til RT-qPCR og ELISA ut ifra hvor i infeksjonsforløpet pasienten befinner seg. Hele tre av forskningsartiklene i Tabell 4.1 konkluderer med at RT-qPCR og ELISA burde kombineres for et best mulig resultat. Zhao et al. oppsummerer sin studie med å si at en kombinasjon av RNA- og antistoff-deteksjon betydelig forbedrer sensitiviteten til diagnostisering av COVID-19 tidlig i infeksjonen [82]. Xiang et al. skriver at antistoff-deteksjon kan spille en viktig rolle innen diagnostisering av COVID-19, sammen med NAAT [84]. Guo et al. fant ut at når man kombinerer IgM-ELISA med RT-qPCR ble den positive deteksjonsraten signifikant økt fra 51,9%, til 98,6%, sammenlignet med RT-qPCR alene [46]. Hverken RT-qPCR eller ELISA er perfekte analyser alene, men man ser at ved å kombinere de får man en bra løsning som gir en betydelig forbedret deteksjonsrate. Spesielt i denne pandemisituasjonen som vi befinner oss i nå, er det ekstremt viktig å detektere flest mulig smittede pasienter.

# Kapittel 6: Konklusjon

Hensikten med denne bacheloroppgaven har vært å undersøke fordeler og ulemper ved å bruke ELISA til å påvise COVID-19 i en pandemisituasjon, kontra å bruke RT-qPCR til påvisning av SARS-CoV-2. For å svare på dette er det tatt utgangspunkt i ti forskningsartikler som omhandler temaet. Ut ifra disse forskningsartiklene kan man konstatere at RT-qPCR er mest spesifikk, og tidlig i infeksjonsforløpet også mest sensitiv. Virusmengden synker senere i infeksjonsforløpet, som fører til en tilsvarende nedgang i sensitiviteten til RT-qPCR. Derimot viser flere studier til en samtidig økning i mengden antistoff mot SARS-CoV-2 i blodet etter hvert som man går over i rekonvalesensfasen. Dette fører igjen til at sensitiviteten til serologiske analyser, slik som ELISA, øker lengre ut i infeksjonsforløpet. For å senke antall falske negative, og dermed øke den totale sensitiviteten, blir det derfor foreslått å kombinere RT-qPCR og ELISA. En kombinasjon vil kunne påvise flere smittede, både i akutt og rekonvalesent fase. Siden vi befinner oss i en pandemisituasjon er det svært viktig å påvise smittede raskt slik at de kan isoleres, og eventuelt behandles, for å unngå ytterligere smittespredning. Fordi det tar tid før man kommer langt nok ut i infeksjonsforløpet, hvor sensitiviteten til ELISA er god nok, vil RT-qPCR alltid være den beste analysen å gjøre ved mistanke om smitte med SARS-CoV-2. Derimot kan ELISA brukes som et hjelpemiddel om en pasient er mistenkt smittet og/eller har symptomer på COVID-19, men som likevel får negativt RT-qPCR-resultat.

## 6.1 Videre arbeid

Vi befinner oss i en svært globalisert verden, hvor vi reiser på tvers av landegrenser og interagerer med mange mennesker. Det er derfor viktig å ta lærdom av denne situasjonen vi nå befinner oss i. Vi må satse på forskning innen virologi, og hele tiden prøve å forbedre ulike analyseprinsipp, slik at vi kan håndtere lignende situasjoner på best mulig måte i fremtiden. Som nevnt i diskusjonen foretrekkes høy sensitivitet over høy spesifisitet i en pandemisituasjon. Derimot vil det etter pandemien også være viktig med høy spesifisitet, vha. metoder som RT-qPCR. Dette er viktig for å kunne skille SARS-CoV-2 fra SARS-CoV og ikke minst fra eventuelt andre nye, humane coronavirus som kan komme i fremtiden. For å kunne opprettholde høy spesifisitet må man dermed arbeide videre med forskning på mutasjonene som skjer i genomet til SARS-CoV-2. Som nevnt i Kapittel 2.1 kan mutasjoner påvirke alvorlighetsgraden og spredningen av SARS-CoV-2 fremover, og det er derfor viktig å følge med på disse endringene. I tillegg vil mutasjoner også kunne påvirke immunitet, som er et annet tema det er viktig å forske mer på fremover. Her er det spesielt behov for mer forskning og data for å kunne si sikkert om en opparbeidet immunitet varer over tid, og om flokkimmunitet faktisk fungerer. I slike tilfeller vil serologiske analyser, slik som ELISA være til hjelp.



