

10001  
10018

# Bruken av RT-qPCR og LFA i deteksjonen av SARS-CoV-2 - en metodesammenligning

Bacheloroppgave i bioingeniørfag

Veileder: Kine Samset Hoem

Medveileder: Ann-Kristin Tveten

Mai 2021



10001

10018

# **Bruken av RT-qPCR og LFA i deteksjonen av SARS-CoV-2 - en metodesammenligning**

Bacheloroppgave i bioingeniørfag

Veileder: Kine Samset Hoem

Medveileder: Ann-Kristin Tveten

Mai 2021

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Fakultet for naturvitenskap

Institutt for biologiske fag Ålesund



Kunnskap for en bedre verden



## Forord

Denne bacheloroppgaven er skrevet i forbindelse med vår avsluttende utdanning i Bioingeniørfag ved NTNU Ålesund. Oppgaven er skrevet våren 2021. Formålet med oppgaven er å se på ulike analysemetoder for SARS-CoV-2. Oppgaven sitt tema er svært relevant for tiden som kommer og det har blitt tydelig hvor viktig bioingeniørfaget er i en slik pandemi.

Koronavirus-pandemien har bydd på utfordringer, da det var meningen å gjennomføre en praktisk bacheloroppgave. Det var stor usikkerhet rundt mulige restriksjoner i forbindelse med pandemien. Det ble på bakgrunn av dette besluttet å skrive en teoretisk bacheloroppgave.

Vi vil til slutt rette en stor takk til våre veiledere, Kine Samset Hoem og Ann-Kristin Tveten. Begge har vært tilgjengelig og gitt gode råd og veiledning gjennom hele prosessen.

## Sammendrag

I mars 2020 erklærte verdens helseorganisasjon COVID-19 for en pandemi. I desember 2020 ble det registrert på verdensbasis over 100 000 nye smittetilfeller hver dag. Per idag er (den molekylærgenetiske) analysemetoden revers transkriptase kvantitativ polymerase kjedereaksjon (RT-qPCR) gullstandarden for deteksjon av SARS-Cov-2. Likevel har et så stort smittetrykk forårsaket problemer med blant annet tilgang på testreagenser. Dette har skapt et behov for optimalisering av RT-qPCR og bruk av nye deteksjonsanalyser. Flere diagnostiske hurtigtester av typen lateral flow assay (LFA) har nå kommet ut på markedet og blir evaluert fortløpende. Denne oppgaven tar for seg en metodesammenligning mellom RT-qPCR og LFA.

RT-qPCR er en analyse med god nøyaktighet, men har forskjellige ulemper. Lang reise- og analyseringstid og store prøvemengder fører til lang svartid. Dette er på grunn av kravet om store maskiner og spesialkompetanse. For å korte ned på ventetiden og bruk av testreagens har det vist seg at såkalt pooling av prøver kan være en god strategi.

Antigenhurtigtester kan være et godt supplement som deteksjonsanalyse for SARS-CoV-2. Nøyaktigheten til testene varierer stort mellom produsentene, men enkelte produsenter gjør det bra i flere evalueringer. For å utføre testene trengs det lite ekstrautstyr og ingen spesialkompetanse. Testene har en kort svartid, noe som gjør at resultat kan gis fortløpende. Dette kan føre til mindre opphopning av prøver. Likevel kan det se ut til at sykdomsprevalensen i samfunnet har en vesentlig betydning for nøyaktigheten til LFA. Ved lav prevalens blir den positive prediktive verdien veldig lav, noe som ikke er ønskelig etter som at dette innebærer flere falske positive svar. I områder med middels til høy prevalens er derimot den positive prediktive verdien høy.

Vi foreslår, på bakgrunn av hvordan situasjonen er i dag, at det kan være gunstig å benytte seg av begge deteksjonsmetodene. En mulig strategi er å bruke RT-qPCR som standard analysemetode for lavprevalensområder og en kombinasjon av RT-qPCR og antigenhurtigtester i middels- til høyprevalensområder.

## Abstract

In March 2020 the World Health Organization declared COVID-19 a global pandemic. In December 2020 over 100 000 new cases were reported daily globally. Currently the (molecular genetic) analyzing method reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) is the gold standard for detection of SARS-CoV-2. Still, the high infection rate has caused problems with things as access to test reagents. This has caused a need for optimisation of RT-qPCR and the use of new detection analysis. Several rapid diagnostic tests of the type lateral flow assay (LFA) have been commercially released and are being evaluated continually. This present thesis contains a methodical comparison between RT-qPCR and Rapid Lateral Flow Assay (LFA).

RT-qPCR is an analysis with good accuracy, but it also has its downsides. Long travel- and analysis time in combination with large sample quantities has led to a long wait-time. This is caused by the requirement of large machines and special expertise. To cut down on the waiting time and the use of test reagents, has pooling of test samples proven to be a possible good strategy.

Rapid antigen tests seem to be a good supplement as a SARS-CoV-2 detection analysis. The accuracy varies greatly between manufacturers, but some manufacturers have performed well in several evaluations. The tests need little extra equipment and no special expertise, and with a relatively short turnaround time there will be a less significant pile-up of samples. Meanwhile, it does appear that the disease prevalence in the community will affect test accuracy. When the prevalence is low the positive predictive value turns very low, which is not ideal as it causes a lot of false positive results. In areas with medium to high prevalence the positive predictive value is high.

We suggest that, based on how the situation is today, it could be favorable to use both detection-analysis in a combination. A possible strategy is to use RT-qPCR as the standard detection method for SARS-CoV-2 in low prevalence areas and use a combination of both RT-qPCR and rapid antigen test in medium to high prevalence areas.

## Ordliste og forkortelser

ACE2	Angiotensinkonverterende enzym 2
Adsorpsjon	Bindingen av gass eller væske på overflaten til et fast stoff
COVID-19	Sykdom forårsaket av SARS-CoV-2
Ct	Cycle threshold – hvor mange qPCR sykluser som blir fullført før en får et positivt svar
LFA	Lateral Flow Assay
Markør-molekyl	Antistoff-fargemarkør-kompleks f.eks. anti-SARS-CoV-2-gull-kompleks
NPV	Negativ prediktiv verdi
Patogenese	Læren om hvordan en sykdom oppstår og utvikles
Prevalens	Tallet på personer som har en viss sykdom (forekomst)
Probe	Enkeltrådet nukleotidsekvens, normalt mellom 18 – 25 nt, merket med et fluoriserende fargestoff og en radioaktiv forbindelse
Primer	Syntetisk oligonukleotid med en bestemt baserekkefølge på 16 – 28 nt. Primer er startpunktet under DNA eller RNA syntese
PV	Prediktiv verdi.
PPV	Positiv prediktiv verdi
RT-qPCR	Revers transkriptase kvantitativ Polymerase kjedereaksjon
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2
Virulens	En mikroorganismes evne til å fremkalle sykdom



## Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>I</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>II</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Ordliste og forkortelser</b> .....	<b>IV</b>
<b>1. Introduksjon</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Teori</b> .....	<b>3</b>
2.1. SARS-CoV-2 .....	3
2.1.1. Morfologi og virulens .....	3
2.1.2. Patogenese .....	4
2.2. Analysemetoder .....	5
2.2.1. RT-qPCR .....	5
2.2.2. LFA .....	9
2.3. Statistiske forhold .....	11
<b>3. Metode</b> .....	<b>14</b>
<b>4. Resultat</b> .....	<b>15</b>
<b>5. Diskusjon</b> .....	<b>17</b>
<b>6. Konklusjon</b> .....	<b>25</b>
<b>7. Referanser</b> .....	<b>26</b>

## 1. Introduksjon

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) er navnet på viruset som forårsaker koronavirusykdommen COVID-19 (1). Viruset ble først påvist omkring årsskiftet 2019/2020. Sykdomsutbruddet ble først oppdaget i byen Wuhan i Kina (2). Wuhan hadde siden desember 2019 hatt en rekke tilfeller av lungebetennelse med ukjent årsak. Tilfellene hadde kliniske presentasjoner som i stor grad lignet en pneumoni, men det ble likevel bekreftet negativt svar ved testing for ulike kjente virus. Det ble på bakgrunn av dette bekreftet et nytt patogen koronavirus som fikk navnet 2019-novel Coronavirus (3). Den nye virusvarianten som ble identifisert i januar 2020 fikk til slutt navnet SARS-CoV-2 (1, 4).

Viruset har spredt seg raskt over hele kloden og verdens helseorganisasjon (WHO) erklærte COVID-19 for en pandemi den 11.mars 2020. Ved årsskiftet 2020/2021 pågikk pandemien for fullt på verdensbasis, hvor det pr. desember 2020 ble registrert over 100 000 nye smittetilfeller hver dag (2). På grunn av den raske spredningen av viruset er det satt i verk flere ulike tiltak verden over for å prøve å begrense denne. Dette innebærer både små tiltak som f.eks. bedre håndhygiene og større tiltak som sosial distansering, samt sette personer i karantene (2, 5). Sykdomsbildet til viruset er varierende og flertallet av de som er smittet får en asymptomatisk infeksjon eller milde forkjølelsessymptomer. Det er et mindretall av de smittede som opplever et mer alvorlig sykdomsbilde med lungebetennelse, akutt lungesviktsyndrom og død (6). En viktig del av smittebegrensningen er å fastslå hvem som er smittet, for å forsøke å forhindre videreføring av viruset til andre. Spesielt med bakgrunn i asymptomatiske smittebærere og et generelt sykdomsbilde er det nødvendig å utarbeide gode laboratorieundersøkelser som blir essensielle for å stille diagnosen.

