



Folkhälsomyndigheten

Användning av PCR för påvisning av pågående covid-19, en teknisk vägledning

Version 1, 2020-09-24



Denna titel kan laddas ner från: www.folkhalsomyndigheten.se/publicerat-material/. En del av våra titlar går även att beställa som ett tryckt exemplar från Folkhälsomyndighetens publikationsservice, publikationsservice@folkhalsomyndigheten.se.

Citera gärna Folkhälsomyndighetens texter, men glöm inte att uppge källan. Bilder, fotografier och illustrationer är skyddade av upphovsrätten. Det innebär att du måste ha upphovsmannens tillstånd att använda dem.

© Folkhälsomyndigheten, 2020.

Artikelnummer: 20136

Om publikationen

Vägledningen har utarbetats för att beskriva användning av realtids RT-PCR i diagnostik av covid-19 och vilka särskilda beaktanden som bör göras avseende testets prestanda beroende på testningens syfte. I dokumentet används genomgående begreppet PCR som kortform för det längre begreppet realtids RT-PCR.

PCR är en träffsäker och tillförlitlig metod, men då den globala efterfrågan på tester är mycket stor och testningen sker i stor skala finns en risk för att felaktiga resultat kan uppstå, varför kvalitetssäkringsarbetet blir särskilt viktigt. Konsekvensen av felaktiga resultat kan bli omfattande för personen som drabbas, hälso- och sjukvården och samhället i övrigt. I vägledningen lyfts av den anledningen exempel på åtgärder som analyserande laboratorier kan vidta för att minska risken för felaktiga resultat.

Dokumentet vänder sig till kliniska mikrobiologiska laboratorier och externa aktörer som använder PCR för att påvisa pågående covid-19.

Folkhälsomyndigheten

Karin Tegmark Wisell

Avdelningschef, avdelningen för mikrobiologi

Innehåll

| | |
|--|----|
| Om publikationen | 3 |
| Ordlista..... | 5 |
| Sammanfattning | 7 |
| Bakgrund | 8 |
| Syfte | 9 |
| Avgränsning..... | 10 |
| Prestanda hos PCR-tester | 11 |
| Källor till felaktiga resultat och åtgärder för att begränsa dem | 13 |
| Falskt positiva resultat | 13 |
| Falskt negativa resultat | 14 |
| Ct-värde i relation till infektionsförloppet..... | 15 |
| Hantering av svagt positiva prover med höga Ct-värden..... | 15 |
| Konsekvenser av felaktiga resultat | 16 |
| Referenser | 17 |

Ordlista

| | |
|---------------------------|--|
| Analytisk känslighet | I vägledningen avses hur låga virusnivåer testet klara av att påvisa |
| Analytisk specificitet | I vägledningen avses testets förmåga att specifikt påvisa nukleinsyran hos viruset som orsakar covid-19 |
| Ct-värde | Mått som indirekt avspeglar virusmängden i ett prov. Ct-värdet är det cykeltal där fluorescenssignalen från PCR-produkten överstiger tröskelvärdet för att räknas som positivt |
| Cut-off | Vald gräns mellan vad som rapporteras som positivt eller negativt |
| Diagnostisk känslighet | Mått som anger andelen individer med covid-19 som får ett positivt resultat vid testning. Synonymt med diagnostisk sensitivitet |
| Diagnostisk specificitet | Mått som anger andelen individer utan covid-19 som får ett negativt resultat vid testning |
| Extraktion | Metod där man renar fram virusets nukleinsyra från ursprungsprov |
| Immunitet | Genomgången infektion som resulterar i att personen är helt eller delvis skyddad mot sjukdom vid exponering för viruset som orsakar covid-19 |
| Negativt prediktionsvärde | Andelen negativa testresultat som är sant negativa |
| Nukleinsyra | Arvs massa, i vägledningen hos SARS-CoV-2 som orsakar covid-19 |
| Positivt prediktionsvärde | Andelen positiva testresultat som är sant positiva |
| Prevalens | Mått som anger andelen individer i en population som har eller har haft en sjukdom eller ett tillstånd, i detta fall covid-19 |

| | |
|-------------------------|--|
| Primer | Kort nukleinsyrafragment som är komplementärt till och binder målsekvens så att amplifiering kan ske |
| Prob | Kort nukleinsyrafragment som är komplementärt till och binder målsekvens i den bildade PCR-produkten så att påvisning sker |
| RdRp/ORF1, env, N och S | Namn på regioner och gener som är målsekvenser i flertalet av de PCR-tester som används vid covid-19 diagnostik |
| Realtids RT-PCR | Realtids Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. Metod för att amplifiera och påvisa nukleinsyra i ett prov |
| SARS-CoV-2 | Viruset som orsakar covid-19 |

Sammanfattning

PCR används för att påvisa pågående covid-19 och det finns såväl egenutvecklade tester som kommersiella att tillgå. PCR-testets prestanda, framför allt dess känslighet och specificitet, är avgörande för att ge tillförlitliga resultat. Olika krav kan ställas på testets prestanda beroende på testningens syfte och det angivna användningsområdet. I vissa sammanhang är hög känslighet viktigast, medan det i andra är testets specificitet som är avgörande.

