**En introduktion till PCR-analyser vid påvisning av**

**SARS-CoV-2 och dess tillförlitlighet**

Apotekarprogrammet, termin 7

Kurs: Farmaceutisk bioteknologi och immunologi

Majed Alkasabali, Chirine Hussein Abdo, Lolo Tedjrasi,

Mariam Husain, Louise Eklund & Agnes Morén

**Introduktion**

SARS-CoV-2 (allvarlig akut respiratoriskt syndrom coronavirus 2) är ett smittsamt coronavirus som orsakar luftvägsinfektioner. Utbrottet av sjukdomen inträffade 2019 i Kina och har sedan dess spridits och drabbat hela världen. Vanliga symptom är feber, hosta samt trötthet (1).

Diagnostiseringen av en pågående SARS-CoV-2-infektion utförs vanligtvis genom att detektera viralt RNA med hjälp av rRT-PCR (realtid omvänd polymeraskedjereaktion).

PCR är en metod som funnits länge och är en av de mest använda inom hälso- och sjukvården när det kommer till att påvisa en infektion som orsakats av exempelvis ett virus (2).

Utöver PCR-tester kan diagnostisering även ske med ett så kallat snabbtest som mäter mängden antigen i provet. På marknaden finns även antikroppstester, men till skillnad från de två förstnämnda kan dessa inte påvisa pågående virussjukdom, utan tas minst sju dagar efter en infektion för att visa om kroppen utvecklat antikroppar och därmed en immunitet (3).

Syftet med detta PM är att beskriva hur viralt RNA spåras med hjälp av PCR-teknik, hur tillförlitlig metoden är, samt hur PCR-tester står sig gentemot antigentester.

**Spårning av viralt RNA med rRT-PCR**

SARS-CoV-2 har ett lipidhölje och är ett positivt enkelsträngat RNA-virus (3). Den mest pålitliga tekniken rRT-PCR är en version av PCR som är utvecklad just för RNA-detektion och ger resultat inom några timmar. Det kan dock inte ge information om viruset är aktivt eller avdödat av immunförsvaret och därmed inte heller visa om personer är smittsamma eller inte (2).

I rRT-PCR kan man samla in data under hela PCR-processen och kombinera amplifikation och detektion i ett enda steg. Tekniken är baserad på två efterföljande reaktioner. Första reaktionen går ut på att omvandla RNA till komplementärt DNA med hjälp av omvänt transkriptionsenzym. Detta utförs eftersom RNA inte går att amplifiera, till skillnad från DNA. I den andra reaktionen amplifieras det komplementära DNA:t med en polymeraskedjereaktion. Polymeraskedjereaktionens första steg är att producera DNA-templat (3).

Provet innehållande DNA värms till cirka 95 grader för att bryta vätebindningarna mellan DNA:s kvävebaser så strängarna skiljs åt. Temperaturen sänks sedan till 50-60°C, så att en genspecifik primer på vardera sträng kan fästa och temperaturen höjs därefter till 72°C (4).

Primern som är fäst på respektive DNA-sträng är en markör och talar om för enzymet Taq-DNA-polymeras var den ska börja DNA-replikationen. Taq-DNA-polymeras börjar sammanfoga korresponderande fria nukleotider med vardera DNA-sträng, vilket resulterar i ett fulländat DNA-segment som är en kopia av det ursprungliga DNA:t. Denna termiska cykel upprepas flera gånger tills ett lämpligt antal DNA-kopior gjorts. Mängden produkt är proportionell mot mängden RNA i provet och detta visualiseras med hjälp av fluorescerande markörer som emitterar ljus om SARS-CoV-2 finns i provet. PCR-maskinen kan detektera fluorescensen med hjälp av en mjukvara som tolkar signaler och visar om testet är positivt eller negativt (5).

**Tillförlitlighet i PCR-tester**

Metodens analytiska specificitet, det vill säga dess förmåga att specifikt påvisa nukleinsyran hos SARS-CoV-2, är hög (3)(6). Likaså är den diagnostiska specificiteten samt sensitiviteten, där båda parametrarna ligger närmare 100% då proverna hanteras av experter. Diagnostisk specificitet definieras som sannolikheten att en sjuk individ klassas som sjuk, medan diagnostisk sensitivitet definieras som sannolikheten att en frisk individ klassas som frisk (6). Falska positiva samt falska negativa svar kommer dock alltid förekomma, men frekvensen minskar med ökad prestanda på metoden (2).