Pr. dags dato er revers transkriptase (RT) kvantitativ (q) polymerase kjedereaksjon (PCR) den mest brukte metoden for å detektere SARS-CoV-2. RT-qPCR påviser viralt RNA og er blitt betegnet som gullstandarden for påvisning av viruset (7). Det er stor etterspørsel etter tester og den begrensede tilgangen av testreagenser for hovedsakelig RNA-ekstraksjonssett har gjort at testingen har utviklet seg til en betydelig flaskehals (8). Det har i senere tid kommet flere hurtigtester på markedet som påviser spesifikke proteiner og antigener på overflaten til viruset,

såkalte lateral flow assay (LFA) (9). Etter som den økende etterspørselen for testing trolig vil fortsette er det derfor avgjørende å utvikle og prøve ut nye hurtige måter for å påvise viruset.

Problemstillingen for denne oppgaven er «Bruken av RT-qPCR og LFA i deteksjonen av SARS-CoV-2 – en metodesammenligning». Oppgaven tar sikte på å svare på problemstillingen ved å se på statistiske og praktiske forhold samt drøfte de ulike fordelene og ulempene for deteksjon av viruset med de to metodene, og potensielle løsninger for veien videre.

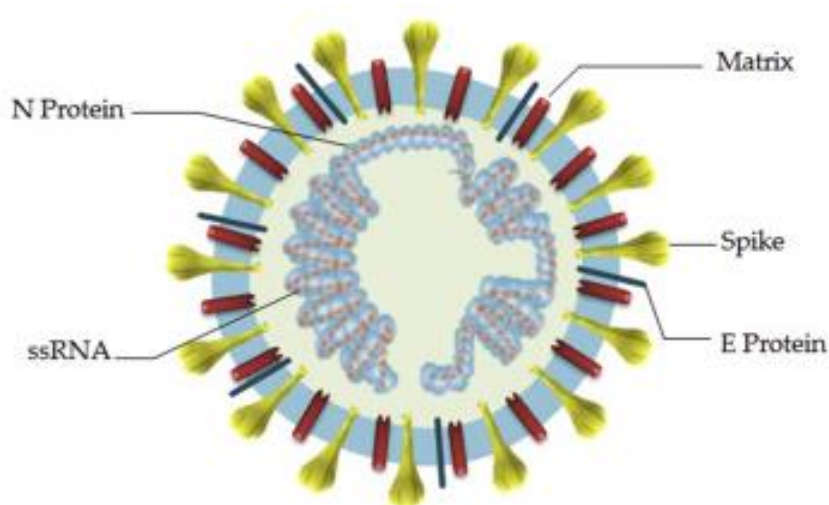
## 2. Teori

### 2.1. SARS-CoV-2

Når en skal utvikle og optimalisere analysemetoder for deteksjon av SARS-CoV-2 er det nødvendig med kunnskap om virusets oppbygning og funksjon. Forskjellige deteksjonsmetoder detekterer ulike komponenter av viruset. RT-qPCR detekterer viralt RNA, altså «oppskriften» til ulike strukturer i viruset. Det kreves dermed kunnskap om selve arvestoffet til viruset for at en skal kunne utarbeide analysemetoden. Antigenhurtigtester detekterer på den andre siden antigen. Det kreves da kunnskap om overflateproteiner (10, 11). Det er derfor hensiktsmessig med en beskrivelse av virusets arvestoff og overflateproteiner for å kunne skildre de aktuelle analysemetodene i detalj.

#### 2.1.1. Morfologi og virulens

SARS-CoV-2 (figur 1) er et omsluttet, ikke-segmentert enkeltrådet RNA virus. Viruset har en diameter som er omtrent 65-125nm og har kornlignende pigger på den ytre overflaten (4). SARS-CoV-2 tilhører familien Coronaviridae. Coronaviridae familien deles inn i ulike slekter som alfa-, beta-, delta- og gamma-koronavirus, hvor SARS-CoV-2 tilhører gruppen betakoronavirus (12). Virusets arvestoff har en lengde på 29,9 kb og har fire hovedstrukturproteiner (se figur 1), samt andre tilleggsproteiner. Hovedstrukturproteinene inkluderer pigg/spike (S) glykoprotein, liten konvolutt (E) glykoprotein, membran/matrix (M) glykoprotein og nukleokapsid (N) protein (4).



Figur 1: SARS-CoV-2 med hovedstrukturer (4).

S-glykoproteinet er et transmembranprotein og befinner seg i den ytre delen av viruset. S-proteinet danner homotrimere som stikker ut av virusoverflaten og vil øke bindingsevnen mellom viruset og vertscellene (4). Proteinet kan spaltes i to forskjellige underenheter, S1 og S2. S1 bestemmer over vertsvirusområdet og cellulær tropisme med reseptorbindende domene (RBD). Det reseptorbindende domenet på S1 vil binde seg med angiotensinkonverterende enzym 2 (ACE2) som er uttrykt i membranen til vertscellene som befinner seg i de nedre luftveiene. S2 har ansvaret for å formidle fusjon av viruscellemembranen (4, 12).

N-proteinet, også kjent som nukleokapsidet er den strukturelle komponenten i viruset. Nukleokapsidet befinner seg i det endoplasmatiske retikulum-golgi-området og er bundet til RNA-et i viruset. Proteinet er sterkt fosforylert og det kan tenke seg at proteinet fører til strukturelle endringer som forbedrer affiniteten for viralt RNA. På grunn av nukleokapsidets binding til RNA er proteinet involvert i prosesser relatert til virusgenomet, virusreplikasjonssyklusen og den cellulære responsen fra vertsceller til virusinfeksjoner (4).

M-proteinet (membranen) til viruset har en viktig rolle ved å bestemme formen på viruskonvoluttene. Proteinet kan binde seg til alle strukturelle proteiner og bindingen hjelper til med å fremme fullføringen av viral montering ved å stabilisere N-protein-RNA komplekset. E-proteinet (konvoluttene) er det minste proteinet i strukturen av SARS-CoV-2. Konvoluttene hjelper til ved produksjonen og ved modningen av viruset (4).

En viktig egenskap hos arvestoffet til SARS-CoV-2 er open reading frame (ORF). En ORF er et stort område på genomet som kan kode for mange forskjellige proteiner (13). Genet ORF1ab koder for flere forskjellige proteiner som har noe å si for bl.a. virusreplikasjon og virulens (14).

### 2.1.2. Patogenese

SARS-CoV-2 smitter ved nærkontakt, hvor kontakt-, dråpe- og luftsmitte er hovedmåtene viruset overføres mellom personer. Viruset har en inkubasjonstid på rundt 4-5 dager, men det har vist seg at dette kan variere fra null til 14 dager (1). Viruset infiserer ved å binde seg til ACE2, som fungerer som reseptorer på vertscellen, og bruker denne bindingen som passasje inn i cellene. ACE2 er svært uttrykt i de nedre luftveier slik som type II alveolære celler (AT2). Slike reseptorer er også svært uttrykt i lungene, øvre spiserør og epitelceller som ligger lagvis. Celler som absorberende enterocytter fra tarm, samt hjerteinfarktceller, nyre-tubuli-celler, m.m.

har også slike mottakere. På grunn av at mottakerne befinner seg i ulike typer celler kan pasienter som er smittet med viruset ikke bare oppleve luftveisproblemer, men også andre lidelser i hjerte, nyrer og fordøyelseskanal (4).

COVID-19 kan altså ofte føre til luftveisinfeksjon og kan gi både milde og mer alvorlige symptomer. De mest vanlige symptomene er sår hals og hoste, samt hodepine, feber og muskelsmerter. Andre vanlige symptomer er nedsatt smak- og luktesans, tung-pust og brystmerter. Enkelte bærere av viruset kan være asymptomatiske, mens andre opplever et svært alvorlig sykdomsbilde som kan ende med døden.

## 2.2. Analysemetoder

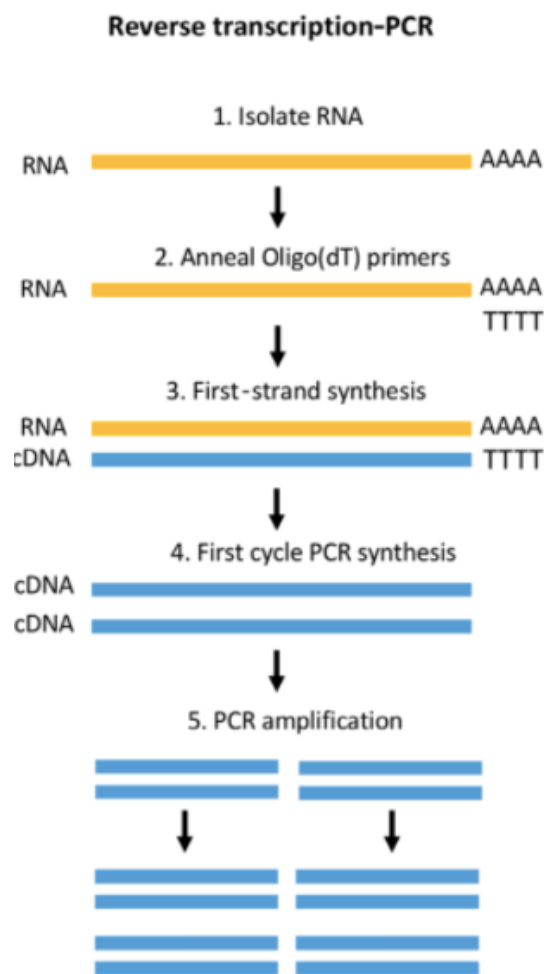
Som beskrevet har COVID-19 et generelt sykdomsbilde og sykdomsforløpet kan variere i ulik grad. Dette gjør det vanskelig å diagnostisere personer basert på symptomer alene. Samtidig er det viktig med nøyaktig og tidlig påvisning hos smittede. Det er derfor essensielt med gode analysemetoder for deteksjon av virusets tilstedeværelse.

