

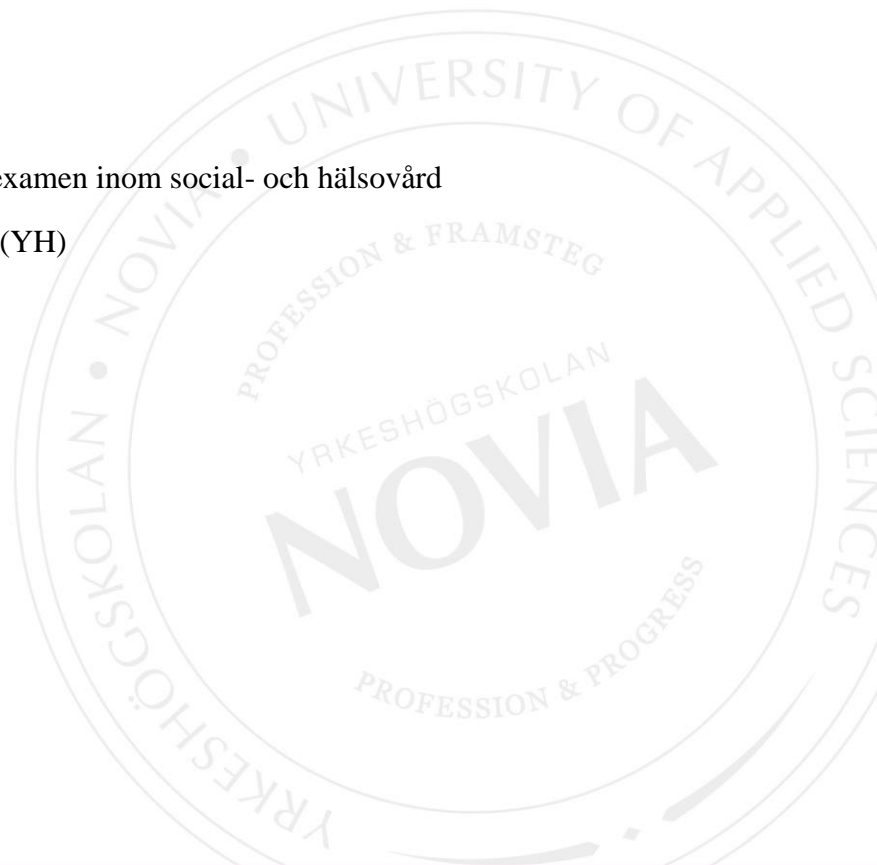
# **Snabbmetoder inom infektionsdiagnostik**

Matias Ahlstedt

Examensarbete för (YH)-examen inom social- och hälsovård

Utbildning: Bioanalytiker (YH)

Vasa 2021



## EXAMENSARBETE

Författare: Matias Ahlstedt

Utbildning och ort: Bioanalytiker, Vasa

Handledare: Ulla Penttinen

Titel: Snabbmetoder inom infektionsdiagnostik

---

Datum 25.10.2021      Sidantal: 41 Bilagor: -

---

### Abstrakt

Guldstandard inom mikrobiologisk diagnostik har länge varit identifikation av patogena mikrober från odlingar på olika näringsmedier. Teknologiska framsteg inom molekylära diagnostikmetoder har skapat apparatur och tester som kan utnyttjas effektivt inom mikrobiologisk diagnostik. Genom detta kan undersökningsresultat fås snabbare till beställaren och användas i vården av patienten. De senaste årtionden har många laboratorier centraliserats, och detta förlänger tiden det tar för att få laboratoriesvar. Många infektionssjukdomar är tidskritiska och optimalt skulle prover analyseras i närheten av patienten. Genom utvecklingen av snabbtester (POC-tester) kan också molekylärbiologiska metoder utnyttjas utanför laboratorier. För att testerna kan användas med flera olika slag av provmaterial, finns det en stor variation på olika tester. Immunokromatografiska tester har utvecklats med så hög specificitet och sensitivitet att de används både i laboratorier och hemma hos patienter. Detta examensarbete är en litteraturöversikt på snabbdiagnostiska metoder och tester inom mikrobiologin.

---

Språk: Svenska Nyckelord: Mikrobdiagnostik, molekylärdiagnostik, snabbdiagnostik, POC-tester.

---

# OPINNÄYTETYÖ

Tekijä: Matias Ahlstedt

Koulutus ja paikkakunta: Bioanalyytikko, Vaasa

Ohjaaja(t): Ulla Penttinen

Nimike: Nopeampaa infektiodiagnostiikkaa

---

Päivämäärä: 25.10.2021 Sivumäärä: 41 Liitteet: -

---

## Tiivistelmä

Käytäntö mikrobiologisessa diagnostiikassa on kauan ollut patogeenien tunnistus viljelyistä eri elatusaineilla. Molekyylidiagnostiikkamenetelmien kehitys on luonut mahdollisuuksia eri laitteiden ja testien käyttämisessä diagnostiikassa. Tämä mahdollistaa, että tulokset ovat tilaajien käytössä nopeammin, ja että niitä voidaan tehokkaammin käyttää potilaan hoidossa. Viime vuosikymmenten aikana laboratoriotoimintaa on keskitetty yhä enemmän, mikä pidentää tulosten saamista yhä enemmän. Monet tartuntataudit vaativat nopeaa hoitoa ja parhaimmassa tapauksessa diagnostiikka toteutettaisiin potilaan läheisyydessä. Vieripikatestien (POC-testien) kehitys mahdollistaa myös molekyylidiagnostiikkamenetelmien hyödyntämisen laboratorioden ulkopuolella. Koska testejä voidaan käyttää erityyppisten näytteiden kanssa, on testivalikoima laaja. Immunokromatografisia testejä on kehitetty niin että niillä on niin korkea spesifisyys ja sensitiivisyys, että niitä voidaan käyttää sekä laboratorioissa, että potilaitten kotona. Tämä opinnäytetyö on tehty kirjallisuuskatsauksena eri pikadiagnostisiin menetelmiin kliinisessä mikrobiologiassa.

---

Kieli: Ruotsi Avainsanat: Pikadiagnostiikka, mikrobidiagnostiikka, molekyylidiagnostiikka, POC-testi.

---

# **BACHELOR'S THESIS**

Author: Matias Ahlstedt

Degree Programme: Bachelor of Health Care, Biomedical Laboratory Scientist, Vaasa

Supervisor(s): Ulla Penttinen

Title: Faster infectious-disease diagnostics

---

Date: 25.10.2021 Number of pages: 41

Appendices : -

---

## **Abstract**

The golden standard within clinical microbiology has been identification of pathogens in cultures on different mediums. Advancements in molecular methods have created possibilities for various apparatus and tests to be utilized in diagnostics. This enables for faster test results so that they can be used in patient care more effectively. In the last decades because of centralization of laboratory services the times for laboratory results have been prolonged even further. Many infectious diseases require fast treatment, and in an ideal situation the diagnostics would be done near the patient. The development of rapid diagnostic test (POC-tests) has permitted for molecular diagnostic methods to be used outside of a laboratory setting. Because tests can be used with different kinds of samples, there is a wide array of tests available. Immunochromatographic tests have been developed to have such a high specificity and sensitivity so that they are used in laboratories, as well as patients' homes. This thesis is a literature review of rapid diagnostic methods used within clinical microbiology.

---

Language: Swedish      Key words: Rapid diagnostics, POC-testing, diagnostic microbiology, molecular diagnostics.

---

# Innehållsförteckning

1	Introduktion .....	1
2	Syfte .....	2
3	POC-diagnostik.....	2
4	Immunokromatografiska tester (LFI) .....	7
4.1	Användningsområde.....	10
5	Amplifierande metoder.....	11
5.1	Polymeras kedjereaktion (PCR) .....	12
5.2	Omvänt transkriptas-PCR-metoden (Reverse transcriptase PCR, RT-PCR) ..	13
5.3	Multiplex PCR.....	13
5.4	Realtids-PCR (Real Time PCR) .....	13
3.4.1	Icke-specifik realtids-PCR .....	14
3.4.2	Specifik realtids-PCR.....	14
5.4.1	På vårdavdelningar .....	16
6	Signalamplifikation.....	18
6.1	Branched DNA-metoder (bDNA).....	19
6.2	Hybrid Capture Assay-metoden (HCA-metoden) .....	20
6.3	Signalamplifikation och immunokromatografiska tester.....	20
7	Snabbdiagnostik och respiratoriska virus.....	21
7.1	PCR-tester för coronavirusdiagnostik.....	24
8	MALDI-TOF .....	26
9	Latex agglutination .....	27
10	Antibiotikaresistens.....	29
10.1	Möjligheter inom POC-diagnostik.....	29
10.1.1	Fluorescerande in situ-hybridisering.....	30
10.1.2	Genomsekvensering.....	30
10.1.3	Immunodetektion av resistensmekanismer .....	31
10.2	Problem med resistensbestämning och snabbdiagnostik .....	31
11	Metodik.....	32
12	Slutsatser .....	32
	Källförteckning .....	33

## 1 Introduktion

Inom mikrobiologi har odlingar länge varit enda metoden för diagnostisering av infektionssjukdomar. Nackdelen med odlingar är tiden det tar att få fram bakterien eller viruset som orsakar infektionen. De senaste årtionden har det dock utvecklats flera olika metoder för att försnabba denna process. Många infektioner är tidskritiska, och med nya diagnostikmetoder får patienterna snabbare vård och mortaliteten sjunker. Onödig användning av antibiotika har också minskat till följd av detta. En ytterligare fördel med snabbdiagnostik är att vid smittsamma sjukdomar kan patienter isoleras och på så sätt vidare smittor förhindras. Snabbdiagnostikindustrin har vuxit inom de senaste årtionden, och tester har utvecklats för alla miljöer, från centraliserade laboratorier till hemmatester. Med att integrera snabbdiagnostik till laboratorieprocessen kan patientvården försnabbas med flera dagar.

På ett laboratorium utnyttjas många molekylära metoder för att analysera provmaterial. Polymeras kedjereaktion (PCR) och andra amplifikationsmetoder är nuförtiden vanliga också på mindre laboratorier. Apparatur har utvecklats så att den är lätt att använda, men ändå behåller hög sensitivitet och specificitet. Om provet inte behövs förbehandlas eller odlas ut kan analyser utföras till och med inom en timme. I många fall vet man oftast inte vilken specifik mikrob som söks så odling är oundvikligt men det har utvecklats metoder som försnabbar identifikationen av specifika mikrober. Långvariga kemiska undersökningar har ersatts av masspektrometri (MALDI-TOF) som ger resultat inom minuter (Vila, Gomez, Salavert, & Bosch, 2017)

För att mikrobiologiska undersökningar kan ta flera dagar, administreras ofta antibiotika empiriskt. Ökad antibiotikaresistens är en direkt följd av över- och felanvändning av antibiotika. Om antibiotikaresistens kunde upptäckas direkt ur ett odlat prov skulle patienten kunna administreras rätt behandling snabbare än de nuvarande metoderna möjliggör. Ett genombrott inom detta område skulle spara på massor resurser inom sjukvården (Lenzen, 2013).

För att snabbdiagnostik har blivit lättare att använda har apparatur spridit sig från laboratorier till avdelningar och polikliniker. Snabbtester eller POC-tester (point-of-care tester) har blivit vanligare till följd av att det bildats så många centraliserade laboratorier.

Implementeringen av dessa tester har skapat problem med kvalitetskontroller och falska svar, men fördelarna är ändå stora. Svarstiden förkortas avsevärt och det betyder att resultaten kan direkt användas i vården av patienten.

Tester så som graviditetstest och blodsockermätningar utför patienten själv hemma. För mikrobiologiska undersökningar finns det flera olika kommersiella tester tillgängliga. Patienter kan välja att använda snabbtester hemma för att skydda deras privatliv, eller som screeningtester för att inte belasta sjukvården. Den dominerande metoden för dessa är immunokromatografiska tester (Kozer & Burnham-Maruisch, 2017)

## 2 Syfte

Syftet med detta arbete är att göra en litteraturstudie på de olika metoderna som används vid snabbdiagnostik inom mikrobiologi, och vilka tester använder sig av dessa metoder. I arbetet tas upp metoder som försnabbar laboratorieprocessen från tiden det skulle ta att utnyttja sig av odlingsmetoder. Detta innebär också point-of-care-diagnostik (POC-diagnostik).

