

Lana Yar
Marthe Bolstad Breistein
Kamilla Dalheim Sivertsen

Hvorfor brukes RT-qPCR påvisning av SARS-CoV-2 framfor en immunrespons påvisning med ELISA?

Bacheloroppgave i bioingeniørfag
Veileder: Bente Alm
Mai 2020

Lana Yar
Marthe Bolstad Breistein
Kamilla Dalheim Sivertsen

Hvorfor brukes RT-qPCR påvisning av SARS-CoV-2 framfor en immunrespons påvisning med 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

Denne bacheloroppgaven er skrevet som en avsluttende del av vår bachelor i bioingeniørfaget. Oppgaven har benyttet tidsriktig- og relevant forskning, samt teori for oppgavens informasjonsgrunnlag. Grunnlaget har gitt oss den nødvendige tyngden for å besvare oppgavens problemstilling.

Oppgavens tema er særdeles viktig og interessant i dag, samt tiden vi har i møte. Det er vår jobb som bioingeniører å forstå analyseprinsippene bak diagnostiseringen av covid-19.

Vi vil rette en stor takk til vår veileder Bente Alm, universitetslektor ved Norges tekniske og naturvitenskaplige universitet i Ålesund. Bente har vært tilgjengelig for å veilede oss under hele perioden, og gitt oss mange gode råd og anbefalinger på veien. Vi har tatt til oss mye kunnskap om det aktuelle temaet, og er veldig takknemlig for den hjelpen vi har fått.

Sammendrag

I møte med covid-19 pandemien ser vi at bioingeniører har en nøkkelrolle i påvisning av SARS-CoV-2. Vi ble nysgjerrige på om de analysemetodene som blir brukt i dag er gode nok, og ønsket å vite hvorfor immunologiske analyser med ELISA ikke er tatt i bruk.

Hensikten med oppgaven er å svare på problemstillingen "Hvorfor brukes RT-qPCR påvisning av SARS-CoV-2 framfor en immunrespons påvisning med ELISA?". Vi ønsker å belyse dette temaet da immunologiske metoder for å påvise covid-19 fortsatt er under utvikling. Utviklingen av analysemetodene er avgjørende for hvor godt laboratoriene vil kunne håndtere pandemien vi står ovenfor i dag.

For å svare på problemstillingen blir det gjennomført et systematisk litteratursøk. Ved litteratursøket finner vi forsknings- og review artikler som omhandler covid-19 og hvordan en påviser denne sykdommen.

Resultatet fra litteratursøket viser at deteksjon av SARS-CoV-2 fortsatt bør analyseres ved bruk av RT-qPCR, da denne analysen er den eneste validerte metoden så langt. På en annen side vil en god immunologisk metode for påvisning av covid-19 være viktig å ferdigstille så fort som mulig. ELISA vil være et godt hjelpemiddel for påvisning av covid-19 lengre ut i sykdomsforløpet. Metoden vil i større grad gi en mulighet for å kunne overvåke sykdomsbilde, kartlegge hvor stor del av befolkningen som har hatt sykdommen, og i hvor stor grad vi danner antistoffer mot SARS-CoV-2.

Abstract

Facing the covid-19 pandemic, we acknowledge that biomedical laboratory scientists have a key role in detecting SARS-CoV-2. We were curious about whether the analysing methods used today are good enough, and wanted to know why immunological analysis like ELISA are not used.

The purpose of this paper is to answer the problem statement “Why is the RT-qPCR detection of SARS-CoV-2 used instead of an immune response detection with ELISA?” The purpose of elucidating this topic is that immunological methods for detecting covid-19 are still under development. The development of detection methods is crucial to how well the laboratories can handle this pandemic.

A systematic literature search is conducted to answer our problem statement. In the literature search, we find research- and review articles on covid-19 and how to detect and identify the disease.

Based on the literature search, detection of SARS-CoV-2 should still be analysed using RT-qPCR, as this assay is the only validated method so far. However, the use of a immunological method to identify covid-19, is important to develop as soon as possible. ELISA will be a good aid for the detection of covid-19 further into the course of disease. It also provides an opportunity to monitor the clinical picture, chart the spread of infection and to what extent we generate antibodies against SARS-CoV-2.

Innhold

1	Innledning	1
1.1	Bakgrunnen for valg av emne	1
1.2	Problemstilling	2
1.3	Oppgavestruktur	2
2	Teori	3
2.1	Koronavirus	3
2.2	Polymerase kjedereaksjon	4
2.2.1	Ekstraksjon	5
2.2.2	RT-qPCR	5
2.2.3	Genområder for SARS-CoV-2	6
2.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	7
2.3.1	Indirekte ELISA	9
2.4	Sensitivitet og spesifisitet	9
3	Metode	11
3.1	Datainnsamling	11
3.1.1	Søkestrategi	11
3.1.2	Kildekritikk	12
3.1.3	Kvalitetsvurdering	12
4	Resultat	14
5	Diskusjon	18
5.0.1	RT-qPCR	18
5.0.2	ELISA	21
5.0.3	Sammenligning av RT-qPCR og ELISA	23
5.1	Konklusjon	25
	Referanser	26

Figurliste

2.1	<i>Venstre: proteinstruktur av SARS-CoV-2. Høyre: ACE2-reseptor på human celle.</i>	4
2.2	<i>Oversikt over genområder ORF1ab-, RdRP-, E- og N-genet. [1]</i>	6
2.3	<i>Tidsperiode for opptreden av antistoffer mot SARS-CoV-2 ved bruk av antistofftiter. Uttrykkes som GMT (geometrisk middelvei titer). Y-aksen representerer antall dager fra 0-40. X-aksen representerer antistoffene IgM og IgG. Påvisningen av antistoffene er valgt fra pasienter som har hatt symptomer innen 7 dager. [2]</i>	8
2.4	<i>Reaksjonen som skjer i mikrotiter brønnene ved indirekte ELISA [3]</i>	8
2.5	<i>Sanne positive (TP), falske positive (FP), falske negative (FN) og sanne negative (TN). [4]</i>	10

Tabelliste

4.1	Resultat	17
-----	--------------------	----

1 Innledning

I dette kapittelet blir det beskrevet valg av tema, og en redegjørelse for hvorfor akkurat dette er aktuelt å belyse ut fra et bioingeniørfaglig ståsted. Videre vil problemstillingen og hensikten med oppgaven bli presentert. Til slutt vil det bli presentert en kort oversikt over oppgavens videre oppbygning.

1.1 Bakgrunnen for valg av emne

Vi står i dag ovenfor en pandemi som vekker stor interesse i mediebildet og for forskere i hele verden. Vi befinner oss i en svært globalisert verden hvor vi reiser mer enn noen gang, og interagerer med mange mennesker. Dette fører til at virus og bakterier kan spre seg på tvers av landegrenser i en høyere hastighet enn noen gang før. Det er derfor viktig å ta lærdom av pandemien vi står ovenfor i dag. Forskning på hvordan viruset smitter, og analyseverktøy for kartlegging vil spille en viktig rolle for å hindre smittespredningen på tvers av landegrenser, og for å verne om risikogrupperne. Etter tre måneder med denne pandemien er det likevel usikkert hvordan den vil utvikle seg videre.[5]

Når media, Folkehelseinstituttet og Bioingeniøren.no begynte å skrive om viruset, var det få som egentlig visste hva dette viruset ville føre med seg. Fremdeles er det usikkerhet rundt dannelsen av humoral immunitet, og om analysemetodene som brukes i dag er optimal.

Bioingeniører spiller en vesentlig rolle i diagnostikken av covid-19. Det er viktig at de analysemetodene som brukes er sensitive og spesifikke, slik at det er mulig å gi riktig diagnose. Gode analysemetoder er kritisk for å kunne kartlegge og hindre spredning av nye sykdommer.

I diagnostiseringen av det nye viruset har det blitt publisert flere artikler som omhandler falskt negative analysesvar, ved bruk av Revers Transkripsjon Sanntids Polymerasekjedereaksjon (RT-qPCR).[6] Artikkelen vekket vår nysgjerrighet på om den brukte metoden virkelig var den beste analysemetoden, og hvorfor metoden brukes framfor andre metoder som Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Nysgjerrigheten gav opphavet til vår problemstilling.

Tematikken i denne oppgaven er høyaktuell og det forskes daglig på dette tema i hele verden. Det publiseres fortløpende forskningsartikler, og for å begrense oppgavens omfang har vi avgrenset litteratursøket tidsmessig fram til 5. april. 2020. Vi ser i ettertid at det er publisert ny forskning

om immunologiske metoder, der blant ELISA.

1.2 Problemstilling

"Hvorfor brukes RT-pPCR påvisning av SARS-CoV-2 framfor en immunrespons påvisning med ELISA?"