# Referanser

- [1] World Health Organization [Internett]. Novel Coronavirus – China. WHO, 12. januar 2020. Hentet 21.03.2020. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/csr/don/12-january-2020-novel-coronavirus-china/en/>.
- [2] World Health Organization [Internett]. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report - 1. WHO, 20. januar 2020. Hentet 21.03.2020. Tilgjengelig fra: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200121-sitrep-1-2019-ncov.pdf?sfvrsn=20a99c10\\_4](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200121-sitrep-1-2019-ncov.pdf?sfvrsn=20a99c10_4).
- [3] World Health Organization [Internett]. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. WHO, 2020. Hentet 21.03.2020. Tilgjengelig fra: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it).
- [4] Ghebreyesus TA. WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020 [Internett]. WHO, 11. mars 2020. Hentet 28.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
- [5] The Centers Disease for Disease Control and Prevention. Pandemic Preparedness Resources [Internett], 15. februar 2020. Hentet 28.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/pandemic-preparedness-resources.html>.
- [6] Holloway R, Rasmussen SA, Zaza S, Cox NJ, Jernigan DB, et al. Updated Preparedness and Response Framework for Influenza Pandemics. Morbidity and Mortality Weekly Report: Recommendations and Reports, 2014, 63(6):1–18.
- [7] Degré M, Hovig B og Rollag H. *Coronaviridae*. I Medisinsk Mikrobiologi, 3 utgave. Gyldendal; 2008, kapittel 30, side 312–313.
- [8] Klein J, Dalgard O og Jensen HLB. Koronavirus [Internett]. I Store medisinske leksikon, 5. mars 2018. Hentet 02.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/koronavirus>.
- [9] Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH og Stahl DA. Viral Genomes and Diversity. I Brock Biology of Microorganisms, Global Edition, 14. utgave. Pearson Education Limited; mai 2014, kapittel 9, side 302–304.
- [10] Cui J, Li F og Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nature reviews Microbiology, 2019, 17(3):181–192.
- [11] Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, Hui KPY, Krishnan P, Liu Y, Ng DYM, Wan CKC,

- Yang P, Wang Q, Peiris M og Poon LLM. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry*, januar 2020.
- [12] World Health Organization [Internett]. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. WHO, 2003. Hentet 20.03.2020. Tilgjengelig fra: [https://www.who.int/csr/sars/country/table2004\\_04\\_21/en/](https://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/).
- [13] World Health Organization [Internett]. MERS situation update november 2019. WHO, 2019. Hentet 20.03.2020. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>.
- [14] World Health Organization [Internett]. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. WHO, 19. mai 2020. Hentet 19.05.2020. Tilgjengelig fra: <https://covid19.who.int/>.
- [15] World Health Organization [Internett]. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases: interim guidance. WHO, 19. mars 2020. Hentet 20.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.
- [16] Liljebakk SA. Bioingeniører i frontlinjen [Internett]. *Bioingeniøren*, 15. mars 2020. Hentet 26.03.2020. Tilgjengelig fra: <https://www.bioingenioren.no/meninger/fra-redaksjonen/2020/bioingeniører-i-frontlinjen/>.
- [17] Poutanen SM. Human coronaviruses. I *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. Elsevier; 2018, kapittel 222, side 1148–1152.
- [18] King AM, Lefkowitz E, Adams MJ og Carstens EB. Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, bind 9. Elsevier; 2011.
- [19] Pellett PE, Mitra S og Holland TC. Basics of virology. I Tselis AC og Booss J, red., *Neurovirology*, bind 123 av *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier; 2014, kapittel 2, side 45 – 66.
- [20] Zhang YZ og Holmes EC. Novel 2019 coronavirus genome [Internett]. *Virological*, 10.01.2020. Hentet 01.04.2020. Tilgjengelig fra <http://virological.org/t/novel-2019-coronavirus-genome/319>.
- [21] Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 2020, 579(7798):265–269.
- [22] Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J og Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Research*, november 2015, 44(D1):D67–D72.
- [23] Nucleotide [Internett]. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. RefSeq Accession number:

- NC\_045512.2. Hentet 23.03.2020. Tilgjengelig fra: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC\\_045512.2?report=genbank&to=29903](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_045512.2?report=genbank&to=29903).
- [24] Shu Y og McCauley J. GISAID: Global initiative on sharing all influenza data – from vision to reality. *Eurosurveillance*, 2017, 22(13).
- [25] Khailany RA, Safdar M og Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Reports*, 2020, 19:100682.
- [26] Pachetti M, Marini B, Benedetti F, Giudici F, Mauro E, Storici P, Masciovecchio C, Angeletti S, Ciccozzi M, Gallo RC, Zella D og Ippodrino R. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *Journal of translational medicine*, April 2020, 18(1):179.
- [27] Austin CP. Open Reading Frame [Internett]. National Human Genome Research Institute (NHI). Hentet 25.03.2020. Tilgjengelig fra <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Open-Reading-Frame>.
- [28] Li X, Geng M, Peng Y, Meng L og Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2020.
- [29] Knoops K, Kikkert M, Worm SHEvd, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, Koster AJ, Mommaas AM og Snijder EJ. SARS-Coronavirus Replication Is Supported by a Reticulovesicular Network of Modified Endoplasmic Reticulum. *PLOS Biology*, 09 2008, 6(9):1–18.
- [30] Stadler K, Masignani V, Eickmann M, Becker S, Abrignani S, Klenk HD og Rappuoli R. SARS – beginning to understand a new virus. *Nature Reviews Microbiology*, 2003, 1(3):209–218.
- [31] Chang Ck, Hou MH, Chang CF, Hsiao CD og Huang Th. The SARS coronavirus nucleocapsid protein - Forms and functions. *Antiviral Research*, 2014, 103:39–50.
- [32] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger 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*, 2020.
- [33] Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020, 579(7798):270.
- [34] Hurst KR, Koetzner CA og Masters PS. Characterization of a Critical Interaction between the Coronavirus Nucleocapsid Protein and Nonstructural Protein 3 of the Viral Replicase-Transcriptase Complex. *Journal of Virology*, 2013, 87(16):9159–9172.
- [35] Fehr AR og Perlman S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. I Maier H, Bickerton E og Britton P, red., *Coronaviruses*, bind 1822 av *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Humana Press; 2015, side 1–23.

- [36] de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D og Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(8):523.
- [37] Dalgard O, Klein J og Jensen HLB. Covid-19 [Internett]. I Store medisinske leksikon, 3. april 2020. Hentet 04.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/covid-19>.
- [38] Folkehelseinstituttet. Hvis du mistenker at du er syk med koronaviruset (covid-19) [Internett], 3. april 2020. Hentet 05.04.2020. Tilgjengelig fra: [https://www.fhi.no/nettpub/coronavirus/fakta/hvis\\_du\\_mistenker\\_at\\_du\\_er\\_syk\\_med\\_covid-19/](https://www.fhi.no/nettpub/coronavirus/fakta/hvis_du_mistenker_at_du_er_syk_med_covid-19/).
- [39] Hu Z, Song C, Xu C, Jin G, Chen Y, Xu X, et al. Clinical characteristics of 24 asymptomatic infections with COVID-19 screened among close contacts in Nanjing, China. *Science China Life Sciences*, 2020.
- [40] Singhal T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *The Indian Journal of Pediatrics*, 2020, side 281–286.
- [41] Yu F, Yan L, Wang N, Yang S, Wang L, Tang Y, et al. Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients. *Clinical Infectious Diseases*, mars 2020.
- [42] Fang Y, Zhang H, Xie J, Lin M, Ying L, Pang P og Ji W. Sensitivity of Chest CT for COVID-19: Comparison to RT-PCR. *Radiology*, 2020.
- [43] Song F, Shi N, Shan F, Zhang Z, Shen J, Lu H, Ling Y, Jiang Y og Shi Y. Emerging 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia. *Radiology*, 2020, 295(1):210–217.
- [44] Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020, 395(10223):497–506.
- [45] Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet*, 2020, 395(10229):1054 – 1062.
- [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*, mars 2020.
- [47] Du Z, Zhu F, Guo F, Yang B og Wang T. Detection of antibodies against SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Journal of Medical Virology*, 2020.
- [48] Xiao DAT, Gao DC og Zhang DS. Profile of Specific Antibodies to SARS-CoV-2: The First Report. *Journal of Infection*, 2020.
- [49] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 2000, 25(2):169–193.

