



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Mikko Hiltunen ja Ulla-Maija Räisänen

## GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestin evaluointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

21.4.2021

|   |  |
|---|--|
| <p>Tekijät<br/>Otsikko</p> <p>Sivumäärä<br/>Aika</p>  | <p>Mikko Hiltunen ja Ulla-Maija Räisänen<br/>Genomera SARS- CoV-2, Flu A/B+RSV yhdistelmätestin evaluointi.</p> <p>48 sivua + 1 liite<br/>21.4.2021</p>    |
| <p>Tutkinto</p>   | <p>Bioanalyttikko (AMK)</p>  |
| <p>Tutkinto-ohjelma</p>   | <p>Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma</p>   |
| <p>Ohjaajat</p>   | <p>Lehtori Heidi Malava<br/>Sairaalamikrobiologi Laura Savolainen<br/>Kemisti Jani Rytönen<br/>Mikrobiologian laboratorion vastuuhoitaja Aila Väisänen</p> |
| <p>SARS-CoV-2 viruksen aiheuttaman COVID-19 pandemian vuoksi huomattiin pian riittävän kattavan testauksen olevan välttämätöntä viruksen leviämisen rajoittamiseksi. RT-qPCR pohjaiset testausjärjestelmät todettiin kaikkein luotettavimmiksi SARS-CoV-2 viruksen havaitsemiseen. Lisäksi influenssa A-, influenssa B- sekä RS-virukset aiheuttavat edelleen kausittaisia epidemioita. Kaikkien näiden virusten aiheuttamat oireet voivat olla hyvin samankaltaisia. Oikeanlaiseen diagnoosiin perustuvan hoidon nopean aloittamisen vuoksi on ollut tärkeää kehittää RT-qPCR pohjaisia yhdistelmätestejä, jotka pystyvät erottamaan näiden neljän virustyyppin tartunnat yhdellä analyysillä.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli suorittaa uuden GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B+RSV yhdistelmätestin evaluointitestausta. Testi on RT-qPCR pohjainen. Tavoitteena oli testata yhdistelmätestin analyttistä varmuutta sekä tarkastella testin herkkyyttä influenssa A-, influenssa B-, RS- ja SARS-CoV-2-virustyyppin kohdalla erikseen. Aihe opinnäytetyölle saatiin Pohjois-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymältä (NordLab). Evaluointitestaus suoritettiin NordLabin Kajaanin laboratorion mikrobiologian osastolla 18-23.11.2020. Evaluointitestauksessa käytettiin 61 nenänielusta otettua, syväjäädetytettyä potilasnäytettä, jotka olivat aiemmin testattu Xpert Xpress Flu/RSV ja Xpert Xpress SARS-CoV-2 menetelmillä ja toimivat referenssinä. Vertailussa kolmantena menetelmänä oli QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel menetelmä. Yhteensä analysejä tehtiin 92 kappaletta.</p> <p>Evaluointitestaussarja sisälsi 41 positiivista ja 20 negatiivista influenssa A-, influenssa B-, RSV- ja SARS-CoV-2- näytettä. Evaluointitestaussarjan herkkyys on 85 % ja tarkkuus 100 %. Virustyyppittäin influenssa A herkkyys on 90 %, influenssa B herkkyys on 100 %, SARS-CoV-2 herkkyys on 81,8 % ja RSV herkkyys on 66,6 %. Kaikkien virustyyppien osalta tarkkuus on 100 %. Evaluointitestaus osoitti uuden GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B+RSV yhdistelmätestin tarkkuuden ja herkkyyden olevan riittävä olemaan kliinisen diagnostiikan apuvälineenä.</p> <p>Tämä NordLabin Kajaanin laboratorion mikrobiologian osastolla suoritettu evaluointitestaussarja on osana uuden GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestipohjan evaluointitestausta, jota on suoritettu neljässä eurooppalaisessa tutkimuslaitoksessa syksyn 2020 ja kevään 2021 aikana. Tämän evaluointitestauksen myötävaikutuksella yhdistelmätesti sai CE- merkinnän 30.11.2020 ja kansainvälisen myyntiluvan joulukuussa 2020.</p> |  |
| <p>Avainsanat</p>   | <p>evaluointi, influenssa A/B, PCR, RSV, RT-qPCR, SARS-CoV-2</p>   |

|   |   |
|---|---|
| Authors<br>Title  | Mikko Hiltunen, Ulla-Maija Räisänen<br>Evaluation of The Genomera SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Combination Test  |
| Number of Pages<br>Date   | 48 pages + 1 appendice<br>21 May 2021   |
| Degree Programme  | Bachelor of Health Care   |
| Specialisation option   | Biomedical Laboratory Science   |
| Instructors   | Heidi Malava, Principal Lecturer<br>Laura Savolainen, Hospital Microbiologist<br>Jani Rytkönen Hospital Chemist<br>Aila Väisänen, Head of The Microbiology Laboratory |
| <p>SARS-CoV-2 virus is the cause of ongoing pandemic of COVID-19 respiratory illness. Soon we did notice that the adequate testing is necessary to prevent the virus from spreading. The tests, based to the RT-qPCR technology, was noticed to be the most reliable to detect the SARS-CoV-2 virus. At the time COVID-19 disease continue to spread globally, seasonal respiratory viruses including influenza A-, influenza B- and RS- virus continue to circulate, also causing acute respiratory diseases. Symptoms caused by all these viruses can be very similar. It is increasingly important to have tools available to differentiate between SARS-CoV-2 and other common respiratory viruses, at the same time investigating the clinical features and impact of co-infections.</p> <p>The aim of this study was to make evaluation test series to a new GenomEra ®SARS-CoV-2, Flu A/B +RSV Combination Test Platform. The purpose of this study was to find out if the new diagnostic platform is accurate enough, that we can use the test in clinical use. Also, we did want to know how sensitive and specific the new diagnostic platform is and investigate the sensitivity and specificity separately with influenza A-, influenza B-, RS- and SARS-CoV-2 viruses. We got a subject to this study from Northern Finland Laboratory Center (NordLab) and performed evaluation tests in NordLab Microbiology Unit Kajaani, November 2020. We used 61 nasopharyngeal patient samples, which were preserved in deep ice. The reference method was Xpert Xpress Flu/RSV and Xpert Xpress SARS-CoV-2 diagnostic platform. We also made tests with QIAstat-DX Respiratory SARS-CoV-2 Panel diagnostic platform, in comparison with the third method.</p> <p>The results showed that the sensitivity of the hole test series is 85 % and specificity of the hole test series is 100 %. The sensitivity by the type of viruses is with influenza A 90 %, influenza B 100 %, SARS-CoV-2 81,8 % and RSV 66,6 %. The specificity of all the virus types is 100 %. This may indicate that The New GenomEra®SARS-CoV-2, Flu A/B+ RSV Combination Test Platform is sufficiently sensitive and specific for clinical use.</p> <p>The evaluation test series, we made in the NordLab Microbiology Unit, Kajaani, was a part of the evaluation tests series, made in the four European Research Institutes in autumn 2020 and spring 2021. With this evaluation test series GenomEra ®SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Combination Test Platform got CE- Marking 30 November 2020 and international marketing authorization in December 2020.</p> |   |
| Keywords  | evaluation, influenza A/B, PCR, RSV, RT-qPCR, SARS-CoV-2  |

## Sisällys

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1    | Johdanto   | 1  |
| 2    | Hengitystieinfektioita aiheuttavat virukset            | 2  |
| 2.1  | SARS-CoV-2   | 3  |
| 2.2  | Influenssa A-, B-, C- ja D-virukset                    | 5  |
| 2.3  | RS-virus   | 7  |
| 3    | Polymeraasiketjureaktio                                | 8  |
| 4    | Reaaliaikainen käänteiskopiointi - PCR                 | 10 |
| 5    | Ct eli kynnysarvo                                      | 10 |
| 6    | Evaluointi   | 12 |
| 7    | GenomEra ®SARS-CoV-2, Flu A/B+RSV yhdistelmätesti      | 14 |
| 7.1  | GeneXpert  | 16 |
| 7.2  | QIAstat-Dx Analyzer 1.0- analysaattori                 | 17 |
| 8    | Opinnäytetyön tarkoitus, tavoite ja tutkimuskysymykset | 18 |
| 9    | Opinnäytetyön menetelmät                               | 18 |
| 9.1  | Aineiston keruumenetelmä                               | 19 |
| 9.2  | Näytteiden käsittely ja aineiston analysointi          | 20 |
| 10   | Evaluointitestaussarjan tulokset                       | 24 |
| 11   | Pohdinta   | 34 |
| 11.1 | Tulosten tarkastelu                                    | 35 |
| 11.2 | Luotettavuus   | 37 |
| 11.3 | Opinnäytetyön eettisten näkökohtien tarkastelu         | 38 |
| 11.4 | Johtopäätökset   | 39 |
| 11.5 | Tutkimuksen hyötyjä                                    | 40 |
| 11.6 | Jatkotutkimuksia                                       | 40 |
| 11.7 | Ammatillinen kasvu                                     | 41 |

## Liitteet

Liite 1. Genomera SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay kit Testiohjekirja.

## 1 Johdanto

Kiinan Wuhanissa eristettiin tammikuussa 2020 uusi beetakoronavirusmuunnos SARS-CoV-2. Tämä COVID-19 nimistä hengitystiesairautta aiheuttava virus alkoi levitä sieltä joulukuussa 2019. Pian havaittiin viruksen leviävän herkästi ihmisten välisissä kontakteissa ja aiheuttavan osalle sairastuneista vakavia hengitystieoireita. Taudin nopean leviämisen vuoksi maailman terveysjärjestö (WHO) julisti COVID-19 taudin pandemiaksi maaliskuussa 2020. Pian sairastuneiden ja tehohoitoa tarvitsevien määrä ylitti monessa maassa terveydenhoidon kestäkyvyn ja kuolleisuus tautiin nousi dramaattisesti. Maailmanlaajuisesti aloitettiin pohtimaan keinoja pandemian kuriin saamiseksi. Muiden toimien ohella huomattiin, että riittävän kattava testaus on välttämätöntä pandemian hallitsemiseksi (WHO 2020:2 a).