Hensikten med denne problemstillingen er å belyse om RT-qPCR virkelig er den beste analysemetoden for påvisning av covid-19. Vi ønsker å få en dypere forståelse på hvorfor en immunrespons påvisning med ELISA ikke er en like utbredt analysemetode, selv om ELISA kunne vært fordelaktig for å øke tidsvinduet for påvisningen av sykdommen.[7]

1.3 Oppgavestruktur

Denne oppgaven er delt inn i fem kapitler og benytter en tradisjonell oppbygging i henhold til IMRoD modellen. Det innebærer at vi gjennomgår, relevant teori og litteratur, metoden vi har brukt for å svare på problemstillingen, resultat med fremstilling av artiklene vi benytter, diskusjon og konklusjon.

2 Teori

I dette kapittelet vil vi ta for oss relevant kunnskap som kan hjelpe oss med å belyse problemstillingen og hensikten med oppgaven. Her vil vi blant annet definere virologien til SARS-CoV-2, samt en innføring i analysemetodene som brukes for å påvise covid-19.

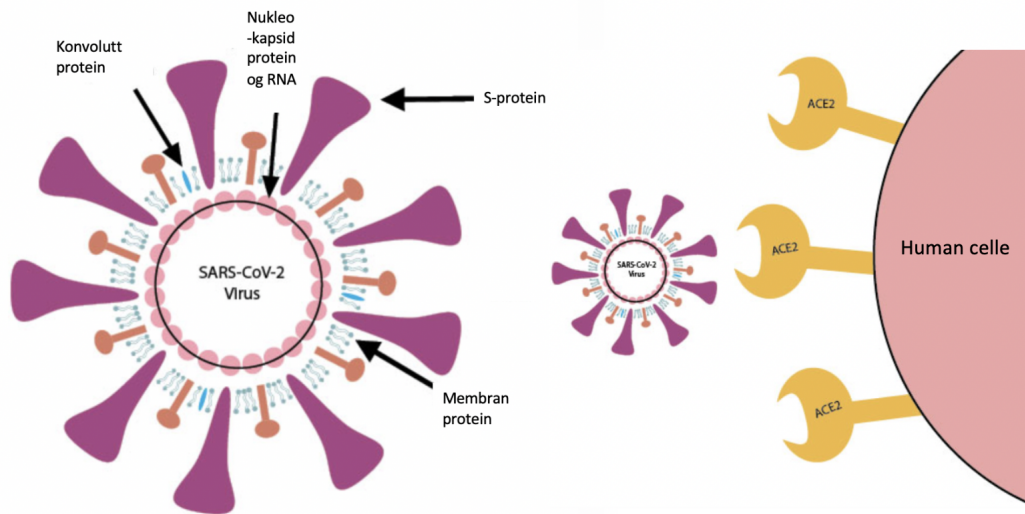
2.1 Koronavirus

Koronavirusene er i familien *Coronaviridae* som har RNA som arvestoff, og er utbredt blant pattedyr og fugler. Virusene forårsaker hovedsakelig luftveissykdommer eller enteriske sykdommer hos mennesker. [8]

Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus (SARS-CoV) er en av de kjente Koronavirusene som i 2003 forårsaket akutt luftveisinfeksjon hos mennesker.[9] 17 år senere ble det identifisert et nytt Koronavirus; *Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2), som basert på gensekvensering er 80-90% identisk med tidligere SARS-CoV. Viruset blir da det tredje zoonotiske Koronavirus etter en episode av et annet Koronavirus kalt *Middle Eastern Respiratory Syndrome coronavirus* (MERS), som også forårsaket luftveisinfeksjon i 2012.[10] Sykdommen viruset forårsaker omtales som *Coronavirus disease 2019* (covid-19). Viruset ble først identifisert i Wuhan, Kina i desember 2019 og spredte seg på kort tid til andre deler av verden. [11] 11. mars 2020 erklærte verdens helseorganisasjon (WHO) utbruddet av covid-19 som en pandemi.[5] Det mangler fortsatt epidemiologisk og immunologisk informasjon om SARS-CoV-2, derfor jobbes det i dag med å identifisere og isolere et nokså ukjent virus. [12] [13] Dette viruset kan forårsake alvorlig infeksjon hos enkelte og i verste fall føre til død.[5] For å unngå videre smitte er det viktig med gode analyser som kan påvise sykdommen.

Et kapsid omslutter det genetiske materialet til SARS-CoV-2. Dette kapsidet er oppbygd av proteiner, og et av de viktigste er Spike-proteinet. Disse proteinene er formet som kronelignende pigger, ergo navnet korona.(2.1). Det er overflateproteinene som avgjør hva viruset kan binde seg til. [14] [15] Spike-proteinet (S-proteinet) spiller en essensiell rolle i binding til angiotensin-konverterende enzym 2 (ACE2) reseptorer på vertscellene.[10] ACE2-reseptorer finnes på overflaten av humane celler, blant annet på epitelceller i tynntarmen og på alveolære epitelceller i lungene. ACE2-reseptorer er dermed en inngangsport for SARS-CoV-2 til humane celler. [16]

2.1



Figur 2.1: Venstre: proteinstruktur av SARS-CoV-2. Høyre: ACE2-reseptor på human celle. [17]

Primærdiagnostikken av covid-19 utføres ved at arvemateriale til SARS-CoV-2 detekteres ved bruk av en RT-qPCR, som er en etablert analysemetode. Det er også forsket på immunologiske metoder som påvisning av antistoffer mot SARS-CoV-2, ved bruk av ELISA analyse.

2.2 Polymerase kjedereaksjon

PCR er et viktig verktøy innen diagnostikk, rettsmedisin og generelt innenfor laboratoriefaget. Metoden kan brukes til amplifisering av små mengder DNA eller RNA, isolering av spesifikke DNA-fragmenter og kvantifisere mengden DNA eller RNA. Ved å bruke spesifikke primere kan målregioner av DNA amplifiseres, som fører til store mengder mål-DNA. Mål-DNA-et kan brukes til sekvensering eller deteksjon. [18]

Prøvetakningsteknikker for RT-qPCR analyse er avhengig av en viss mengde virus (viral load). Det benyttes forskjellige prøvetakningsmetoder for å innhente prøvemateriale til deteksjon av SARS-CoV-2. De mest brukte metodene for prøvetakning er:

1. **Øvre luftveier** - Pensel prøve fra svelg og nasofarynks. Ved bruk av samme pensel oppnås det større viral load.
2. **Nedre luftveier** - Bronko-alveolær lavage . Dette er en mer invasiv metode som går ut på å hente opp prøvemateriale fra bronkiene og alveolene ved bruk av bronkoskop.

3. **Selvprøvetakning** - For å unngå kontakt med den antatt smittede blir pasienten instruert til å ta prøven selv. Dette innebærer spyttprøver og penselprøver av svelg og munnhule.

[19]

2.2.1 Ekstraksjon

Under ekstraksjonen av arvematerialet til SARS-COV-2 er det viktig å bevare et mest mulig intakt RNA. Hvilken metode som brukes for å ekstrahere RNA varierer mellom laboratorier. Vanligvis blir det benyttet forskjellige kit som kan isolere RNA, deretter blir det isolerte RNA håndtert i henhold til fremgangsmåten som de ulike laboratoriene benytter seg av. [20] MagNA pure 96 system og mini kit kan brukes for å ekstrahere RNA fra prøver. Dette er forhåndsbestemte kit som kommer med en anbefalt prosedyre fra produsenten.[1]

Trizol kan også brukes som en del av ekstraksjonsprosessen. Trizol har i denne sammenheng også en egenskap til å inaktivere viruset, og på denne måten oppnås et høyt biosikkerhetsnivå. RNA-et blir ekstrahert ved å blande Trizol med prøvematerialet (fra pensel prøve). [21]

2.2.2 RT-qPCR

SARS-CoV-2 er et RNA-virus, og for å detektere viruset brukes en kombinasjon av RT-PCR og qPCR.

RT-PCR er en teknologi som gjør det mulig å bruke RNA som templat for å danne komplementære DNA (cDNA). RNA blir syntetisert til cDNA ved hjelp av enzymet revers transkriptase. Det blir deretter brukt PCR for å amplifisere regionen som er av interesse.[22]

qPCR blir brukt som et diagnostisk verktøy når det kommer til å identifisere og genotype virus og bakterier. Teknikken som brukes gjør det mulig å kunne bestemme forekomsten og mengden cDNA, samtidig som den analyseres. Ved å bruke qPCR blir det registrert et kvantitativt mål på cDNA, mens det ved en PCR analyse påvises om sekvensen som er amplifisert, er tilstede i prøvematerialet (en kvalitativ analyse). qPCR analyse bruker et primerpar som velger målsekvensen, og en DNA-probe med en kjent og spesifikk sekvens av fluorescens merket oligonukleotider. Proben brukes til å kvantitere forekomsten cDNA i prøvematerialet. Fluorokromet emitterer lys som kan detekteres av en fotomultiplikator. Dette lyssignalet blir så omdannet til et elektronisk signal som vises på en dataskjerm i form av en lineær kurve.[23]

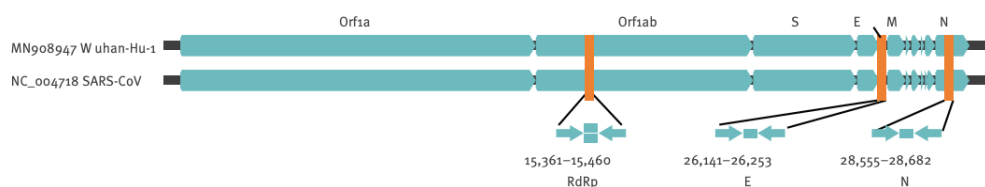
For å kunne gjennomføre en RT-qPCR er det viktig å ta i bruk riktige typer primere og prober. Dette blir designet etter hvilken region av RNA-et som blir brukt som målregion.