En anledning till metodens höga prestanda är att det görs en direkt mätning av virusets arvsmassa, vilket har gjort PCR till en gyllene standard vid identifiering av SARS-CoV-2 (2)(3). I Sverige pågår det även ett ständigt kvalitetsarbete på laboratorierna som hanterar proverna, där det ställs höga krav på metoderna och testerna som utförs för att kunna bibehålla en hög tillförlitlighet. Detta inkluderar både arbetet inne på laboratorierna, men även all typ av transport av proverna (2).

**Skillnad mellan PCR-test och antigentest**

Det finns en allmän förvirring kring vad skillnaden mellan PCR-test och de självtester som säljs på apotek är. Självtesten är antigentester, vilket innebär att de letar efter proteindelar av viruset och tas, likt PCR-test, ofta i näsan och halsen (7). Fördelen är att svaret kommer snabbare, inom 30 minuter, jämfört med PCR som tar några timmar (2)(7). Dessutom kan de användas när man vill testa många personer, som på en arbetsplats där distansarbete inte är möjligt (7).

Det är viktigt att komma ihåg att antigentesterna är mindre tillförlitliga än PCR-test då de exempelvis kräver högre virusnivåer och mäter indirekt på sekundära biomarkörer (2)(7). Ytterligare en faktor som bidrar till detta är att man inte kan säkerställa att antigentestet genomförs på ett korrekt sätt då de utförs av patienten själv. Risken att testet ger ett falskt negativt eller positivt resultat ökar därmed, vilket i sin tur kan leda till smittspridning respektive onödigt hårda restriktioner (6)(8). Därför anser folkhälsomyndigheten att antigentesterna endast ska användas som ett komplement till PCR (7).

Avslutningsvis skulle det vara fördelaktigt att utveckla en metod som är lika snabb som antigentesterna men med samma, eller högre, tillförlitlighet som PCR.

**Referenser**

1. 1177. covid-19 Uppdaterat: 2021-08-27. Hämtad: 2021-09-01. E-länk: <https://www.1177.se/sjukdomar--besvar/lungor-och-luftvagar/inflammation-och-infektion-ilungor-och-luftror/om-covid-19--coronavirus/covid-19-coronavirus/>
2. Folkhälsomyndigheten. PCR-test visar om du har covid-19. Uppdaterat: 2021-08-11. Hämtad: 2021-09-01. E-länk: <https://www.folkhalsomyndigheten.se/smittskydd-beredskap/utbrott/aktuella-utbrott/covid-19/testning-och-smittsparning/testa-dig-for-covid-19/om-pcr-test/>
3. Filiztekin Elif, Gasia Özkaya Korin, Yuce Meral. 2020. COVID-19 diagnosis- A review of current methods. Elsevier. Volume 172. Hämtad: 2021-09-01. E-länk:

<https://www-ncbi-nlm-nih-gov.ezproxy.its.uu.se/pmc/articles/PMC7584564/#bib34>

# [Shannon L. Emery](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Emery%20SL%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15030703) *et al*. Real-Time Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction Assay for SARS-associated Coronavirus. 2004. Volume 10. Hämtad: 2021-09-01. E-länk: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3322901/>

1. Clevland clinic. COVID-19 and PCR Testing. Uppdaterad: 2021-08-24. Hämtad: 2021-09-01. E-länk: <https://my.clevelandclinic.org/health/diagnostics/21462-covid-19-and-pcr-testing>
2. Läkemedelsverket. Självtester för covid-19. Uppdaterad: 2021-08-02. Hämtad: 2021-09-01. E-länk: <https://www.lakemedelsverket.se/sv/medicinteknik/anvanda/sjalvtester-for-covid-19#hmainbody3>
3. Folkhälsomyndigheten. Antigentest kan visa om du har Covid-19. Uppdaterad: 2021-08-19. Hämtad: 2021-09-01. E-länk:

<https://www.folkhalsomyndigheten.se/smittskydd-beredskap/utbrott/aktuella-utbrott/covid-19/testning-och-smittsparning/testa-dig-for-covid-19/antigentest/>

1. Folkhälsomyndigheten. Användning av PCR för påvisning av pågående covid-19, en teknisk vägledning. Uppdaterat: 2020-09-24. Hämtad: 2021-09-01. E-länk:

<https://www.folkhalsomyndigheten.se/contentassets/b2c3b5f226ac45d0926cf351ea15b0dc/anvandning-pcr-pavisning-pagaende-covid-19.pdf>

**Författarnas insatser**

Introduktion: Lolo och Chirine

Spårning av viralt RNA med rRT-PCR: Majed och Mariam

Tillförlitlighet & jämförelse med antigentester: Louise och Agnes

Samtliga i gruppen bidrog till arbetets helhet.