On useita tekniikoita SARS-CoV-2 viruksen toteamiseksi, joista viruksen nukleinihappojen tunnistamiseen perustuvat RT-qPCR pohjaiset järjestelmät todettiin luotettavimmiksi. (Jawerth 2020: 1-2) COVID-19 taudin rinnalla maailmalla kiertää kausittaisia hengitystie-epidemioita aiheuttavia influenssa A-, influenssa B- ja RSV- viruskantoja. Näiden virusten aiheuttamien infektioiden oireet voivat olla samankaltaisia, ja oireettomasta aina vakavaan sairastumiseen asti kehittyviä, kuin COVID-19 viruksen aiheuttamat oireet. Kliinisen diagnoosin ja hoidon aloittamisen nopeuttamiseksi onkin ollut tarpeellista kehittää testijärjestelmiä, jotka erottavat kaikkien näiden virusten esiintymisen näytteessä samalla kerralla.

Kliinisen diagnostiikan laitteita ja testijärjestelmiä valmistava Abacus Diagnostica Oy ryhtyi vuoden 2020 viimeisellä vuosineljänneksellä teettämään evaluointitestausta kehittämästään GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestijärjestelmästä. Kyseessä on RT-qPCR pohjainen testi, jolla voidaan yhdellä kertaa tutkia influenssa A-, influenssa B-, RS- ja SARS-CoV-2-virusten esiintymistä nenänielu- tai sylkinäytteestä. Evaluointitestausta suoritettiin neljässä eurooppalaisessa tutkimuslaitoksessa, sekä Pohjois-Suomen liikelaitoskuntayhtymän (NordLab) mikrobiologian laboratoriossa Kajaanissa. Tässä opinnäytetyössä tarkastellaan NordLabilla tehtyä evaluointitestaussarjaa ja analysoidaan sen tuloksia sekä verrataan tuloksia osana suurempaa kokonaisuutta.

Evaluointitestaussarja suoritettiin NordLabin Kajaanin laboratorion mikrobiologian osastolla olevilla kolmella Genomera CDX-analysaattoreilla. Testisarjassa oli 61 aikaisemmin

Xpert Xpress Flu/RSV ja Xpert Xpress SARS-CoV-2 menetelmällä analysoituja potilasnäytteitä. Yhteensä analyysyjä suoritettiin 92 kappaletta. Tarkoituksena oli evaluointitestauksen avulla mitata, onko Genomera® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätesti riittävän herkkä ja tarkka kliinisen diagnostiikan apuvälineenä, mitata testin analyttistä herkkyyttä ja tarkkuutta sekä määrittää yhdistelmätestin tarkkuutta ja herkkyyttä jokaisen viruksen osalta erikseen. Kajaanissa tehty evaluointitestausta oli osana laajempaa evaluointitestauskokonaisuutta, jonka myötä Genomera® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätesti sai CE-IVD merkinnän 30.11.2020 sekä kansainvälisen myyntiluvan marraskuussa 2020.

## **2 Hengitystieinfektioita aiheuttavat virukset**

Aikaisemmin virukset on erotettu bakteereista pienen kokonsa perusteella, mutta tärkeimpiä eroja on, että virukset tarvitsevat isäntäsolun, koska niillä ei ole omaa aineenvaihduntaa lisääntyäkseen. Monet virukset aiheuttavat tyypillisen taudin, joka on oireiden perusteilla tunnistettavissa, kuten rokkotaudit, herpes ja myyräkuume. Useammat virukset aiheuttavat keskenään samanlaisia tauteja, eikä aiheuttajaa voida päätellä kliinisten oireiden perusteella. Tällaisia ovat muun muassa hengitystieinfektiot, mukaan lukien COVID-19 taudin aiheuttava koronavirus SARS-CoV-2 sekä influenssaa ja ripulia aiheuttavat virukset. Virukset voivat aiheuttaa myös syöpää; esim. papilloomavirus (HPV; kohdunkaulan syöpä), hepatiitti B- ja C-virus (maksasyöpä). Muutamia virustauteihin käytetään lääkehoitoa ja useisiin viruksiin on myös tehokas rokote käytössä. (Lumio 2020:1-3.)

Virusten koko vaihtelee suuresti 20-300 nanometrillä. Ulkomuodoltaan virukset ovat usein pyöreitä tai sauvamaisen pitkiä. Virusten nukleokapsidi on useimmiten symmetrinen muodoltaan, koska viruksen kuori rakentuu monista toistuvista proteiiniinialyksiköistä. Virukset ovat pelkistyneitä loisia, joilla on tarvittavia geenejä ja niitä ympäröi infektoiva suojakerros. Virukset muodostuvat nukleonihaposta ja proteiiniukuoresta eli kapsidista. Vaipallisilla viruksilla on lipidikalvo. Virusten perimä on deoksiribonukleiinihappoa (DNA:ta) tai ribonukleiinihappoa (RNA:ta), ja ne käyttävät solujen synteetilaitteistoa lisääntyäkseen ja muodostaakseen infektiokykyisiä uusia partikkeleita. Ne sisältävät viruksen perintöaineksen siirtäen sen edelleen toisiin soluihin. (Saksela – Söderlund - Vennermo 2020:479-487.)

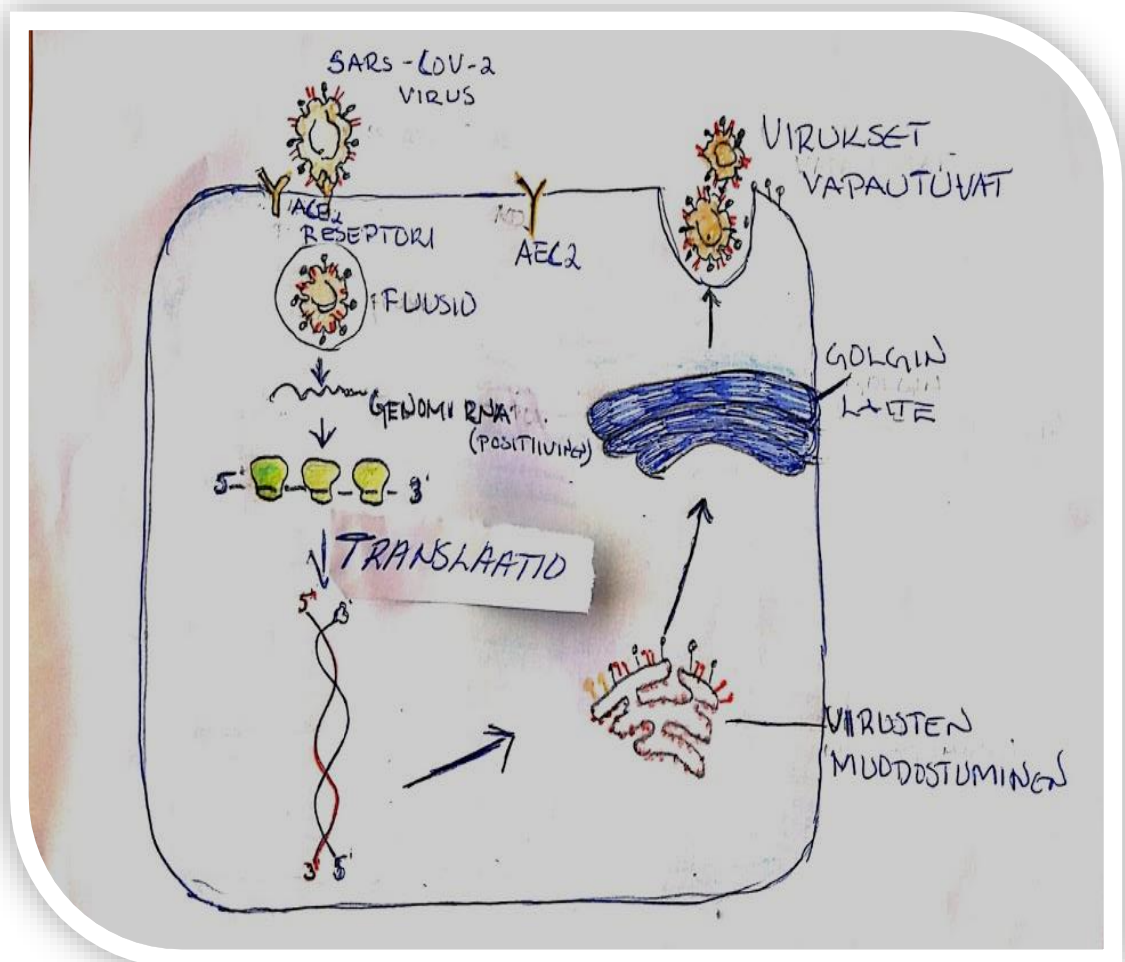
Virukset ovat merkittäviä taudinaiheuttajia, jotka aiheuttavat vuosittain maailmanlaajuisia epidemioita. SARS-CoV-2 virus on aiheuttanut pandemian, joka sai maailman terveysjärjestöltä (WHO) helmikuussa 2020 nimen COVID-19. Ensimmäisen kerran tämä SARS-virusmuunnos tunnistettiin Kiinan Wuhanissa joulukuussa 2019 (Centers for Disease Control and Prevention 2020:1). COVID-19 viruksen ohella myös influenssa A-, B- ja RS- (engl. *respiratory syndrome*) virukset ovat edelleen riesanamme aiheuttaen kausittaisia hengitystie-epidemioita. Virukset tarvitsevat isäntäsolun lisääntyäkseen, koska viruksilla ei ole omaa aineenvaihduntaa. Tämän vuoksi on ollut tärkeää kehittää uudenlaisia RT-qPCR (engl. *quantitative, real time PCR*) pohjaisia yhdistelmäanalyysijärjestelmiä, joilla voidaan luotettavasti saada taudin aiheuttanut virustyyppi luotettavasti selville (Jawerth 2020:1-2).

## 2.1 SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 virukset kuuluvat beetakoronaviruksiin. Koronavirukset kuuluvat *Nidovirales* virusten lahkoon ja *Coronaviridae* sukuun. Ne ovat vaipallisia, positiivissäikeisiä, yksijuosteisia RNA-virusia. Koronavirukset ovat luokiteltu neljään pääryhmään: *alpha-, beta-, delta- ja gammakoronavirukset*. SARS-CoV-2 virus aiheuttaa COVID-19 tautia, jossa oireet voivat vaihdella lievistä hengitystieinfektion oireista hyvinkin vakaviin, kuten keuhkokuume, akuutti hengitysvaikeusoireyhtymä (engl. *acute respiratory distress syndrome, ARDS*) sekä muut komplikaatiot, jotka voivat johtaa kuolemaan. (THL 2021:1 a). Kuolleisuuteen vaikuttaa kuitenkin muun muassa ikä, sukupuoli sekä pitkäaikaissairaudet. Koronavirusia esiintyy niin eläimillä kuin ihmisillä. Kymmenistä tunnetuista koronaviruksista seitsemän on havaittu olevan taudinaiheuttamiskykyinen ihmisissä ja kolme on aiheuttanut vakavia epidemioita: Vuonna 2003 SARS-CoV, vuonna 2012 Middle East Respiratory Syndrome (MERS) sekä vuonna 2020 Kiinan Wuhanista lähtöisin oleva SARS-CoV-2. Sen perimä on 29891 nukleotidia ja se koodaa 9860 aminohappoa. (Chan ym. 2020:221-225.)