### 2.2.1. RT-qPCR

RT-qPCR anses pr. dags dato som gullstandarden når det kommer til testing for SARS-CoV-2 (10). RT-qPCR er en metode som er satt sammen av ulike trinn. Revers transkriptase (RT) delen vil omdanne RNA til cDNA. cDNA-molekylet vil så gå videre til kvantitativ PCR (qPCR) for amplifisering og til slutt deteksjon av eventuell tilstedeværelse av virus-nukleinsyrer (15).

Ved bruk av RT-qPCR metode trenger en ulike komponenter. Den viktigste komponenten er prøvematerialet og det er nettopp i prøvetakningstrinnet de viktigste pre-analytiske feilkildene oppstår (10). På grunn av dette er det anbefalinger og retningslinjer på hvordan prøvematerialet skal bli samlet. Prøven kan høstes fra ulike lokalisasjoner ved hjelp av en vattpinne (swab) (10, 16). De vanligste prøvetakingslokalisasjonene ved testing for COVID-19 er i øvre luftveier (nasopharynx) og svelg (16). Når prøvetakningen er over, blir vattpinnen overført til et transportmedium. Dette innebærer et rør med 2-3ml viralt transportmedium som skal opprettholde levedyktigheten til eventuelle virus i prøven (10).

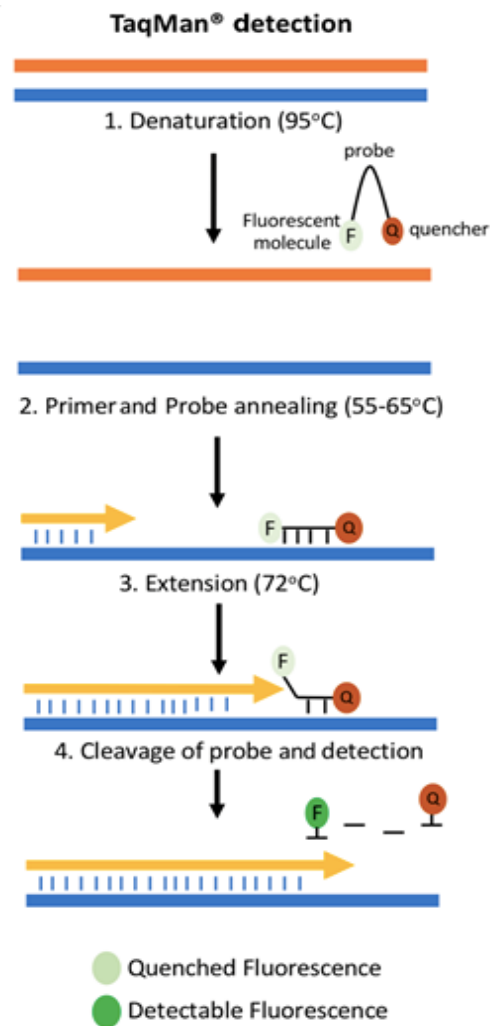
Når laboratoriet mottar en prøve som skal detektere virus ved hjelp av RT-qPCR må cellene først gjennom en RNA-ekstraksjon. Dette er en prosess som gjør prøvematerialet tilgjengelig i form av RNA (15). Etter ekstraksjonsprosessen benyttes enzymet revers transkriptase (RT), en type polymerase, for å omgjøre RNA til et enkelttrådet komplementært molekyl kalt cDNA (se figur 2). Når cDNA-et er syntetisert vil det være festet sammen med det opprinnelige RNA-molekylet (10). RNA-molekylet blir deretter fjernet slik en får en fri cDNA-tråd. Dette skjer ved hjelp av Ribonuclease H (10). DNA-polymeraser kan så til slutt syntetisere et dobbeltrådet cDNA-molekyl (15).



*Figur 2: Revers transkripsjon – 1: RNA isoleres, 2:Primer hybridiseres, 3: Enkeltrådet cDNA syntetiseres vha. revers transkriptase, 4: dobbeltrådet cDNA syntetiseres vha. DNA-polymeraser, 5: Videre PCR amplifisering (15).*

Polymerasene kan kun feste seg på enkelttrådet RNA/DNA ved hjelp av primere (17). Primere er korte DNA-sekvenser på 16-28 nukleotider, også kalt oligonukleotider. Disse utgjør startpunktet som polymerasen er avhengig av for å kunne legge til nye nukleotider til tråden, såkalt polymerisering. En kan velge ulike primere ut ifra hvilken metode en bruker, og hvilke(t) områder på genomet en har lyst til å amplifisere (18). Bindingen dannes ved optimal temperatur på rundt 5 grader under smeltepunktet til den valgte primer (10).

Etter fullført cDNA-syntese går analysen videre til kvantitativ PCR (qPCR). qPCR tillater deteksjon i sanntid med eksponentiell amplifikasjon av DNA-sekvenser (19). qPCR-reaksjonen skjer gjennom et bestemt antall sykluser, normalt rundt 40, som hver består av ulike temperaturtrinn (17). De ulike trinnene er beskrevet i figur 3.



*Figur 3: qPCR og deteksjon ved bruk av TaqMan-kjemi - 1: Denaturering. Prøven varmes opp til 95°C og det dobbeltrådede cDNA-molekylet åpnes opp og separeres til to enkelttråder.*



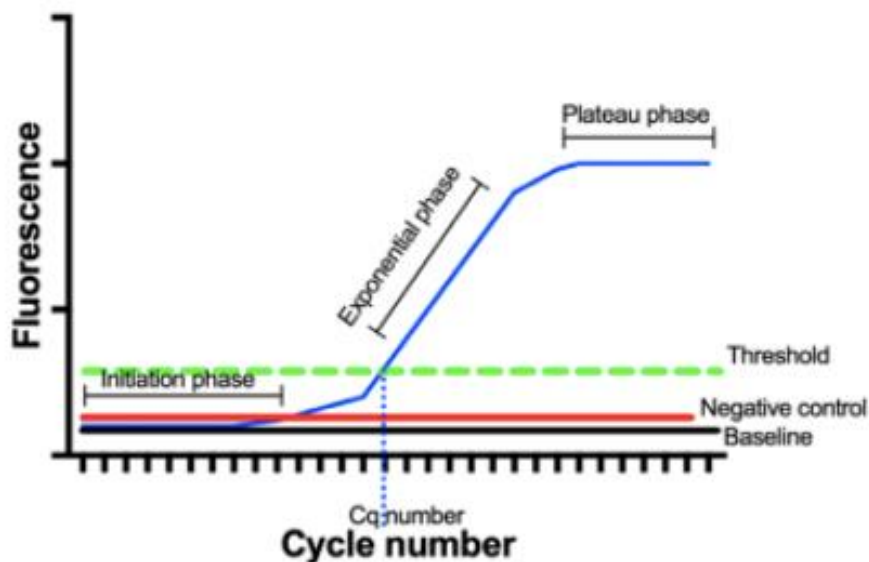
2: Hybridisering. Reaksjonen senkes til ca. 60°C og primerne kan feste seg til deres respektive områder. 3: Syntetisering/polymerisering. Skjer ved en temperatur på rundt 70-72°C, optimalt for varmemestabil DNA-polymerase. Polymerasen forlenger DNA-tråden med utgangspunkt i primeren. 4: Kløyving av probe ved fjerning av quencher (Q) og deteksjon av fluorescens (F) (15, 17, 19).

Etter hver endt syklus skjer det en deteksjon av PCR-produktet. Deteksjonen av fluorescens blir overvåket av en fluorescensdetektor. På denne måten kan en følge med på amplifiseringen samtidig som prosessen foregår. Etter som at antall DNA-molekyl dobler seg for hver syklus, kan en ved bruk av qPCR regne seg tilbake til hvor mye/lite DNA (omgjort fra viralt RNA) som en startet med i utgangspunktet (20). Deteksjonen kan skje ved bruk av ulike kjemiske systemer, som alle baserer seg på fluorescerende fargestoffer. De to mest vanlige deteksjonsmetodene er TaqMan og SYBR Green. SYBR Green vil binde seg uspesifikk til dobbeltrådet DNA, mens TaqMan bruker sekvensspesifikke prober til å binde seg til helt bestemte områder. Dette gjør TaqMan til et relativt mye dyrere system enn SYBR Green. SYBR Green er det vanligste fargestoffet og vil avgi fluorescerende signal ved interkalering med nysyntetisert DNA. Mengden av fluorescens som blir oppdaget øker dermed med mengden DNA som genereres i qPCR-reaksjonen (15). I denne oppgaven vil vi fokusere på bruk av TaqMan metoden, da det er denne som er mest beskrevet i artiklene brukt til å besvare problemstillingen.

TaqMan-prober består av et fluorescerende reporterfargestoff (F) i den ene enden (5'-enden) og et quencher-fargestoff (Q) i den andre enden (3'-enden) (se figur 3) (20). Quencher-fargestoffet sin oppgave er å forhindre fluorescerende utslipp i nærheten av reporteren (15). På grunn av dette er det ikke mulig å måle fluorescensemisjonen når reporter og quencher er nær hverandre. Reporter og quencher forskyves og separeres ved hjelp av Taq DNA-polymerasen under forlengelsen av primerne. Etter separeringen vil dermed ikke reporterfargestoffet være undertrykket av quencher-fargestoffet og fluorescensemisjonen sendt ut av reporteren kan detekteres (20).