## 3 POC-diagnostik

Traditionellt har diagnostiken av akuta infektioner baserat sig på odlingsmetoden. Provet odlas på olika näringsmedium, patogenerna identifieras och det undersöks vilka antibiotika är effektiva. Denna arbetsprocess tar flera dygn och gör det svårt att ge lämplig vård till patienten tillräckligt snabbt. Olika metoder av identifikation av den infektiösa orsaken, så som mikroskopering, kan inte utföras utanför ett laboratorium för att det kräver specifik utrustning och utbildad personal. Med användning av snabbdiagnostiska tester kan orsaken till infektionen snabbare identifieras och lämplig vård påbörjas snabbare. De tester som nu finns tillgängliga är små, lättanvända tester med färdiga kit. Dessa tester kan användas i närheten av patienten av all vårdpersonal för att utföra molekylärbiologisk diagnostik med resultat tillgängliga i under 30 minuter. Rätt integrering av denna teknologi kan flytta en stor del av diagnostiken bort från centraliserade laboratorier som använder sig av traditionella odlingsmetoder. Med rätt användning kan påverkan vara stor på patientvården och administreringen av antibiotika,

speciellt i områden där det inte finns möjlighet att få laboratoriesvar inom en lämplig tidsram (Lisby & Schneider, 2021).

Med utvecklingen av olika snabbtester och snabba molekylära metoder kan många av proven analyseras direkt på vårdavdelningar. POC-tester (vieritutkimus, point-of-care testing, snabbtester) är laboratorieanalyser som kan göras utanför ett laboratorium, i närheten av patienten. Proven behöver inte transporteras, analysen är förenklad, och användaren är oftast inte laboratoriepersonal. Snabbtester görs överallt inom hälsovården: akutrum, ambulanser, mödravårdcentraler, ålderdomshem och bäddavdelningar. Detta möjliggör att resultaten kan användas direkt i vården av patienten. De mest använda POC-testerna är blodsockermätningar och graviditetstest (Tuokko, Rautajoki, & Lehto, 2008).

Dominerande modellen inom sjukvården är ett centraliserat laboratorium där processen är till stor del automatiserad, som möjliggör analysering av stora mängder av prover och minimering av kostnader. Ekonomiskt tryck har varit huvudorsaken för centraliserade laboratorium och detta har haft sidoeffekten att vården blivit mindre patientfokuserad. Alternativa modeller som använder sig mera av POC-tester har utvecklats. Dessa modeller kan utnyttjas både av hälsocentraler i glest bebyggda områden, samt storstäder där analyseringen kan göras hemma av patienten. För många patienter är modellen med ett centraliserat laboratorium inte optimalt (Tuokko et al, 2008)

Uppgiften av ett laboratorium för klinisk mikrobiologi är att förse den beställande vårdenheten med en diagnos, ifall det identifieras en patogen i provet. Laboratoriet ger ett svar som innehåller sådan information som vilken bakterie det är frågan om, och vilken antibiotika som kan användas mot infektionen. Vårdenheten använder sedan denna information för att påbörja rätt antibiotikabehandling, och möjligtvis tar också andra åtgärder så som isolering av patienten. För att laboratoriesvaren kan användas i patientvården måste resultaten finnas till vårdande läkarens tillgång inom en relativt kort tid. Oftast betyder detta inom några dagar, men många infektionssjukdomar är tidskritiska och vården måste påbörjas mycket tidigare.

Definitionen på POC-tester är bred och innehåller flera olika sorters test och apparatur, från små lättanvända pappersbaserade tester till sofistikerad apparatur på ett laboratorium. Den avgörande faktorn är att om testet kan utföras snabbt, och om det är lättanvänd.

POC-tester kan indelas i grupper baserat på var de används, och av vem.

#### Grupp 1A:

POC-testerna används av utbildad laboratoriepersonal på ett laboratorium. Detta kan vara på ett centraliserat laboratorium, eller på en mindre enhet av ett centraliserat laboratorium.

#### Grupp 1B:

I denna miljö används POC-testerna av utbildad sjukvårdspersonal på ett sjukhus. Detta kan vara på akutrum, intensivvårdsavdelning eller annan vårdavdelning. För att personalen som använder sig av testerna inte har laboratorieutbildning måste testerna vara lättanvända.

#### Grupp 2A:

POC-testerna används av utbildad personal, men i en vårdanstalt utanför ett sjukhus. Till exempel inom äldrevård och läkarmottagningar.

#### Grupp 2B:

Här utförs testerna utanför en vårdanstalt men av utbildad personal. Hit hör till exempel användningen av tester i fältarbete i u-länder.

#### Grupp 3:

I denna grupp faller tester som görs hemma hos patienten av användare som inte har tidigare utbildning.

Det har utvecklats flera olika POC-tester som använder sig av olika undersökningsmetoder och provmaterial. Det finns delade åsikter om vem som tar ansvaret om POC-verksamheten. En del tycker att vårdenheten som använder apparaten är ansvarig för kvalitetskontroll och användning. Medan andra tycker att laboratoriet ska vara ansvarig för skolning och kvalitetsövervakning (Åkerman, 2010). Användning av POC-tester kräver i varje fall personal. Detta betyder att på sådana ställen där svar inte behövs direkt eller laborativ verksamheten är centraliserad, är inskaffning av POC-tester inte alltid lönsamt (Tuokko et al, 2008).

Laboratorieprocessen kan delas i tre olika delar: preanalytik, analytik och postanalytik.

<b>1.Preanalytik</b>	<b>2.Analytik</b>	<b>3.Postanalytik</b>
Beslut av undersökning	Analysering	Granskning av resultat
Beställning till ADB	Kvalitetskontroll	Möjlig kommentar eller beskrivning av svaret
Informering av patienten		Sändning av resultat åt beställaren

Provtagning		Dokumentering och arkivering
Förvaring och transport		Förvaring av provet i lämplig tid
Mottagning till laboratoriet		Tolkning av resultat av vårdenheten
Bekräftning att provet går att analysera		Beslut om vård

När apparatur har blivit lättare att använda, minskar felen inom analytiska fasen och arbetsmomenten inom preanalytiken och postanalytiken blir allt viktigare. Rätt provtagningssätt, samt analysering och sparande av resultaten är faktorer som blir allt viktigare. Kvaliteten av snabbdiagnostik kan förbättras med att utbilda personalen som använder sig av den väl. Utbildningen kan utföras av en representativ från företaget som utvecklat testet, eller avdelningens POC-ansvariga. Utbildningen skall vara förberedd så att alla områden och detaljer går igenom. Också i snabbdiagnostik kommer fram laboratorieprocessens tre faser (Tuokko et al, 2008)

Ett problem med POC-tester kommer från användargruppen. För att användaren oftast inte har laboratorieutbildning, saknas information om kvalitetskontroll. POC-tester blir ofta som en extra uppgift i en redan hektisk arbetsmiljö. Det finns oftast inte tid för kontroller, felsökning eller service. Enligt studier sker det mera preanalytiska fel för POC-användare, än för laboratoriepersonal. (O’Kane et al, 2011). Att registrera svaren från testerna hör till postanalytiska fel och händer speciellt med bärbara apparater. Många apparater skickar iväg svaren direkt till databasen. I sådana situationer är det väldigt viktigt att identifiera patienten. Alla apparater kan inte läsa sträckkoder, så man måste mata in information för hand. Manuell inskrivning ökar chansen för fel (Shaw, 2016)

Ett idealt POC-test beskrivs som följande: första resultaten på under en minut, bärbart instrument, har möjlighet att analysera obearbetade prover (helblod, urin, faeces etc), enkla arbetsmoment, resultaten jämförbara med resultaten från ett centraliserat laboratorium, integrerade kontroller och kalibrationer, möjlighet att skicka eller spara resultaten och låg kostnad. POC-testernas huvud användningsområde är både på ett sjukhus samt vårdanstalter utanför ett sjukhus. På sjukhusen kan de användas på t.ex. operationssalar,

förlossningsavdelningar, dialys. Annanstans än sjukhus kan vara t.ex. Läkarmottagningar, apotek, patientens hem och naturkatastrofområden (Dima, 2021)

Marknaden för POC-tester är en viktig del av in vitro diagnostikmarknaden, upp till 30%. Värdet av den globala marknaden uppskattas stiga kraftigt över de kommande åren, upp till 43 miljarder euro till året 2025 från 25,4 miljarder euro år 2020. Teknologiska framsteg inom industrin, högre insidens av infektionssjukdomar och ökat stöd är huvudorsakerna till denna snabba tillväxt. De största bolagen inom dessa marknad är bl.a. Abbott (USA), Roche (Schweiz) och Siemens (Tyskland) (Dima, 2021).

## 4 Immunokromatografiska tester (LFI)

*Lateral flow immunoassay* (LFI) eller *lateral flow immunochromatographic assay* är en av de mest använda metoderna inom POC-tester. Den mest kända och första formen av dessa var för detektion av humant koriongonadotropin (hCG) (Creative Diagnostics, 2019).

LFI används också inom mat- och jordbruksindustrin. LFI används för detektion av antikroppar, antigen och PCR-produkter. För att testerna kan användas med blod, serum, saliv, svett, plasma, urin etc., är utbudet på tester mångfaldigt. LFI kan delas in i två olika kategorier: lateral flow immunoassays (LFI) och nucleic acid lateral flow assay (naLFA). Nucleic acid lateral flow assay används för detektion av amplifikationsprodukten som bildas under polymeraskedjereaktionen (PCR). Lateral flow immunoassays kan vidare delas in i tester som detekterar antikroppar, och de som detekterar andra ämnen (proteiner, hormoner, etc) (Koczula & Gallotta, 2016).

LFI detekterar antigen, hormoner etc i ett prov genom att bindas med antikroppar. Provet rör sig genom testens olika zoner med hjälp av kapillärkraft. I ena ändan av testet läggs provet först på en provdyna ”sample pad”. Provdynan har flera roller, men viktigaste är att jämnt dela ut provmaterialet och styra det till konjugations zonen. Provdynan innehåller ytaktiva ämnen samt andra vätskor för att göra provmaterialet lämpligt för detektion. Porerna i provdynan fungerar också som filter för att ta bort material som kan störa testet. T.ex. erythrocyter vid tester med helblod.

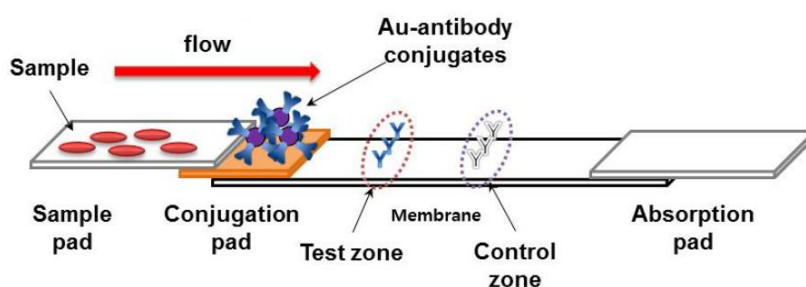
Provet når en konjugations zon där det finns antikroppar specifika för antigenet som ska detekteras. Antikropparna är konjugerade oftast med guldpartiklar eller latex. Konjugations zonen viktigaste uppgift är att hålla komplexen som behövs vid detektion stabila tills testet används. Detta uppnås med bufferter och kolhydrater så som sackaros som fungerar som förvaringsämne. När komplexen torkas i närvaro av sackaros bildar sockermolekylerna ett skikt runt komplexen som gör att deras biologiska struktur hålls stabil. När provet når konjugations zonen upplöses sockermolekylerna och komplexen kommer i kontakt med provmaterialet (Koczula & Gallotta, 2016)

Analyt komplexet rör sig sedan framåt till en detektions zon. Det är en porös zon oftast av nitrerad cellulosa. Här finns det rader av antikroppar eller antigen vars uppgift är att reagera med komplexet som bildades i konjugations zonen. Ifall det har funnits antigen i provet, och det har bildat komplex med antikropparna, binds komplexet i en test zon. Detta

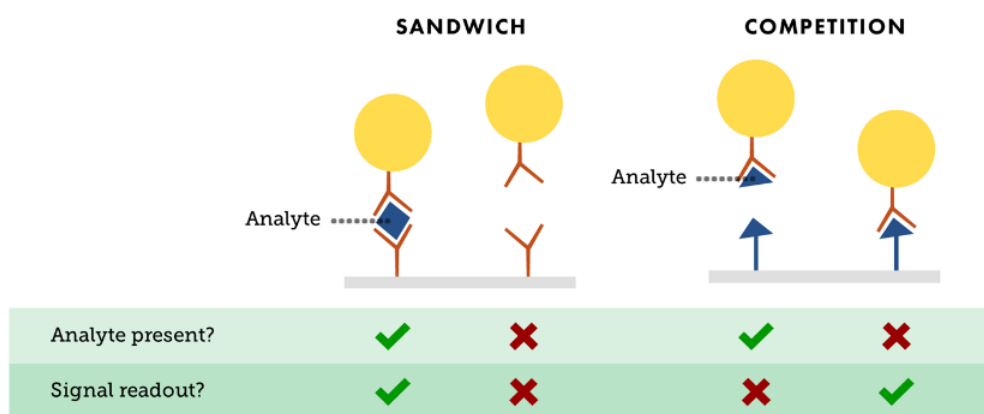
streck som bildas är synligt och kan avläsas med blotta ögat. Det finns också apparatur för att avläsa testremсор. Kontrollinjen som kommer senare i detektionszonen är där för att uppvisa att provet dragits tillräckligt långt. Till sist så finns det en absorberande platta som finns där för att driva kapillärkraften och hindra överlopps spill (figur 7)(Koczula & Gallotta, 2016).