SARS-CoV-2 virukset leviävät lähikontaktissa tartunnan saaneen henkilön kanssa. Virukset voivat levitä pieninä nestemäisinä partikkeleina, kun infektoitunut henkilö yskii, niistää, puhuu, laulaa tai hengittää raskaasti. Tämä on uusimpien tutkimusten valossa pääasiallinen tartuntareitti. Virukset voivat levitä myös kosketustartuntana, kun infektoitunut henkilö yskii, niistää tai koskettelee pintoja tai esineitä. Näiden pintojen koskettelu ja sen jälkeen suun, nenän tai silmien koskettelu pesemättömin käsin voi aiheuttaa tartunnan. (WHO 2020:1 b.)

SARS-CoV-2 viruksen elinkaari isäntäsolussa alkaa, kun viruksen piikkoproteiini sitoutuu solureseptoriin ACE2. Tämän jälkeen reseptori sitoutuu viruksen vaipan kanssa, jonka jälkeen SARS-CoV-2 vapauttaa RNA perimänsä isäntäsoluun. Tämän jälkeen genomi-RNA muuntuu, virusreplikaatiopolyproteiineiksi pp1a ja 1ab, jotka ovat pilkottu pienemmiksi tuotteiksi virusproteiinin avulla. Polymeraasi tuottaa epäjatkuvalla transkriptiolla sarjan subgenomista lähetti-RNA:ta, jonka avulla saadaan muodostettua virusproteiinia. Muodostuneet virusproteiinit ja viruksen genomin RNA kootaan viruksiksi solun endoplasmakalvostossa (ER) sekä golgin laitteessa. Kalvorakkuloiden (engl. vesicle) avulla ne kuljetetaan ulos solusta. Solu on muuttunut virustehtaaksi. (Kuvio 1) (Shereen-Khan-Kazmi-Bashir-Siddique 2020:1-8.)



Kuvio 1. SARS-CoV-2 viruksen lisääntyminen isäntäsolussa. (Mukailtu kuvioista Shereen ym. 2020:7.)



Yksi nopeimmista ja tarkimmista menetelmistä COVID-19-viruksen havaitsemiseksi on reaaliaikainen käänteiskopiontipolymeraasiketjureaktio (RT-qPCR), joka on laboratorio-menetelmistä yleisimmin käytetty COVID-19-viruksen havaitsemiseksi (Jawerth 2020:1-2). Toinen yleisesti käytetty testausmenetelmä on viruksen antigeenien osoittaminen näytteestä. Euroopan tautiehkäisy- ja valvontakeskus (ECDC) suosittelee antigeenitestausta tilanteissa, jossa tulos on hyvä saada erityisen nopeasti. Antigeenitestit ovat tyyppillisesti herkkyydeltään heikompia kuin PCR-pohjaiset testit. (THL 2020:1 b).

Kolmas yleisesti käytetty testausmenetelmä on tutkia virusta vastaan muodostuneiden vasta-aineiden esiintymistä näytteessä (European Centre for Disease Prevention and Control 2020:1). SARS-CoV-2 viruksen vasta-ainetestit pyrkivät osoittamaan IgG-, IgM- ja IgA-vasta-aineita viruksen eri proteiineille. Nämä perustuvat entsyymi-immunologiseen määrittelyyn (EIA). Vasta-aine diagnostiikka voidaan hyödyntää SARS-CoV-2 viruksen takautuvassa epidemiologisessa seurannassa, sekä harkitusti tapauksissa, joissa PCR-pohjaiset testit osoittavat negatiivista tulosta ja potilaan taudinkuva viittaa tartuntaan. (Jääskeläinen-Lappalainen-Kurkela 2021:1-5).

## 2.2 Influenssa A-, B-, C- ja D-virukset

Tyyppin A- ja B- influenssavirukset ovat ihmisten yleisimmät patogeenit. Niillä on paljon toiminnallisia ja rakenteellisia piirteitä keskenään. (Gao ym. 2019:1). Influenssa A- ja B- virukset levittävät kuumetta aiheuttavaa ja helposti leviävää infektiosairautta. Influenssavirukset kuuluvat *ortomyksovirusiin* ja tarkastellessa elektronimikroskoopilla virukset näkyvät pallomaisina tai soikeina. Influenssa A- ja B- virusten genomit ovat muodostuneet yksisäikeisestä RNA:sta (Ziegler-Heikkinen 2010: 472).

Influenssa A- ja B- virukset ovat kahdeksan jaokkeisia, ja se lisää influenssavirusten muuntelupotentiaalia. Viruksien RNA:n transkriptio ja mRNA:n synteetit tapahtuvat isäntäsolun tumassa. Influenssavirukset jaetaan A-, B- ja C- tyyppihin, joista A- ja B-tyypin virukset ovat kliinisesti merkittävimpiä. Influenssa A-virukset luokitellaan alatyyppeihin viruksen pinnan HA- ja NA-proteiiniyhdistelmän perusteella. Näistä influenssaepidemioita aiheuttavat influenssa A(H1N1) ja A(H3N2) alatyypin virukset. Influenssa A(H1N1) on vuoden 2009–2010 sikainfluenssa-pandemian jälkeläinen, joka on sen jälkeen aiheuttanut lievempiä kausi-influenssaepidemioita. (THL 2020:1 c.)

Influenssa B-virukset luokitellaan eri sukulinjoihin ja kantoihin. Influenssa B-epidemiat ovat keskimäärin lievempiä kuin A-typin aiheuttamat. Ne ajoittuvat myös usein lähemmäs kevättä, kuin talvea. Influenssa C-virus aiheuttaa yleensä lievän taudin ihmisille. Niiden ei tiedetä aiheuttaneen epidemioita ihmisille. Influenssa D-virukset tartuttavat etupäässä nautoja. Niiden ei tiedetä tarttuneen tai aiheuttaneen tautia ihmisille. (THL 2020: 1 d.)

Influenssa tarttuu herkästi yskimisen, aivastelun ja puhumisen seurauksena sekä koskettelemalla nenää tai silmiä käsillä, jotka ovat kontaminoituneet virusten saastuttamilta pinnoilta (Boktor - Hafner 2020: 1). Influenssaviruksille on tyypillistä huomattava antigeneenien vaihtelu. Suuret antigeeni- tyyppimuutokset aiheuttavat kaksi tai kolme kertaa vuosisadassa maailmanlaajuisia pandemioita. Vuosittain esiintyvät pienet muutokset vaativat uusien rokoteostumusten jatkuvaa kehittämistä. (Turkulov - Samardzija - Madle 2000:154-158.)

Influenssan toteaminen tehdään nenä-nielulimasta. Influenssaa ja tavallista nuhakuumetta on hankala erottaa toisistaan, mutta influenssassa yleisimpiä oireita ovat korkea kuume ja lihaskivut. Influenssavirusten RNA:n transkriptio ja mRNA:n yhdistyminen tapahtuu isäntäsolun tumassa. Influenssan aiheuttaman taudin kuva vaihtelee oireettomasta patologiseen saakka. Influenssavirusten itämisaika on yleisimmin 2-3 päivää, mutta se voi kestää jopa seitsemän päivää. Viruksen lisääntymisaluetta on henkitorven ja keuhkoputkien värekarvaepiteelien lieriösolut, joista se etenee muualle hengitysteihin, ja voi edetä sydänlihakseen saakka. (Heikkinen - Julkunen: 2020: 530.)

Influenssa alkaa aikuisilla nopeasti kuumeilulla, joka voi nousta jopa 40 °C:een ja kestää useita päiviä. Muina oireina esiintyy lihaskipuja, kuivaa yskää, kurkkukipua ja huonovointisuutta. Yleisimpiä influenssan komplikaatioita aikuisilla on nenän sivuontelotulehdukset, keuhkokuume sekä astman ja keuhkohtaumataudin pahentuminen. Influenssan tärkeimpänä ehkäisynä on rokotukset, mutta influenssavirusten muuntuvuus vaikeuttaa löytää tehokasta oikeanlaista rokotetta ja tämän vuoksi rokotteiden kokoonpanoa muutetaan vuosittain. (Ziegler - Heikkinen:2010: 481- 483.)

Maailman terveysjärjestö seuraa WHO GISRS-järjestelmän kautta influenssatilannetta maailmanlaajuisesti sekä suosittelee, opastaa ja tukee maailmanlaajuisesti jäsenvaltioita influenssan ennaltaehkäisyssä- ja valvontastrategioiden kehittämisessä (WHO 2018: 1.)

Koronarajoitusten vuoksi influenssa-aktiivisuus on ollut vuonna 2021 pohjoisella pallonpuoliskolla normaalia vähäisempää. Matkustamisen välttäminen, etätyöskentely, hygieniaohteet, turvavälit ja maskin käyttö on todennäköisesti vähentänyt myös influenssatartuntoja. Tartuntatautirekisteriin on 12.2.2021 mennessä ilmoitettu vain muutamia influenssa A- ja B-löydöksiä. (THL 2021: 1.)

### 2.3 RS-virus

RS-virus (engl. *respiratory syncytial*) kuuluu *paramyksomaviruksiin*. RS- viruksesta tunnetaan kaksi erilaista alatyyppeä RSV-A ja RSV-B ja nämä jakautuvat edelleen erilaisiin geneettisiin ryhmiin. RS-virus aiheuttaa infektiota etenkin talvikuukausina, jossa se haakeutuu hengitysteiden pintakerrokseen. RS-virus leviää pisaratartuntana ja sairastunut henkilö voi levittää virusta noin viikon ajan. RS-viruksen itämisaika on 4-5 päivää. Hyvällä käsihygienialla voidaan estää tarttuvuutta. RSV-tartunnan voi saada monesti ja ensimmäinen tartunta on yleensä voimakkain.