Prestandan påverkas av många olika faktorer och den utvärderas och säkerställs genom validering och kliniska studier. Även för tester med mycket hög prestanda finns risk för felaktiga resultat i signifikant omfattning när testningen sker i stor skala. PCR har en ökad risk för falskt positiva resultat på grund av bland annat ospecifik amplifiering och bildning av dimers vid höga Ct-värden. En särskild utmaning är därför tolkning av provresultat med höga Ct-värden. Dels på grund av risken för falsk positivitet, men även eftersom virusmängden och därmed Ct-värdet varierar under infektionsförloppet, mellan olika provmaterial, mellan olika tester och beroende på hur väl provtagningen lyckats.

Laboratorieresultat behöver vara så exakta som möjligt. Felaktiga resultat kan ge stora konsekvenser för samhället, hälso- och sjukvården och personen som drabbas. Det är viktigt att laboratoriet vidtar åtgärder som minskar risken för felaktiga resultat. God mikrobiologisk praxis, användning av kontroller som säkerställer att alla analyssteg fungerar på det sätt som definierats i valideringen och rutiner för analys och tolkning av resultat nära testets detektionsgräns är exempel på åtgärder som kan vidtas.

Bakgrund

PCR är den metod som under hela pandemin använts för att påvisa pågående covid-19. Orsaken till att man använder PCR är att virusets nukleinsyra i allmänhet kan påvisas tidigt i infektionsförloppet i provmaterial från de övre luftvägarna. Tidig diagnos är en viktig smittskyddsåtgärd för att minska pandemins utbredning.

Det finns såväl egenutvecklade PCR-tester som ett stort antal olika kommersiella att tillgå för att påvisa pågående covid-19. Pandemins omfattning gör att den globala efterfrågan på tester är stor. PCR är i allmänhet en träffsäker och tillförlitlig metod för diagnostik. Validering och klinisk utvärdering innan ett PCR-test tas i bruk är viktigt för att säkerställa att prestandan är god. Vid testning i stor skala, särskilt i områden där prevalensen är låg eller vid testning av asymtomatiska personer utan klinisk frågeställning, finns en ökad risk för felaktiga resultat (falskt positiva). Denna kan hanteras genom lämpligt valda analys- och kvalitetskontroller. Felaktiga resultat kan få stora konsekvenser för personen som drabbas men framför allt för hälso- och sjukvården och samhället i stort.

Den här vägledningen har utarbetats för att belysa några av de faktorer som påverkar ett tests prestanda, beaktanden som bör göras avseende prestanda beroende på testningens syfte samt vilka åtgärder laboratorier kan vidta för att minska risken för felaktiga resultat.

Syfte

Syftet med vägledningen är att övergripande beskriva faktorer som visat sig vara av särskild relevans för SARS-CoV-2 PCR-testers prestanda och vilka beaktanden som bör göras avseende prestandan beroende på vad syftet med testningen är.

Syftet med vägledningen är även att beskriva relevansen av validering och kliniska studier, orsaker till felaktiga resultat och vilka åtgärder laboratoriet kan vidta för att minska risken för dessa.

Avgränsning

Vägledningen har inte som syfte att ge en fullständig beskrivning av validering och dess omfattning för att fastställa testers prestanda. För vägledning och stöd i sådan frågeställning hänvisas till andra dokument. Se exempelvis [dokument](#) utgivet av SWEDAC, [ISO 20395:2019](#) och [förordning 2017/746](#). För ett fåtal smittämnen har EU-kommissionen tagit fram [gemensamma tekniska specifikationer](#), där valideringens omfattning bland annat styrs av testets användningsområde. För SARS-CoV-2 finns ännu ingen teknisk specifikation framtagen, men de som finns för andra smittämnen kan anpassas och vid behov användas som stöd vid validering av tester för SARS-CoV-2.

Vägledningen omfattar inte heller pre-analytiska steg som rör själva provtagningen, exempelvis val av provtagningslokal, provtagningsteknik eller vilka provtagningsmateriel som är lämpliga.