En primer er en kort base-rekke som er satt sammen for å indusere syntesen av valgt RNA. Primeren binder seg til en kjent eller ønsket sekvens i RNA. Når en RNA-tråd skal syntetiseres brukes det to primere, en som er komplementær til starten av genet og en som er komplementær til slutten av genet. [24] Lengden på primeren gjør den mer spesifikk, og ved å bruke et primerpar vil en kunne amplifisere valgt RNA. [23]

En probe er en kort enkelttrådet DNA-sekvens som er merket med et fluoriserende fargestoff. Proben vil hybridiseres til sin komplementære sekvens dersom denne sekvensen finnes i prøven.[25] Når det gjelder SARS-CoV-2 benyttes stort sett TaqMan som er en probe der fluorokrom er konjugert til den ene enden og en quencher som er konjugert i den andre enden. Det er også mulig å bruke SYBR-green som et fluoriserende fargestoff for deteksjon av cDNA. I dette tilfelle vil SYBR-green fungere som en erstatning for en probe ved at det dannes fargesignaler når det binder seg til cDNA.[26]

2.2.3 Genområder for SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 har fire genområder som blir brukt for deteksjon; E-, RdRP-, ORF1ab- og N-genet. Hver av disse genområdene har hver sin primer og tilhørende prober for det valgte genet. [27] I figur 2.2 vises det til de fire genområder som er viktig. For å kunne bekrefte diagnosen covid-19 må en kombinasjon av to genområder være positivt (en dobbel positiv RT-qPCR analyse). Dersom bare et genområde er positiv tilsier dette en svak positiv test. Pasienten må i dette tilfellet testes på nytt.[28]



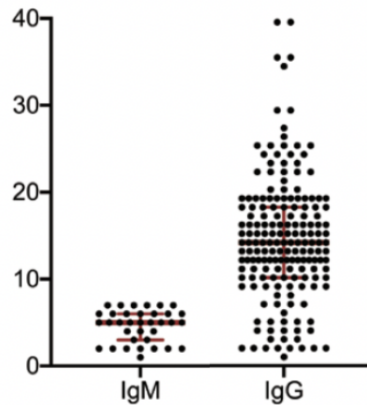
Figur 2.2: Oversikt over genområder ORF1ab-, RdRP-, E- og N-genet. [1]

2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ELISA er en betegnelse som ofte brukes for Enzyme Immunoassay som bruker kolorimetrisk deteksjonsprinsipp.[3] Dette er en immunkjemisk metode som påviser antigener eller antistoffer i en prøve. ELISA har den egenskapen at den kan påvise små mengder antigen og antistoff noe som gjør analysen meget sensitiv. Metoden blir ofte brukt for å stille diagnose i en rekke sykdommer. For å gjennomføre en ELISA analyse brukes et spesifikt antigen som kan reagere med et spesifikt antistoff av interesse.

Immunglobuliner spiller en sentral rolle i forbindelse med påvisningen av covid-19 ved bruk av ELISA. Når immunsystemet møter på et antigen for første gang skjer det en primær respons. I primærresponsen dannes det hovedsakelig IgM-antistoffer.[29] I mange infeksjoner vil IgM være mulig å påvise allerede på dag tre etter sykdomsdebut.[30] Lenger ut i immunresponsen vil det skje et klassebytte og det vil produseres mer og mer IgG. Det er disse antistoffene som bidrar med immunologisk hukommelse ved at de blir i blodet også etter en endt infeksjon. Det er også IgG som hovedsakelig vil produseres ved en sekundær respons. IgG antistoffer kan med dette være et tegn på en endt infeksjon eller lengre sykdom da de produseres senere i sykdomsforløpet. [29]

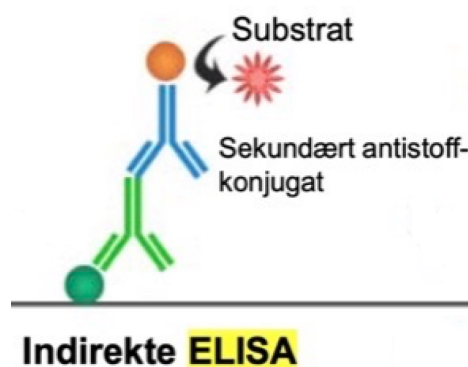
IgG antistoffet kan være mulig å påvise allerede 8-14 dager etter sykdomsdebut, og produksjonen vil fortsatt øke fram til mellom 15-21 dager. Blir det påvist IgM antistoffer mot SARS-CoV-2, blir pasienten fulgt opp med videre testing for å se om vedkommende danner IgG antistoffer mot viruset. Dannes det IgG antistoffer kan dette være tegn på framtidig immunitet for SARS-CoV-2.[2][31]



Figur 2.3: Tidsperiode for opptreden av antistoffer mot SARS-CoV-2 ved bruk av antistofftiter. Uttrykkes som GMT (geometrisk middelverdi titer). Y-aksen representerer antall dager fra 0-40. X-aksen representerer antistoffene IgM og IgG. Påvisningen av antistoffene er valgt fra pasienter som har hatt symptomer innen 7 dager. [2]

Den humorale immunresponsen aktiveres ved første kontakt med en inntrenger. Hvor raskt responsen skjer er avhengig av virusets virologi, hvor sterk immunforsvar individet har og eventuelt om det underligger en sykdom som undertrykker deres immunforsvar.

Når ELISA blir brukt til påvisning av covid-19 er det vanlig å teste for antistoff mot N-proteinet på overflaten til SARS-CoV-2 (N-basert ELISA analyse). Det er også mulig å teste for antistoff mot S-proteinet (S-basert ELISA analyse).[30][26] Ved påvisning av antistoffene mot SARS-CoV-2 er det indirekte ELISA analyse som er den mest brukte metoden.



Figur 2.4: Reaksjonen som skjer i mikrotiter brønnene ved indirekte ELISA [3]

2.3.1 Indirekte ELISA

En indirekte ELISA skjer i brønner på mikrotiterplater. Brønnene blir dekket med antigener av interesse. (2.4) Prøvematerialet som skal testes, for eksempel serum fra pasient, tilsettes i brønnene. Har pasienten antistoff mot et eller flere av antigenene brønnene er dekket med, vil antistoffet binde seg til antigenet. [3] Videre vaskes brønnene med en vaskeløsning som vil skylle vekk alle antistoffer som ikke har bundet seg til antigenene på mikrotiterplatene. Deretter tilsettes enzymkonjugerte antistoff som vil binde seg til antistoffet fra serumet. 2.4

Brønnene vaskes så igjen for å fjerne overskuddet av det enzymkonjugerte antistoffet. Til slutt tilsettes en væskeblanding som inneholder et substrat. Interaksjonen mellom substratet og det enzymkonjugerte antistoffet vil utvikle en farge i løsningen. Denne fargen vil være synlig for det blotte øyet og kan detekteres kolorimetrisk (vanligvis ved hjelp av et spektrofotometer). Hvis det er fargeutvikling i brønnen vil dette indikere at prøven inneholder det spesifikke antistoffet av interesse. Fargeintensiteten vil være proporsjonal med mengden antistoff i prøven.[3]

Ved påvisning av antistoff med ELISA blir verdiene omtalt som ikke-reaktive (negative) og reaktive (positive). Dersom det oppstår falske positive analysesvar vil dette komme av feil som kontaminasjon eller feilmerking. Det kan også forekomme kryssreaktivitet mellom forskjellige antistoffer. Dette skjer spesielt hos kvinner som har vært gjennom en eller flere graviditeter, eller personer som har gjennomgått flere transfusjoner. Falske negative analysesvar kan forekomme på bakgrunn av feilkilder slik som pipetteringsfeil og prøvetakningsfeil.[4]

2.4 Sensitivitet og spesifisitet

Sensitivitet og spesifisitet defineres som analysens egenskap til å identifisere friske og syke individer i en gruppe.

Sensitivitet er analysens evne til å identifisere de individene som er syke. Hvor sensitiv en analyse er, regnes ut fra andelen personer med den gitte sykdommen som faktisk får et laboratoriepositivt analysesvar.[4]

Spesifisitet er analysens evne til å identifisere de individene som er friske. Dette handler om analysens egenskaper til å skille mellom ulike sykdommer.[4]

Sensitivitet og spesifisitet kan defineres med formlene:

$$\text{Sensitivitet} = \frac{TP}{TP + FN} \qquad \text{Spesifisitet} = \frac{TN}{TN + FP}$$

Figur 2.5: *Sanne positive (TP), falske positive (FP), falske negative (FN) og sanne negative (TN).* [4]

Alle analyser har en nedre grense for deteksjon, dette kalles en cut-off verdi. Dersom konsentrasjonen av analytten foreligger under denne grenseverdien, vil analysen gi negativt resultat, selv om den aktuelle analytten faktisk finnes i prøvematerialet. Det er foretrukket at alle analyser skal ha høy sensitivitet og høy spesifisitet. Vanligvis vil en av egenskapene være mer foretrukket enn den andre, avhengig av den kliniske nytteverdien.