RS-virus on vastasyntyneiden ja yleensä pienten lasten infektioiden aiheuttaja alahengitysteissä. Se voi myös aiheuttaa epidemioita vanhusten hoitolaitoksissa. RS-virus on tunnettu jo vuodesta 1956 saakka. RS-virusta esiintyy kaikkialla maailmassa ja se aiheuttaa epidemioita vuosittain varsinkin talvikuukausina. Joidenkin tutkimusten mukaan keuhkoputkentulehdusta sairastavien lasten tehohoidon tarve on suurempi RSV-A virus-tartunnan yhteydessä, mutta RSV-B viruksestakin on useita vakavaan sairastumiseen altistavia variantteja. (Laham ym.2017:808-810; THL 2019:1.)

RS-virukset leviävät pisaratartunnan välityksellä. Itämisaika on neljästä viiteen päivään ja oireet alkavat ylähengitysteistä ja virusta voi erittyä paranemisen jälkeenkin vielä viikon ajan. Keuhkoihin viruksen leviäminen kestää nuorilla, etenkin vauvoilla muutaman päivän siitä, kun ensimmäiset oireet ovat alkaneet. RS- virukset leviävät hengitysteiden epiteeliä pitkin jatkaen matkaa vähitellen alaspäin keuhkojen suuntaan. Tätä virusta ei voida osoittaa verestä, eikä se leviä kliinisesti merkitsevästi kuin keuhkokudokseen. Tieteenkin on poikkeustapauksia kuten immuunipuutteiset, joille virus voi olla jopa tappava, jos se on levinnyt munuaisiin tai sydänlihakseen saakka. RS-virusta vastaan on todennäköisesti saatavilla turvallinen rokote lähitulevaisuudessa (Heikkinen-Ojala-Waris.2016:132; THL 2019: 1.)

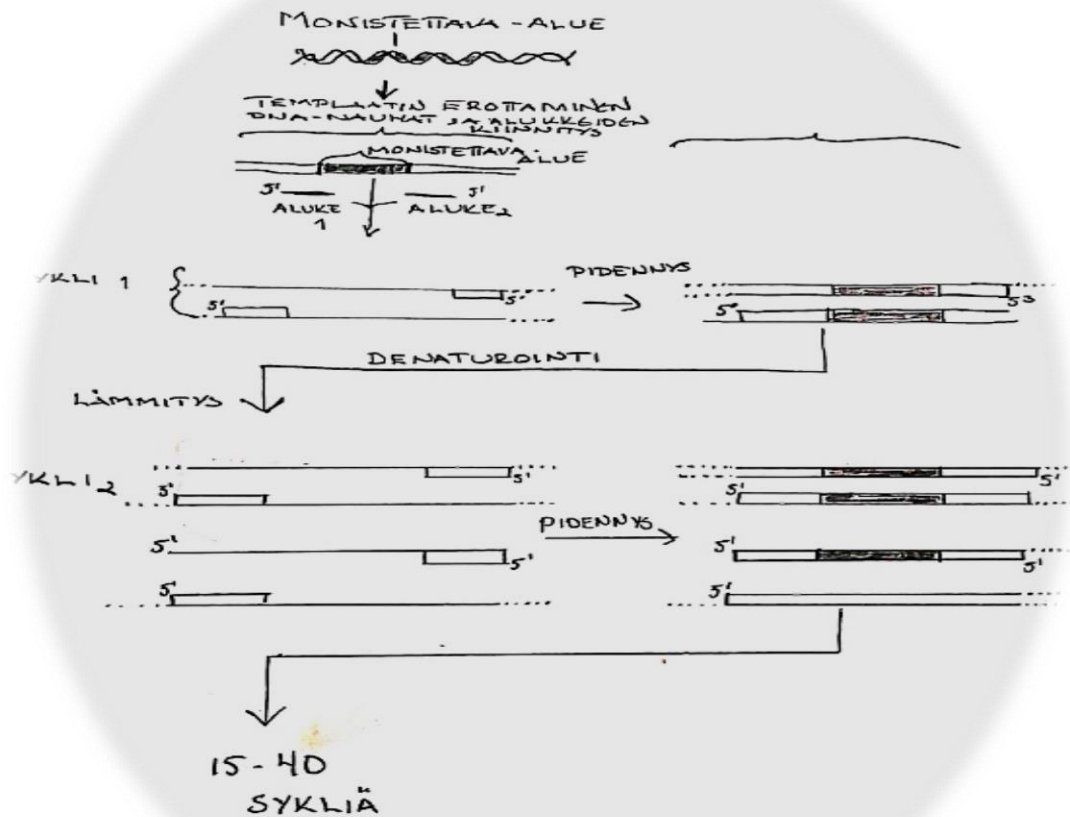
### 3 Polymeraasiketjureaktio

Polymeraasiketjureaktio (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) menetelmän on kehittänyt Kary Mullis kollegoidensa kanssa 1980-luvulla. Tämän myötä PCR:stä on tullut hyvin houkutteleva tekniikka ihmisen patogeenien havaitsemiseksi. (Khot-Fredricks 2009: 1-7.)

PCR-menetelmää käytetään geenien tutkimuskartoituksessa, geenitoimintojen tutkimuksissa sekä solujen tunnistamisessa PCR-menetelmää käytetään myös rikosteknologiassa. PCR-menetelmä on tänä päivänä korvaamaton työväline molekyylibiologeille ja bioteknologiayrityksille. PCR- menetelmällä on kyky monistaa hyvinkin pienestä määrästä geeniperimää. PCR- menetelmä pystyy tunnistamaan taudin aiheuttamat organismit paljon aikaisemmin, kuin muut menetelmät, koska se etsii itse organismin DNA:ta, proteiineja tai sen vaikutusta immuunijärjestelmäämme. (Bio-Rad Laboratories 2021: 1.)

PCR-menetelmä on biokemiallinen prosessi, jossa haluttua DNA-juostetta voidaan monistaa eksponentiaalisesti. PCR-syklin alussa eri menetelmin eristetty templaatti-DNA katkotaan halutuista kohdin restriktioentsyymeillä. Kaksijuosteinen DNA-ketju denaturoidaan yksijuosteiseksi lämmittämällä se noin 95 asteeseen. Lämpötilan laskiessa syntetisestisesti valmistetut alukkeet tarttuvat tietyille paikoille DNA:n vastinjuosteisiin. Niitä tarvitaan sekä DNA juosteen 5` että 3` päihin. Prosessi tarvitsee monistettavan templaatti DNA:n tai RNA:n, alukkeet, restriktioentsyymiin, nukleotideja, puskuriliuosta, DNA-polymeraasientsyymiin, magnesiumin ja lämpösyklin. Normaalisti PCR syklejä toistetaan 15-40 kappaletta. Muodostunutta DNA:ta voidaan tutkia geelielektrofooresilla. Geenejä ja geenimuunnoksia voidaan tutkia myös RNA:sta. Yleisesti käytetty menetelmä on rakentaa eristetystä RNA:sta komplementaarista DNA:ta (cDNA). Sitä voidaan käyttää tavallisen DNA:n tavoin PCR-reaktiossa.

Polymeraasiketjureaktio alkaa, kun valittua templaattia (mallijuostetta) kuumentamalla (94-98 °C) saadaan sen DNA-nauhat erotettua toisistaan. Valitut alukkeet kiinnittyvät haluttuun kohtaan yksijuonteista DNA:ta monistettavalle alueelle 45-72 asteen lämpötilassa, ja polymeerasi luo alukkeista alkaen vapaana olevista nukleotideista uuden vastinjuosteen. Pidentysvaiheen jälkeen monistettu kaksijuosteinen-DNA denaturoidaan uudelleen yksijuosteiseksi ja uusi sykli alkaa. Näitä vaiheita toistamalla monistuminen on eksponentiaalista. (Kuvio 2) (Haajanen - Pelkonen - Pärssinen - Suominen 2010:154-158.)



Kuvio 2. Polymeerasiketjureaktion periaate. (Mukailtu kuviosta Haajanen - Pelkonen - Pärssinen - Suominen 2010:157.)

Työskentely PCR- menetelmällä vaatii tarkkaa suunnittelua laboratoriossa ja tietokoneella. Varsinaisen monistusreaktion ohella on hyvä tehdä myös kontrollireaktioita, joilla varmistetaan, ettei reagenssit ole kontaminoituneet ja monistuminen tapahtuu halutulla tavalla. PCR-menetelmässä templaattina toimii yleisemmin kaksijuosteinen DNA, mutta lähtömateriaalina voi olla myös RNA. Siitä valmistetaan yleensä yksijuosteinen cDNA käänteistranskriptaasilla, jonka jälkeen tulee varsinainen monistusreaktio. Yksi tärkeimmistä PCR-menetelmän vaiheista on alukkeiden suunnittelu. Minkälaisia alukkeita käytetään, riippuu siitä mitä geenisekvenssejä halutaan monistaa. PCR-reaktion lämpötila riippuu alukkeiden pituudesta, nukleotidien koostumuksesta ja niiden pitoisuudesta. Alukkeiden sitoutumista kuvaa sulamislämpötila, jossa osa alukkeista on kiinnittynyt

templaattiin ja osa on irrallaan liuoksessa. (Haajanen - Pelkonen - Pärssinen - Suominen 2010:154-158.)

#### 4 Reaaliaikainen käänteiskopiointi - PCR

Reaaliaikainen eli kvantitatiivinen käänteiskopiointi- PCR, (RT-qPCR) on yleisimmin käytetty laboratoriomenetelmä SARS-CoV-2-viruksen havaitsemiseksi (q= engl. *quantitative*). Menetelmänä reaaliaikainen RT-qPCR on herkkä, spesifinen ja nopea sekä sillä on pieni kontaminaation tai virheiden mahdollisuus, koska koko prosessi suoritetaan suljetussa putkessa. RT-qPCR menetelmä on tarkin käytettävissä olevista menetelmistä COVID-19-viruksen havaitsemiseen. (Jawerth 2020:1-2.) Siinä viruksen yksijuonteinen ja herkästi hajoava RNA-perimä käänteiskopioidaan komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) käänteiskopiointia käyttäen. Prosessin ensimmäinen vaihe on RNA/DNA- hybridin synteettinen muodostaminen. Käänteiskopiointiprosessissa on toiminto, joka hajottaa tämän jälkeen hybridin RNA-säikeen. Yksisäikeinen-DNA täydennetään kaksijuosteiseksi cDNA:ksi käänteiskopiointimenetelmällä. Ensimmäisen vaiheen kopioinnin onnistumisen tehokkuus voi vaikuttaa myöhempään kopiointiprosessiin. Kopiointisyklejä on yleensä 25-45 kappaletta. Yleisimmin RT-qPCR tarjoaa ensimmäisen askeleen qPCR pohjaiselle RNA käänteiskopioinnille biologisissa näytteissä. (Jawerth 2020: 1-2.)