Det finns två sorter av metoder inom LFI: Sandwich format och kompetitive format. Sandwich format används för att detektera större analyter i provet. Om analyten har två epitoper, binds först på ena epitopet antikroppen som är märkt med färgade nanopartikeln. Komplexet som uppstår binder sig sedan på andra epitopet med antikroppen som är fäst i testzonen (figur 8) (Creative Diagnostics, 2019).

Om analyten är mindre och det inte går och binda två antikroppar, används kompetitive format. Sådana analyter kan t.ex. vara vitaminer eller antibiotika. På testzonen finns då protein-analyt komplex och nanopartikel är bundna till antikroppen som binds till analyten. Om det inte finns analyt i provet, binds antikroppen till den på testzonen. Om det finns analyt i provet, binds den till testzonen och förhindrar den märkta antikroppen från att binda till testzonen. Det sker ingen signal, vilket betyder att den omvänt proportionell till mängden analyt (figur 8)(Creative Diagnostics)(Koczula & Gallotta, 2016).



Figur 1 De olika delarna av ett immunokromatografiskt test (Kim & Moon, 2013).



Figur 2 I sandwich assay, när analyten binder sig till antikroppen fäst på testzonen finns det ännu plats för en till antikropp att binda sig till komplexet. Den andra antikroppen har färdigt bunden till sig en nanopartikel som utger en signal när den bundits till analyten. Däremot i competition assay kan inte de nanopartikelmärkta antikropparna binda sig till testzonen om analyten är bunden till den. Det sker alltså ingen signal i närvaro av analyten (NanoComposix, 2021)

Membranen med detektions-zonerna är oftast tillverkad av nitrerad cellulosa. Men det finns också ”pelar baserade” tester där membranerna ersätts med en mikropelarrad (micropillar array). Dessa tester används för detektion av DNA och reglerar kapillärflödet effektivare. Vid val av membran är kapillärkraften och immobilisering samt binding av proteiner viktiga egenskaper. Porerna på membranerna är av varierande storlek från 0,05 till 12  $\mu\text{m}$ , men de är inte jämt fördelade (Koczula & Gallotta, 2016).

Absorberingsdynan (absorption pad) i ändan av testet är där för att styra provmaterialet genom membranerna och samla upp överlopps provmaterial. Den möjliggör användning av större volymer av provmaterial som leder till högre sensitivitet. De tillverkas oftast av cellulosa.

För att LFI är antikropp-baserade metoder, kan specificitet och sensitivitet påverkas av molekyler med liknande sammansättningar. Detta kan leda till falska positiva resultat. Testets sensitivitet begränsas av antikropp-antigen komplexets benägenhet att sönderfalla, eller dissociationskonstanten. Beroende på vilken markör som används i testet väljs avläsningsmetoden. Fluoreserande och paramagnetiska markörer kan inte avläsas med blotta ögat och det behövs avläsningsapparat för en kvantitativ analys.

Beroende på hurdan markör som används i ett LFI, kan resultaten vara kvantitativa, semi-kvantitativa eller kvalitativa. Kvantitativa svar ger ett numeriskt värde åt mängden analyt

som finns i provet. Med färgmarkörer, så som guld-nanopartiklar eller färgad latex, kan man använda en optisk avläsare som mäter styrkan av färgen som produceras på test- och kontrollinjen. Kvantitativa svar kan också fås med fluorescerande markörer så som rutenium-komplex, eller paramagnetiska markörer. Gemensamt för de kvantitativa markörerna är att det behövs ytterligare utrustning för att mäta reaktionen (Koczula & Gallotta, 2016).

Färgade markörer kan också användas i semikvantitativa eller kvalitativa LFI. Ett test kan vara utvecklat att ha flera testlinjer för samma analyt, så mängden analyt korrelerar med antalet linjer som färgas. I kvalitativa LFI tolkas resultatet med att visuellt analysera färgreaktionen på testlinjen.

På grund av att LFI inte behövs förvaras nedkyllt och har bra hållbarhet, är LFI ett perfekt verktyg för POC-testing. Resultaten kan tolkas lätt och de kräver oftast inga speciella verktyg eller apparatur. Det krävs oftast ingen behandling av provmaterialet och mängderna som behövs är små. Fastän metoden varit samma länge utvecklas nya tester hela tiden samtidigt som specificiteten och sensitiviteten av existerande tester blir bättre.

#### **4.1 Användningsområde**

För snabbtesttillverkare är marknaden annorlunda i i-länder och u-länder. Detta beror på att diagnostisk mikrobiologi har annorlunda mål i olika förhållanden. I den mest lönsamma marknaden, är snabbtester utvecklade för att bli använda utanför centraliserade laboratorier. Detta innebär akutvård, hälsovårdcentraler och intensivvård. I områden med lite eller ingen infrastruktur för hälsovård, kan det vara svårt att implementera teknologiskt avancerad apparatur i vårdkedjan. I länder med dåliga resurser för laboratorieverksamhet, brister i infrastrukturen eller extrema förhållanden kan implementeringen av snabbtester ha en betydande socio-ekonomisk påverkan. Graviditetstest och glukostest har visat sig vara effektiva och lätta att använda i hemmiljö. Men POC-tester är mera benägna till misstag, och en stor faktor som påverkar är vem som använder testerna.

När automatiserade analysatorer med kapacitet för att köra hundratalsprover blev vanliga inom laboratorieverksamhet uppstod det stora centraliserade laboratorier med stor variation undersökningar. För diagnostik och uppföljning av icke livshotande och kroniska sjukdomar har denna modell logistiska och ekonomiska fördelar. Men vid livshotande infektionssjukdomar har modellen sina brister. Dessa uppstår främst vid kommunikation av

resultat och snabbhet. Den kritiska tiden för behandling av infektionssjukdomar är under 6 timmar, och därför har det föreslagits att snabbtester kan användas ännu effektivare av mindre vårdanstalter och t.o.m. av patienten själv. Instrument skulle utvecklas också att vara lättare att använda, bärbara och prisvärda.

De snabbtester som används i hemmamiljö är oftast immunokromatografiska tester som kan köpas i t.ex. apotek. Under coronavirus pandemin utnyttjade länder olika metoder för testning och en strategi i t.ex. Storbritannien var utdelningen av gratis hemmatest åt befolkningen (Landler & Castle, 2021).

För testning av coronavirus utvecklades också snabbtester, som kan användas med flera olika provmaterial. Det finns kommersiellt både för detektion av antigen och antikroppar. Till skillnad från PCR-tester, identifierar antikroppstesterna inte en aktiv infektion. Istället för att detektera virusets genetiska material identifierar antikroppstesterna markörer för en respons från immunförsvaret, IgM, IgG och IgA antikroppar producerade av B-celler. Antigen snabbtesten baserar sig däremot på detektion av ytmolekyler på viruset (Abbasi, 2020).

Testerna har både hög specificitet och sensitivitet, men det finns faktorer som kan påverka resultaten. Utan utbildad personal som tar provet, kan man inte garantera att provet tagits på rätt sätt. Detta leder till falska negativa svar. Olämplig förvaring och frakt av testerna kan påverka testernas funktion.

Den största positiva faktorn med hemmatester är att de skapar mindre tryck på hälsovården. Patienter kunde testa sig själva och söka sig till hälsovården bara om de fått ett positivt resultat. Då blir det också mindre sannolikt att patienter skulle smitta sjukvårdspersonal.

## **5 Amplifierande metoder**

Metoder för detektion av nukleinsyror är nu vardagliga inom diagnostiken av infektionssjukdomar. Mängden av olika kommersiella tester och analyt specifika reagens har ökat användningen inom kliniska laboratorier. Framsteg inom real-time PCR, nukleinsyra sekvensering, mikromatris (DNA microarray) och proteomik har skapat nya möjligheter för diagnostik. Dessa framsteg har minskat laboratoriernas beroende av odlings-baserad diagnostik (Cameron, Bohrhunter, Taffner, Malek & Pecora, 2020).

Det finns applikationer i POC-diagnostik av amplifikationsmetoder, men alla kan klassas som snabbdiagnostik när man jämför med odlingsmetoder. Speciellt inom virologin har amplifikationsmetoder blivit populära tack vare deras sensitivitet. När en negativ virusodling kan ta upp till 2-3 veckor möjliggör amplifikationsmetoder snabbare vård åt patienten (Loginov & Lappalainen, 2021).

Det finns flera olika slag av amplifikationsmetoder, men de kan delas in i kategorier beroende på vad som amplifieras, målnukleotiden eller signalen som uppstår från närvaro av analyten.

Alla amplifikationsmetoder av analyten delar samma princip. De använder sig av enzymer som syntetiserar kopior av av målnukleinsyran. I alla dessa tekniker detekteras amplifieringsprodukten av två oligonukleotid-primers, som binder sig till komplementära sekvenser på motsatta ändor av dubbelsträngade analyten. Dessa tekniker producerar miljontals kopior av målsekvensen i en relativt kort tid, och produkten kan användas till vidare amplifikation (Nolte & Caliendo, 2007).

Metoderna ger snabba svar jämfört med odlingsmetoderna. I vanlig polymeras kedjereaktion, om det används färdiga kit, får man svar redan några timmar efter provtagningen. Metoden har vidare utvecklats för att kunna observera reaktionen i real tid, och på så sätt kan positiva svar ges ut snabbare än vid vanlig PCR. Ett prov kan också analyseras för flera målgener på samma körning, med hjälp av multiplex PCR (Walker-Daniels, 2012).

## 5.1 Polymeras kedjereaktion (PCR)

PCR, polymerase chain reaction, är en genteknologisk metod som används för att öka mängden DNA man har. Det finns variationer av PCR där man kan amplifiera också RNA eller cDNA. PCR har flera applikationer men inom diagnostiken används PCR för att amplifiera en patogens arvs massa för att kunna lättare detektera den (Walker-Daniels, 2012).

För reaktionen krävs primers, som är konstgjorda oligonukleotider för att hitta sekvensen som skall amplifieras. dNTPs är fria nukleotider som bygger upp den nya sekvensen. På samma sätt som DNA-replikation som sker i våra celler krävs också fria nukleinsyror i en PCR-reaktion. PCR-buffert används för att reglera pH under reaktionen. Magnesiumklorid har en viktig roll i en PCR-reaktion.  $MgCl_2$  gör att magnesiumjoner kan frisättas, som i sin

tur påverkar de fria nukleinsyornas funktion. Det behövs också ett DNA-polymeras som kan tåla värme, så som taq-polymeras. Allt detta läggs i en PCR-apparat som höjer och sänker temperaturen i cykler för att amplifiera målsekvensen (Walker-Daniels, 2012).

Hela reaktionen är uppdelad i fyra faser. Under denaturering, om man har dubbelsträngad DNA som mall, dras den isär när temperaturen höjs (94-96°C). Vätebindningarna mellan kvävebaserna bryts. När hybridisering skall ske, sänks temperaturen till 50-65°C. Detta kallas en inbindningstemperatur, som tillåter primers att hybridisera till DNA-mallen. Under elongering höjs temperaturen till 72°C. Taq-polymeraset binder sig till primers och syntetiserar en ny komplementär sträng (Walker-Daniels, 2012).