Etter endt qPCR-kjøring blir fluorescens-deteksjonen presentert som en graf hvor x-aksen er tid og y-aksen er mengde fluorescens (se figur 4). Denne kurven danner grunnlaget for

kvantifisering av viralt RNA. Når en skal fastslå om en prøve er negativ eller positiv ser en på punktet hvor kurven krysser terskelnivået (grønn linje i figur 4) (15). Prøven vil bli registrert med en cycle-threshold-verdi (Ct-verdi, Cq i figur 4), som er antall sykluser som kreves før det fluorescerende signalet i prøven overstiger denne terskellinjen. Ct-verdien er omvendt proporsjonal med mengden nukleinsyre i prøven. Dette betyr jo lavere Ct-nivå, jo større mengde nukleinsyre, og dermed virus, befinner seg i prøven (21). Studier viser til at RT-qPCR resultater for positive SARS-CoV-2-prøver bør ha en Ct-verdi på mindre enn 40. Prøver som har Ct-verdier over 40 bør dermed betraktes som negativt resultat. Dersom prøven har en Ct-verdi på 37-40 bør prøven kjøres på nytt (10).

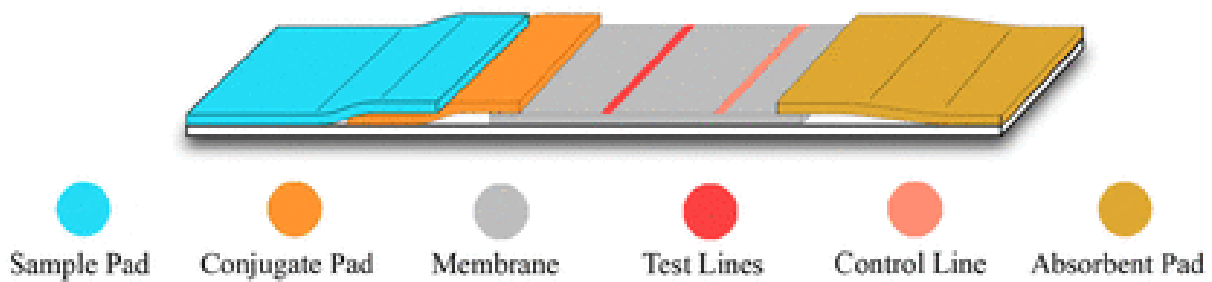


*Figur 4: Deteksjon av fluorescens: Fluorecensnivået er lavt når amplifikasjonen starter og brukes dermed i dannelsen av grunnlinjenivået (base-line/svart linje) for fluorescensen. Reaksjonen utvikler seg til den eksponentielle veksten hvor fluorescensen har dannet et terskelnivå (threshold/grønn linje) som er betydelig høyere enn grunnlinjen (15).*

### 2.2.2. LFA

Det finnes mange forskjellige måter å sette opp en antigenhurtigtest, og mange forskjellige deteksjonsmetoder. I denne oppgaven har vi valgt å fokusere på lateral flow assay (LFA) med visuell avlesning som er den typen antigenhurtigtest som blir brukt i Norge i dag (22).

En LFA består hovedsakelig av fire forskjellige komponenter satt sammen til en strips, ekskludert dekselet rundt (se figur 5). Prøvemateriale-puten (Sample pad) er «starten» av testen. Puten er som regel laget av glassfiber, cellulose eller en blanding av materialene. Oppgaven til puten er å transportere prøvematerialet til resten av komponentene i stripsen ved hjelp av kapillærkrefter. Prøvematerialet blir transportert på en jevn, sammenhengende og homogen måte. Konjugat-puten (conjugate pad) er ofte satt sammen av cellulose, glassfiber eller polyester. Puten inneholder adsorberte markør-molekyl som lett løsner når prøvematerialet flyter over feltet. Membranen (membrane) består ofte av nitrocellulose og er en vesentlig faktor for sensitiviteten til testen. Det eksisterer mange forskjellige grader av membranen som gir et stort utvalg av porestørrelser å velge mellom slik at en enklere kan optimalisere for analytten. På membranen er det laget to linjer, en testlinje (T) og en kontrollinje (C). Dette blir gjort ved å legge ned prober (f.eks. antigen eller antistoff) som fester seg til det avgrensede området på membranen. Testlinjen er dekket med monoklonale anti-SARS-CoV-2 antistoff. Kontrollinjen er dekket med et annet antistoff, i dette eksempelet monoklonalt anti-kylling IgY. I konjugatputen ligger det to forskjellige kompleks - monoklonale anti-SARS-CoV-2 antistoff og kylling IgY som er koblet sammen med hvert sitt fargemolekyl f.eks. gull. Absorpsjonsputen (absorbent pad) er «slutten» av prøven. Denne puten er laget av et absorberende materiale som skal absorbere det overflødig materialet som ikke fester seg på hverken T eller C linjen. Putens absorpsjonsevne forhindrer tilbakestrømming av prøvemateriale i tillegg til å hjelpe med å opprettholde en jevn flyt gjennom stripsen (22).

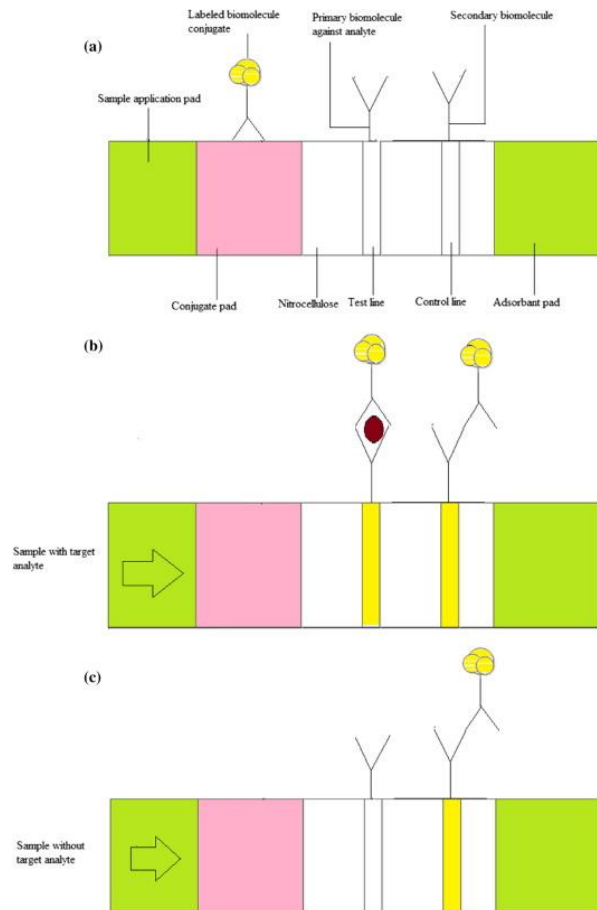


Figur 5: Skjematisk visning av oppbygning til en LFA (23).

En LFA-test foregår altså over flere trinn (se figur 6). De ulike trinnene er:

1. Prøvematerialet blir tilsatt prøvematerialputen.
2. Kapillæreffekt drar prøvematerialet gjennom konjugatputen, hvor potensielle SARS-CoV-2 antigen danner komplekser med konjugatet.

3. Kompleksene reise oppover membranen fram til linjene T og C hvor de vil danne nye kompleks.
4. Etter at kompleksene har festet seg på T og C linjen vil konsentrasjonen av fargepartikler gjøre linjene synlige og konsentrasjonen av antigen bestemmer hvor synlig testlinjen blir (24, 25).



Figur 6: LFA eksempel (a) overblikk over alle komponentene i prøvestrips, (b) positivt utslag på prøve, (c) negativt utslag på prøve (22).

### 2.3. Statistiske forhold

For å vurdere hvor god en analyse er kan en blant annet se på statistiske forhold som, spesifisitet, sensitivitet, positiv prediktiv verdi og negativ prediktiv verdi. Det foreligger ulike formler for å vise utregning av de ulike parameterne. Det blir ikke gjort noen utregninger i oppgaven. Formlene vil kun gi en forståelse for hva som kan påvirke de ulike parameterne.

Spesifisitet og sensitivitet forteller hvor nøyaktig testen er til å finne negative og positive prøver (26). Det er ønskelig med både spesifisitet og sensitivitet nærmest mulig 100%. Ofte vil optimalisering for økt sensitivitet senke spesifisiteten til en analyse og omvendt. En måte å optimalisere på er ved å justere deteksjonsgrensen til analysen f.eks. ved å øke eller senke Ct-verdien til RT-qPCR (27).

Sannsynligheten for at en frisk person tester negativt kaller en spesifisitet. Spesifisitet kan beregnes ved bruk av formelen (1):

$$\text{spesifisitet} = \frac{\text{sann negativ}}{\text{sann negativ} + \text{falsk positiv}} \quad (1)$$

Sannsynligheten for at en syk person tester positivt kaller en sensitivitet. Sensitiviteten kan beregnes ved bruk av formelen (2):

$$\text{sensitivitet} = \frac{\text{sann positiv}}{\text{sann positiv} + \text{falsk negativ}} \quad (2)$$

Den prediktive verdien (PV) er satt sammen av spesifisitet, sensitivitet og prevalens. Prevalens er forekomsten av en sykdom i befolkningen. I motsetning til nøyaktighet som er uavhengig av prevalens, er PV sterkt avhengig av dette (27, 28).