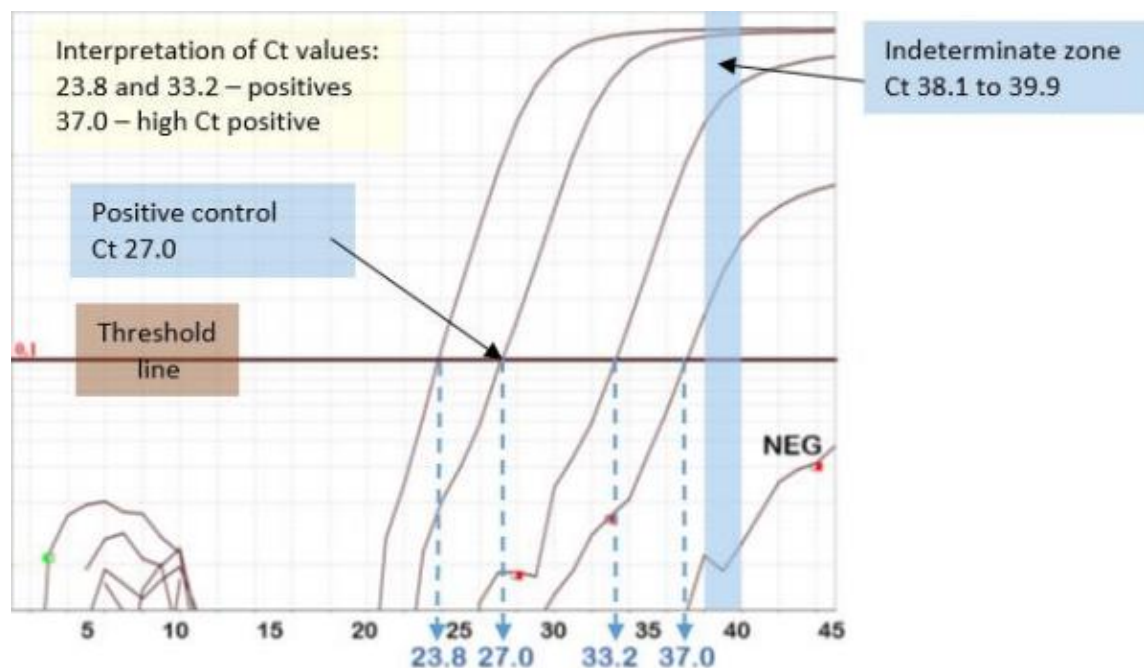
Tarkasteltaessa PCR-pohjaisten, nukleiinihappojen osoittamiseen perustuvien, nenänielunäytteistä tehtävien koronavirustestien tarkkuutta (engl. *specificity*), se on käytännössä sadan prosentin luokkaa. Toisin sanoen testit tunnistavat tarkasti negatiivisiksi näytteet, joissa virusta ei esiinny. Sen sijaan yksittäinen testauskerta havaitsee koronaviruksen vain noin kahdesta kolmasosasta tutkittavista positiivisista näytteistä, ja testien herkkyys on 60-80 prosentin luokkaa. Tämä johtuu pääosin näytteenottoon liittyvistä epävarmuustekijöistä, ei niinkään PCR-menetelmien puutteellisesta herkkyydestä. Testien herkkyys on parempi, jos nenänielunäyte on otettu tartunnan alkuvaiheessa, mutta oireiden edessä keuhkojen huuhtelunestenäytteestä (BAL) tehty PCR-pohjainen koronavirustesti on havaittu jopa 90 % herkäksi (engl. *sensitivity*). (Hetemäki 2020:1-4.)

#### 5 Ct- eli kynnysarvo

RT-qPCR tutkimuksessa mitataan niin sanottua Ct-arvoa eli kynnysarvon määrää (engl. *Cycle threshold*). Se ilmaisee numeroina, kuinka monta PCR-sykliä tarvitaan siihen, että

eksponentiaalisesti monistuvaa tutkittavaa kohdetta havaitaan nukleiinihappoihin liitetyn fluorisoivan leiman avulla. RT-qPCR testien kehittyessä positiivisen monistustuloksen raja-arvo (engl. *Limit of detection*, LOD) on määritelty käyttäen tunnettuja monistuskohteita. Näistä on tehty laimennossarjoja, joita on testattu PCR-menetelmällä. Positiivisen testituloksen suurin kynnyssykli, jossa PCR-tuotetta alkaa muodostua (Ct-arvo) vaihtelee ollen yleisesti noin 38 sykliä. Raja-arvo asetetaan normaalisti testin sisältämän positiivisen kontrollin eksponentiaaliseen monistumiskohtaan. Positiivinen tulos on aina raja-arvon yläpuolella. Jos näytteessä on tutkittavaa nukleiinihappoa, sen määrä kaksinkertaistuu jokaisen PCR-syklin aikana. Tämä havaitaan fluorisoivan koettimen avulla. Jos näyte on negatiivinen, tutkittavan nukleiinihapon monistumista ei tapahdu. Kaikki kaupalliset RT-qPCR tutkimukset eivät ilmoita käyttäjälle Ct-arvoa. Kuviossa kolme näkyy testin raja-arvoa kuvaava viiva (engl. *Threshold line*) tummana viivana. Sen ylittävistä monistuskäyrästä voidaan alhaalla olevaa asteikkoa hyväksikäyttäen tulkita tarvittujen Ct-syklien määrä. Sininen palkki on kuviossa alue, jossa monistumista ei voida varmentaa. (engl. *Intermedinate zone*.)

On kuitenkin huomioitava, ettei kahden eri testausjärjestelmän samasta näytteestä saatujen Ct-arvojen tieteellinen vertailu ole sopivaa. Testin raja-arvoa muuttamalla voidaan lisätä testin sensitiivisyyttä, jolloin spesifisyys vähenee ja päinvastoin. (Public Health Ontario 2020:1-6.)



Kuvio 3. Esimerkki RT-qPCR tutkimuksen Ct-arvojen määrytyksestä. Kyseessä on logaritminen asteikko. (Public Health Ontario 2020:4.)

SARS-CoV-2 virusten määrää potilaasta voidaan päätellä RT-qPCR analyysin Ct-arvojen perusteella. Mitä suurempi viruspitoisuus potilasnäytteessä on, sitä nopeammin virusten nukleiinihappojen monistumista tapahtuu, ja sitä pienemmillä syklimäärillä niitä havaitaan. Tutkimuksen mukaan vakavaan COVID-19 tautimuotoon sairastuneilla on yleisesti pienemmät analyysin Ct-arvot kuin taudin lievempään muotoon sairastuneilla (negatiivinen korrelaatio). Matala Ct-arvo (<25) positiivisen testituloksen yhteydessä kertoo suuremmasta riskistä siihen, että COVID-19 tauti kehittyy vakavaksi. Tehokas viruksen lisääntymistä vähentävä hoito taudin alkuvaiheessa vähentää taudin tappavuutta. Myös taudin tartuttavuuden ja testien Ct-arvojen välillä on huomattu olevan vahva yhteys. Ct-arvon kasvaessa viruksen tartuttavuus pienenee. Näiden seikkojen vuoksi on tarpeellista tutkia positiivisten testitulosten yhteydessä myös analyysin Ct-arvoja. (Yu ym. 2020:1-4; Singanayagam ym.2020:25-29.)

## 6 Evaluointi

Evaluointi on systemaattisen hyväksynnän saaminen jonkin esineen arvolle. (Trochim 2020.) Suomisanakirjan mukaan evaluoinnille on olemassa muun muassa seuraavia synonyymisanoja: arviointi, hinnoitus, arvon määrittäminen (Suomisanakirja 2021).

Terveydenhuollon lääkinnällisen laitteen tulee täyttää sitä koskevat olennaiset vaatimukset. Terveydenhuollon laite täyttää olennaiset vaatimukset silloin, kun se on suunniteltu, valmistettu, varustettu ja tutkittu sitä koskevien standardien mukaisesti. Näin täyttyvät myös vaatimukset CE (IVD) merkinnän myöntämiselle. Kliinisellä arvioinnilla (engl. *Clinical evaluation*) tarkoitetaan valmistajan kliinisten tietojen perusteella tekemää arviointia, jolla vahvistetaan, että terveydenhuollon laitteen ominaisuudet ja suorituskyky ovat vaatimusten mukaisia laitteen tavanomaisissa käyttöolosuhteissa. Kliininen arviointi sisältää arvion haittavaikutusten ja haitta - hyötysuhteen hyväksyttävyydestä. Kliininen arviointi on dokumentoitava. (Laki terveydenhuollon laitteista tarvikkeista 2010/629.)

Diagnostisia testijärjestelmiä arvioitaessa on yleistä määrittää testin herkkyys eli sensitiivisyys sekä tarkkuus eli spesifisyys. Testin herkkyys tarkoittaa positiivisen testituloksen osuutta kaikista sairaista. Tarkkuus tarkoittaa testin negatiivisten tulosten osuutta kaikista terveistä. Sensitiivisyyden ja spesifisyyden laskemisessa käytetään nelikenttätaulukkoa. Sensitiivisyys (herkkyys) =  $a / (a + b)$  ja Spesifisyys (tarkkuus) =  $d / (c + d)$ . (Uhari - Nieminen 2014:2) (Kuvio 4).



|                        |         | testitulos   |              |     |
|------------------------|---------|--------------|--------------|-----|
|                        |         | positiivinen | negatiivinen |     |
| referenssi<br>(totuus) | sairaat | a            | b            | a+b |
|                        | terveet | c            | d            | c+d |
|                        |         | a+c          | b+d          | n   |

Kuvio 4. Sensitiivisyyden ja spesifisyyden laskemiseen käytettävä nelikenttätaulukko. (Uhari-Nieminen 2014:1.)

On huomattava, etteivät sensitiivisyys ja spesifisyys yksittäisinä lukuina anna oikeaa kuvaa RT-PCR pohjaisen testin luokittelukykyvystä. Testin raja-arvoa muuttamalla voidaan lisätä testin sensitiivisyyttä, jolloin spesifisyys vähenee ja päinvastoin. (Public Health Ontario 2020:6.)