Prestanda hos PCR-tester

PCR är i allmänhet en träffsäker och tillförlitlig metod. Tillförlitligheten påverkas i hög grad av designen av testets primer och prober och vilka av virusets målsekvenser som de utformats för att binda till. Flertalet av de PCR-tester som idag finns tillgängliga amplifierar och detekterar målsekvenser i en eller flera av generna env, N, S, RdRp/ORF1 i SARS-CoV-2 virusgenomet.

Genom att välja målsekvenser i konserverade regioner och i kombination med faktorer som god primer- och probdesign, optimerade reagens, optimerad temperaturprofil och utprovat cykelantal är det möjligt att uppnå mycket hög analytisk specificitet och känslighet i ett test. Testets analytiska känslighet och därmed detektionsgräns påverkas förutom av faktorerna som nämns ovan, exempelvis även av kvalitén i extraktion av nukleinsyra, förekomst av inhiberande substanser som saltrester och cellpartiklar i prov eller provtagningsmateriel och av eventuella sekundärstrukturer i primers, prober eller målsekvenser. Pre-analytiska faktorer som provförvaring och provtransport (tid och temperatur) kan också påverka testresultatet. Bristande valideringar och studier under utvecklingen av ett test kan leda till bristande kännedom om och förståelse för testets prestanda, med följden att prestandan blir sämre.

Olika krav kan ställas på testets prestanda beroende på testningens syfte och det angivna användningsområdet. I en situation där det är viktigt att hitta alla som är smittade är det viktigt att testet har hög analytisk känslighet, det vill säga klarar av att hitta låga virusnivåer i det provmaterial som testas. För att ge hög diagnostisk känslighet krävs hög analytisk känslighet, men även att provet är taget i ett läge av infektionsförloppet då virusets nukleinsyra finns i det provmaterial som testas. Hög känslighet är särskilt viktigt för ett test som används för att diagnosticera patienter med misstänkt covid-19 i behov av slutenvård. Vid storskalig testning i en befolkning där prevalensen är låg kan man acceptera ett test med något lägre känslighet medan det är viktigt att testet har mycket hög specificitet för att det positiva prediktionsvärdet ska bli högt, se tabell 1 nedan. Om ett test med lägre specificitet används kommer en större andel av dem som får ett positivt resultat att få ett felaktigt sådant vilket kan få stora konsekvenser för personen som drabbas, för hälso- och sjukvården och för samhället i stort.

Valideringens omfattning styrs bland annat av testets användningsområde. Ett test vars primära syfte är att användas vid screening behöver innan det tas i bruk exempelvis ha utvärderas på ett mycket stort antal negativa prover, se vidare i dokument som länkats till i avsnittet *Avgränsningar*. Det är viktigt att tydliggöra för beställaren för vilka patientkategorier och i vilket syfte testet är ämnat att användas. För kommersiella CE-IVD tester framgår det av bruksanvisningen.

Tabell 1. Exempel på hur resultatet varierar med testets specificitet och prevalensen i befolkningen. 10 000 personer testas och testets analytiska känslighet är 99 procent. Antal personer är avrundade till heltal i tabellen

| Prevalens | 0,1 % | | | 0,5 % | | | 1 % | | | 5 % | | |
|-------------------------------------|-------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|
| | | | | | | | | | | | | |
| Testets specificitet i procent | 100,0 | 99,9 | 99,5 | 100,0 | 99,9 | 99,5 | 100,0 | 99,9 | 99,5 | 100,0 | 99,9 | 99,5 |
| Antal positiva utifrån förekomst | 10 | 10 | 10 | 50 | 50 | 50 | 100 | 100 | 100 | 500 | 500 | 500 |
| Antal negativa utifrån förekomst | 9990 | 9990 | 9990 | 9950 | 9950 | 9950 | 9900 | 9900 | 9900 | 9500 | 9500 | 9500 |
| Sant positivt resultat i test | 10 | 10 | 10 | 50 | 50 | 50 | 99 | 99 | 99 | 495 | 495 | 495 |
| Sant negativt resultat i test | 9990 | 9980 | 9940 | 9950 | 9940 | 9900 | 9900 | 9890 | 9851 | 9500 | 9491 | 9453 |
| Falskt positivt resultat i test | 0 | 10 | 50 | 0 | 10 | 50 | 0 | 10 | 50 | 0 | 10 | 48 |
| Falskt negativt resultat i test | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 5 | 5 | 5 |
| Positivt prediktionsvärde i procent | 100 | 49,8 | 16,5 | 100 | 83,3 | 49,9 | 100 | 90,9 | 66,7 | 100 | 98,1 | 91,2 |