## **5.2 Omvänt transkriptas-PCR-metoden (Reverse transcriptase PCR, RT-PCR)**

I omvänt transkriptas-PCR börjar man med omvänd transkription som följs av PCR. Enzymet omvänt transkriptas syntetiserar komplementärt DNA (cDNA) från RNA. Den största skillnaden mellan PCR och RT-PCR är att PCR använder dubbelsträngat DNA som mall, medan RT-PCR använder RNA. RT-PCR är en av de sensitivaste metoderna för detektion av mRNA. Mallen för amplifieringen kan vara viralt, bakteriellt eller humant RNA.

## **5.3 Multiplex PCR**

I multiplex PCR används två eller flera primers designade för amplifikation av olika målsekvenser i samma lösning. Med denna teknik kan flera än en målsekvens amplifieras i samma provrör. Primers i en multiplexlösning måste väljas noggrant så att de har en liknande hybridiseringstemperatur. Multiplex PCR är komplicerade att utveckla och är mindre sensitiva än PCR med en uppsättning primers.

## **5.4 Realtids-PCR (Real Time PCR)**

Polymeraskedjereaktion (PCR) är en metod av att amplifiera enstaka DNA-strängar för att skapa ett obegränsat antal av kopior.

För att reaktionen skall fungera behövs DNA primers, DNA-polymeras (taq-polymeras), nukleotider, buffertlösning och joner. Genom att upphetta och kyla ner lösningen i sk cykler. När lösningen hettas upp denatureras DNA. Vid kylning, binds primers till komplementära sekvenser på respektive DNA sträng. Taq-polymeraset tillsätts och temperaturen höjs. Från enkelsträngda DNA syntetiserar DNA-polymeraset dubbelsträngat DNA (Solunetti, 2019)

Realtids PCR är en form av polymeraskedjereaktion, där reaktionens gång kan observeras i realtid. Samtidigt kan en relativt liten mängd av PCR produkten (cDNA, DNA, RNA) amplifieras. Metoden baserar sig på detektion av en fluoreserande rapportör-gen. Fluoreserande rapportör-generna kan vara t.ex. SYBR Green för dubbelsträngat DNA eller sekvensspecifika sonder som t.ex. TaqMan Probes. Baserat på vilken rapportör-gen används kan man dela real-time PCR i två kategorier: icke-specifik detektion med DNA-bindande färger och specifik detektion med specifika sonder (Premier Biosoft, 2019)

#### **3.4.1 Icke-specifik realtids-PCR**

När man använder realtids PCR med DNA-färger detekterar man fluoresensen i produkten som amplifieras vid varje cykel. SYBR Green är den mest använda färgen specifik för dubbelsträngat DNA. Den binder sig vid helixens *minor groove*. Etiniumbromid kan också användas men på grund av att det är carcinogent har man bytt till mera säkra ämnen. Detta betyder att SYBR Green och liknande färgämnen inte är specifika. (Premier Biosoft, 2019)

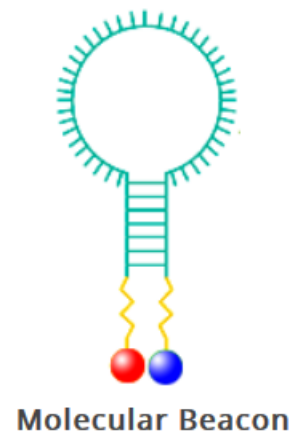
#### **3.4.2 Specifik realtids-PCR**

För att detektera specifika sekvenser behövs sonder. Oligonukleotider märkta med fluoreserande ämne och en dämpare (quencher). Oligonukleotiden bildar en ögla med dämparen och färgen på ändorna. Sonden delas in i fyra delar: Ögla, på 18-30 baspar som är komplementär med målsekvensen. Stammen, 5-7 baspar lång och komplementerar andra ända på oligonukleotiden. 5'-färgämnen, som fluoreserar i närvaro av målsekvensen. 3'-quencher, färg som är kovalent bundet till 3'-ändan på oligonukleotiden när den är som en stängd ögla. Hindrar 5'-färgämnet från att fluorescera.

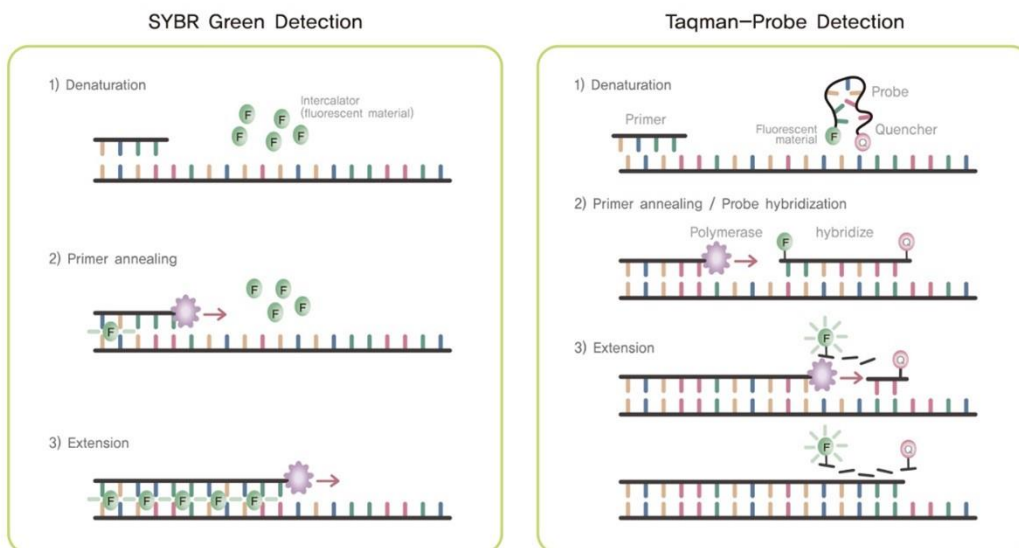
I närvaro av en målsekvens öppnas stam-delen och oligonukleotiden hybridiserar med målsekvensen. När ögla öppnas hindrar inte 3'-quencher mera färgämnet från att emittera

ljus. I en real-time PCR apparat detekteras ljuset som korrelerar med mängden målsekvens det fanns i provet (Premier Biosoft).

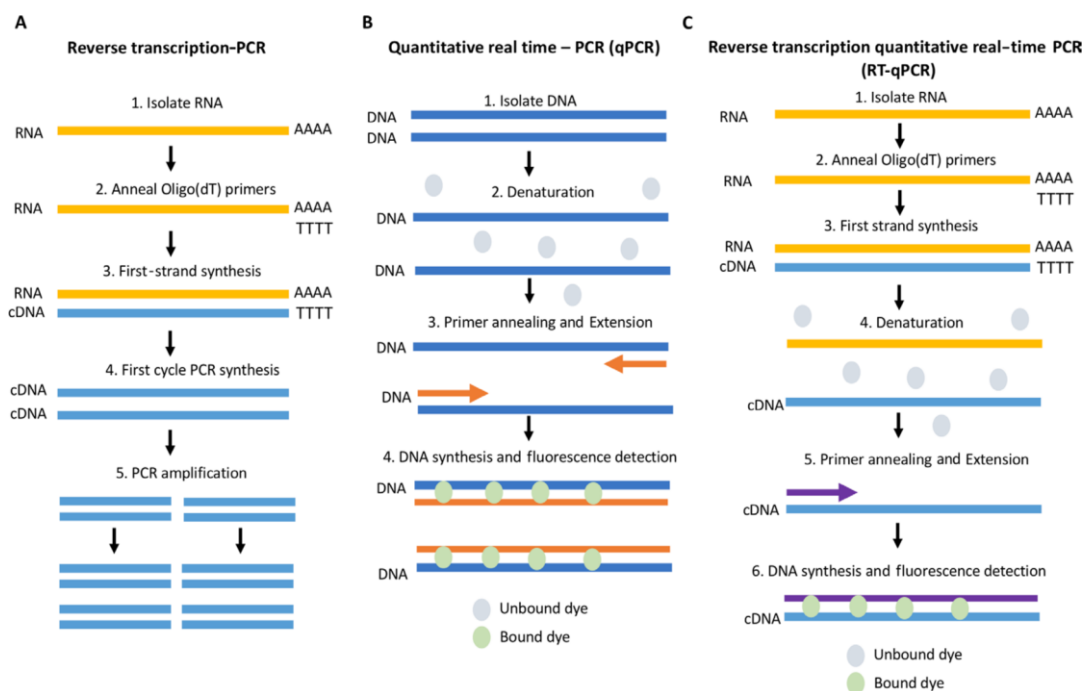
Taqman-sonder som är ett varumärke av Roche diagnostics skiljer sig lite till funktion. Oligonukleotider är inte hydrolyserad, och färgämnet på 5'-ändan är skilt från quenchern i 3'-ändan. Skillnaden mellan är längden av oligonukleotiden som gör att fluorescens kan observeras i bakgrunden. Under PCR binder sig sonden mellan forward och backward primern på sekvensen som korrelerar med sonden. Polymerasen syntetiserar en ny DNA-sträng komplementär till templatet där sonden är bunden. Polymeraset klyver proben, som frigör färgämnet. För att färgämnet inte längre är så nära quenchern stiger fluorescensen (Premier Biosoft, 2021).



**Figur 3 Oligonukleotid med, ögla, stam, färg och quencher (PREMIER Biosoft, 2021)**



**Figur 4 Skillnad i funktion mellan SYBR Green probes och Taqman probes (Sagar Aryal)**



**Figur 5** Schematisk bild över de olika momenten i de olika PCR-metoderna. **A:** RNA isoleras och cDNA bildas med omvänd transkription. Sedan utförs PCR för att amplifiera målgenen. **B:** DNA isoleras och amplifieras. Mängden DNA kvantifieras med hjälp av fluorescerande ämnen. **C:** Realtids-PCR kombinerat med omvänd transkription. RNA isoleras och cDNA bildas före realtids-PCR. (Adams, 2020)

### 5.4.1 På vårdavdelningar

Ett utmärkt exempel på hur snabbdiagnostik kan implementeras till en vårdavdelning är hur man övergått från bakterieodling till PCR vid screening av grupp B streptokocker (GBS) hos gravida.

Grupp B streptokock (Group B streptococcus, GBS, *Streptococcus agalactiae*) är en bakterie som hör till människans normalflora och det är vanligt att vara en symptomfri bärare. Hos vuxna finns GBS utan att orsaka infektion i mag- och tarmkanalen, vagina, urinblåsa, svalg och på huden. Hos gravida kvinnor, är 10-30% symptomfria bärare. Då har mag- och tarmkanalen eller vagina koloniserats av GBS. Grupp B streptokock sprids med kontaktsmitta. Om mamman är GBS bärare kan fostret smittas i samband med förlossningen (THL, 2021).

*Streptococcus agalactiae* är en betahemolytisk, grampositiv bakterie, vars cellvägg består mestadels av polysackarider. Utanför polysackaridväggen är en polysackaridkapsel som är betydande till virulensfaktorn. Utgående från kapselns omsättning kan GBS-stammar vidare delas upp i olika antigentyper. Stammarna kan vidare uppdelas med hjälp av olika

ytproteiner. Med noggrannare identifikation kan olika stammarna jämföras bättre och effektivare utveckla ett GBS-vaccin.