Syyskuussa 2019 julkaistussa tutkimuksessa esitellään tuloksia Genomera® Flu A/B + RSV testisarjan evaluoinnista. Evaluointi on suoritettu Poitiersin sairaalassa Ranskassa talvikaudella 2018-2019 otetuista potilasnäytteistä. Evaluoinnissa näytteitä oli 299 kappaletta, 131 nielunäytettä sekä 168 nenänielunäytettä. Referenssinäytteet on aiemmin testattu Seegene Allplex® Respiratory panel 1 testijärjestelmällä, Bioradin CFX 96 analysaattoria käyttäen. Genomera® Flu A/B + RSV testin evaluoinnissa influenssa-A sensitiivisyydeksi on saatu 98,4 % ja spesifisyydeksi 99,6 %. Influenssa-B kohdalla sensitiivisyyttä ei ole ilmoitettu ja spesifisyys on 99,7 %. RSV-A näytteiden sensitiivisyys on 96,4 % ja spesifisyys 100 %. RSV-B näytteiden sensitiivisyys on 97,7 % ja spesifisyys 99,6 %. Koko evaluointitestaussarjassa oli yksi väärä negatiivinen ja viisi väärää positiivista tulosta. (Choquet ym. 2019: 1.)

Genomera® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestin reaktioherkkyttä on tutkittu Abacus Diagnostica Oy:n neljässä eurooppalaisessa tutkimuslaitoksessa teettämässä tutkimuksissa. Evaluointitestausta on tehty erilaisilla viljellyillä viruskannoilla, analyysin spesifisyyttä ja ristireaktioita on tutkittu useilla erilaisilla bakteeri- ja viruskannoilla, analyysin herkkyttä häiritsevien kemikaalien ja lääkeaineiden suhteen on tutkittu. Näyttei-

den säilyvyyttä huoneenlämmössä COPAN eSwap™- putkissa on myös tutkittu. Kaikkien näiden tutkimusten tuloksia on esitelty GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit-testiohjekirjassa sivuilla 11-15.

Evaluoititestausta tämän opinnäytetyön yhteydessä käsitti vertailevan testisarjan suorittamisen, tulosten analysoinnin sekä raportoinnin. Evaluointisuunnitelma sisälsi kohteen, tavoitteet, näyteaineiston hankkimisen, työhön osallistuvien henkilöiden nimeämisen sekä tavoiteaikataulun.

## **7 GenomEra®SARS-CoV-2, Flu A/B+RSV yhdistelmätesti**

GenomEra® CDX on Turkulaisen Abacus Diagnostica Oy:n valmistama kliinisen diagnostiikan analyysijärjestelmä, jolla tutkitaan bakteerien sekä virusten nukleiinihappojen esiintymistä näytteissä. Järjestelmän toiminta perustuu reaaliaikaiseen polymeerasiketjureaktioon. Mittaaminen perustuu fluoresenssileimattujen DNA- tai RNA-ketjujen mittaamiseen fluorometrillä. GenomEra® CDX on molekyyli diagnostiikka – alusta, joka koostuu integroidusta lämmitysjärjestelmästä ja aikaresoluutioisesta fluorometristä. Analysointia käytetään tietokoneeseen asennetun GenomEra® CDX-laiteohjelmiston avulla. Analyysien tekeminen perustuu analyysispesifisten, käyttövalmiiden testilastujen käyttöön, jotka on kehitetty DNA:n tai RNA:n havaitsemiseksi suorissa kliinisissä tai viljellyistä näytematriiseissa. Kaikki RNA:n tai DNA:n monistamiseen tarvittavat reagenssit ovat kuivatuna testilastun sisällä.

GenomEra® SARS-Cov-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätesti on tarkoitettu nenänielu- tai sylkinäytteille, jotka on kerätty nestettä sisältäviin viruskuljetusputkiin. Testi sisältää sisäisen kontrollin, joka on kuivatuna testipakkauksen sisältämien SPC-putkien pohjalla. Näytteiden esikäsittely tapahtuu SPC-putkissa, jolloin putken pohjalla oleva sisäinen kontrolli kastuu samalla. Sisäinen kontrolli sisältää pieniä määriä MS2 bakteriofagia mikä matkii analysoitavia viruksia ja sisältää erityisen RNA sekvenssin, joka tulee havaita analyysin aikana. SPC varmistaa, että näytteiden esikäsittely suoritetaan ohjeiden mukaisesti ja toimii amplifikaatio kontrollina testin mahdollisen inhibition seuraamiseksi. Esikäsitellyistä näytteistä pipetoidaan 35µl testilastulle, joka laitetaan automatisoituun GenomEra® CDX analysaattoriin. Prosessissa tutkittavat RNA- tai DNA-sekvenssit monistuvat PCR- sykleissä, jos näyte sisältää niitä. Näytteen tulos valmistuu noin 70 minuutin kuluttua siitä, kun lastut on asetettu analysaattoriin ja laitejärjestelmä raportoi tulokset automaattisesti tietokoneelle. (Abacus Diagnostica 2020:1-6.)

Kuvassa viisi on kolme Genomera CDX analysointilaitetta, jotka sijaitsevat Nordlabin Kajaanin laboratorion mikrobiologian osastolla. Laitteiden takana mustat virransyöttöyksiköt ja oikealla puolella tietokone. Laitteiden kannessa oikealla luukku, jonka alle neljä testilastua sisältävät kasetit asetetaan. Laitteiden työnimet: Jani, Genomera ja Vesa. (Kuvio 5.)



Kuvio 5. Kolme Genomera CDX analysointilaitetta. Kuva Jani Rytönen.

GenomEra® SARS-CoV-2, Flu AB+ RSV yhdistelmätesti on laitevalmistaja Abacus Diagnostica Oy:n vuonna 2020 kehittämä yhdistelmätestialusta, jolla voidaan analysoida vakavaa akuuttia hengitystieoireyhtymää aiheuttavan koronaviruksen SARS-CoV-2:n, influenssa A:n, Influenssa B:n sekä RSV:n nukleiinihappojen esiintymistä näytteessä. Järjestelmä toimii käyttäen reaaliaikaista polymeerasiketjureaktiota virusten nukleiinihappojen monistamiseen ja havaitsemiseen (RT-qPCR). Analyysin tarvitsemia hengitystienäytteitä voidaan säilyttää laitevalmistajan ohjeiden mukaisesti COPAN eSwap™,

Universal Transport Medium (UTM) tai fosfaattipuskuroiduissa suolaliuos (PBS) näyteputkissa. Abacus Diagnostica suosittelee mieluiten käytettäväksi COPAN eSwab™ putkia näytteiden keräämiseen ja säilyttämiseen. (Abacus Diagnostica 2020:12.)

Yhdistelmätestin tarkoituksena on olla tukemassa potilaalle tehtävää kliinistä diagnoosia. Virusten RNA on yleensä eristettävissä ylähengitysteistä otetuissa näytteissä infektion aikana. Se ei kuitenkaan sulje pois muidenkin kuin testattavien virusten tai erilaisten tautia aiheuttavien bakteerien esiintymistä näytteessä. Yhdistelmätestin etuna on se, että sen avulla voidaan tutkia samalla kertaa influenssa A-, influenssa B-, RSV ja SARS-CoV-2 virusten esiintymistä näytteessä, mikä nopeuttaa potilasdiagnoosin tekemistä ja oikeanlaisen hoidon aloittamista.

GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B+RSV yhdistelmätestissä käytetään RT-qPCR menetelmää ja hydrolyysikoettimia tiettyjen virussekvenssien havaitsemiseksi: SARS-CoV-2 RNA-riippuvaista RNA polymeerasia (RdRP), influenssa A-matriisia (M), influenssa B-hemagglutiinia (HA) ja RSV nukleotidikapseli (N) proteiinin geenejä.

Yhdistelmätestissä käytetään sisäistä laaduntarkkailua. Testin sisäinen kontrolli (engl. *Sample processing control*; SPC) on kehitetty tarkkailemaan analyysiprosessia. Näin varmistetaan, että näytteiden esikäsittely on tehty ohjeiden mukaisesti ja että näytettä on pipetoitu ohjeiden mukaan testilastulle. Jos testin sisäinen kontrolli (SPC) havaitsee virheitä prosessin vaiheissa se antaa PCR-inhibition vastauksen. Testipakkaukset tulee säilyttää laitevalmistajan ohjeiden mukaisesti +2 - +8 asteessa ja avatut pakkaukset ovat kaksi viikkoa käyttökelpoisia. Eräkohtaiset LOT-numerot tulee asentaa laitekohtaiseen ohjelmistojärjestelmään. (Abacus Diagnostica 2020:4-6.)

## 7.1 GeneXpert

GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestin referenssinä käytetyt potilasnäytteet olivat analysoitu XpertXpress SARS-CoV-2 tai XpertXpress Flu /RSV testeillä. Testit oli tehty GeneXpert järjestelmäanalyysointilaitteella NordLabin Kajaanin laboratorion mikrobiologian osastolla. Järjestelmä sisältää automatisoidun analyysointilaitteen, siihen yhdistetyn tietokoneen ohjelmistoinen sekä kyseisiin testeihin valmistetut testipakkaukset. Järjestelmässä näytettä pipetoidaan suoraan kasetille, joka laitetaan analyysointilaitteeseen. Testin tulokset saadaan 20-60 minuutissa, riippuen tehtävästä analyysistä. Ge-

neXpert järjestelmä on kvalitatiivinen testi, joka perustuu reaaliaikaiseen PCR-menetelmään. Laittevalmistaja Cepheidin testien evaluoinnissa ilmoittama oikeiden positiivisten tulosten prosenttiosuus (engl. *Positive percent agreement*) Xpert Xpress SARS-Cov-2 näytteille on 97,8 % (95 % CI:88,4 %-99,6 %) ja oikeiden negatiivisten tulosten prosenttiosuus (engl. *Negative percent agreement*) 95,6 % (95 % CI 85,2 %-98,8 %). Testi tunnistaa SARS-CoV-2 viruksen N2- ja E- geenien nukleiinihappoja. Molemmista saadaan Ct- arvo. (Cepheid 2020: 1 a.)

Xpert Xpress Flu/RSV testille laitevalmistaja ilmoittaa nenänielunäytteiden oikeiden positiivisten prosenttiosuudeksi virustyypeittäin: influenssa A- 98,1 %, influenssa B- 100 % ja RSV 98,4 %. Oikeiden negatiivisten prosenttiosuudeksi laitevalmistaja ilmoittaa virustyypeittäin: influenssa A-: 98,8 %; influenssa B-: 99,1 % ja RSV 99,3 %. (Cepheid 2020:1 b.)