Sannsynligheten for at en positiv test tilhører en syk person kaller en positiv prediktiv verdi (PPV). For å finne PPV kan en bruke formel (3):

$$\text{Positiv prediktiv verdi} = \frac{\text{Sensitivitet} \times \text{Prevalens}}{\text{Sensitivitet} \times \text{Prevalens} + (1 - \text{Spesifisitet}) \times (1 - \text{Prevalens})} \quad (3)$$

Sannsynligheten for at en negativ test tilhører en frisk person kaller en negativ prediktiv verdi (NPV). For å finne NPV kan en bruke formel (4):

$$\text{Negativ prediktiv verdi} = \frac{\text{Spesifisitet} \times (1 - \text{Prevalens})}{(1 - \text{Sensitivitet}) \times \text{Prevalens} + \text{Spesifisitet} \times (1 - \text{Prevalens})} \quad (4)$$

En idèell deteksjonsanalyse vil score 100% på alle parameter, men dette er i praksis urealistisk. Det er viktig å vurdere hva som er viktigst for analysen etter som at økning av en parameter kan gå på bekostning av en annen. Hvordan analysen blir brukt vil bestemme hvilken parameter en bør prioritere (26-28). En screeningtest prioriterer hovedsakelig høy sensitivitet slik at en skal klare å detektere flest mulige positive prøver. Dette kan føre til at en vil oppdage så godt som alle syke. Selv om de fleste syke vil bli oppdaget fører dette også til at en god del friske personer vil kunne teste positivt, såkalt falske positive. Denne formen for testing er ment for asymptotiske grupper der det er liten mistanke om smitte. På den andre siden vil en diagnostisk test prioritere høy spesifisitet, slik at en kan utelukke sykdommen hos flest mulige personer. Denne formen for testing er ment for symptomatiske personer eller personer hvor det av ulike årsaker er større grunn til å mistenke smitte (29, 30).

### 3. Metode

Artikkelen er basert på litteratursøk ved bruk av ulike søkemotorer. Google scholar ble brukt som hoved-søkemotor. I tillegg ble Oria og Proquest brukt i forbindelse med å undersøke troverdigheten til de ulike artiklene. Det ble søkt etter artikler i perioden 25. mars til 23.april. Søket ble avgrenset på bakgrunn av språk, hvor alle søkeord var på engelsk. Andre kriterier for søket var at artiklene ikke skulle være eldre enn ett år gammel og at de er fagfelleurdert. Det ble brukt ulike kombinasjoner av søkeordene “SARS-CoV-2”, “RT-qPCR”, “PCR methodology”, “Pooling”, “Rapid antigen test” og “Rapid lateral flow assay”. Enkelte kombinasjoner ga svært mange treff; eksempelvis ga sammensettingen “SARS-CoV-2” og “RT-qPCR” et søkeresultat på rundt 3200 artikler. På bakgrunn av dette ble det besluttet å kun ta utgangspunkt i de første 20 treffene som kom opp for hver enkelt kombinasjon, når et hovedpanel av artikler skulle selekteres ut (tabell 1).

Artikler ble valgt utfra hvor aktuelle de var for problemstillingen. Troverdigheten til artiklene ble som beskrevet også et viktig kriterium for valg av artikler. Fagfellevurdering ble bekreftet ved hjelp av Oria, Proquest og ved undersøkelse av tidsskriftene som artiklene er publisert i. Åtte av ni artikler ble funnet å være fagfelleurdert og publisert i et fagfelleurdert tidsskrift. Det ble imidlertid også valgt å inkludere en ikke-fagfelleurdert artikkel. Denne hadde likevel troverdige kilder, samt at metode og resultat var i samsvar med andre evalueringer av antigenhurtigtester. Det ble derfor besluttet at denne artikkelen er troverdig og bidrar med å svare på problemstillingen.

## 4. Resultat

Ni artikler ble selektert ut som grunnlag for å besvare problemstillingen. Blant disse beskriver tre artikler påvisning av virus ved bruk av RT-qPCR og seks artikler omhandler antigenhurtigtest LFA vs. RT-qPCR. Alle artiklene er hentet fra året 2020-2021.

Tabell 1: Oversikt over valgte artikler. Ikke-fagfelleverdert artikkel er merket med (\*)

<b>Tittel</b>	<b>Forfatter og referanse</b>	<b>Relevans</b>	<b>Publiseringssted</b>
<b>rRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical considerations</b>	Rahbari, Rezgar, et al. [10]	Evaluering av RT-qPCR – feilkilder og optimalisering	Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry
<b>Pooling of samples for testing for SARS-CoV-2 in asymptomatic people</b>	Lohse, Stefan, et al. [33]	Evaluering av pools på størrelse 4-30 prøver for RT-qPCR	The Lancet Infectious Diseases
<b>Evaluation of COVID-19 RT-qPCR Test in Multi sample Pools</b>	Yelin, Idan, et al. [34]	Evaluering av pools på størrelse 2-64 prøver for RT-qPCR	Clinical Infectious Diseases
<b>Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand</b>	Chaimayo, Chutikarn, et al. [7]	Evaluering av Standard Q antigenhurtigtest	Virology Journal
<b>Evaluation of three rapid lateral flow antigen detection tests for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection</b>	Jääskeläinen, A.E, et al. [39]	Evaluering av blant annet Standard Q og Panbio antigenhurtigtest	Journal of Clinical Virology



<b>Field evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device) for COVID-19 diagnosis in primary healthcare centres</b>	Albert, Eliseo, et al. [32]	Evaluering av Panbio antigenhurtigtest i primærhelsetjenesten	Clinical Microbiology and Infection
<b>Diagnostic performance of a SARS-CoV-2 rapid antigen test in a large, Norwegian cohort</b>	Landaas, Elisabeth, et al. [37]	Evaluering av Panbio antigenhurtigtest	Journal of Clinical Virology
<b>“Comparison of Rapid Antigen Tests for COVID-19</b>	Yamayoshi, Seiya, et al. [40]	Evaluering av blant annet Standard Q antigenhurtigtest	Viruses
<b>Evaluation of the accuracy, ease of use and limit of detection of novel, rapid, antigen-detecting point-of-care diagnostics for SARS-CoV-2*</b>	Krüger, L.J, et al. [38]	Evaluering av Standard Q antigenhurtigtest	medRxiv

## 5. Diskusjon

Den pågående COVID-19-pandemien innebærer stor etterspørsel etter gode og effektive analysemetoder, både med tanke på diagnostisering og begrensning av smittespredning. I denne teoretiske oppgaven ønsker vi å svare på følgende problemstilling: «Bruken av RT-qPCR og LFA i deteksjonen av SARS-CoV-2 – en metode sammenligning». RT-qPCR påviser tilstedeværelse av det genetiske materialet til SARS-CoV-2-viruset, mens LFA påviser antigener. RT-qPCR og hurtigtesten LFA har begge ulike fordeler og ulemper. For å svare på problemstillingen har vi benyttet litteratursøk til å innhente relevant informasjon. Det har blitt utført spesifikke søk ved bruk av ulike søkeord i kombinasjon med begrensninger som språk og publisering i løpet av det siste året. Slike begrensninger vil påvirke utfallet av søket. Det er derfor mulig at de ulike begrensningene som ble satt har hindret enkelte artikler i å komme med under søket. Vi mener imidlertid likevel at artiklene som ble valgt gir et godt grunnlag for diskusjon av problemstillingen. Panelet av artikler omhandler påvisning av viruset for både RT-qPCR og LFA. Både forskere og samfunnet ellers har hatt stort behov for økt kunnskap om SARS-CoV-2. Dette har ført til hyppig publisering av artikler om viruset. Nettopp dette har gjort det enkelt å finne artikler rundt det ønskede tema, men det har imidlertid gjort at en må se på artiklene med noe mer kritiske øyne. Dette fordi at ved hyppig publisering kan en risikere at resultat blir publisert for tidlig, noe som ved senere forskning kan vise seg å være feil (31).

Ved analysering for SARS-CoV-2 er det viktig med høy nøyaktighet og prediktiv verdi for å minimalisere mengden falske positive og negative svar. RT-qPCR har generelt en moderat sensitivitet og høy spesifisitet. Dette er noe en kan optimalisere ved hjelp av forskjellige tiltak. Ett av tiltakene er valg av primere. Primere for N-proteinet er rapportert å ha en sensitivitet på 96,6% og spesifisitet på 100% og primere for ORF1ab har en sensitivitet på 95,7% og en spesifisitet på 88,9% (10). Det er også vanlig å analysere med flere forskjellige primere samtidig, f.eks. N-, S-, og ORF1ab-primer (32).

Andre aspekter ved RT-qPCR blir også forsøkt optimalisert. En potensiell måte å optimalisere effektiviteten på er ved hjelp av pooling. Pooling vil si at en blander sammen flere pasientprøver for så å analysere de som en prøve. På grunn av at en RT-qPCR analyse tar flere timer, kan dette være en måte å effektivisere analyseringen på. Dersom alle prøvene i pooling er negative betyr det at en har spart inn x-antall reagenser og en får muligheten til å analysere flere

prøver pr. dag. Det har blitt evaluert RT-qPCR analyser med pools på størrelse fra 2-64 pasientprøver. Med en cut-off grense på 40 sykluser ble det oppnådd en sensitivitet på 96% for en pool på 16 prøver. Etter hvert som poolen blir større og prøven mer fortynnet, tar det lengre tid før RNA-amplifikasjonen når terskelverdien Ct. Det ble observert en lineær korrelasjon mellom dobling av størrelsen på poolen og når reaksjonen nådde terskelverdien. For hver gang poolen doblet i størrelse økte Ct-verdien for terskelverdien med 1,24. Med bakgrunn i litteraturen kan det virke som at standard cut-off verdi for SARS-CoV-2 deteksjonsanalyser gjerne er på 40 sykluser (10). Dette betyr at en prøve som når over terskelverdien etter syklus nr. 40 vil bli ansett som negativ. En risiko med pooling blir dermed at det blir såpass lite viralt RNA i en stor pool at Ct-verdien overstiger 40 for prøven, og blir derfor ansett som negativ. Dette kan dermed feiltolkes og føre til falske negative prøver, noe som tyder på at det kan være hensiktsmessig å øke cut-off grensen ved bruk av større pools (33, 34).