- [50] Kaltenboeck B og Wang C. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Advances in clinical chemistry*, 2005, 40(4):219–259.
- [51] Wong ML og Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 2005, 39(1):75–85.
- [52] Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. I Bustin SA, red., *The Real-Time PCR Encyclopedia A–Z of Quantitative PCR*. La Jolla, CA, USA: International University Line; 2004, kapittel 3, side 87–112.
- [53] Gallup JM og Ackermann MR. The ‘PREXCEL-Q method’ for qPCR. *International journal of biomedical science: IJBS*, 2008, 4(4):273.
- [54] Zimmermann K og Mannhalter JW. Technical aspects of quantitative competitive PCR. *BioTechniques*, 1996, 21(2):268–279.
- [55] Nolan T, Novak T og Huggett J. Taking control of the polymerase chain reaction. I Bustin SA, red., *The PCR Revolution: Basic Technologies and Applications*. New York: Cambridge University Press; 2010, kapittel 9, side 141.
- [56] Wacker MJ og Godard MP. Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 2005, 16(3):266.
- [57] Thermo Fischer Scientific. Real-time PCR handbook [Internett]. Life Technologies, 2012. Hentet 05.04.2020. Tilgjengelig fra <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>.
- [58] Mackay IM, Arden KE og Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*, 2002, 30(6):1292–1305.
- [59] Wittwer CT og Kuskawa N. *Nucleic Acid Techniques and Applications*. I Burtis CA og Bruns DE, red., *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 7. utgave. St. Louis, Missouri: Saunders; mai 2014, kapittel 48, side 937–939.
- [60] Rakshi SK. Thermostable enzymes used in polymerase chain reaction. I Bustin SA, red., *The PCR Revolution: Basic Technologies and Applications*. New York: Cambridge University Press; 2010, kapittel 2, side 14.
- [61] Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N og Patel HR. Basic principles of real-time quantitative pcr. *Expert review of molecular diagnostics*, 2005, 5(2):209–219.
- [62] Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH og Stahl DA. *Diagnostic Microbiology*. I Brock *Biology of Microorganisms*, Global Edition, 14. utgave. Pearson Education Limited; mai 2014, kapittel 27, side 831–833.
- [63] Kricka LJ og Park JY. *Immunochemical Techniques*. I Burtis CA og Bruns DE, red.,

- Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 7. utgave. St. Louis, Missouri: Saunders; mai 2014, kapittel 15, side 247–248.
- [64] Halse J. ELISA [Internett]. I Store medisinske leksikon, 11. desember 2018. Hentet 24.03.2020. Tilgjengelig fra: <http://sml.snl.no/ELISA>.
- [65] MyBioSource. ELISA - Enzymed-Linked Immunosorbent Assay [Internett]. MyBioSource. Hentet 26.03.2020. Tilgjengelig fra: <https://www.mybiosource.com/learn/ELISA>.
- [66] Gaastra W. Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA). I Walker JM, red., Proteins. Totowa, NJ: Humana Press; 1984, side 349–355.
- [67] Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. Peptides, oktober 2015, 72:4–15.
- [68] John R. Crowther, red. Systems in ELISA. I The ELISA Guidebook, Methods in Molecular Biology™. Totowa, NJ: Humana Press; 2009, kapittel 2, side 9–42.
- [69] Thermo Fisher Scientific. Overview of ELISA [Internett]. Thermo Fischer Scientific. Hentet 07.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html#2>.
- [70] Yoshihara N. ELISA for diagnosis of infections by viruses. Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine, 1995, 53(9):2277–2282.
- [71] Punmani V. Diagnosing HIV - Concepts and tests [Internett, video]. Khan Academy, 2015. Hentet 27.03.2020. Tilgjengelig fra: <https://www.khanacademy.org/science/health-and-medicine/infectious-diseases/hiv-and-aids/v/diagnosing-hiv-concepts-and-tests>.
- [72] Kvam M. Immunsystemet [Internett]. Norsk Helseinformatikk, 4. april 2017. Hentet 26.03.2020. Tilgjengelig fra: <https://nhi.no/kroppen-var/funksjoner/immunsystemet/?page=all>.
- [73] Henochowicz SI. Immunodeficiency disorders [Internett]. MedlinePlus, 9. April 2020. Hentet 04.05.2020. Tilgjengelig fra: <https://medlineplus.gov/ency/article/000818.htm>.
- [74] Ashwood ER og Bruns DE. Clinical Evaluation of Methods. I Burtis CA og Bruns DE, red., Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 7. utgave. St. Louis, Missouri: Saunders; mai 2014, kapittel 3, side 33–34.
- [75] Saah AJ og Hoover DR. “Sensitivity” and “Specificity” Reconsidered: The Meaning of These Terms in Analytical and Diagnostic Settings. Annals of Internal Medicine, januar 1997, 126(1):91–94.