## 7.2 QIAstat-Dx Analyzer 1.0- analysaattori

QIAstat-Dx Analyzer 1.0- analysaattori tunnistaa patogeenien nukleiinihappoja biologisista näytteistä reaaliaikaisella PCR-menetelmällä. Tätä käytetään yhdessä QIAstat-Dx testikasettien kanssa. Näytettä pipetoidaan 300µl testikasettiin tai vaihtoehtoisesti näytetikku katkaistaan kasetin sisälle. Kasetti sisältää kaikki nukleiinihappojen eristämiseen ja monistamiseen tarvittavat reagenssit. Laitteen sisäinen ohjelmisto tulkitsee monistuksessa havaitut reaaliaikaiset signaalit ja raportoi ne käyttöliittymän välityksellä. Laite antaa kvalitatiivisen tuloksen. (Qiagen 2019:15.)

QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel-testi havaitsee Sars-CoV-2:n lisäksi 21 muuta patogeeniä. Mukana ovat useat Influenssa A- tyypit, influenssa B-, useita koronavirustyyppijä, useita para-influenssa-virustyyppijä, RS-virus tyypit A ja B, ihmisen *metapneumovirus* A ja B, *adenovirus*, *bokavirus*, *rinovirus* ja *enterovirus*, sekä bakteereista *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* ja *Bordetella pertussis*. Testikasetti sisältää sisäisen kontrollin. Kvalitatiivisen tuloksen lisäksi voi näytteen ja sisäisen kontrollin käyriä tarkastella laitteen näytöltä. Laite antaa sisäisestä kontrollista ja mahdollisista patogeeneistä Ct-arvon sekä päätetapahtuman fluoresenssiarvon (engl. *Endpoint fluorescence*). (Qiagen 2020:42-45.)

Kajaanin NordLabin mikrobiologian laboratoriossa on käytössä QIAstat-DX Analyzer 1.0-analysaattori. Se sisältää yhden käyttömoduulin ja kaksi analyysimoduulia, joten laitteella voidaan tehdä kaksi analyysiä kerrallaan. Analysointi kestää noin 70 minuuttia.

## **8 Opinnäytetyön tarkoitus, tavoite ja tutkimuskysymykset**

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kerätä taustatietoa SARS-CoV-2, influenssa A- ja B- sekä RS-viruksista. Tietoa kerättiin myös virologiasta sekä kolmesta näiden virusten tutkimiseen käytettävistä RT-qPCR menetelmään perustuvasta laitejärjestelmästä. Tavoitteena oli evaluointitestauksen avulla määrittää GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestin herkkyyttä ja tarkkuutta. Evaluointitestauksen tuloksia käytettiin myös osana yhdistelmätestin laajempaa evaluointitestaussarjaa. Opinnäytetyössä haettiin vastausta seuraaviin kysymyksiin:

- Onko Genomera SARS-CoV-2, Flu A/B+ RSV yhdistelmätestin analyttinen herkkyys ja tarkkuus riittävä potilasnäytteiden testaamiseen.
- Mikä on uuden yhdistelmätestin analyttinen herkkyys ja tarkkuus
- Mikä on uuden yhdistelmätestin herkkyys ja tarkkuus virustyypeittäin

## **9 Opinnäytetyön menetelmät**

Opinnäytetyö suoritettiin kokeellisena tutkimuksena. Evaluointitestaussarjassa käytettiin referenssinäytteinä GeneXpertillä tutkittuja, -80 C lämpötilaan varastoituja potilasnäytteitä. Evaluointitestaussarjassa verrattiin GeneXpert analysaattorilla tehtyjen Xpert Xpress Sars-Cov-2- sekä Xpert Xpress Flu/ RSV-testien positiivisia sekä negatiivisia tuloksia GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestillä saatuihin tuloksiin. Opinnäytetyön päämääränä oli kyseisen yhdistelmätestin evaluointitestauksen suorittaminen ja testien analysointi sekä raportointi. Evaluointitestit suoritettiin noudattamalla laitevalmistaja Abacus Diagnostica Oy:n sekä NordLabin antamia ohjeita. Varsinainen evaluointiin liittyvä testien tekeminen suoritettiin NordLabin Kajaanin laboratorion mikrobiologian osastolla. olevilla kolmella Genomera CDX analysaattorilla 18-23.11.2020.

Koska kyseessä on RT-qPCR-pohjainen testi, työskentelyn täytyy olla aseptista kontaminaation välttämiseksi. Näytteiden sulatus ja esikäsittely tehtiin biosuojakaapissa ja analysaattorit sijaitsivat eri huoneessa. Testauksessa käytettiin pakastettuja, Xpert Xpress Flu/RSV ja Xpert Xpress SARS-CoV-2 järjestelmillä aikaisemmin testattuja potilasnäytteitä. Näytteiden analysoinnissa ei käsitelty potilastietoja. Vanhojen potilasnäytteiden ilman henkilötietojen käsittelyä tehtävä testaus ei vaatinut lupaa näytteitä luovuttaneilta henkilöiltä. Abacus Diagnostica Oy toimitti evaluointiin tarvittavat GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV- testipakkaukset NordLabin Kajaanin laboratorion mikrobiologian osastolle.

Opinnäytetyön työelämäohjaajien kanssa sovittiin tehtävien testien määrästä. Testitulokset raportoitiin NordLabille ja laitevalmistaja Abacus Diagnostica Oy:lle heidän toimittamansa Excel-tiedoston avulla. Myös Genomera CDX laiteohjelmistoon tallentunut evaluointitestien raakadata lähetettiin Abacus Diagnosticalle. Evaluointitestaukseen liittyvään tietojen kirjaamiseen sekä analysointiin käytettiin Excel- sekä SPSS- taulukointiohjelmaa.

## 9.1 Aineiston keruumenetelmä

Valitut näytteet olivat aikaisemmin GeneXpert- järjestelmällä testattuja potilasnäytteitä. Kaikki näytteet olivat säilytetty -80 asteen lämpötilassa. Vanhimmat näytteet olivat vuoden 2020 tammikuulta. Positiivisiksi näytteiksi valittiin 40 influenssa A-, B-, RSV ja Covid-19 näytettä, kymmenen kutakin. Positiivisiksi vertailunäytteiksi valittiin 41 influenssa A-, B-, RSV ja COVID-19 näytettä ja negatiivisiksi vertailunäytteiksi 10 negatiivista SARS-CoV-2- ja 10 negatiivista Flu/RSV näytettä.

Näytteet olivat nenänielusta pumpulipuikolla otettuja ja säilytysmediumina oli Copan UTM 3 ml sekä Vacuette virus 3 ml viruskuljetusputket. Influenssa A-, B-, RSV- ja SARS-CoV-2-näyte otetaan riittävän syvältä nenänielusta näytepakkauksessa olevalla pumpulipuikolla. Vacuette virus 3 ml sisältää suolafosfaattiliuosta ja näyte otetaan samalla tekniikalla kuin UTM-putkiin. Molempien putkien näytetikut sisältävät murtokohdan. Copan UTM putkissa on bakteereja sekä sieniä tuhoavia antibiootteja, jotka eivät vaikuta viruksiin sekä lasihelmiä, jotka eivät vaikuta näytteen laatuun, mutta auttavat sekoitusta sekä näytteen irtoamista pumpulipuikosta. Näytettä pipetoitaessa on varottava, ettei lasihel-

miä tule näytteen joukkoon. Molemmat näyteputket soveltuvat pitkäaikaiseen säilytykseen pakastimessa ja ne voidaan avata ja sulkea useita kertoja. (Copan 2021: 1-5; Vacuette 2020: 1.)

Uudella GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestillä voidaan analysoida nenänielu tai sylkinäytteitä, jotka on säilytetty näyteputkissa korkeintaan 96 tuntia +2-+8 asteessa. Näytteet tulee kuljettaa +2-+8 asteessa ja pidempiaikaisempaa säilytystä varten pakastaa vähintään -70 asteeseen. (Abacus Diagnostica 2020: 6.)

## 9.2 Näytteiden käsittely ja aineiston analysointi

Näytteet numeroitiin tavalla, joiden avulla näytteet olivat helposti tunnistettavissa. Tämä auttoi analyysien tekemistä varsinkin uusinta ja varmistussarjojen yhteydessä sekä selkeytti myöhempää taulukoiden tutkimista. Positiiviset influenssa A- näytteet identifioitiin Flu A pos 1-10 tunnuksin. Positiiviset influenssa B-näytteet identifioitiin Flu B pos 1-10 tunnuksin. Positiiviset RS- virusnäytteet identifioitiin Flu RSV pos 1-10 tunnuksin. Positiiviset COVID-19 näytteet identifioitiin Covid pos 1-11 tunnuksin. Negatiiviset influenssanäytteet identifioitiin Flu neg. 1-10 tunnuksin. Negatiiviset COVID-19 näytteet identifioitiin Covid neg. 1-10 tunnuksin.

Näytteiden sulatuksessa, esikäsittelyssä ja analysoinnissa pyrittiin mahdollisimman huolelliseen työskentelyyn. Näytteet kuljetettiin suojapusseissa -80 asteisesta pakkasesta ja niiden annettiin sulaa biosuojakaapissa tunnin ajan ennen käsittelyä. Sulatetut näytteet esikäsiteltiin ja analysoitiin Abacus GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestijärjestelmällä valmistajan ohjeiden mukaisesti. Näytteet säilytettiin tulosten valmistumiseen saakka +4C asteisten kylmägeelipussien välissä biosuojakaapissa, jonka jälkeen näyteputket pakastettiin säilytyspusseissa uudelleen -80 asteeseen.

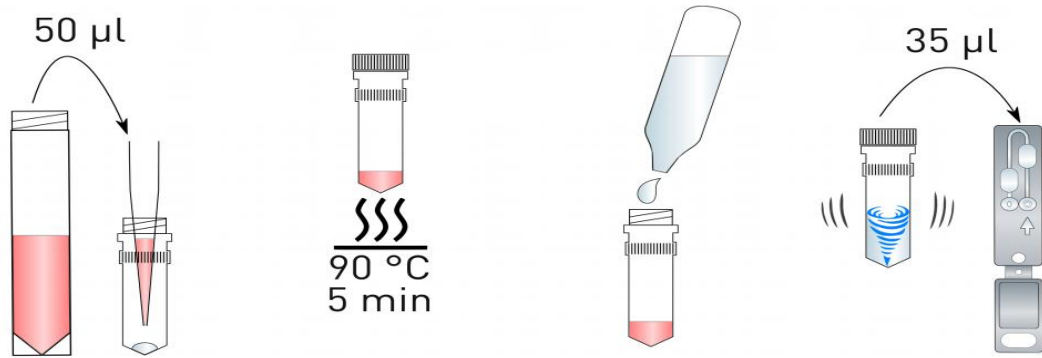
Näytteiden esikäsittelyssä toimittiin aseptisesti käyttämällä suojaessua, puuterittomia nitriilikäsineitä sekä kirurgisia hengityssuojaimia. Ristikontaminaation välttämiseksi näytteitä käsiteltiin yksi näyteputki kerrallaan ja työ tehtiin tarkasti ja järjestelmällisesti. Analysointi suoritettiin neljän näytteen sarjoissa, kolmella Genomera CDX analysaattorilla. Testien tulokset kirjattiin päivittäin sekä omiin tiedostoihin että Abacus Diagnostica Oy:n jakamaan Excel- tiedostoon.