GBS har flera virulensfaktorer som hjälper den orsaka en infektion hos sin värd. Med hjälp av polysackaridkapseln utanför cellväggen kan bakterien fästa sig till sin omgivning. Kapseln skyddar också bakterien effektivt från kroppens försvarsmekanismer så som fagocyter och komplementsystemet. *Streptococcus agalactiae* producerar flera olika toxiner som orsakar hål i målcellens yta, vilket gör att cellen dör. En av toxinerna, som kodas av *cfb*-genen, är ytantigenen CAMP-faktor som orsakar hemolys. En virulensfaktor är också att GBS kan förändra dens genexpression. På så sätt kan den anpassa sig till dens miljö vid t.ex. syre- eller temperaturförändringar. Med hjälp av den virulensfaktorer kan bakterien överleva i värden och spridas i kroppen (Rajagopal 2009; Madzivhandila 2011)

GBS kan orsaka olika infektioner så som urinvägsinfektioner, sepsis, mjukvävnadinfektioner och hjärnhinneinflammation. I allvarliga infektioner hos vuxna finns det oftast en grundsjukdom i bakgrunden, så som diabetes, cancer eller leversjukdom. GBS kan också orsaka allvarliga infektioner hos äldre eller gravida, men hos nyfödda är GBS en speciellt allvarlig infektionsorsakare. Ungefär en av 100 nyfödda där mamman varit bärare får en infektion. De flesta av de nyfödda som får infektion har symptom under första dygnet. (Lyytikäinen, 2006)

Det finns tre alternativ för identifikation av gravida GBS-bärare. Första metoden är en riskbedömning som baserar sig på tidigare sjukhistoria och symptom som uppstår under förlossningen. Andra alternativet är en bakterieodling i senare skedet av graviditeten (vecka 35-37). Tredje alternativet är en molekylär undersökning när förlossningen skall börja (Hovi, Lyytikäinen, Laitinen & Mäkelä, 2007)

En bakterieodlings fördelar är att materialen är billiga och bakteriestammarnas egenskaper är lätt att undersöka med andra metoder. Också stammens antibiotikaresistens kan bestämmas i samband med en positiv odling. Bakterieodlingarnas tolkning och hantering kräver dock kunskaper och specialiserad personal. En odlad skål inkuberas i ett dygn före man kan kolla om det finns växt. Med hjälp av latexagglutination eller MALDI-TOF kan man identifiera GBS från övrig bakterieväxt.

Användning av en molekylär undersökning direkt på vårdavdelningen har blivit möjlig med utvecklingen av lättanvända real-time PCR apparatur, som t.ex. Cepheid GeneXpert GBS. Cepheid GeneXpert GBS är en kvalitativ in vitro metod som används vid GBS-

diagnostik från vagina eller rektumprov. Under PCR-reaktionen känner primers och probes igen *cfb*-genen i 3' ändan hos *Streptococcus agalactiae*. Systemet uppgörs av apparaten, en dator och datorsystemet. Det behövs också reagenskassetter, där PCR reaktionen sker.

Provet läggs i kassetten, som läggs i apparaten och datasystemet tolkar svaret. Inre kontrollerna SPC (sample processing control), IC (internal control) och probe check sker i samband med varje körning. SPC kontrollerar att provet har bearbetats på rätt sätt. IC kontrollerar att det inte fanns faktorer som imhåller PCR-reaktionen och reagensernas funktion. Med probe check mäts probernas fluorescens innan reaktionen påbörjas, som försäkrar att de fungerar på rätt sätt. Hela reaktionen tar ca 50 minuter (Cepheid, Kimura et al. 2013)

Flera undersökningar har utförts för att jämföra odlingsmetoden och molekylära diagnostiken av GBS. Enligt El Helali et al. 2009, är PCR-metoden väldigt sensitiv för indentifikation av GBS-bärare. Användningen av GeneXpert har hjälpt identifiera de som behöver antibiotikapofylax, också hos de som föder för tidigt. Testet var lätt att använda, och lämpar sig till dejouranvändning på grund av korta analysiden. Begränsningarna hos tidigare PCR-metoder har varit att användaren behöver specialutbildning eller laborieutrustning. (El Helali, Nguyen, Giovanrandi & Trinquart, 2009)

PCR-testerna kan också minska på onödvändig användning av antibiotikabehandlingar. Jämfört med bakterieodlingar som görs i slutskedet av graviditeten minskar PCR-test användningen av oödig behandling (Poncelet-Jasserand, Varlet, Chauleur, Seffert, Siani, Pozzetto & Ros, 2013)

## **6 Signalamplifikation**

Signalamplifikation utvecklades som ett alternativ till målamplicerande metoder så som PCR, för att minimera risken för kontaminationer. Till skillnad från PCR, använder signalamplifikation inte sig av enzymer (Wang, 2016)

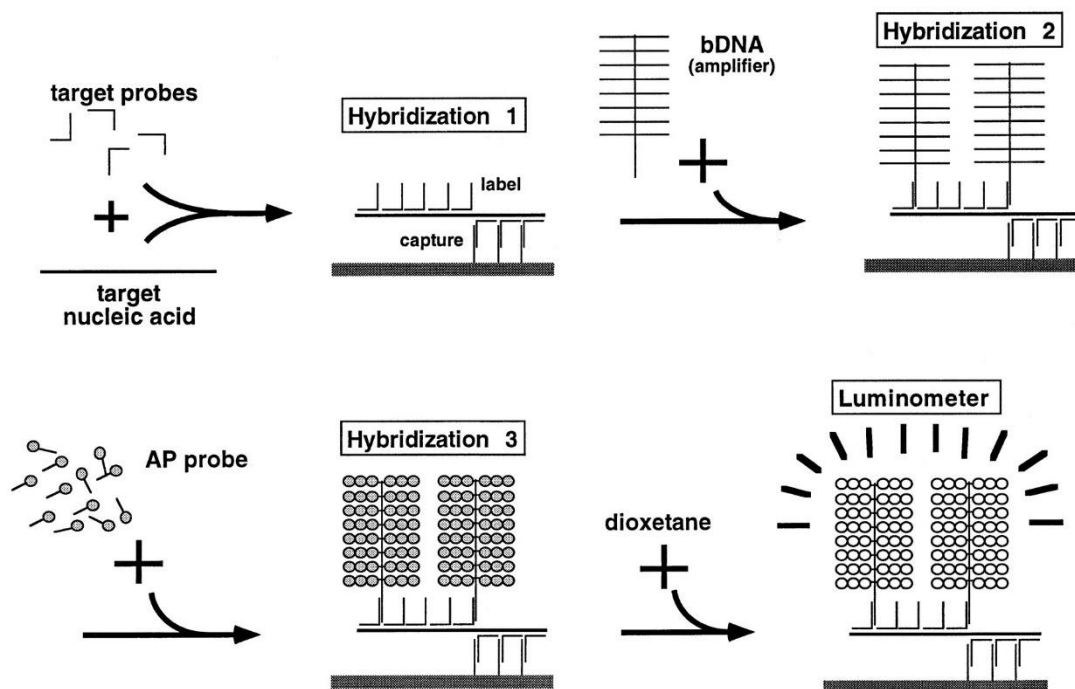
I signalamplifikation vid PCR ökar inte koncentrationen av proberna eller målsekvensen. Den ökade sensitiviteten kommer från amplifiering av koncentrationen markerade molekyler bundna till målsekvensen. Signalamplifikation har ofta inte lika hög sensitivitet som målsekvensamplifiering men den har några fördelar. I signalamplifikation förändras

inte mängden målsekvenser i ett prov. Detta betyder att signalen är direkt proportionell till mängden målsekvenser i provet. Till följd av detta minskar mängden falska positiva som orsakats av kontaminationer. För att signalamplifieringsmetoder är inte beroende av enzymatiska processer för att amplifiera målsekvensen, är de inte påverkade av enzyminhibitorer i kliniska prover (Nolte & Caliendo, 2007)

## **6.1 Branched DNA-metoder (bDNA)**

Populäraste signalamplifieringsmetoden som används är branched DNA (bDNA) - metoden. Metoden används ofta inom virusdiagnostik så som t.ex. HIV-1 och Hepatit B (Lappalainen, Söderlund, Piiparinen, Puolakkainen, Mannonen, Suni, Bonsdorff, Koskiniemi, Hyypiä, Vaheeri & Hedman, 1999). Fördelarna med bDNA-metoden är att den inte kräver isolering, rening eller amplifiering av RNA eller DNA. Vilket som helst provmaterial kan användas: helblod, bakterier, virus men också isolerat DNA eller RNA (Fuchs, Truisi, & Hewitt, 2013).

Flera mål-specifika prober används för att fånga målnukleinsyran på ytan av en mikrotiterbrunn. En till uppsättning av mål-specifika prober binder sig också till målsekvensen. Preamplifikationsmolekyler binder till andra uppsättningen av målprober och upp till åtta bDNA amplifierare. Tre alkaliska fosfatas-markerade prober hybridiseras till varje gren av amplifieraren (Figur 1). För detektion av markerade bundna prober måste det inkuberas med dioxetane, och ljusreaktionen mäts med en luminometer. Reaktionen är direkt proportionell till mängden analyt i provet och tolkas med en standardiserad kurva (Nolte & Caliendo, 2007)



Figur 5 Schema av momenten som ingår i bDNA metoden: Målsekvensen fångas av prober i ett fast medium, en till uppsättning målprober binder sig till målsekvensen. Dessa prober binder sedan en amplifierare (bDNA), som i sin tur binder sig till AP-prober (alkaline fosfatase). ref: Wang et al

## 6.2 Hybrid Capture Assay-metoden (HCA-metoden)

Hybrid Capture Assay är en metod som används t.ex för screening av humant papillomvirus (HPV). Mål DNA:t denatureras och hybridiseras sedan med en specifik RNA-probe. Denna DNA-RNA hybrid fångas sedan av antikroppar fästa på en microwell-platta. Alkalisk fosfatase konjugerade antihybrid antikroppar binds till de redan bundna hybriderna. De bundna antikroppskonjugaten detekteras genom signalamplifikation med ett kemiskt luminiserande substrat och ljuset mäts med en luminometer. Flera alkalisk fosfatase konjugat binder sig till varje hybridmolekyl, som amplifierar signalen.

Intensiteten av ljuset är proportionell till mängden mål DNA i provet. Tester som utnyttjar hybrid capture assay -metoden finns kommersiellt för t.ex. HPV, *Neisseria gonorrhoeae* och *Chlamydia trachomatis* av Qiagen. (Nolte & Caliendo, 2007, QIAGEN)

## 6.3 Signalamplifikation och immunokromatografiska tester

Signalamplifikation kan i framtiden också tillämpas i pappersbaserade snabbtester, så som LFI. LFI baserar sig på avläsningen av en färgförändring antingen med blotta ögat eller med semikvantitativ apparatur. Störningar orsakade av provet eller testet kan göra

avläsningen utmanande. Detta kan påverka diagnostiken och patientens vård speciellt vid allvarligare tidskritiska infektioner. Signalamplifikation kan vara lösningen till pappersbaserade snabbtesters problem med sensitivitet (Hoang, Phan, Vo, & Cho, 2021).

Ett av de effektivaste sätten att amplifiera färgsignalen i ett LFI är förstora partikelstorleken. Plasmoniska egenskaperna hos nanopartiklar av ädelmetaller kan användas i utvecklingen i nya LFI för att förstärka signalen (Hoang, Phan, Vo, & Cho, 2021). Plasmoniska nanopartiklar är partiklar som kan modifieras att ha olika färgrespons beroende på dess form och storlek. Guld, silver och koppar är populära material för tillverkningen av plasmoniska nanopartiklar (nanoComposix, 2021). SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering), fotoakustisk amplifikation och fotoelektrokemisk amplifikation är andra metoder som används i LFI. Men just nu är testerna komplicerade att producera och apparaturen som används vid avläsning dyr. Det behövs vidare utveckling för att kunna nå kraven av ett POC-test (Hoang, Phan, Vo, & Cho, 2021).

## **7 Snabbdiagnostik och respiratoriska virus**

Respiratoriska virus är en stor hälsorisk runt om världen, och därför har det varit en stor press på att utveckla snabbare diagnostik. WHO uppskattar att 3,9 miljoner människor avlider på grund av akuta virala infektioner varje år. Respiratoriska virusinfektioner ökar risken för bakteriella infektioner så som lunginflammation eller sepsis. Hos barn under 5 år är mortaliteten av influensa och respiratory syncytial virus (RSV) ca 300 000 per år. Andra respiratoriska virus så som adenovirus, parainfluensa virus typ 1-4, humant metapneumovirus, humant koronavirus och rhinovirus har inte lika hög mortalitet (Azar & Landry, 2018)

Influensa orsakas av influensa A och influensa B virus. I Finland startar den årliga epidemin mellan november och mars. Epidemierna orsakas oftast av typ A virus men det förekommer också infektioner orsakade av typ B med liknande symptom. Att skilja på influensa och vanlig flunsa utan laborieprover är så gott som omöjligt. Influensa misstänks sällan om det inte pågår en epidemi inom kommunen. Vid en influensa-epidemi är ändå bara hälften av fallen egentlig influensa, med några RSV fall (Duodecim, 2019).