- [76] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J og Wittwer CT. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 04 2009, 55(4):611–622.
- [77] Wald NJ. Guidance on terminology. *Journal of Medical Screening*, 2008, 15(1):50–50.
- [78] Lv DF, Ying QM, Weng YS, Shen CB, Chu JG, Kong JP, et al. Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clinica Chimica Acta*, 2020, 506:172 – 175.
- [79] Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 2020, 25(3).
- [80] Zhang W, Du RH, Li B, Zheng XS, Yang XL, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1):386–389.
- [81] Wu HS, Chiu SC, Tseng TC, Lin SF, Lin JH, Hsu YF, et al. Serologic and molecular biologic methods for SARS-associated coronavirus infection, Taiwan. *Emerging infectious diseases*, 2004, 10(2):304–310.
- [82] Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*, mars 2020.
- [83] Chan JFW, Yip CCY, To KKW, Tang THC, Wong SCY, Leung KH, et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay validated *in vitro* and with clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020.
- [84] Xiang F, Wang X, He X, Peng Z, Yang B, Zhang J, et al. Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients with COVID-19. *Clinical Infectious Diseases*, april 2020.
- [85] Berg K. Dyktige fagfolk og godt samarbeid ga ny koronatest i rekordfart [Internett]. *Bioingeniøren*, 4. april 2020. Hentet 03.05.2020. Tilgjengelig fra: <https://www.bioingenioren.no/aktuelt/2020/dyktige-fagfolk-og-godt-samarbeide-ga-ny-koronatest-i-rekordfart/>.

# Figurliste

1.1	Utviklingsforløpet til influensapandemier. Et lignende forløp antas ved COVID-19-pandemien. Figuren er tilpasset fra Holloway et al., ved CDC [6].	1
2.1	Organisering av genomet til SARS-CoV-2. Illustrasjonen er basert på arbeidet til Wu et al. [21] og referansesekvensen utgitt i Genbank (accession nr. NC_045512.2) [23].	5
2.2	Skjematisk fremstilling av SARS-CoV-2. En dobbelt lipidmembran som inneholder S-protein (spike protein), M-protein (membrane glycoprotein) og E-protein (envelope protein), omslutter det spiralformede nukleokapsidet. Nukleokapsidet består av N-protein (nucleocapsid protein) og +ssRNA. Figuren er tilpasset fra Stadler et al. [30].	5
2.3	Forandring av gjennomsnittsmengden av IgM- og IgG-antistoff [AU/ml] over tid som respons på SARS-CoV-2. Referanseverdien er <10 AU/ml. Standardfeil er inkludert. Figuren er tilpasset fra Xiao et al. [48].	7
2.4	Skjematisk fremstilling av antigenpåvisning ved hjelp av a) direkte, b) indirekte og c) sandwich ELISA. Antigenet fra prøven immobiliseres til brønner og et enzymmerket antistoff bindes til antigenet. Deteksjonen av mengden antigen i prøven gjøres ved å tilsette et substrat som gir en fargereaksjon som kan måles. Figuren er tilpasset fra Thermo Fisher Scientific [69].	11
2.5	Trinnvis fremstilling av direkte kompetitiv ELISA. Tilstedeværelsen av antigen i prøven gir en nedgang i det detekterte signalet, slik at mengden antigen i prøven er omvendt proporsjonal med signalstyrken. Figuren er tilpasset fra Aydin [67].	12



# Tabelliste

- 3.1 Liste over 10 utvalgte forskningsartikler. . . . . 14
- 4.1 Analyse, testpopulasjon og funn hos de utvalgte forskningsartiklene. . . . . 16
- 4.1 (fortsettelse). . . . . 17