Källor till felaktiga resultat och åtgärder för att begränsa dem

Otillräcklig validering av ett tests prestanda innan det tas i bruk kan leda till ökad risk för felaktiga resultat, både falskt negativa och falskt positiva. Utöver den validering som ingår under utvecklingen av ett test är kliniska studier viktiga. Vid kliniska studier kan man bland annat utvärdera när under infektionsförloppet och för vilka provmaterial testet är användbart, att prestandan är tillräcklig i ett kliniskt sammanhang och att de inställningar som gjorts för att ge ett tillförlitligt resultat är lämpliga. Det kan exempelvis handla om inställningar för Ct cut-off, gränsen mellan vad som räknas som positivt och negativt. Denna påverkar både testets diagnostiska känslighet och diagnostiska specificitet. Ju lägre vald cut-off desto högre diagnostisk specificitet, men sämre diagnostisk känslighet som följd.

Falskt positiva resultat

I en situation där prevalensen av covid-19 är låg och ett stort antal asymtomatiska personer testas finns en risk för falskt positiva resultat även om testets specificitet är mycket hög, se tabell 1.

Kvarstående PCR-positivitet finns rapporterad upp till månader efter genomgången covid-19, vilket kan leda till att ett positivt resultat felaktigt tolkas som en ny infektion medan det i själva verket är en tidigare som mäts. För tidigare PCR-bekräftat fall är förnyad provtagning i allmänhet inte indikerat inom sex månader från föregående testtillfälle, se vidare i [Provtagningsindikation för nukleinsyrapåvisning vid covid-19](#).

Vanliga orsaker till falskt positiva resultat är kontaminering av prov eller reagens med tidigare amplifierad nukleinsyra (amplikon) och korskontamination från närliggande positivt prov eller positiv kontroll. Prover med mycket höga virusnivåer och därmed låga Ct-värden förekommer vid covid-19 diagnostik. Sådana prover innebär en ökad risk för korskontamination vid hantering eller under själva PCR-reaktionen. En annan källa är korskontaminering som kan uppstå mellan prover under uppsamling, transport och provhantering i laboratoriet. Storskalig produktion av syntetiska kontroller kan också leda till kontamination i produktion och produktionsmiljö. Generös användning av negativa kontroller som omfattar alla delsteg av analysflödet och en strukturerad plan för bekräftande testning vid osäkra resultat bidrar till att laboratoriekontaminering upptäcks och att prover inte felaktigt svaras ut som positiva.

PCR har en ökad risk för falskt positiva resultat vid höga Ct-värden. Efter ett högt antal cykler kan slumpmässig, ospecifik amplifiering uppstå utan att primers och prob har perfekt passform till målsekvensen. Det kan också ske på grund av dimer-bildning där det är testets primers och prober som ger upphov till en positiv signal. Ct-intervallet där slumpmässig amplifiering kan uppstå varierar mellan olika tester. Testresultat som väger samman och beaktar utfallet från fler än en målsekvens har i allmänhet en lägre risk för falskt positiva resultat på grund av denna typ av artefakt än tester som använder en målsekvens.

Även instabilitet hos proven kan ge upphov till falskt positiva resultat genom att risken för bakgrundssignal ökar. Felaktigt förvarade reagens, eller låg kvalitet hos proven orsakad av exempelvis orenheter ökar risken för probdegradering.

Laboratorier som utför PCR-analys för covid-19 bör etablera rutiner för hur resultat med höga Ct-värden hanteras, för definition av höga Ct-värden och hantering se avsnitt *Hantering av svagt positiva prover med höga Ct-värden*.

Falskt negativa resultat

Tester med lägre känslighet har en ökad risk för falskt negativa resultat. Risk för falskt negativa resultat finns också om provet tas för tidigt i infektionsförloppet, då personen befinner sig i inkubationsfasen.

En annan orsak till falskt negativa resultat kan vara att infektionsfokus skiftat en tid efter insjuknandet så att virusets nukleinsyra inte längre kan påvisas i det provmaterial som testas. Falskt negativa resultat kan också uppstå på grund av inhibition, felaktig eller dålig provtagning, eller om virusets nukleinsyra brutits ner under transport eller lagring.

Provförväxling under uppsamling, transport och provhantering i laboratoriet är ytterligare en orsak till både falskt positiva och falskt negativa resultat.

Lämpligt valda analyskontroller som identifierar inhibition eller prover med låg kvalitet av annan orsak minskar risken för de flesta falskt negativa resultat.