Enkelte analyser kan kun gi positive eller negative resultater (kvalitative resultater). Disse testene som omtales som dikotomisk (sann eller falsk), har et enkelt sensitivitet- og spesifisitetspar for en bestemt cut-off verdi. Dersom cut-off verdien er valgt for å gi en høy sensitivitet, vil dette føre til lav spesifisitet, da det kan øke sannsynligheten for falske positive analysesvar. Dersom en velger høy spesifisitet, vil dette igjen gå på bekostning av sensitiviteten til analysen.

Det motsatte av en dikotomisk test er kontinuerlig test. En kontinuerlig test gir kvantitative resultater. Denne typen test har et uendelig utvalg av sensitivitetspar og spesifisitetspar, da cut-off verdien varierer ut fra om det ønskes høy sensitivitet eller høy spesifisitet.[4]

3 Metode

“En metode er en fremgangsmåte, et middel til å løse problemer og komme fram til ny kunnskap. Et hvilket som helst middel som tjener dette formålet, hører med i arsenalet av metoder” ([32], s.196)

I dette kapittelet beskriver vi hvordan vi har kommet fram til litteraturen vi bruker, hvilke vitenskapelige databaser som er benyttet samt kildekritikk. I denne oppgaven er det brukt forsknings- og review artikler som baserer seg på kvantitativ data. Dette betyr at artiklene oppgir målbare data for å støtte sin argumentasjon.[33]

3.1 Datainnsamling

Det systematiske litteratursøket startet 18. mars. 2020, samtidig som en prosjektplan og midlertidig problemstilling ble utarbeidet.

I denne oppgaven har vi anvendt et systematisk litteratursøk som metode. Det er brukt vitenskapelige databaser og nettsider som Medline/Ovid, NTNU biblioteket, NCBI/Pubmed, Google Scholar og ScienceDirect. Vi har valgt ut tilsammen ti forsknings- og review artikler som ble brukt for å svare på problemstillingen "Hvorfor brukes RT-pPCR påvisning av SARS-CoV-2 framfor en immunrespons påvisning med ELISA?".

3.1.1 Søkestrategi

Følgende søkeord ble benyttet: “SARS-CoV-2”, “ELISA”, “COVID-19”, “SARS-serologic”, “Detection of SARS-CoV-2” og “PCR”. Fokuset gjennom de valgte søkeordene var å finne artikler som var relevante for vår problemstilling.

De aktuelle søkeordene ble enten søkt på alene eller i kombinasjon med de andre søkeordene. I en kombinasjon med flere søkeord kan en i de fleste databaser velge *AND* eller *OR*. Dersom en velger *AND* vil en finne referanser som inneholder både søk A og B, dette begrenser søket, og i vårt tilfelle kunne det ende med null treff. Ved å bruke *OR* legger en inn et ønske om å finne referanser som inneholder både søk A og B, men også hver for seg. Dette ga et bredere søk og kunne ende opp med flere tusen treff. Dette skjedde med det ene kombinasjonssøket vårt (*OR*) i OVID med “SARS-CoV-2” eller “PCR” som søkeord, som ga hele 612 986 treff 23.03.2020.

Deretter ble de første søkeordene begrenset med å legge til “Detection” ved “SARS-CoV-2” og “PCR” som resulterte i treff på 80 190. Søket ble igjen avgrenset med årstall 2019-2020, men dette resulterte ikke i endring av antall funn. Derfor valgte vi å gå vekk fra kombinasjonssøket med *OR* da avgrensningen ble for bred og ga lite nytteverdi for et strategisk søk.

Noe som imidlertid ga gode søkeresultater var kombinasjonssetninger som “Detection of SARS-CoV-2”, dette ga mindre enn ti aktuelle artikler i både ScienceDirect og Pubmed. Overskrifter og sammendrag ble så lest for å få et overblikk, deretter lagt til i et dokument dersom artikkelen var relevant for problemstillingen. Søket ble avsluttet 5. april 2020, og deretter ble artiklene systematisk gjennomgått for å velge ut hvilke artikler som ga grunnlag for videre diskusjon.

3.1.2 Kildekritikk

“Kildekritikk er de metodene som brukes for å fastslå om en kilde er sann. Det betyr å vurdere og karakterisere de kildene som benyttes. Leth og Thurén (2000) sier at kildekritikk er et samlebegrep for metoder brukt for å skille verifiserte opplysninger for spekulasjoner.” ([34], s.67-68)

Hensikten med kildekritikken er å bestemme litteraturens relevans, styrker og begrensninger.

I denne oppgaven er intensjonen med litteratursøket å finne svar på problemstillingen "Hvorfor brukes RT-pPCR påvisning av SARS-CoV-2 framfor en immunrespons påvisning med ELISA?". I forbindelse med dette er det viktig å vurdere hvor og når artiklene er publisert og hvem litteraturen retter seg mot. Litteraturen som er brukt for å svare på problemstillingen i denne oppgaven er forskningsartikler og review artikler fra 2020.

Vi har brukt primærlitteratur så langt det har vært mulig for å unngå at litteraturen er bearbeidet av en annen forfatter. Forsknings- og review artiklene som er tatt med i oppgaven kommer fra blant annet Kina, Tyskland, England og Nederland, og er ofte et samarbeid mellom flere land. Dette er land som er velutviklet innenfor laboratoriefaget og metodene de bruker kan sammenlignes med metoder som brukes i Norge.

3.1.3 Kvalitetsvurdering

Når det ble valgt ut artikler, var det viktig for oss å tenke på oppgavens formål og problemstilling. På bakgrunn av dette valgte vi disse inklusjonskriteriene for å kvalitetssikre litteratursøket:

- Artikkelen må være skrevet i tidsrommet 2019-2020.
- Artikkelen må være engelsk, norsk, dansk eller svensk språklig.
- Artikkelen må ta for seg RT-qPCR analyse av SARS-CoV-2 og/eller ELISA analyse av covid-19.

Artiklenes grad av pålitelighet ble nøye vurdert ut fra publiseringskanal, og hvorvidt artikkelen var fagfelleurdert eller ikke. Et spørsmål som vi stilte oss ved gjennomgang av litteraturen var: “kan denne artikkelen være relevant for å svare på problemstillingen vår?”. Artikler med ufullstendig og mangelfull data, samt nettsider med et tydelig markedsbudskap ble ekskludert fra søket. Artiklene som ble inkludert inneholdt demografiske, kliniske, laboratorie- og bildefunksjoner av RT-qPCR som kan detektere SARS-CoV-2, og den immunologiske metoden ELISA som kan påvise tilstedeværelsen av antistoffer mot viruset.

4 Resultat

I arbeidet med denne oppgaven er det valgt ut ti artikler som vil ligge til grunn for drøftingsdelen av oppgaven. I dette kapittelet blir disse artiklene presentert med tittel, hvor den er publisert, publiseringsdato, forfatter, hvorfor denne artikkelen er relevant og funn.

Nr.	Tittel	Publisert	Forfattere	Relevans	Funn
1	<i>Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2 using a high throughput system [35]</i>	Eurosurveillance. Denne artikkelen ble sendt inn 14. februar 2020/ godkjent 4. mars 2020/ publisert 5. mars 2020.	Pfefferle S, Reucher S, Nörz D og Lütgehetmann M.	I denne artikkelen ser de på muligheten av å automatisere RT-qPCR ved å bruke en helautomatisk PCR-plattform	Pfefferle S <i>et.al</i> (2020) kom fram til at en automatisert løsning for RT-qPCR kan hjelpe med å håndtere store antall prøver innenfor et rimelig tidsvindu.
2	<i>Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from jan to feb 2020 [28]</i>	ScienceDirect. Mottatt 2.mars.2020/ Godkjent 6.mars.2020/ Tilgjengelig på nett fra 7.mars.2020.	Liu R, Han H, Liu F, Lv Z, Wu K, Liu Y <i>et.al.</i>	I denne artikkelen tar de for seg RT-PCR som analysemetode og om denne metoden spiller en viktig rolle i identifiseringen av SARS-Cov-2.	Liu R <i>et.al</i> (2020) skriver om at RT-qPCR bør kombineres med CT for å bekrefte en diagnose, samt at det bør produseres mer reagens for å få gjennomført flere RT-PCR analyser.
3	<i>Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR [1]</i>	Eurosurveillance. Mottatt 21.januar.2020/ Akseptert 22.januar.2020.	Corman VM, Landt O, Kaiser M , Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW <i>et.al.</i>	I denne artikkelen tar de for seg forskning der det brukes metoden RT-qPCR for å detektere og kvantifisere SARS-CoV-2.	Corman VM <i>et.al</i> (2020) forsker på å forberede arbeidsflyten til RT-qPCR analysen. I følge denne artikkelen gjør den nye arbeidsflyten det mer mulig å diagnostisere pasienter hyppigere ved bruk av RT-qPCR.