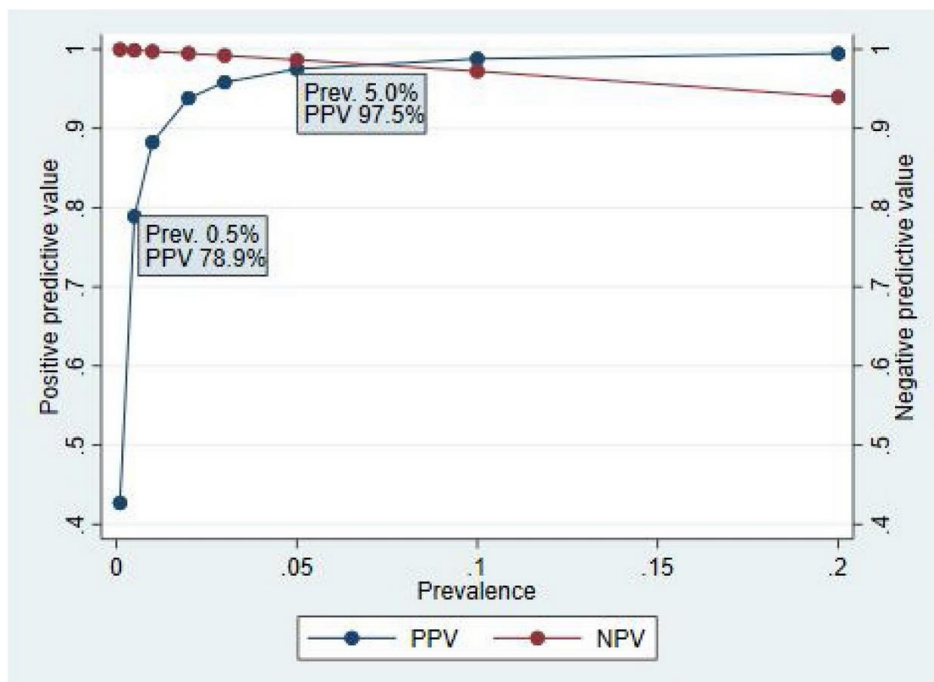
Sykdomsprevalensen i befolkningen er en annen viktig faktor med hensyn til pooling, og den kan ha stor innvirkning på hvilken strategi en bør velge når det kommer til deteksjon av SARS-CoV-2. Ved svært høy prevalens kan det være lurt å unngå pooling for RT-qPCR ettersom det da vil være stor sannsynlighet for å finne en positiv prøve. Ved funn av en positiv pool må alle pasientprøvene i poolen bli reanalysert individuelt. Dette er ikke gunstig ettersom at en da vil ende opp med å bruke ekstra tid og testreagens (33, 34).

Som beskrevet i kapittel 2.3 vil graden av nøyaktighet til en analyse variere ut ifra både hvor høy spesifisitet og sensitivitet er (35). RT-qPCR har en relativt høy nøyaktighet som antigenhurtigtester gjerne blir målt opp mot. WHO har satt minimumskrav til hvor gode antigenestene skal være for å bli godkjent til bruk. Kravene er  $\geq 80\%$  i sensitivitet og  $\geq 97\%$  i spesifisitet i forhold til PCR (36). De ulike LFA-produzentene oppgir nøyaktigheten til analysene de lager, men det kan være en stor forskjell mellom produsentens oppgitte nøyaktighet og den kliniske nøyaktigheten. Dette er fordi produsentene ofte bruker klart positive (høy virusmengde) og negative (uten virus) prøver i et rolig miljø, noe som ikke nødvendigvis gjenspeiler klinisk bruk. Personer som tester seg er enten friske eller syke, hvor flestparten vil være friske. De syke vil enten være asymptomatiske eller symptomatiske. Hvor lenge de har hatt symptomer før testing vil variere, og mengden virus i luftveiene vil også variere stort gjennom sykdomsforløpet (37). Likevel, mange forskjellige antigenhurtigtester har blitt og fortsetter å bli evaluert for klinisk bruk. Det er blitt rapportert en sensitivitet på alt i fra

50% opp til 98%, noe som viser hvor viktig det er å grundig evaluere potensielle tester før en tar de i bruk for fullt (7, 38). To antigenhurtigtester som ser ut til å prestere godt er Standard™ Q COVID-19 Ag kit (SD Biosensor®) og Panbio™ COVID-19 Ag rapid test device (abbott®)(7, 38-40).

Fremgangsmåten for å evaluere de to ulike metodene varierer. Noen av artiklene (i tabell 1) bruker nedfrosset prøvemateriale med kjent resultat som har blitt analysert med RT-qPCR tidligere, mens andre bruker ferske prøver med ukjent resultat. Når en bruker ferskt prøvemateriale blir det tatt én prøve for RT-qPCR og én for antigenhurtigtest. Ferske prøver reflekterer bedre hvordan det foregår under klinisk bruk, men om det har noe å si for evalueringen om prøvene har blitt nedfrosset på forhånd er usikkert (32, 39). Noen tester også ut prøvemateriale fra ulike opphavskilder. Visse typer prøvemateriale slik som spytt, gurgle skylning og sputum m.m. ser ikke ut til å gjøre det så bra (40). Produsentene Abbott og SD Biosensor oppgir begge at prøvematerialet skal være en nasopharynx-swab (24, 25). Enkelte bruker hals- og nasopharynx-swab til prøvemateriale og får en høy nøyaktighet (37, 38), mens andre bruker kun nasopharynx-swab og oppnår også en høy nøyaktighet.

Når det kommer til bestemmelse for å skalere opp bruken av antigenhurtigtester i samfunnet har den prediktive verdien mye å si. I en evaluering av Panbio™ COVID-19 Ag rapid test device var nøyaktigheten høy. Med en prevalens på 6,3% ga dette en PPV på 98,4% og en NPV på 98,3%. Dette betyr at det er stor sannsynlighet for at en positiv test tilhører en smittet person og at en negativ test tilhører en frisk person, som jo er den ønskede situasjonen. For å illustrere betydningen av prevalensen med hensyn til PPV og NPV ble det fremstilt en graf (se figur 7) (37, 38).



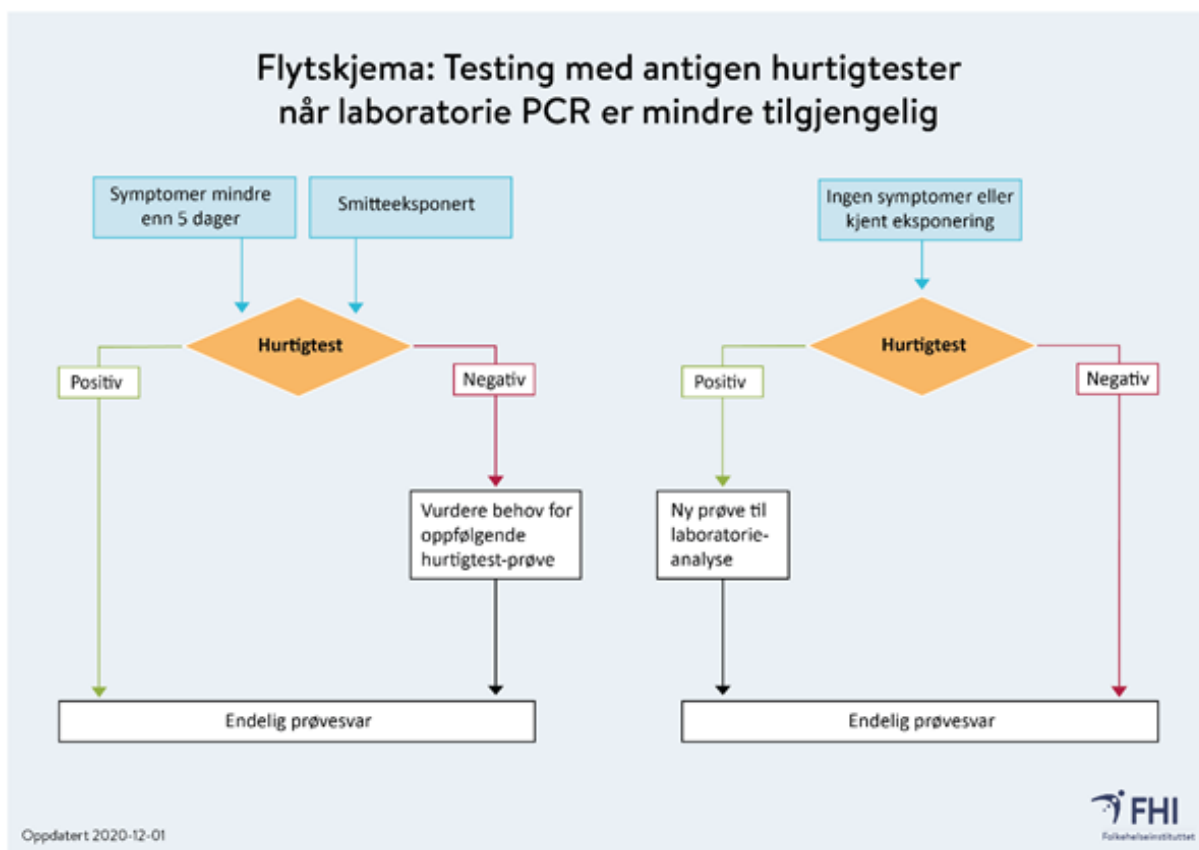
Figur 7: graf over PPV og NPV ved forskjellig prevalens med en sensitivitet på 74,4% og spesifisitet på 99,9% (37).

Grafen viser at når prevalensen havner under 1% så vil PPV gå raskt ned i verdi. Ved en prevalens på 0,5% er PPV bare 78,9%. I en evaluering av STANDARD™ Q Ag kit var også nøyaktigheten høy. Ved en prevalens på 10% vil PPV være 92% i motsetning til ved en lav prevalens på 1% som tilsvarer en PPV på bare 53%. Med en så lav PPV betyr det at bare halvparten av de positive testene faktisk vil tilhøre en syk person, som er svært uheldig (37, 38).