För att symptomen är lik varandra, kan inte bakteriell och viral infektion differentieras utan laborieprov. En snabb metod att identifiera virala infektioner kan hindra onödig användning av antibiotika och försnabbar ordinationen för antivirala medel. Därtill kan

spridningen förhindras och sjukhusvistelser göras kortare. Diagnostiken har utvecklats från virusodlingar och antigen immunoassays till amplifikationsmetoder (Azar & Landry, 2018)

Det finns flera olika metoder för detektion av virus som orsakas luftvägsinfektioner. Alla av dessa kan mera eller mindre kategoriseras som POC-tester. MariPOC-systemet av ArcDia använder sig av en automatiserad sandwich immunoassay som detekteras med two-photon excitation (TPX) teknologi. Apparaturen är simpel att använda och kräver inte laboratorieutbildning, men är ändå relativt stor och kräver laboratorieutrustning. MariPoc kan dock identifiera flera olika respiratoriska virus semi-kvantitativt. Från ett prov kan det identifieras: adenovirus, influensa typ A & B, parainfluensa typ 1 – 3, RSV och metapneumovirus (ArcDia).

Det finns LFI-tester som kan användas på vårdavdelningar för influensa samt RSV. Dessa tester har relativt låg sensitivitet (70-89% Abbott Binaxnow), och därför föredras molekylära metoder. Vid HUSLAB används ett immunkromatografiskt test för influensa A/B, men bara vid influensa-säsong. Utanför säsongen rekommenderas real-time PCR med mycket högre sensitivitet. Speciellt under säsong då det finns mycket influensa-misstankar, är det förmånligare att göra ett snabbare test. Apparatur som utnyttjar molekylär diagnostik har alltid en max kapacitet som leder till förlängda turnaround-tider (HUSLAB).

Oberoende av vilken metod som används är provtagningen ett viktigt moment. Falska negativa svar kan bero på olika saker. För att få viralt material på provtagningsstickan skall den föras tillräckligt långt i nashålan och roteras. Speciellt om provet transporteras till ett annat laboratorium skall provet förvaras kylt, och analyseras inom 48 timmar. Provet kan också ha tagits vid fel tidpunkt i sjukdomförloppet. För influensa finns det mest virus vid 24 – 72 timmar efter symptom uppkommit. Om provet tas utanför denna ram, antingen för tidigt eller sent, kan testet vara negativt (Azar & Landry, 2019).

Nuvarande antigen detektions immunoassays amplifierar varken produkten eller signalen och är därför mindre sensitiva än virusodlingar eller amplifikations tester.

Immunkromatografiska tester finns tillsvidare bara för influensa A/B och RSV, och de säljs som separata tester. För att höja specificitet och sensitivitet använder sig två tillverkare av digitala avläsare för att förbättra tolkningen. Ena använder sig av reflektans från kolloidala metallpartiklar för att tolka signalens intensivitet (BD Veritor; Becton Dickinson Diagnostics) och andra fluorescensmärkta antikroppar som tillåter fluorimetrisk detektion (Sofia; Quidel Corp.) Dessa digital immunoassays (DIA) kommer med flera fördelar. De ger testet högre sensitivitet, minskar misstag vid avläsning, reagens och

patientinformation kan skannas, och resultaten kan skrivas ut eller överförs direkt till laborationssystemet. För att ett immunkromatografiskt test skall bli positivt krävs  $10^5 - 10^6$  viruspartiklar. Tillverkarna anger ofta en sensitivitet av 82 – 99%, men flera studier har fått resultat med mycket lägre sensitivitet. Fastän specificiteten av testerna är höga, rekommenderas inte användning av immunkromatografiska tester utanför influensasäsong. Fördelarna med immunkromatografiska tester är låga kostnader, enkelhet, korta analystider och när resultaten tolkas visuellt krävs ingen apparatur. Prover kan testas individuellt direkt efter provtagning. Billiga avläsare kan höja sensitivitet och noggrannhet (Azar & Landry, 2019).

På grund av deras högre sensitivitet, är amplifikationsmetoder den föredragna metoden för diagnostik av respiratoriska virus. NAAT (nucleic acid amplification test) har tidigare krävt komplicerad apparatur, flera arbetsmoment och utbildad personal. Men under de senaste åren har teknologin utvecklats så att de kan användas som POC-instrument. Det finns flera olika metoder som kan klassificeras som NAAT. Isothermal amplifikation används (ex. Abbott Influenza A/B), real-time reverse transcriptase PCR (ex. cobas Liat influenza A/B, nested multiplex PCR (ex. EZ respiratory panel) och real-time PCR kombinerat med testremsa (Accula Flu A & Flu B). I alla former läggs obehandlat prov i en kassett som ställs i apparaten, och inkuberas i 10-60 minuter.



**Figur 6** Abbott ID NOW (ovan) är ett molekylärt kvalitativt POC-test för influensa typ A och B. Testet utnyttjar nicking enzyme nucleic acid (NEAR) isothermal amplifikation, som håller temperaturen konstant. Jämfört med PCR som hettar upp och kyler ner lösningen i cykler. Reagenserna i testkassetterna öppnar upp virus för att få fram RNA. Reagensen identifierar specifika sekvenser och de amplifieras. Varje RNA-produkt binds med sonder märkta med fluorescerande ämnen. Fluorescensen mäts och om det överskrider en specifik mängd är testet positivt. Bild: Abbott ID NOW

I laboratorier, minskar användningen av NAAT risken av kontaminationer pga slutna system. Huvudanvändargruppen av POC-instrument är trots allt personal utan egentlig laboratorieutbildning. Instrument, bord och händer kan bli kontaminerade av starkt positiva prover, kontroller, eller av amplifikationsprodukter om de inte hanteras korrekt. Problem med testerna kan uppstå till följd av dålig skolning, slarvig eller ingen underhållning av apparaten samt oaktksamhet med kvalitetskontroller (Azar & Landry, 2018)

Kostnaderna för NAAT samt möjliga serviceavtal är betydligt högre än immunkromatografiska tester. För att apparaturen kan analysera bara ett prov åt gången är provmängderna en begränsande faktor. På grund av detta kan det behövas flera apparater för att kunna analysera alla prover under influensasäsonger, som sedan står oanvända när provmängderna är mindre. Ogiltiga svar som måste köras om och tekniska fel kräver tid och resurser. (Azar & Landry, 2018)

För att virus kan förändra så snabbt kan sensitiviteten av test plötsligt sjunka. Detta hände för Cepheid GeneXpert Flu och Roche cobas Liat mellan 2014 och 2015. En förändring hade skett i grupp 3C av influensa A H3N2 så den inte kunde detekteras av testerna. Detta ledde dock till förbättrade tester så som med Cepheid Xpert som använder nu två målsekvenser (Azar & Landry, 2018).

## **7.1 PCR-tester för coronavirusdiagnostik**

Molekylära tester, så som real-time PCR har länge varit en stor del inom diagnostiken av infektioner. Metoden har också varit den vanligaste i diagnostiken av COVID-19. Höga sensitiviteten av PCR-tester möjliggör att bara små mängder av viruset kan upptäckas. Trots detta, fanns det i början av pandemin en stor oro om falska negativa testsvar (YLE, 2020). Falska negativa innebär att en infektion har funnits i en patient trots att testsvaren har blivit negativa. Motsatsen falska positiva är när testet är positivt men infektionsorsakaren inte funnits. Flera undersökningar visade att COVID-19 tester från övre luftvägarna som utfördes med real-time PCR kunde sensitiviteten vara så låg som 60%. Men när det samlades in mera data kom man till slutsatsen att provtagningen hade väldigt stor påverkan i detektionen av viruset. Hur lång tid efter symptomen uppstått har provet tagits, typen av prov och provtagninssättet blev då de största påverkande faktorerna. Mängden virus är störst i övre luftvägarna de första dagarna när patienten har symptom, oftast 5-7 dagar efter

exponering. Därefter minskar mängden under följande vecka. I senare skeden av infektionen (1 vecka efter symptomen börjat) finns största chansen av detektion i prover från nedre luftvägarna, så som upphostningsprover och BAL-prover (bronkoalveolärt lavage). När så många olika faktorer påverkar detektionen av viruset blir det svårt att tolka om provet faktiskt varit ett falskt negativt.

För att molekylära tester kan ge positiva svar för patienter som haft COVID-19 länge efter symptomen upphört har det funnits intresse i att också svara till beställaren mängden PCR-cykler som krävdes för detektion. Många real-time PCR tester uppger ett värde (*cycle threshold value*) för hur många cykler av amplifikation krävdes för detektion. Detta värde är då omvänt proportionellt till mängden virus i provet. Värdet är dock inte kvantitativt för att det påverkas av flera faktorer, så som målgenen av testet och kvaliteten av provet (Binnicker, 2020).

För testning av coronavirus utvecklades också snabbtester, som kan användas med flera olika provmaterial. Det finns kommersiellt både för detektion av antigen och antikroppar. Till skillnad från PCR-tester, identifierar antikroppstesterna inte en aktiv infektion. Istället för att detektera virusets genetiska material identifierar antikroppstesterna markörer för en respons från immunförsvaret, IgM, IgG och IgA antikroppar producerade av B-celler. Antigen snabbtesten baserar sig däremot på detektion av ytmolekyler på viruset (Abbasi, 2020).

Testerna har både hög specificitet och sensitivitet, men det finns faktorer som kan påverka resultaten. Utan utbildad personal som tar provet, kan man inte garantera att provet tagits på rätt sätt. Detta leder till falska negativa svar. Olämplig förvaring och frakt av testerna kan påverka testernas funktion.

Den största positiva faktorn med hemmatester är att de skapar mindre tryck på hälsovården. Patienter kunde testa sig själva och söka sig till hälsovården bara om de fått ett positivt resultat. Då blir det också mindre sannolikt att patienter skulle smitta sjukvårdspersonal.

## 8 MALDI-TOF

Masspektrometri är en metod där kemiska föreningar joniseras till laddade molekyler och deras förhållande mellan massa och laddning mäts.

Senaste årtiondet har MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight) möjliggjort snabbare identifikation av patogener än traditionella biokemiska metoder. När identifikation med biokemiska metoder kan ta flera dygn, kan MALDI-TOF identifiera en mikroob från en ren odling på några minuter eller rakt från en positiv blododling på ca 20 minuter. Trots att MALDI-TOF är ett verktyg vanligen reserverat för centraliserade laboratorier, kan också anses vara POC-apparatur. Den möjliggör billig och snabb diagnostik som kan utföras av personal utan laboratorieutbildning (Chabriere, Bassène, Drancourt, & Sokhna, 2018)

Identifikation av en mikroob med MALDI-TOF baserar sig på ribosomala proteinernas och peptidernas ”proteinspektrum”, eller peptidfingeravtryck (peptide mass fingerprint). En bakteriekoloni flyttas över från en odlingskål till en platta, och på den pipetteras ett matrix. Matrix är kristalliserade molekyler, oftast sinapinsyra eller kanelsyra, blandat med destillerat vatten och ett organisk lösningsmedel som etanol eller asetonitril. Tillsättning av både vatten och organisk lösningsmedel gör att både hydrofobiska och hydrofila molekyler kan lösa upp sig. När man pipetterat matrixet och låtit det torka, blir det kvar ett kristalliserat matrix men nu med analyten inbäddad. Plattan med provet läggs in i masspektrometern, där proteinerna joniseras med hjälp av laser. I ett vakuum flyger joniserade proteinerna mot en detektor. Tiden mäts, och baserat på den tiden mäts förhållandet mellan massa och laddning. Varje bakterie och svamp har ett eget proteinspektrum. Med att jämföra databaser med kända proteinspektrum mot analytens kan bakterien identifieras TOF (Harju & Grönroos, 2020).