Nr.	Tittel	Publisert	Forfattere	Relevans	Funn
4	<i>Development of a laboratory-safe low-cost detection protocol for SARS-CoV-2 of the coronaviruses disease 2019 (COVID-19 [21]</i>	Experimental Neurobiology (en-journal). Mottatt 28.februar 2020/ Godkjent 7.mars 2020/ Publisert 11.mars 2020.	Won J, Lee S, Park M, Kim TY, Park MG, Choi BY <i>et.al.</i>	I denne artikkelen tar de for seg en billigere RT-qPCR deteksjonsprotokoll for SARS-CoV-2, med fokus på å holde høy biosikkerhetsnivå.	Won J <i>et.al</i> (2020) har utviklet en billigere og mer biosikker deteksjonsprotokoll ved bruk av Trizol med høy sensitivitet for SARS-CoV-2, men skriver at denne metoden må forskes mer på før den tas i bruk.
5	<i>Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19 [2]</i>	Oxford Academic. Mottatt 22.februar.2020/ Publisert 21.mars.2020.	Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F <i>et.al.</i>	I denne artikkelen diskuteres det om RT-qPCR er den beste påvisningsmetoden for SARS-CoV-2 og om påvisning av antistoffer, spesielt IgM ved bruk av ELISA-metoden kan fungere som et diagnostisk verktøy.	Guo L <i>et.al</i> (2020) skriver om at antistofftesting ved bruk av ELISA vil være nyttig å bruke dersom qPCR ikke kan utføres. De viser også til en ELISA analyse kan være et hjelpemiddel i diagnostisering av covid-19 sammen med RT-qPCR.
6	<i>Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19 [26]</i>	ScienceDirect. Mottatt 24.februar 2020/ Revidert 1.mars 2020/ Tilgjengelig online fra 5.mars.2020.	Li X, Geng M, Peng Y, Meng L og Lu S.	I denne artikkelen skriver de om at RT-qPCR er den hyppigste brukte metoden for deteksjon av SARS-Cov-2, men at det også kan være en fordel å ta i bruk immunologiske metoder som ELISA.	Li X <i>et.al</i> (2020) fant ut at det vil hjelpe å kontrollere spredning av sykdom i tidlig stadie av epidemien ved bruk av nøyaktige analyseteknikker som RT-qPCR. De konkluderer med at det er viktig å utvikle en enkel og rask teknologi for å påvise covid-19.

Nr.	Tittel	Publisert	Forfattere	Relevans	Funn
7	<i>Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes</i> [11]	TaylorandFrancis Online. Mottatt 4.februar 2020/ Godkjent 7.februar 2020/ Publisert 17.februar 2020.	Zhang W, Du RH, Li B, Zheng XS, Yang XL, Hu B <i>et.al.</i>	I denne artikkelen er hensikten å gi en oversikt over analysing av viruset SARS-CoV-2 ved bruk av RT-qPCR og den immunologiske metoden ELISA. Det blir benyttet flere typer prøvematerial for å kunne konkludere hvilken som gir best grunnlag til å kunne påvise covid-19.	Zhang W <i>et.al</i> (2020) konkluderer med at både RT-qPCR og en immunologisk metode med ELISA er nødvendig for å kunne bekrefte en virusbærer.
8	<i>Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring</i> [30]	Wiley Online Library. Mottatt 1.februar 2020/ Godkjent 4.februar 2020/ Publisert 7.februar 2020.	Xiao S, Wu Y og Liu H.	I denne artikkelen skriver de om den utviklende statusen for deteksjon av viruset SARS-CoV-2. De får frem fordeler og ulemper ved bruken av RT-PCR og ELISA.	Xiao S <i>et.al</i> (2020) konkluderer de med at det er enklere å implementere og bruke immunologiske metoder i laboratoriet en en RT-qPCR. De mener at det er høyst nødvendig å skaffe en hurtigpresterende immunologisk analyse for å kunne kartlegge smitteoverføring innad i befolkningen.

Nr.	Tittel	Publisert	Forfattere	Relevans	Funn
9	<i>Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection</i> [27]	ACSPublications Sendt inn 27 mars 2020/ Godkjent 30 mars 2020/ Publisert 9 April 2020.	Udugamaa B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li V.Y.C. <i>et.al.</i>	I denne artikkelen tar de for seg fordeler og ulemper med forskjellige analysemetoder for SARS-CoV-2. Her ser de på hvordan en RT-PCR analyse og ELISA analyse fungerer for testing av SARS-CoV-2.	Udugamaa B <i>et.al</i> (2020) konkluderer med at RT-qPCR er viktig å beholde som en del av første forsvarslinje når en pandemi inntreffer. De skriver også om at en utarbeidet immunologisk metode er en enklere analysemetode, og at det kan fungere som et godt supplement til en RT-qPCR analyse for påvisning av covid-19.
10	<i>SARS-CoV-2 spesific antibody responses in COVID-19 patients</i> [7]	MedRxiv Publisert 20.mars.2020/ Fagfelleurdert 8. april 2020.	Okba NMA, Muller MA, Li W, Wang C, Geustsvan-Kessel CH, Corman VM <i>et.al.</i>	I denne artikkelen ser de på at spesifikke og validerte serologiske analyser som ELISA mangler for å teste SARS-CoV-2.	Okba NMA <i>et.al</i> (2020) konkluderer med at immunologisk metode er mulig og viktig å implementere på laboratorier for å kunne overvåke antistoffproduksjon generelt og ved utvikling av vaksiner.

Tabell 4.1: Resultat

5 Diskusjon

I dette kapittelet bruker vi teori og funn fra litteratursøket og drøfter dette for å svare på problemstillingen “hvorfors brukes RT-pPCR påvisning av SARS-CoV-2 framfor en immunrespons påvisning med ELISA?”

En av hovedutfordringene med litteratursøket vårt var de korte intervallene mellom innsending, godkjenning og publisering av artiklene. Etter at viruspandemien oppstod, ble det viktig å publisere forskning, og få godkjente og validerte metoder for analysering av SARS-CoV-2. Dette kan ha noe å si for kvaliteten av arbeidet som blir publisert i forbindelse med pandemien.

Vi har tatt høyde for dette når vi har brukt artiklene som er publisert, og har forsøkt å bruke artikler med lengre intervall. Vi har hatt fokus på å bruke fagfelleverderte artikler, men valgte til slutt å ta i bruk en artikkel som ikke var fagfelleverdert (Artikkel ti Okba N.M.A *et.al* (2020)). Vi kom fram til at denne artikkelen kunne bidra med å svare på problemstillingen vår på tross av dette. Grunnen til at vi velger å ta med denne artikkelen er fordi den bruker troverdige kilder og den har gjennomført oversiktlige undersøkelser. Vi så i ettertid at denne artikkelen ble fagfelleverdert 8. april. 2020.

5.0.1 RT-qPCR

Flere studier har påpekt at RT-qPCR er den mest brukte analysemetoden vi har for SARS-CoV-2. Det finnes ulike måter å analysere SARS-CoV-2 ved bruk av RT-qPCR. For eksempel så tar Pfefferle *et.al*(2020) for seg en automatisk RT-qPCR metode, mens Won J *et.al* (2020) forsker på hvordan å gjøre den nåværende RT-qPCR metoden tryggest, enklest og billigst mulig.[35]
[21]

Prøvetakningsmetode

Vi ser ulikheter i prøvetakningsmetode og hvor prøvematerialet er hentet fra. Den hyppigste brukte prøvetakningsmetoden er prøvematerialet hentet fra nasofarynx og svelg. Et problem med denne metoden er at RT-qPCR er avhengig av en viss mengde viruspartikler i prøvematerialet, for å kunne detektere SARS-CoV-2. Dersom prøven blir tatt tidlig i sykdomsforløpet, kan det føre til at det ikke er nok virus tilgjengelig i prøvematerialet, som kan lede til et falskt negativt svar.[2]

En annen type prøvetakningsmetode er bronko-alveolær lavage. Denne prøvetakningsmetoden

sikrer større mengde virus fra personer med infeksjon i nedre luftveier. Derfor kan dette være en god prøvetakningsmetode for å unngå falske negative analysesvar ved bruk av RT-qPCR. Derimot er denne metoden svært invasiv og ressurskrevende, og vil ikke være mulig å foreta på alle pasienter som er mistenkt for å være smittet med SARS-CoV-2. Det er også et poeng at pasientene som er testet med bronko-alveolær lavage er pasienter som er syke, men som ikke får et positivt svar ved prøve tatt fra svelg og nasofarynks. Infeksjonen hos disse pasientene sitter lengre ned i luftveiene. Det vil da være hensiktsmessig å utføre en slik test, for å kunne bekrefte en diagnose. Ut fra forsøk hvor de har tatt i bruk bronko-alveolær lavage ser vi at populasjonen er lav.[28] Det er totalt fem pasienter som ble testet med denne prøvetakningsteknikken. Med tanke på den lave populasjonen kan en stille spørsmålet om hvor representativ denne statistikken faktisk er.