Selv om antigenet som Panbio™ Ag rapid test device og Standard™ Q Ag kit tester for er N-proteinet, så er det ikke noe amplifisering slik som ved RT-qPCR. Dette betyr at det krever en større mengde med virus for å få et positivt svar. Resultat fra forskjellige evalueringer viser at enn så lenge er hurtigtestene gode til å finne positive prøver som har en Ct-verdi under 25. Når Ct-verdien begynner å stige over 25 øker mengden falske negative svar. Dette er mest sannsynlig fordi at mengden virus tilgjengelig i prøvene blir så liten at de antigen-konjugat kompleksene som oppstår ikke har stor nok konsentrasjon til at en kan se testlinjen (38-40). I en evaluering av Panbio™ Ag rapid test device var den generelle sensitiviteten på 74,4%, men når en ser på forskjellige grupper av testpersoner så forandrer sensitiviteten seg drastisk. Hos asymptotiske personer med positiv RT-qPCR resultat var sensitiviteten lavest, bare 55,3%.

Ved symptomatiske personer var sensitiviteten på 78,9%, og hvor det var en sensitivitet på 79,8% hos personer med mindre enn seks dager med symptom. Gruppen med høyest sensitivitet er de som hadde en Ct-verdi under 30 og som hadde hatt symptomer i mindre enn seks dager, 87,6% (37). Som en kan se, så hadde prestasjonen til antigenhurtigtestene en stor variasjon i ulike testgrupper. Dette tyder på at LFAs ikke er like brukbare i alle situasjoner, og en muligens bør sette krav til hvem som kvalifiserer seg for testing ved bruk av LFA.

Det kan med andre ord være komplisert å tolke testsvar. For å prøve å kompensere for potensiell lav nøyaktighet, positiv prediktiv verdi og negativ prediktiv verdi ved antigenhurtigtesting har FHI gitt ut et flytskjema for hvordan en skal vurdere prøvesvar (se figur 8) (41).



Figur 8: flytskjema for hvordan en skal håndtere forskjellige prøvesvar ved bruk av antigenhurtigtest (41).

Pasientene er her delt inn i to grupper. Gruppe 1 (venstre side) er symptomatiske/smitteeksponert og gruppe 2 (høyre side) er symptomfri/ikke kjent eksponering. I gruppe 1 antar en at det er en høy prevalens og vil dermed akseptere positivt prøvesvar på

hurtigtesten og vurdere behovet for retesting ved negativt svar. I gruppe 2 er det omvendt. Her er det antatt lav prevalens og eventuelle positive tester vil bli kontrollert med en RT-qPCR analyse mens alle negative svar forblir det endelige svaret.

En vesentlig faktor for valg av test under en pågående pandemi er de praktiske forholdene knyttet til de ulike metodene. De praktiske forholdene for antigenhurtigtest og RT-qPCR er svært ulike og det er derfor relevant å se nærmere på disse. Et viktig aspekt er kostnad. Antigenhurtigtester for f.eks. malaria har en kostnad så lav som \$0,25 USD, tilsvarende 2,- NOK. Dette står i kontrast til RT-qPCR som er en relativt dyr analysemetode (11). Et annet viktig forhold er tidsaspektet. RT-qPCR er en tidkrevende prosedyre. Et oppsett for RT-qPCR kan ta opptil 2-3 timer før resultatet er klart. I tillegg til dette kommer det transporttid for prøvematerialet som ofte blir høstet ved en annen lokasjon enn laboratoriet som utfører analysen. Dette er på grunn av at RT-qPCR metoden krever godt utstyrte laboratorier med aktuelle instrumenter, samt god plass slik utformingen på arbeidet kan gå fra et «rent» område til et «skittent» område. Denne arbeidsflyten er viktig for å unngå at aerosoler og partikler som kan inneholde virus påvirker det molekylære laboratoriemiljøet og føre til kontaminering. Maskiner og annet utstyr, som pipetter og hansker må også på bakgrunn av dette ha egne seksjoner (10).

Risikoen for at laboratoriet kan bli påvirket av viruspartikler ved bruk av RT-qPCR er altså relativt høy fordi en jobber med viruset direkte. Prøverørene blir åpnet før analyseringen kan starte. Det kan forekomme søl av transportmedium og prøvene åpnes derfor i avtrekk slik at potensielle aerosoler blir fjernet. Prøvene prosesseres gjennom ulike trinn og forflyttes fra ulike maskiner. Analyseringen skaper dermed en risiko for smitte både for personal og for kontaminering mellom forskjellige prøver. Det kreves derfor et laboratorium som kan opprettholde riktig grad av biosikkerhet. Ved bruk av RT-qPCR trenger en biosikkerhetsnivå 3 (BSL-3). Det kreves personell som har riktig kunnskap og ferdigheter for å analysere og tolke data. Det er ikke alle laboratorier som oppfyller de ulike kravene. Prøvemateriale som skal analyseres må derfor transporteres til et laboratorium som har mulighet til å analysere prøven. Dette resulterer i at det kan ta flere dager før en testperson får svar på prøven (10, 37).

Antigenhurtigtester som LFA bruker vesentlig kortere tid før det produseres et svar. Et oppsett med LFA tar 10-30 minutter, samtidig som at det ikke er noe transporttid. Dette er fordi slike

assays ikke krever store maskiner eller personell med spesialkompetanse. Testen kan dermed bli utført hvor som helst, og ikke bare i noen få kvalifiserte laboratorier. Dette fører til en vesentlig raskere analysetid hvor en kan gi ut svar fortløpende sammenlignet med RT-qPCR. Den raske analysetiden vil igjen føre til hurtigere isolering og mer effektiv kontaktsporing av personer (38). Ved å bruke LFA som et screening-verktøy i grupper som f.eks. skoleklasser trengs det ingen ekstra utstyr. Ved bruk av LFA på teststasjoner derimot, er en nødt til å opprettholde biosikkerhetsnivået.

Uansett lokalisasjon er det viktig å skape et tryggest mulig arbeidsmiljø. Dette kan bli gjort ved bruk av smittevernsutstyr, men det er også viktig å minimalisere potensialet for dannelse av både søl og aerosoler. Eksempelvis må man ved bruk av Abbotts antigenhurtigtest fylle reagensrøret med riktig mengde buffer før en kan begynne testingen. Dette kan være tidkrevende og om en ikke er presis nok så kan dette muligens føre til feil ved analysering. Et positivt aspekt med Abbotts antigenhurtigtest er imidlertid det at en bryter av swaben oppi reagensrøret, noe som skaper et lukket system. På den andre siden kommer SD Biosensors antigenhurtigtest med ferdig fylte reagensrør. En ulempe her er derimot at en er nødt til å kaste swaben separat fra reagensrøret, ettersom den ikke skal brytes av inni røret. Dette skaper et mer åpent system, noe som kan øke risikoen for uhell (24, 25, 42).

Antigenhurtigtester er i teorien enkle å bruke og trenger minimalt med opplæring, men også her er det forskjell mellom de ulike produsentene. Under en evaluering av tre forskjellige LFAs i England og Tyskland ble det delt ut spørreskjema til testpersonell som handlet om brukervennligheten. Det ble stilt spørsmål om kvaliteten til testkomponentene, istandgjøring av testen og utføring av testen. Resultatene fra spørreskjemaet viser at det oppleves store forskjell mellom hvor synlige T og C linjene er for de ulike variantene og dermed hvor enkelt det er å tolke resultatet, størrelsen på teststripsen, avlesningsvinduet, prøvemateriale-brønn, og mengden tilgjengelig plass til å markere pasient-ID. Dette er faktorer som er viktige for å kunne minimalisere mengden applikasjons- og avlesningsfeil samt minimere søl. Slike faktorer bør bli vektlagt ved valg av antigenhurtigtest og variasjonen blant testene viser hvor viktig det er å evaluere dette (38).

Et pilotprosjekt i Vestland fylkeskommune ble satt i gang for å prøve å oppdage flere asymptotiske smittebærere i samfunnet. Prosjektet varte fra 15. mars til og med 28. mai



2021. Det ble utført som en screening ved bruk av LFA. Formålet med pilotprosjektet var å fange opp asymptomatiske elever og ansatte ved utvalgte videregående skoler tidlig slik at disse kan forbli åpne og at smittetrykket skal synke. Prosjektet var iverksatt ved 24 videregående skoler i fylkeskommunen, hvor testing ble utført to ganger i løpet av uken. Elever og ansatte fikk opplæring av kvalifisert personell om hvordan de skal ta nasopharynx-penselprøven og riktig påføringsmetode av prøvemateriale på teststripsen. Dette utførte de på seg selv. En ansvarsperson, enten en ansatt eller noen utenfra, har deretter ansvar for å samle inn testkassetene og avlese svar. Pr. 7.04.2021 var det blitt utført 45.474 tester hvor 11 tester har vært positive. I de tilfellene en test viste positivt resultat testet personen seg på nytt på en teststasjon hvor prøven ble sendt videre til RT-qPCR analysering. Av de 11 positive antigenhurtigtestene testet også 10 av de positivt med RT-qPCR mens én kom tilbake negativ. Denne ble ansett som en falsk positiv prøve (42). Prosjektet foregikk i middels- til høyprevalens-områder, noe som tidligere beskrevet er en viktig faktor for å oppnå en høy PPV. En kan anta at prosjektet hadde en høy PPV etter som at 10 av 11 positive LFA-svar ble bekreftet med et positivt RT-qPCR svar.