Billiga reagenser och material i kombination med pålitliga svar är stora fördelar för MALDI-TOF. Det uppskattas att det kostar ungefär 0,70€ per bakterie identifierad. Trots att själva apparaten och programmet kostar mellan 150 000€ och 250 000€ beroende på tillverkare och databasen, är MALDI-TOF mycket förmånlig jämfört med tester baserat på identifikation av nukleinsyra som kan kosta mellan 10€ och 100€ per test TOF (Harju & Grönroos, 2020)

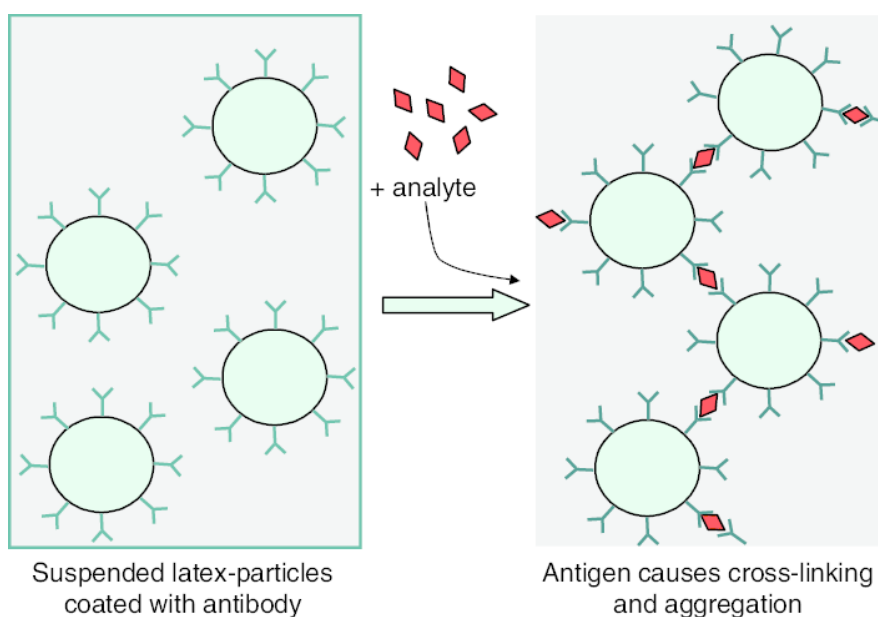
För en läkare är inte MALDI-TOF bara nyttig med försnabbade odlings svar, men också ökat noggrannheten i identifikationen av flera kliniskt betydelsefulla bakteriegrupper. Till

exempel infektioner orsakade av *Actinomyces* -arter kan lättare identifieras med hjälp av MALDI-TOF. Samma gäller koagulasnegativa stafylokocker, där en stor del hör till normalfloran. Viktigaste av patogener i denna grupp är *Staphylococcus lugdunensis* och *Staphylococcus pseudintermedius* som kan ha liknande virulenta egenskaper som *Staphylococcus aureus*. Tidigare har dessa arter svarats som koagulasnegativa stafylokocker eller felaktigt identifierats som *Staphylococcus aureus* (Harju & Grönroos, 2020).

I bakteriemiska infektioner krävs en odling i blododlingflaskor för att få en tillräckligt stor bakteriebiomassa för diagnostik. För att bakteremi (sepsis) kan vara livshotande är det viktigt med tidig antibiotikabehandling. Med MALDI-TOF förkortas tiden från en positiv blododling till slutligt laboratoriesvar anmärkningsvärt. Olika metoder har utvecklats för att kunna direkt ur blododlingsflaska identifiera olika bakterier och jästsvampar med MALDI-TOF (Harju & Grönroos, 2020).

## 9 Latex agglutination

Latex agglutination kan användas för flera ändamål men inom mikrobiologin för detektion av olika bakterier. Provet som innehåller specifikt antigen reagerar med antikroppar bundna till latexkroppar. Om det finns specifika antigenet i provet klumpas latexkulorna ihop dvs agglutinerar. Latex agglutination används som POC-test för bl.a. hepatit B.



**Figur 7** Funktion av latexagglutinationstester (Gubala & Klein 2014)

*Cryptococcus* är ett släkte av svampar, som kan orsaka hjärnhinneinflammation speciellt hos patienter med nedsatt immunförsvar. Kryptokockmeningit är en av de vanligaste dödsorsakerna för AIDS-patienter. Vid misstanke av kryptokockmeningit tas serumprover och cerebrospinalvätska. I ett laboratorium för mikrobiologi färgas och mikroskoperas cerebrospinalvätskan, och odlas på sabouraud agar skålar. Skålarna inkuberas vid 25 °c och 37 °c i två dygn. Serumet testas för HIV. Det finns också ett test som utnyttjar latex agglutination. Testet använder latexpartiklar med anti cryptococcus polyklonalt globulin som detekterar cryptococcus polysackarid antigen som leder till agglutination. Enligt flera undersökningar är sensitiviteten 100% och specificiteten runt 85%. Fastän det alltid görs odling och färgning är ett agglutinations test nödvändigt för snabb diagnostik (Parameshwaran & Naicker, 2019)

## 10 Antibiotikaresistens

Antibiotika används för behandling och förebyggande av bakteriella infektioner, men när bakterien blir motståndskraftig, resistent, mot ett antibiotikum kan detta antibiotikum inte mera användas mot infektionen. En viktig del av arbetet på ett laboratorium för klinisk mikrobiologi är test av antibiotikaresistens. Vanligast sättet är diskdiffusionsmetoden. Där dras bakterien ut på en skål på ett medium där mikroben kommer växa, men man lägger in också lappar med antibiotika. Efter inkuberingen växer sedan bakterien olika långt in mot lappen. Zonerna runt antibiotikalappen mäts och tolkas. Ju större diametern av zonen utan växt är, desto sensitivare är bakterien mot antibiotikan. Detta är den rekommenderade metoden bl.a. av EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (Vasala, Hytönen, & Laitinen, 2020).

### 10.1 Möjligheter inom POC-diagnostik

Ett snabbt sätt behövs dock för att denna metod kan ta flera dygn med långa inkubationstider, och för att runt 50% av antibiotikabehandlingar påbörjas med fel sorts antibiotika och utan ordentlig diagnostik. (Frontiers). Det finns redan flera olika metoder för att snabbt identifiera mikroben som orsakar infektionen, och vissa av dem kan detektera resistensgener, men de behöver ofta en ren odling av bakterien. En snabb metod för identifikation av resistensmekanismer skulle minska användningen av onödiga antibiotikabehandlingar och hjälpa bestämma vilken antibiotika som skall egentligen användas. Vanliga infektioner blir obotliga för att allt flera bakterier blir resistent. I EU dör ca 33 000 personer varje år på grund av infektioner orsakade av resistent bakterier (Vasala, Hytönen, Laitinen 2020).

Innovationer inom mikrofluidik, biosensorteknik, optik och DNA-amplifikation har presenterat nya metoder för testing av resistensmekanismer (Vasala, Hytönen, & Laitinen, 2020). Dock har dessa metoder varit svåra att applicera för POC-testing. Flera av metoderna som utvecklats har krävt tid och resurser som är svåra att applicera till ett användarvänligt POC-test. Rena odlingar av mikroberna, hantering av provmaterialet och krav av ett laboratorium gör också svårt att jämföra kostnaderna mellan traditionella och nya resistensbestämningsmetoder. Snabb diagnostik av dessa resistent bakterier skulle effektivt hindra deras spridning. Det skulle också inte mera behövas patient isolering, som i sin tur också skulle spara på tid och resurser (Vasala, Hytönen, Laitinen 2020).

Bakterier kan bli resistenta genom flera olika mekanismer, vilket gör resistensbestämningen mera komplicerad. Metoder baserat på bakteriens genotyp detekterar bara en sorts mekanism, och det möjligt att detekterade mekanismen inte är från en patogen bakterie. Enligt EUCAST kräver resistensbestämning ett fenotypiskt test, där det undersöks om bakterien växer i närvaro av antibiotikan. Denna metod fungerar oberoende av resistensmekanism och ger svar på hur stor dos det krävs för effektiv medicinering (Vasala, Hytönen, Laitinen 2020).

### 10.1.1 Fluorescerande in situ-hybridisering

FISH (fluorescence in situ hybridization) är ett effektivt sätt att visualisera målorganismen kvantitativt. PNA-FISH (Peptide nucleic acid)s som använder sig av prober som binder sig till ribosomalt RNA, är en effektivare och mera sensitiv metod än användning av prober som binder sig till DNA eller RNA. Kommersiellt appliceras detta av Quickfish technology (USA), som identifierar bakterien genom att detektera 16S rRNA (16S ribosomalt RNA). Deras XpressFISH test detekterar specifikt *mecA* genen i *Staphylococcus aureus*, som tillåter snabb identifikation och diagnostik av meticillinresistens redan 2 timmar efter en positiv blododling. Det är osannolikt för kliniska laboratorium som använder sig av masspektrometri för identifikation av mikrober att använda PNA-FISH. Detta är p.g.a. att det finns kit för detektering av *mecA*-genen som kan användas med MALDI-TOF (t.ex. Bruker MALDI septityper kit PBP2A).

I växande celler finns det mera RNA än DNA, som gör det ett bättre mål för detektion med prober. Speciellt pre-rRNA, ett förstadium till rRNA, är en bra indikator för bakteriemetabolism och växt. Biosensorbaserad resistensbestämning används av Genefluidics Inc. (USA), som mäter bakterieväxt genom att detektera mängden 16S rRNA molekyler med hjälp av en elektrokemisk biosensor. Systemet använder artspecifika prober och kombinerar nanoteknologi och mikrofluidik. År 2018 publicerade Genefluidics ett UtiMAX™ kit för diagnostik av urinvägsinfektioner. Testet kan identifiera mikrober inom 30 minuter och göra resistensbestämningar på 2 timmar men sensitivitet på 100% och specifisitet på 98,2% (Vasala, Hytönen, Laitinen 2020).

### 10.1.2 Genomsekvensering

Whole Genome Sequencing (WGS) är också en möjlighet inom snabbare resistensbestämning. System så som Illuminas MiniSeq eller Pacific Biosciences PacBio Sequel system är relativt snabba på sekvensering. I teorin, skulle WGS kunna identifiera

patogener och detektera antibiotikas målgener i en relativt kort tid. För de flesta bakterier finns det dock för lite eller inget bevis att metoden skulle kunna användas inom resistensbestämning. En stor orsak är att det inte finns en databas för alla kända resistensgener eller mutationer för att kunna jämföra WGS med andra metoder (Vasala, Hytönen, Laitinen 2020).

### 10.1.3 Immunodetektion av resistensmekanismer

Immunokromatografiska tester och lateral flow assays är utmärkta metoder för användning inom POC-industrin. Trots detta finns det bara få tester som direkt kan detektera resistensmekanismer. Alere Inc. har ett test för detektion av MRSA, som baserar sig på en PBP2a specifik IgY-antikropp från hönor. PBP2a är ett protein som kodas av *mecA* genen i MRSA. Detta test kan identifiera MRSA på 6 minuter. Coris Bioconcept har test för detektion av karbapenemaser (OXA-48, KPC) från enterobakteriella isolater. Dessa tester går dock inte att använda direkt från patientprover (Vasala, Hytönen, Laitinen 2020).

## 10.2 Problem med resistensbestämning och snabbdiagnostik

På grund av små provmängder (t.o.m. bara en bakteriecell), är det möjligt att ett test svar inte representerar hela bakteriepopulationen inom ett prov. Tester kan misslyckas p.g.a. icke-optimal atmosfär eller ackumulering av icke-gynnsamma ämnen. Snabbdiagnostik skulle skapa mindre kostnader för vården men molekylära test är dyra jämfört med traditionella metoder. För ett sjukhus med 500 bäddplatser skulle testning av varje positiva blododling med multiplex PCR kosta t.o.m. 500 000€/år i bara reagens (She & Bender, 2019). Förutom att själva instrumenten har höga kostnader. Kostnader för testning kan vara svårt att uppskatta, för att priset på instrument och reagens baserar sig på erbjudanden från försäljaren. Den billigaste metoden för resistensbestämning skulle vara kit för masspektrometri, om man antar ett laboratorium använder sig redan av den metoden. Totala kostnaderna måste jämföras med vanliga fenotypiska resistensbestämningar, som är ca 30-50€/prov. Det finns flera tester som är billigare än så, men de alla kräver rent odlade prover. Testkapaciteten är också en viktig faktor (Vasala, Hytönen, Laitinen 2020).

Bara få av metoderna som används för resistensbestämning kan appliceras i POC-tester. Detta är p.g.a. höga kostnader, krav av laboratorieutrustning, utbildad personal och dålig prestation inom test direkt från patientprover. Användning av amplifikations metoder är effektiva för identifikation och vissa kan också identifiera resistensmekanismer, men rutinanvändning av denna metod för diagnostik är alldeles för dyr.