Det blir også gjennomført prøvetakningsmetoder hvor pasientene selv utfører prøvetakningen. Pasientene samler i dette tilfellet inn sitt eget spytt og/eller utfører en penselprøve fra svelg og munnhule. Det at pasientene tar prøven selv åpner for flere feilkilder. Feilkildene kan være dårlig prøvetaking på grunn av manglende kompetanse, som igjen kan føre til lav viral load i prøvematerialet. Andre viktige feilkilder kan være forurensing av prøvematerialet, feilmerking og at prøvematerialet ikke blir håndtert riktig. Det er også et poeng at SARS-CoV-2 kan være fraværende i øvre luftveier noe som gjør at selvtesting og pensel prøve kan føre til et falskt negativt analysesvar. [21][26] Dette er en av de viktigste feilkildene ved RT-qPCR analyse.

Studier viser at penselprøver fra svelg og nasofarynks ikke er pålitelige åtte dager etter symptomdebut. Dermed kan et negativt analysesvar med RT-qPCR fra dette området ikke utelukke covid-19 så sent i sykdomsforløpet. Et falskt negativt analysesvar kan også forekomme selv om helsepersonell utfører prøvetakningen. Det kan blant annet være lav viral load på området prøven ble tatt fra eller mutasjoner som kan ha skjedd i virus genomet. [27]

Forskjellige varianter av RT-qPCR

Det finnes muligheter for å forenkle RT-qPCR, som for eksempel metoden Pfefferle *et.al* (2020) beskriver, hvor de tar for seg en automatisert RT-qPCR analyse ved å bruke analyseinstrumentet cobas 6800. Prosessene nukleinsyreekstraksjon, amplifisering og deteksjon blir automatisert og utføres av cobas 6800. Dette kan føre til mindre belastning på laboratoriene ved at de kan tilpasse seg store mengder prøver, som for eksempel ved covid-19 pandemien. Ved å gjøre RT-qPCR automatisert blir de manuelle trinnene redusert med opptil 60%. Det manuelle arbeidet med en

RT-qPCR analyse blir redusert fra 74 minutter til 14 minutter ved å benytte seg av en automatisert RT-qPCR. Denne metoden vil også gi en mer oversiktlig framstilling av resultatene som gjør at personell som ikke er kjent med RT-qPCR også kan tolke det. Vi ser at dette imidlertid er en metode som fortsatt er under utbedring. Den vil derfor ha noen utfordringer knyttet til analytisk ytelse da alle de positive prøvene fortsatt må testes ved en konvensjonell RT-qPCR analyse.[35]

Det er også mulig å dele opp RT-qPCR i ett trinns eller to trinns-analyser. En ett trinns RT-qPCR er mindre tidkrevende da revers transkripsjonen og amplifisering skjer samtidig. En ulempe med en ett trinns metode er at optimalisering av disse to stegene ikke er mulig. Dette kan gjøre at sensitiviteten til analysen blir lavere. Personer som egentlig er SARS-CoV-2 positive kan få negativt analysesvar, som igjen kan føre til en falsk trygghet som er ugunstig med tanke på å verne om risikogrupperne. På en annen side kan en to trinns RT-qPCR analyse oppnå en høyere sensitivitet da revers transkripsjon og amplifisering kan optimaliseres hver for seg. Dette fører imidlertid til at denne metoden er mer tidkrevende enn en ett trinns metode.[27] Ved en pandemi som covid-19 kan det være en fordel at analysen tar kort tid, da det vil være mulig å analysere flere prøver i løpet av en dag. Det å teste en større andel av befolkningen kan også gjøre kartlegging av pandemien lettere og iverksetting av smittereduserende tiltak mulig.

Sensitivitet og spesifisitet

Forskning relatert til deteksjon av SARS-CoV-2 viser til at 3% av de som ble testet var negativ for SARS-CoV-2 ved første analyse med RT-qPCR. Ved en senere anledning viste det seg likevel at alle var positive.[26] Her ser vi et eksempel på at hvis det ikke er nok viral load i prøvematerialet så vil ikke RT-qPCR klare å detektere viruset. Selv om dette er tilfelle så er det viktig å bemerke seg at sensitiviteten til RT-qPCR i dette forsøket er 97% noe som vil tilsi at denne analysen har en høy sensitivitet.

Når vi tar for oss sensitiviteten til en RT-qPCR analyse er det viktig å legge merke til når i sykdomsforløpet testene er tatt. Blir testen utført på et tidlig tidspunkt etter smitte, er det ikke sikkert det er nok viral load i prøvematerialet til å detektere det. Dette vil senke den prosentvise sensitiviteten til analysen. Liu R *et.al* (2020) viser til et eksempel på høy sannsynlighet for deteksjon hvor 1707 pasienter ble testet fra en feberklinikk.[28] Pasientene som var innlagt på denne klinikken var kommet så langt i sykdomsforløpet at de hadde fått sterke symptomer. Det vil dermed være mer virus til stede i respirasjonssekretet deres, enn en person som har utviklet milde symptomer. Derfor vil det være større sannsynlighet for pasientene ved denne

feberklinikken å teste positivt for SARS-CoV-2 ved første prøvetaking.

Corman V.M *et.al* (2020) skriver om den analytiske sensitiviteten og spesifisiteten for de ulike genområdene knyttet til SARS-CoV-2. Det er viktig at sensitiviteten for RT-qPCR analysen er høy da dette er avgjørende for å kunne detektere viruset. Dersom sensitiviteten blir for høy kan dette imidlertid gå ut over spesifisiteten til analysen. For å unngå dette bør det i følge Corman V.M *et.al* (2020) testes for kryssreaktivitet og utelukke ikke-spesifikk reaktivitet mellom oligo-nukleotidene. Det er viktig at primerne som blir designet for det aktuelle genområdet er så spesifikk som mulig slik at det ikke oppstår interferens med andre gener som er tilstede i prøven.[1]

5.0.2 ELISA

Det mangler spesifikke og validerte immunologiske analyser for å teste for antistoffer mot SARS-CoV-2.[7] En antistoffpåvisning med ELISA kan være viktig for å kartlegge sykdomsforløpet og for utvikling av vaksiner.

Påvisning av antistoffer

Ved en ELISA analyse for covid-19 brukes det hovedsakelig serum fra pasient som prøvematerialet. Her testes det for spesifikke antistoff mot spesifikke antigen som finnes på overflaten til SARS-CoV-2. Litteratursøket viser til at det som regel testes for er IgG og IgM antistoffer ved diagnostisering av covid-19. Det er uenighet om når det er mulig å påvise antistoff. I følge Okba N.M.A *et.al* (2020) kan antistoff påvises mellom dag 13 og 21 etter symptomdebut [7], mens et annet forsøk viser at det er mulig å påvise IgM antistoff mellom dag 3 og 6 etter symptomdebut.[2] Dette viser høy variasjon i sensitiviteten til de forskjellige ELISA analysene.

Guo L *et.al* (2020) viser at 22% av de som hadde fått påvist SARS-CoV-2 ved bruk av RT-qPCR testet negativt for IgM antistoffer ved en ELISA analyse. [2] Dette kan tyde på at ELISA analysen ikke vil egne seg som en metode å diagnostisere covid-19 tidlig i sykdomsforløpet.

Det er imidlertid uenigheter om hvor kort tid det tar å påvise antistoffer i serum. Udugama B *et.al* (2020) viser til at på dag null var 50% av pasientene IgM positive og hele 81% IgG positive. På dag fem økte disse tallene til at 81% var IgM positive og 100% var IgG positive.[11] [27] Det er viktig å bemerke seg at disse testene ble utført på serum fra pasienter som allerede var bekreftet SARS-CoV-2 positiv ved hjelp av RT-qPCR. Dette gjør at det er vanskelig å anslå nøyaktig hvor de er i sykdomsforløpet. Dag null vil dermed ikke si at det er første dag med

symptomer, men at det er første dag pasientene ble testet ved bruk av ELISA analyse.

Ved å ta i bruk ELISA analyse kan det også åpne seg en mulighet for å teste antistoff utviklingen mot SARS-CoV-2. På denne måten kan en få oversikt over hvor mange som har vært smittet og om det dannes immunitet mot viruset. Dette kan gjøre det lettere å kartlegge sykdommen som igjen vil føre til at smitteverntiltak kan tilrettelegges ut fra geografi og livssituasjon.

Sensitivitet og spesifisitet

I følge Okba N.M.A *et.al* (2020) kan det foreligge kryssreaktivitet mellom SARS-CoV-2 og SARS-CoV. Dette kommer av at disse to virusene har ganske lik oppbygging og deler de samme overflatestrukturene. På en annen side har ikke SARS-CoV sirkulert i samfunnet siden 2003. Tidligere studier har også rapportert om at spesifikke antistoffer mot SARS-CoV ikke var mulig å påvise i 91% (21/23) av serumprøver tatt 6 år etter infeksjon.[7] Det vil da være lite sannsynlig at SARS-CoV antistoffer påvirker prøveresultatet til SARS-CoV-2, men dette kan ikke utelukkes.