## 6. Konklusjon

Denne oppgaven har tatt for seg en metodesammenligning mellom RT-qPCR og LFA. RT-qPCR er pr. dags dato ansett for å være gullstandarden når det kommer til deteksjonsmetode for SARS-CoV-2. Dette er på grunn av den høye nøyaktigheten til metoden. Det finnes imidlertid ingen perfekt deteksjonsanalyse som ikke har noen ulemper. RT-qPCR har lang analysetid, er lite kostnadseffektiv og stiller høye krav til maskiner og utdannet personell. Antigenhurtigtester som LFA har på sin side rask analysetid, er kostnadseffektiv og stiller minimale krav til maskiner eller personell. LFAs har ikke like god nøyaktighet som RT-qPCR. Imidlertid kan slike tester fungere som et godt supplement til RT-qPCR ved høy prevalens. Dette er fordi den høye sykdomsforekomsten vil gi en høy positiv prediktiv verdi. En potensiell løsning kan altså være å benytte én eller begge metoder i kombinasjon basert på den foreliggende smittesituasjonen.

Det er pr. dags dato stor smitte på verdensbasis. Pandemien foregår enda i stor grad og det er dermed fortsatt viktig å optimalisere og utvikle nye metoder for deteksjon av SARS-CoV-2. Videre forskning vil kunne føre til bedre håndtering av pandemien og skape et bedre grunnlag for analysemetoder for eventuelle fremtidige pandemier.

## 7. Referanser

1. FHI. Fakta om koronaviruset SARS-CoV-2 og sykdommen covid-19. FHI [Internet]. 2021 [cited 2021 15.04]. Available from: <https://www.fhi.no/nettpub/coronavirus/fakta-og-kunnskap-om-covid-19/fakta-om-koronavirus-coronavirus-2019-ncov/?term=&h=1>.
2. Tjernshaugen A, Hiis H, Bernt JF, Braut GS. koronavirus-pandemien 2020-2021. SNL [Internet]. 2020 [cited 2021 15.04]. Available from: [https://sml.snl.no/koronavirus-pandemien\\_2020-2021](https://sml.snl.no/koronavirus-pandemien_2020-2021).
3. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *Journal of medical virology*. 2020;92(9):1518-24.
4. Astuti I. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2020;14(4):407-12.
5. Dalgard O, Klein J, Jensen HLB. covid-19. SNL [Internet]. 2021 [cited 2021 15.04]. Available from: <https://sml.snl.no/covid-19>.
6. FHI. Covid-19-epidemien: risikovurdering og respons i Norge – andre versjon. Folkehelseinstituttet [Internet]. 2020 [cited 2021 15.04]. Available from: <https://www.fhi.no/contentassets/c9e459cd7cc24991810a0d28d7803bd0/vedlegg/notat-om-risiko-og-respons-2020-02-25.pdf>.
7. Chaimayo C, Kaewnaphan B, Tanlieng N, Athipanyasilp N, Sirijatuphat R, Chayakulkeeree M, et al. Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand. *Virology Journal*. 2020;17(1):1-7.
8. Ben-Ami R, Klochendler A, Seidel M, Sido T, Gurel-Gurevich O, Yassour M, et al. Large-scale implementation of pooled RNA extraction and RT-PCR for SARS-CoV-2 detection. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020;26(9):1248-53.
9. Johannessen T. Hurtigtest til påvisning av covid-19. NHI [Internet]. 2020 [cited 2021 15.04]. Available from: <https://nhi.no/for-helsepersonell/fra-vitenskapen/hurtigtest-til-pavisning-av-sars-cov-2/>.
10. Rahbari R, Moradi N, Abdi M. rRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical considerations. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 2021;516:1.

11. Grant BD, Anderson CE, Williford JR, Alonzo LF, Glukhova VA, Boyle DS, et al. SARS-CoV-2 coronavirus nucleocapsid antigen-detecting half-strip lateral flow assay toward the development of point of care tests using commercially available reagents. *Analytical chemistry*. 2020;92(16):11305-9.
12. Yu F, Du L, Ojcius DM, Pan C, Jiang S. Measures for diagnosing and treating infections by a novel coronavirus responsible for a pneumonia outbreak originating in Wuhan, China. *Microbes and infection*. 2020;22(2):74-9.
13. Austin CP. open reading frame[cited 2021 16.05]. Available from: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Open-Reading-Frame>.
14. Graham RL, Sparks JS, Eckerle LD, Sims AC, Denison MR. SARS coronavirus replicase proteins in pathogenesis. *Virus research*. 2008;133(1):88-100.
15. Adams G. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*. 2020;42(3):48-53.
16. FHI. Prøvetaking - praktisk gjennomføring. FHI [Internet]. 2021 [cited 2021 15.04]. Available from: <https://www.fhi.no/nettpub/coronavirus/testing-og-oppfolging-av-smittede/provetaking/#proevetaking-i-vre-luftveier>.
17. Bustin SA, Nolan T. RT-qPCR testing of SARS-CoV-2: a primer. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(8):3004.
18. Martinsen L, Børresen-Dale A-L. primer. SNL [Internet]. 2019 [cited 2021 23.04]. Available from: <https://sml.snl.no/primer>.
19. Aryal S. Microbe notes [Internet]2020. [cited 2021 23.04]. Available from: <https://microbenotes.com/real-time-pcr-principle-process-markers-advantages-applications/>.
20. Siqueira Jr JF, Rôças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *Journal of dentistry*. 2003;31(5):333-9.
21. wisconsin-veterinary-diagnostic-laboratory. What does CT mean? 2018 [Available from: <https://www.wvdl.wisc.edu/wp-content/uploads/2018/05/What-does-CTmeanfinahandoutJanuary2014.pdf>].
22. Sajid M, Kawde A-N, Daud M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2015;19(6):689-705.
23. Chen Z, Zhang Z, Zhai X, Li Y, Lin L, Zhao H, et al. Rapid and sensitive detection of anti-SARS-CoV-2 IgG, using lanthanide-doped nanoparticles-based lateral flow immunoassay. *Analytical chemistry*. 2020;92(10):7226-31.

24. Abbott. Panbio COVID-19 Ag Rapid Test Device Nasopharyngeal Instructions for Use (Multilingual). 2020.
25. Biosensor S. Q COVID-19 Ag INSTRUCTION FOR USE. 2020.
26. Trevethan R. Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Plabilities, and Pitfalls in Research and Practice. *Frontiers in Public Health*. 2017;5(307).
27. Burtis CA, Bruns, David E. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics 7ed*2015.
28. Lydersen S. Hva er sannsynligheten for riktig resultat av en diagnostisk test? *Tidsskrift for Den norske legeforening*. 2017.
29. Ruf MM, Oliver; Mackenzie, Kelly. Differences between screening and diagnostic tests and case finding Available from: <https://www.healthknowledge.org.uk/public-health-textbook/disease-causation-diagnostic/2c-diagnosis-screening/screening-diagnostic-case-finding>.
30. CDC. Overview of Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19)2021. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing-overview.html>.
31. Redden E. Rush to Publish Risks Undermining COVID-19 Research2020 [cited 2021 24.05]. Available from: <https://www.insidehighered.com/news/2020/06/08/fast-pace-scientific-publishing-covid-comes-problems>.
32. Albert E, Torres I, Bueno F, Huntley D, Molla E, Fernández-Fuentes MÁ, et al. Field evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device) for COVID-19 diagnosis in primary healthcare centres. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;27(3):472. e7-. e10.
33. Lohse S, Pfuhl T, Berkó-Göttel B, Rissland J, Geißler T, Gärtner B, et al. Pooling of samples for testing for SARS-CoV-2 in asymptomatic people. *The Lancet Infectious Diseases*. 2020;20(11):1231-2.
34. Yelin I, Aharony N, Tamar ES, Argoetti A, Messer E, Berenbaum D, et al. Evaluation of COVID-19 RT-qPCR Test in Multi sample Pools. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(16):2073-8.
35. Braut GS. Nøyaktighet2019 [cited 2021 15.04]. Available from: <https://sml.snl.no/n%C3%B8yaktighet>.
36. WHO. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays2020 [cited 2021 15.04]. Available from:

<https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>.

37. Landaas ET, Storm ML, Tollånes MC, Barlinn R, Kran A-MB, Bragstad K, et al. Diagnostic performance of a SARS-CoV-2 rapid antigen test in a large, Norwegian cohort. *Journal of Clinical Virology*. 2021;137:104789.
38. Krueger LJ, Gaeddert M, Koepfel L, Bruemmer L, Gottschalk C, Miranda IB, et al. Evaluation of the accuracy, ease of use and limit of detection of novel, rapid, antigen-detecting point-of-care diagnostics for SARS-CoV-2. *medRxiv*. 2020.
39. Jääskeläinen A, Ahava MJ, Jokela P, Szirovicza L, Pohjala S, Vapalahti O, et al. Evaluation of three rapid lateral flow antigen detection tests for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Journal of Clinical Virology*. 2021;137:104785.
40. Yamayoshi S, Sakai-Tagawa Y, Koga M, Akasaka O, Nakachi I, Koh H, et al. Comparison of Rapid Antigen Tests for COVID-19. *Viruses*. 2020;12(12):1420.
41. FHI. Antigentester2020 [cited 2021 15.04]. Available from: <https://www.fhi.no/nettpub/coronavirus/testing-og-oppfolging-av-smittede/hurtigtester-for-pavisning-av-koronavirus/>.
42. Vestland-fylkeskommune. Statusrapport for pilotprosjekt om hurtigtesting for covid-19 hos elever2021 [cited 2021 15.04]. Available from: <https://www.vestlandfylke.no/om-oss/beredskap/korona/status-pilotprosjekt-koronatesting-av-elevar-ved-to-vgs/>.