## 11 Metodik

Detta arbete är en systematisk litteratursökning genom att läsa vetenskapliga artiklar och studier inom området. Källor som använts är skrivna på svenska, finska och engelska. För att hitta artiklar användes sökmotorn Google.

Sökord som användes var: POC-test, vieritutkimus, pikatesti, POCT, rapid diagnostics, lateral flow testing, lateral flow assay, PCR testing, multiplex PCR, reverse transcription PCR, point-of-care, och MALDI-TOF.

För att skilja på de olika artiklarna från kemiska snabbtester specificerade man med: microbiology, POC och rapid test.

## 12 Slutsatser

De teknologiska framstegen som har gjorts inom molekylära metoder har möjliggjort att diagnostik av infektionssjukdomar kan utföras snabbare än någonsin förut. Nuförtiden används en kombination av traditionella odlingsmetoder och olika snabbdiagnostikmetoder för optimala resultat. I framtiden kan olika metoder utvecklas för snabbare diagnostik också inom spesis och antibiotikaresistens. Nu är dessa metoder för dyra och komplicerade för att implementeras i laboratorier världen över.

Med att vidare utveckla apparatur för att bli mera användarvänliga kan diagnostiken förflyttas till avdelningar och akutrum. För att det används kemiska undersökningar på många olika områden inom sjukvården är implementeringen av ny diagnostik inte svårt, men själva apparaturen kan vara för dyr. För att immunokromatografiska tester är lätta att använda och relativt billiga, är det bästa alternativet för sådana undersökningar som inte utförs så ofta.

I framtiden kan snabbdiagnostik lättare utföras i sk. POC-laboratorier. Laboratorier som bara använder sig av POC-diagnostik, kan i framtiden utvecklas speciellt i områden där det inte finns ett laboratorium tillgängligt. Utbildningen som krävs för många apparater är kort och kostanderna låga. Utvecklingar inom mikrofluidik PCR och enzymkopplad immunadsorberande analys som utförs med mobiltelefoner kan bli verklighet i nära framtiden.

## Källförteckning

- Adams. (2020). *A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR*. Hämtat från <https://portlandpress.com/biochemist/article/42/3/48/225280/A-beginners-guide-to-RT-PCR-qPCR-and-RT-qPCR>
- ArcDia. (2019). *maripoc test system*. Hämtat från <https://www.arcDia.com/maripoc/>
- Aryal, & Sagar. (2021). *Real Time PCR- Principle, Process, Markers, Advantages, Uses*. Hämtat från Microbe Notes: <https://microbenotes.com/real-time-pcr-principle-process-markers-advantages-applications/>
- Azar, & Landry. (2018). Detection of Influenza A and B Viruses and Respiratory Syncytial Virus by Use of Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA)-Waived Point-of-Care Assays: a Paradigm Shift to Molecular Tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(7), e00367-18.
- Binnicker. (2020). Challenges and Controversies to testing for COVID-19. *Journal of Clinical Microbiology*, volume 58, issue 11.
- Cameron, Bohrhunter, Taffner, Malek, & Pecora. (2020). Clinical Pathogen Genomics. *Clinics in laboratory medicine*, 40(4), 447-458.
- Chabriere, Bassène, Drancourt, & Sokhna. (2018). MALDI-TOF MS and point of care are disruptive diagnostic tools in Africa. *New Microbes and New Infections*, Volume 26, S83-S88.
- Creative Diagnostics. (2019). *Lateral Flow Immunoassay*. Hämtat från <https://www.creative-diagnostics.com/food-analysis/tag-lateral-flow-immunoassay-30.htm>
- Dima. (2021). *Point of Care Testing (POCT) Present and Future*. EuroLabNews.
- Duodecim. (2019). *Influensa*. Hämtat från [https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00570](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00570)
- Duodecim. (2019). *Vastasyntyneiden GBS-taudin ehkäisy - asiantuntijaryhmän suositus*. Hämtat från <https://www.kaypahoito.fi/sll27041>
- Fuchs, Truissi, & Hewitt. (2013). Toxicogenomics in Preclinical Development. i Faqi, A *Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development* (ss. 827-854).
- Gubala, K. (2014). Immunodiagnosics and immunosensor design. *Pure and Applied Chemistry* 86(10), 1539-1571.
- Harju. (2020). MALDI-TOF massaspektrometria kliinisessä mikrobiologiassa. *Duodecim*, volume 136, issue 15, 1660-1667.
- Helali, E., Nguyen, Ly, Giovangrandi, & Trinquart. (2009). Diagnostic Accuracy of a Rapid Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Universal Intrapartum Group B Streptococcus Screening. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 49, Issue 3, 417-423.

- Hoang, Phan, Vo, & Cho. (2021). Advanced Signal-Amplification Strategies for Paper-Based Analytical Devices: A Comprehensive Review. *Biomedicines*.
- Hovi, Lyytikäinen, Autti-Rämö, Laitinen, Mäkelä, & Asiantuntijaryhmä. (2007). *B-ryhmän streptokokkitaudin ehkäisy vastasyntyneillä: Toiminnallinen vertailu*. Finohta.
- HUSLAB. (2019). *Tutkimusohjekirja*. Hämtat från [https://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt\\_show.exe?assay=4746&terms=influen](https://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=4746&terms=influen)
- Kim, M. (2013). *Image Analysis of a Lateral Flow Strip Sensor for the Detection of Escherichia coli O157:H7*. Hämtat från <https://www.semanticscholar.org/paper/Image-Analysis-of-a-Lateral-Flow-Strip-Sensor-for-Kim-Moon/3d078be03e9072b46ec15ccb48e3df789077e749#citing-papers>
- Kimura, Yanagisawa, Wachino, Shibayama, & Arakawa. (2013). Rapid and reliable loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Streptococcus agalactiae*. *Japanese journal of infectious diseases*, 66(6), 546-548.
- Koczula, & Gallotta. (2016). Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry, issue 60*, 111-120.
- Kozer, & Burnham-Maruisch. (2017). *Point-of-care testing for Infectious Diseases: Past, Present and Future*. Hämtat från <https://jcm.asm.org/content/55/8/2313/article-info>
- Landler, & Castle. (den 5 April 2021). *Boris Johnson Announces Free Coronavirus Tests and Status Certificates for England*. Hämtat från The New York Times: <https://www.nytimes.com/2021/04/05/world/europe/britain-johnson-coronavirus-lockdown-opening.html>
- Langabeer, Harvey, Gale, Cook, Mackinnon, & Linch. (2002). Transcription-mediated amplification and hybridisation protection assay to determine BCR-ABL transcript levels in patients with chronic myeloid leukaemia. *Nature*, 393-399.
- Lenzen. (2013). *Empirisk antibiotikabehandling av akuta allvarliga infektioner med hänsyn tagen till ökande antibiotikaresistens – faktorer för såväl patientsäker som icke-resistensdrivande läkemedelsanvändning*. Hämtat från Västra Götalandsregionen: <https://www.researchweb.org/is/vgregion/ansokan/384381>
- Lisby, & Schneider. (2021). Point of care testing for infectious disease: ownership and quality. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volume 76, Suppl 3*, iii28-iii32.
- Loginov, & Lappalainen. (2021). Virusdiagnostiset menetelmät: viljely, antigeeninosoitus vai nukleinihaponosoitus? *Lääkärilehti 8/21 vsk 76*, 485-489.
- Lyytikäinen, Nuorti, Halmesmäki, & ... (2006). Vastasyntyneiden GBS-taudin ehkäisy -asiantuntijaryhmän suositus. *Suomen Lääkärilehti*, 61(46), 4821-4824.
- Madzivhandila, Adrian, Cutland, Kuwanda, Schrag, & Madhi. (2011). *Serotype Distribution and Invasive Potential of Group B Streptococcus Isolates Causing Disease in Infants and Colonizing Maternal-Newborn Dyads*. Hämtat från PLOS

ONE:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0017861#references>

- NanoComposix. (2021). *Introduction to Lateral Flow Rapid Test Diagnostics*. Hämtat från <https://nanocomposix.com/pages/introduction-to-lateral-flow-rapid-test-diagnostics#target>
- nanoComposix. (2021). *The Science of Plasmonics*. Hämtat från <https://nanocomposix.com/pages/the-science-of-plasmonics>
- Nolte, & Caliendo. (2007). Molecular Detection and Identification of Microorganisms. i B. J. Murray, *Manual of Clinical Microbiology* (ss. 218-244).
- O'Kane, McManus, McGowan, & Lynch. (2011). Quality Error Rates in Point of Care Testing. *Clinical Chemistry vol 57 issue 9*, 1287-1271.
- Parameshwaran, & Naicker. (2019). Comparison of conventional methods with latex agglutination test in the diagnosis of *Cryptococcus meningitis*. *International Journal of Scientific Research, Volume 8, Issue 3*, 47-48.
- Premier Biosoft. (2019). *Molecular Beacons*. Hämtat från [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/molecular\\_beacons.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/molecular_beacons.html)
- Premier Biosoft. (2019). *Real Time PCR*. Hämtat från [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/real\\_time\\_PCR.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/real_time_PCR.html)
- Premier Biosoft. (2021). *Molecular Beacons*. Hämtat från [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/molecular\\_beacons.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/molecular_beacons.html)
- Premier Biosoft. (u.d.). *TaqMan Probes*. Hämtat från [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/TaqMan.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/TaqMan.html)
- QIAGEN. (2021). *Hybrid Capture 2 Modular System*. Hämtat från <https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/sexual-reproductive-health/cervical-cancer-screening/hybrid-capture-2-modular-system/>
- Rajagopal, & Lakshmi. (2009). Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence. *Future Microbiology*, 4(2), 201–221.
- RIVM. (2021). *Coronavirus monitoring in sewage research*. Hämtat från National Institute for Public Health: <https://www.rivm.nl/en/covid-19/sewage>
- Shaw. (2016). Practical challenges related to point of care testing. *Practical laboratory medicine volume 4*, 22-29.
- She, & Bender. (2019). Advances in Rapid Molecular Blood Culture Diagnostics: Healthcare Impact, Laboratory Implications, and Multiplex Technologies. *The Journal of Applied Laboratory Medicine, Volume 3, Issue 4*, 617–630.
- Siipilehto. (2020). *Koronaviruksen näytteiden testauksen tehostaminen onnistuu yksilöiden näytteiden yhdistämällä*. Hämtat från <https://www.dimensiolehti.fi/koronaviruksen-naytteiden-testauksen-tehostaminen-onnistuu-yksiloiden-naytteiden-yhdistamisella/>

- Solunetti. (2019). *Nukleiinihappojen monistaminen*. Hämtat från [http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen\\_monistaminen/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_monistaminen/2/)
- THL. (2021). *B-ryhmän streptokokki*. Hämtat från <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/b-ryhman-streptokokki>
- Tuokko, Rautajoki, & Lehto. (2008). *Kliiniset laboratorionäytteet - opas näytteiden ottoa varten*. Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Vasala, Hytönen, & Laitinen. (2020). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Hämtat från Modern tools for Rapid Diagnostics of Antimicrobial Resistance: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00308/full>
- Vila, Gomez, Salavert, & Bosch. (2017). Methods of rapid diagnosis in clinical microbiology: Clinical needs. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Volume 35, Issue 1*, 41-46.
- Walker-Daniels. (2012). *Current PCR Methods*. Hämtat från <https://www.labome.com/method/Current-PCR-Methods.html>
- Wang. (2016). Signal Amplification Methods. i H. Y. Loeffelholz, *Clinical Virology Manual* (s. Chapter 14).
- Wang, J., Shen, L., Najafi, H., Kolberg, J., Matschinsky, F. M., Urdea, M., & German, M. (1997). Regulation of insulin preRNA splicing by glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 94 (9)*, 4360-4365.
- Worldometer. (2021). *Coronavirus*. Hämtat från <https://www.worldometers.info/coronavirus/>
- YLE. (2020). *YLE*. Hämtat från Pahimmillaan jopa puolet koronatestien negatiivista tuloksista voi olla vääriä: <https://yle.fi/uutiset/3-11317963>
- Åkerman, Niemelä, & Pulkki. (2010). *Laboratoriolääketiede - Kliininen kemia ja hematologia*. Helsinki: Kandidaattikustannus ry.