Udugama B *et.al* (2020) gjennomførte en analyse der N-proteinet de brukte for å påvise antistoff mot SARS-CoV-2 hadde 90% lik aminosyre sekvens som andre SARS relaterte virus. Likhetene øker sannsynligheten for kryssreaktivitet.[27] Dette skiller seg fra studie til Okba N.M.A *et.al* (2020), hvor kryssreaktiviteten skjer bare mellom SARS-CoV og SARS-CoV-2. Ved Udugama B *et.al* (2020) sitt studie er det derfor større sannsynlighet for at dette kan interferere med prøveresultatene. Kryssreaktivitet mellom antistoffer kan være en av de største fallgruvene for spesifisiteten til ELISA analysen. Dette på bakgrunn av at individer som ikke har antistoff mot SARS-CoV-2 får et positivt analysesvar da de har hatt en tidligere infeksjon med en av de andre korona virusene.

Det viser seg også at ved alvorlig covid-19 infeksjon er antistoffnivået høyere enn ved mildere infeksjoner.[7] Ved bruk av denne metoden for påvisning av antistoffer vil det kunne oppstå falsk negative svar hvis symptomene er for svake. Denne metoden kan derfor være lite sensitiv ved milde symptomer eller tidlig i sykdomsforløpet. [7]

Det kan være hensiktsmessig å ta i bruk immunologiske metoder som retter seg mot virus antigen og/eller antistoff analyser. Statistiske verdier for immunologisk testing av SARS-CoV-2 viser at N-basert IgG ELISA har en sensitivitet på 94,7%, og S-basert IgG ELISA har en sensitivitet på 58,9%.[26] En kombinasjon av S-basert- og N-basert ELISA kan være en fordel for å oppnå en høyere grad av sensitivitet, da det analyseres både for antistoff mot N-proteinet og S-proteinet.

Dette kan imidlertid senke spesifisiteten da N-basert ELISA er mer spesifikt mot antigen på SARS-CoV-2 enn S-basert ELISA.[7]

5.0.3 Sammenligning av RT-qPCR og ELISA

Etter å ha sett nærmere på både RT-qPCR og ELISA analysering av SARS-CoV-2 og SARS-CoV-2 spesifikke antistoff, observerte vi ulemper og fordeler med begge metodene.

Prøvetakningsmetoder

Ved bruk av både RT-qPCR og IgM ELISA oppnås en høyere grad av positiv deteksjon fra 51,9% (ved bare bruk av RT-qPCR) til 98,6% ved bruk av begge. Dette viser igjen at ved å bruke RT-qPCR alene kan det oppstå falske negative analysesvar da pensel prøve som prøvetakningsmetode ikke alltid sikrer nok virus for deteksjon.[2]

Biosikkerhetsnivået på arbeidsplassen er også en faktor å betrakte når RT-qPCR og ELISA analyse sammenlignes. I dag er ELISA analysen avhengig av at helsepersonell tar blodprøve på pasienten. Dette innebærer at helsepersonell kommer i direkte kontakt med pasientene. Ved en Trizol basert RT-qPCR analyse er ikke dette tilfellet. Won J *et.al* (2020) benytter en metode som går ut på at pasientene utfører prøvetakningen selv, og at prøvematerialet fraktes i et prøverør med Trizol som vil inaktivere viruset. Dette kan redusere sjansen for smitte fra pasient til helsepersonell betraktelig. [21]

Dersom det brukes en konvensjonell RT-qPCR analyse er viruset aktiv, og krever derfor smittevernutstyr. Det er ikke behov for dette på laboratoriet ved en ELISA analyse, da analysen skjer med rekombinant protein (antigen) og antistoff, ikke viruset direkte. ELISA analysen har derfor høyere biosikkerhetsnivå enn en RT-qPCR analyse med hensyn til laboratoriepersonell.

Sensitivitet og spesifisitet

En RT-qPCR analyse er en god metode for å detektere det spesifikke viruset som en tester for. Hvis pasienten tester positiv ved en RT-qPCR analyse for SARS-CoV-2, så er det helt sikkert at det er dette viruset pasienten er infisert med. Dette viser at en RT-qPCR analyse har en høy spesifisitet. ELISA analysen kan ha problemer med kryssreaktivitet på dette området, noe som kan redusere analysens spesifisitet. På en annen side ser vi at RT-qPCR har den ulempen at den ikke kan utelukke sykdom ved et negativt analyseresultat, da dette kan komme av at det er lav viral load på området prøven er tatt fra. ELISA analyse bruker derimot serum som prøvematerialet. Er det dannet antistoff mot SARS-CoV-2 kan det være mulig å påvise allerede

mellom dag tre og seks etter sykdomsdebut ved en indirekte ELISA analyse.[2] Det er imidlertid viktig å bemerke seg at en RT-qPCR analyse er sensitiv for deteksjon av SARS-CoV-2 (grad av deteksjon=95%), men den prosentvise graden av deteksjon kan reduseres ved at det ikke er nok viral load på området prøven er tatt fra.[1]

SARS-CoV-2 er 80% - 90% identisk med tidligere SARS-CoV og 50% identisk med MERS.[10] Når virusene er så like kan dette skape kryssreaktivitet mellom antistoffene mot de forskjellige koronavirusene. Dette kan gå ut over spesifisiteten til analysen på den måten at en person som ikke har hatt SARS-CoV-2, men som har hatt en tidligere infeksjon av SARS relaterte virus, kan få et falskt positivt analysesvar ved en IgG ELISA analyse. [7][27]

Påvisning av covid-19

En fordel med ELISA analyse er at det er mulig å påvise infeksjonen lengre ut i sykdomsforløpet enn ved en RT-qPCR analyse. Forskning viser at 14 dager etter sykdomsdebut var det bare mulig å detektere viruset i 50% av covid-19 pasientene ved bruk av RT-qPCR. Den positive graden for deteksjon av RT-qPCR var mer enn 90% de første tre dagene etter symptomdebut, men var fallende til 80% på dag seks. Her kunne ELISA vært et godt hjelpemiddel for å påvise om en pasient har hatt eller har en infeksjon, da antistoffene mot SARS-CoV-2 har vist seg å være påvisbart i lengre tid etter infeksjon.[2]

Videre ser vi at en ELISA analyse ikke kan brukes som en akutt test for covid-19 da det kan være vanskelig å påvise antistoffer tidlig i sykdomsforløpet. Dette er på grunn av at ELISA er avhengig av den humorale immunresponsen og produksjon av antistoff. Hvor tidlig antistoff kan påvises, har vist seg å variere mellom de ulike forskningsartiklene. Samtlige artikler har vist til at antistoffpåvisning med ELISA ikke bør brukes alene i diagnostikk av covid-19 tidlig i sykdomsforløpet. En kombinasjon av RT-qPCR og ELISA vil være den beste måten å påvise sykdommen i en tidlig fase, da ELISA analysen sin prøvetaking ikke trenger samme grad av kvalitet som en RT-qPCR analyse. Det kan på denne måten være mulig å luke ut de falske negative analysesvarene som skjer ved at det er lav viral load i prøvematerialet til en RT-qPCR.[7][30]

Ved bruk av ELISA vil det også være mulig å overvåke sykdomsbilde. Dette kan gjøres ved å se hvilke antistoffer som produseres og når. Dersom personen produserer IgM så tyder dette på en aktiv infeksjon, men hvis det bare er IgG som produseres kan dette tyde på at personen har hatt en tidligere infeksjon som nå er over. Det er også et poeng at ELISA kan være et godt hjelpemiddel i utvikling av vaksiner da man kan overvåke antistoffproduksjon hos de vaksinerte

personene. Dette vil ikke være mulig ved en RT-qPCR analyse.[30]

5.1 Konklusjon

Hensikten med denne oppgaven var å finne ut hvorfor det brukes RT-pPCR påvisning av SARS-CoV-2 framfor en immunrespons påvisning med ELISA. Det er mye usikkerhet rundt ELISA påvisning av covid-19, og om dette kan erstatte eller brukes som et hjelpemiddel i tillegg til en påvisning med RT-qPCR.

Ved å bruke informasjonen fra litteratursøket sammenlignet vi ELISA analyse og RT-qPCR analyse av SARS-CoV-2. Vi ser tydelig at det kan være en stor fordel å ta i bruk begge disse analysemetodene. En kombinasjon av disse analysemetodene vil gjøre det mulig å påvise SARS-CoV-2 infeksjonen over en lengre tidsperiode. Antistoff er mulig å påvise i lang tid ut i, og etter sykdomsforløpet ved bruk av en ELISA analyse, mens ved en RT-qPCR kan viruset detekteres kort tid etter sykdomsdebut. Ved å bruke begge analysemetodene vil en også øke sannsynligheten for påvisning av covid-19. ELISA analyse kan også brukes som et supplement for de prøveresultatene som er negativ ved bruk av RT-qPCR, men der pasientene har symptomer på covid-19.