Ct-värde i relation till infektionsförloppet

Virusmängden och därmed Ct-värdet kan variera under infektionsförloppet. Låga Ct-värden ses oftast i den tidigare delen av förloppet då den provtagnes smittsamhet är som störst medan höga Ct-värden ses i den senare delen och kan kvarstå upp till månader efter genomgången infektion.

Ct-värdet varierar även beroende på vilket provmaterial som testas, hur väl provtagningen lyckats och mellan olika tester. Att sätta en gräns för vad som räknas som ett högt Ct-värde bör avgöras av laboratoriet utifrån det test som används och den eller de provtyper som är aktuella. Ett lämpligt riktmärke är Ct-värden som ligger i närheten av respektive tests detektionsgräns, alternativt det område där resultat från valideringen visar att testets reproducerbarhet är lägre.

Hantering av svagt positiva prover med höga Ct-värden

Alla laboratorier rekommenderas att etablera rutiner för hantering av prover med höga Ct-värden. Rekommenderad hantering i fallande ordning är:

- Ny extraktion av ursprungligt prov och analys med ett test som använder andra målsekvenser eller har en högre känslighet
- Ny extraktion av ursprungligt prov och analys med samma test som vid det föregående analystillfället
- Ny analys från tidigare extraherat material vid misstanke om kontamination i PCR-reaktionen. Antingen med ett test som använder andra målsekvenser eller har en högre känslighet, eller med samma test som vid det föregående analystillfället

I de fall testresultaten från de två analysomgångarna inte är samstämmiga rekommenderas att provet svaras ut som "Ej bedömbart" med rekommendation om att ett nytt prov tas.

Notera att det för kommersiella CE-IVD tester inte är tillåtet att frångå de inställningar (exempelvis Ct cut-off, fluorescens cut-off) som fastställts av tillverkaren. Den prestanda som uppges gäller under de förhållanden som tillverkaren specificerat. Om ett test modifieras utan tillverkarens medgivande eller används för testning på annan patientkategori än den testet är godkänt för är det närmast att betrakta som egentillverkning. Vårdgivaren övertar då det fulla ansvaret för testet från tillverkaren.

Konsekvenser av felaktiga resultat

Ett falskt negativt resultat medför ökad risk för smittspridning till och mellan personal och andra patienter/omsorgstagare inom hälso- och sjukvård samt omsorg. Även i samhället i övrigt medför ett falskt negativt resultat risk för smittspridning.

Ett falskt positivt svar får för personen som drabbas konsekvenser i form av smittskyddsåtgärder och skyddsföreskrifter som vid ett korrekt resultat inte hade varit nödvändiga, ekonomisk påverkan på grund av onödig sjukfrånvaro samt antagen immunitet med risk för förändrat smittskydds beteende och bristande förståelse för relevansen av provtagning vid faktisk covid-19. Inom hälso- och sjukvård kan ett falskt positivt svar medföra att felaktiga beslut tas gällande kohortvård, behov av förnyad provtagning vid symtom på covid-19 och vid smittspårning.

Referenser

1. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2;
2. JAMA. 2020;323(22):2249-2251. doi:10.1001/jama.2020.8259
3. Interpreting a covid-19 test result
4. BMJ 2020;369:m1808. doi: 10.1136/bmj.m1808
5. A Narrative Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19
6. Infect Dis Ther (2020) 9:573–586 10. doi:1007/s40121-020-00324-3
7. False Negative Tests for SARS-CoV-2 Infection – Challenges and Implications
8. N Engl J Med 2020; 383:e38. doi: 10.1056/NEJMp2015897
9. Australian Government Department of Health: Public Health Laboratory Network Statement on Nucleic Acid Test False Positive Results for SARS-CoV-2
10. ECDC: Population-wide testing of SARS-CoV-2: country experiences and potential approaches in the EU/EEA and the United Kingdom
11. SWEDAC DOC 01:55, utgåva 4: Validering/verifiering av kvantitativa och kvalitativa metoder - Vägledning
12. ISO 20395:2019 Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR
13. REGULATION (EU) 2017/746 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU
14. COMMISSION DECISION of 27 November 2009 amending Decision 2002/364/EC on common technical specifications for in vitro diagnostic medical devices

Folkhälsomyndigheten är en nationell kunskapsmyndighet som arbetar för en bättre folkhälsa. Det gör myndigheten genom att utveckla och stödja samhällets arbete med att främja hälsa, förebygga ohälsa och skydda mot hälsot. Vår vision är en folkhälsa som stärker samhällets utveckling.



Folkhälsomyndigheten

Solna Nobels väg 18, 171 82 Solna. **Östersund** Campusvägen 20. Box 505, 831 26 Östersund.

www.folkhalsomyndigheten.se