Grunnen til at ELISA ikke er implementert for diagnostisering av covid-19 i laboratorier internasjonalt, er at det enda ikke finnes en validert metode for dette. ELISA analyse for SARS-CoV-2 spesifikke antistoff er fortsatt under utviklig.

Vi tolker ut fra litteratursøket at deteksjon av SARS-CoV-2 fortsatt bør analyseres ved bruk av RT-qPCR, siden denne analysen er den eneste validerte metoden så langt. En god immunologisk metode kan derimot bli hensiktsmessig å ta i bruk i tillegg til den eksisterende RT-qPCR analysen. Da vil det i større grad være mulig å overvåke sykdomsbilde, og i hvor stor grad vi danner antistoffer mot SARS-CoV-2. Det å ta i bruk både ELISA og RT-qPCR analyse vil også øke sensitiviteten for påvisning av sykdommen. En ELISA analyse gir også mulighet for å påvise antall personer som har vært smittet, som ikke har fått påvist covid-19 med RT-qPCR. På denne måten kan det kartlegges hvor stor del av befolkningen som har hatt sykdommen.

Referanser

- [1] Corman VM, Landt O, Kaiser M , Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW et.al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveillance, 22.01.2020. Hentet: 03.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.
- [2] 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). Oxford Academic, 21.03.2020. Hentet: 02.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa310>.
- [3] Hansen LS. Immunologiske metoder. NITO, 20. November 2018. Hentet: 25.03.2020. Tilgjengelig fra: <https://www.nito.no/contentassets/4976ff82a9564ea5935a617f70a3710b/immunologi-og-immunologiske-metoder/02-immunologiske-metoder-linn-silje-hansen.pdf>.
- [4] Burtis CA og Bruns DE. Clinical Evaluation of Methods . I Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 7. utgave. St. Louis, Missouri: Saunders; kapittel 3.
- [5] World Health Organization. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19. who.no, 11.03.2020. Hentet: 30.04.2020. Tilgjengelig fra: 11.03.2020 <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
- [6] Hauge MT, Nilsen E og Nordseth T. Akutt lungesviktsyndrom hos covid-19-pasient med negative nasofarynksprøver. Tidsskriftet, den norske legeforening, 11.04.2020. Hentet: 13.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://tidsskriftet.no/2020/04/kort-kasuistikk/akutt-lungesvikt-syndrom-hos-covid-19-pasient-med-negative-nasofarynksprover>.
- [7] OKBA NMA, Muller MA, Li W, Wang C, GeustsvanKessel CH, Corman VM et.al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. medRxiv, 20.03.2020. Hentet: 30.03.2020. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.20038059>.

- [8] Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. bind 66 av *Advances in Virus Research*. Academic Press; 2006, side 193 – 292.
- [9] Myrvang B. sars. sml.no, 17.03.2020. Hentet: 20.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/sars>.
- [10] Xie M og Chen Q. Insight into 2019 novel coronavirus — an updated intrim review and lessons from SARS-CoV and MERS-CoV. *International Journal of Infectious Diseases*, 2020. Hentet: 20.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.071>.
- [11] 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. *Taylor and Francis online*, 17.02.2020. Hentet: 30.03.2020. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1729071>.
- [12] A.Liljebakk S. Bioingeniører i frontlinjen. *bioingenioren.no*, 2020. Hentet: 30.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://www.bioingenioren.no/contentassets/4e4efd00efb244ad84a9c0f09eef52d9/bioingenioren-3-2020.pdf>.
- [13] European Centre for Disease Prevention and Control. Factsheet for health professionals on Coronaviruses. *ecdc.europa.eu*, 2020. Hentet: 30.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://www.ecdc.europa.eu/en/factsheet-health-professionals-coronaviruses>.
- [14] Grødeland G. Fakta om koronavirus. *uio.no*, 03.02.2020. Hentet: 20.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://www.med.uio.no/forskning/aktuelt/aktuelle-saker/2020/coronavirus.html>.
- [15] Lilleøre A. Her får du se den usynlige fienden. *forskning.no*, 15.04.2020. Hentet: 30.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://forskning.no/bioteknologi-virus/mikroskopbilder-av-koronaviruset-her-far-du-seden-usynlige-fienden/1669706>.
- [16] Bionordika. reagenser og kit for SARS-CoV-2. *bionordika.no*, 2020. Hentet: 20.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://bionordika.no/aktuelt/nyheter/COVID-19-forskning>.

- [17] Promocell. Study and fight Coronavirus with research tools from PromoCell. Promocell.com, 28.02.2020. Hentet: 13.05.2020. Tilgjengelig fra:
<https://www.promocell.com/news/news-announcement/study-and-fight-coronavirus-with-research-tools-from-promocell/?fbclid=IwAR0FffhpKHDpIsaS-bpSWMN5315uykEhPrOkGw4LPKmjBN7ePpjvPhpiLlg>.
- [18] Fossum S og Dissen E. Polymerasekjedereaksjon. Store Norske Leksikon, Sist oppdatert 17.03.2020. Hentet: 24.03.2020. Tilgjengelig fra:
<https://sml.snl.no/polymerasekjedereaksjon>.
- [19] FHI. RNA-kvalitet i vevsprøver. Folkehelseinstituttet, Sist oppdatert 29.04.2020. Hentet: 01.05.2020. Tilgjengelig fra:
<https://www.fhi.no/nettpub/coronavirus/helsepersonell/provetaking/>.
- [20] Moghen A og Halgunset J. RNA-kvalitet i vevsprøver. Bioingeniøren, Sist oppdatert 14.07.2016. Hentet: 01.05.2020. Tilgjengelig fra:
<https://www.bioingenioren.no/fag/fag-originalartikkel/rna-kvalitet-i-vevsprover/>.
- [21] Won J, Lee S, Park M, Kim TY, Park MG, Choi BY et.al. Development of a Laboratory-safe and Low-cost Detection Protocol for SARS-CoV-2 of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). EN-Journal.org, 11.03.2020. Hentet: 06.04.2020. Tilgjengelig fra:
<https://doi.org/10.5607/en20009>.
- [22] Farell RE. 18. RT-PCR: A science and an Art Form. Fjerde utgave; 29. januar. 2010, side 385 – 448. Hentet 23.03.2020. Tilgjengelig fra:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123747273000188>.
- [23] UIO, institutt for biovitenskap. PCR. Universitetet i Oslo, 4. februar.2011. Hentet: 23.03.2020. Tilgjengelig fra:
<https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html>.
- [24] UIO, institutt for biovitenskap. Primer. Universitetet i Oslo, 4.februar.2011. Hentet: 04.05.2020. Tilgjengelig fra:
<https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/primer.html>.
- [25] Børresen-Dale AL. DNA-probe. Store Norske Leksikon, Sist oppdatert 31.12.2018. Hentet:

- 01.05.2020. Tilgjengelig fra:
<https://sml.snl.no/DNA-probe>.
- [26] Li X, Geng M, Peng Y, Meng L og Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 05.03.2020. Hentet: 02.04.2020. Tilgjengelig fra:
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.001>.
- [27] Udugamaa B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li V.Y.C. et.al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. ACS publications, 30.03.2020. Hentet: 06.04.2020. Tilgjengelig fra:
<https://dx.doi.org/10.1021/acsnano.0c02624>.
- [28] Liu R, Han H, Liu F, Lv Z, Wu K, Liu Y at.al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Science Direct*, 06.03.2020. Hentet: 06.04.2020. Tilgjengelig fra:
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.009>.
- [29] Store medisinske leksikon. Immunglobuliner. Snl.no, 16. januar 2020. Hentet: 1. mai 2020. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/immunglobuliner>.
- [30] Xiao S, Wu Y og Liu H. Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: Proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. *Journal of medical virology*, 07.02.2020. Hentet: 02.04.2020. Tilgjengelig fra:
<https://doi.org/10.1002/jmv.25702>.
- [31] fhi. Serologi og hurtigttester. FHI, 23.03.2020. Hentet: 07.05.2020. Tilgjengelig fra:
<https://www.fhi.no/nettpub/coronavirus/helsepersonell/serologi-og-hurtigttester/>.
- [32] Aubert V. Om metoder og teori i sosiologien. I *Det skjulte samfunn*, 1. utgave. Oslo, Norge: Universitetsforlaget; 1985, kapittel 9, side 196.
- [33] Grønmo S. Kvantitativ metode. Store norske leksikon, Sist oppdatert: 16.04.2020. Hentet: 16.05.2020. Tilgjengelig fra:
https://snl.no/kvantitativ_metode.
- [34] Dalland O. Kilder og kildekritikk. I *Metode og oppgaveskriving for studenter*, 5. utgave. Oslo, Norge: Gyldendal Norsk Forlag AS; 2013, kapittel 4, side 269.

- [35] Pfefferle S, Reucher S, Nörz D og Lütgehetmann M. Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2 using a high throughput system. *Euro Surveill*, 04.03.2020. Hentet: 02.04.2020. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000152>.