Näytteet esikäsiteltiin biosuojakaapissa testipakkauksessa mukana tulleen GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B +RSV Assay Kit-testiohjekirjan mukaisesti. GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV- testipakkaus sisältää 40 kappaletta testilastuja, 1 ml puskuriampullit, SPC-putket ja uudelleen käytettävän testilastujen pidikekasetin. Analyysipakkaukset tulee säilyttää +2-+8 asteen lämpötilassa ja avatuissa näytepusseissa olevat testilastut tulee käyttää 14 vuorokauden sisällä. Näytteiden analysointiin tarvittiin 1-2 ml näyteputkille sopiva Biosan TDB-100 lämpöblokki, jossa näyteputkien lämmittäminen tapahtui +90 asteessa 5 minuuttia, sekoittajaa, keskikoon mikropipettiä (10-100µl), steriilejä filterillisiä pipetinkärkiä, kertakäyttöisiä puuterittomia suojakäsineitä, suojaessu, hengityssuoja, tietokoneeseen asennettu kyseiselle testille tehty tietokoneohjelmisto sekä Genomera CDX analysaattori.

Sulatettuja näyteputkia sekoitettiin viisi sekuntia ja niistä pipetoitiin 50µl SPC-putkeen. Yhdeksän uusintänäytettä tehtiin myös 100µl näytemäärällä. Näyte kosteuttaa myös SPC-putken sisältämän kuivatun sisäisen prosessikontrollin. SPC-putkia kuumennettiin viisi minuuttia 90 asteisella Biosan Bio TDB-100 lämpöblokillä, jonka jälkeen niihin lisättiin testipakkauksen sisältämä 1 ml puskuriampulli. Tämän jälkeen SPC-putkia sekoitettiin viisi sekuntia. Esikäsitellyistä näytteistä pipetoitiin 35 µl testilastuihin, joita mahtuu testikasettiin neljä kappaletta. Kasetti tulee asettaa analysaattoriin kolmen minuutin sisällä lastuille pipetoinnista. Genomera CDX-analysaattorit ja näytteiden esikäsitely tapahtuivat erillisissä huoneissa. Suojakaappityöskentely näytteitä käsiteltäessä oli aseptista. Kaappi desinfioitiin ennen työskentelyä. Kasettiin asetettujen testilastujen analysointi kestää noin 70 minuuttia ja tulokset taltioituvat laitteen mukana tulevalle tietokoneohjelmalle automaattisesti. Näytekaseteissa ei ole mitään henkilötietoja ja niitä varten on laboratorioissa oma jäteastia.

Havainnekuviassa neljä näytteiden esikäsitely suojakaapissa. Vasemmalla sekoitetun näytteen pipetointi SPC-putkeen, seuraavana kuumennus ja puskurin lisääminen, sekä sekoitus ja pipetointi näytelastulle. Esikäsiteltyjä näytteitä voidaan tarvittaessa säilyttää kolme tuntia viilennettynä (+4 °C) SPC-putkessa ennen näytelastulle pipetointia. (Kuvio 4.)



Kuvio 4. Havainnekuviot näytteiden käsittelystä laminaarikaapissa. (Abacus Diagnostica 2020:6.)

Näytteet esikäsiteltiin biosuojakaapissa. Sen toimintaperiaatteena on alaspäin suunnattu steriili, laminaari-ilmavirtaus, joka varmistaa työtilan puhtauden ja estää ristikontaminaatioita sekä estää likaisen huoneilman pääsyn työtasolle. Työskentelyaukolla oleva sisäänpäin suuntautuva ilmavirtaus estää ilman virtaamisen kaapista ulos ja estää työntekijän sekä ympäristön altistumisen käsiteltäville aineille. (Laboline 2021:3-8.) (Kuvio 5).



Kuvio 5. Kuva näytteiden esikäsitelyssä käytettävästä biosuojakaapista. Vasemmalta oikealle: lämpökuoppalevy, jossa 12 SPC putkea, sekoittaja, roska-astia, puskuriampulleja mustassa telineessä, pipetit ja takana käsitellyt näyteputket suoja-pakkauksessa kylmägeelissä. Kuva Mikko Hiltunen.

Evaluointitestaukset tehtiin kolmella NordLabin Kajaanin mikrobiologian osastolla olevalla Genomera CDX analysaattorilla. Analysaattoreiden työnimet olivat Jani, Genomera ja Vesa. Testaukseen liittyvät näytteiden esikäsittelyt tehtiin 12 näytteen sarjoissa, jolloin testauksessa käytettiin kaikkia kolmea käytettävissä olevaa analysaattoria. Kukin analysaattori pystyy tekemään neljä analyysiä kerrallaan. Analyysiohjelma antaa kvalitatiivisen tuloksen. Plus merkki (+) ja punainen "POSITIVE" teksti virustyyppin kohdalla ilmoittaa kyseisen kohteen löytymisestä näytteestä. Miinusmerkki (-) ja vihreä teksti "NEGATIVE" kyseisen virustyyppin jälkeen tuloksessa ilmoittaa, ettei kyseistä virustyyppiä löydy näytteestä. Keltainen "BORDERLINE" teksti virustyyppin kohdalla ilmoittaa, että tulos on raja-arvon alapuolella mutta amplifikaatiokäyrä on vahvasti ei-lineaarinen. Virusta ei voi ilmoittaa löytyvän näytteestä luotettavasti. On mahdollista, ettei kopioitavaa virusta ole riittävästi näytteessä tai näytteessä olevat inhibiittorit (suom. *estäjät*) ovat heikentäneet reaktiota.

PCR-inhibition tulos merkitsee, ettei yhtään kohdesekvenssiä, eikä myöskään näytekontrollia ole tunnistettu. Syynä voi olla reaktiossa oleva liian iso näytemäärä tai näytteessä olevat inhibiittorit, jotka estävät reaktiota. Failed-tulos ilmoittaa, että näyte ei ole analyysikelpoinen tai testikortin kuivakemikaalit ovat vialliset. Kaikissa kolmessa testituloksessa Borderline, PCR-Inhibition ja Failed, näyte täytyy analysoida uudelleen. Run Failed tulos ilmoittaa mahdollisesta analyysilaitteen toimintahäiriöstä. (Abacus Diagnostica. 2020:8-9.)

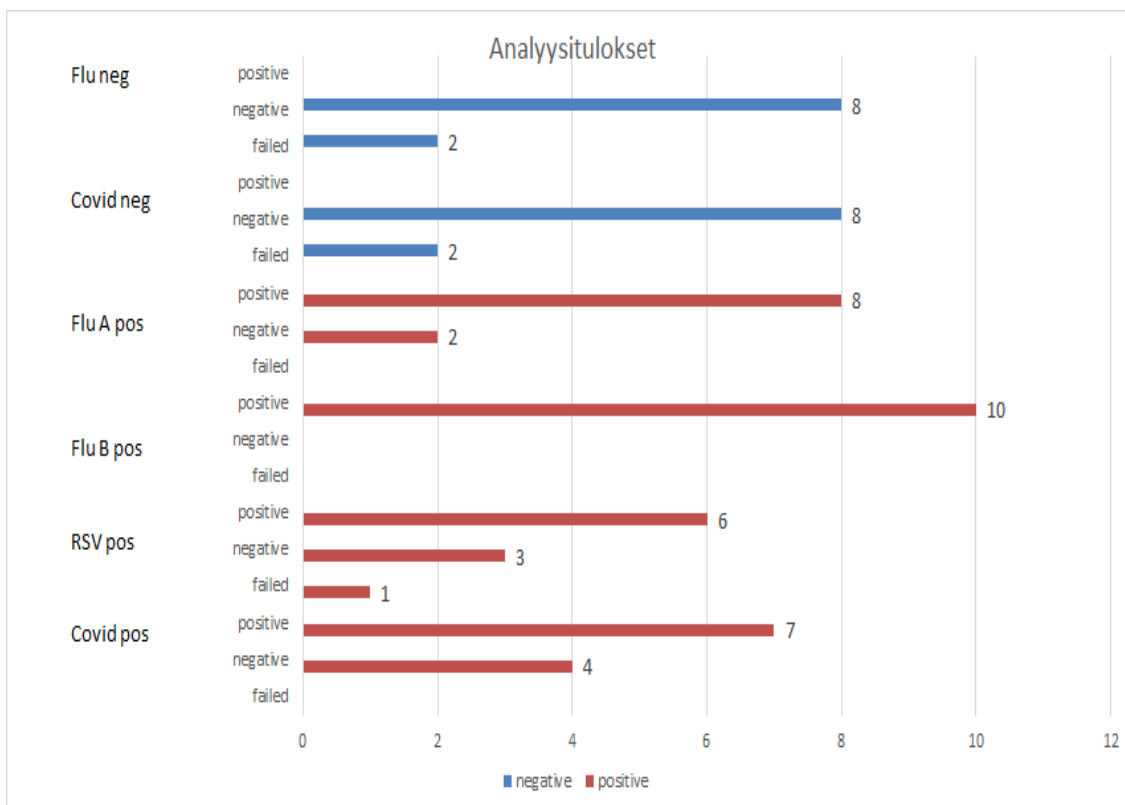
Laadullisen tuloksen lisäksi jokaisen analyysin yhteydessä ilmoitetaan kaksi numerollista arvoa. Ne ilmoitetaan testiraportissa yhden desimaalin tarkkuudella ja erotetaan toisistaan kauttaviivalla. (esimerkiksi 2.0/14.5). Ra-arvo (engl. *Amplification ratio*) ilmoitetaan ensimmäisenä (esimerkissä 2.0). Sitä käytetään arvioitaessa PCR-reaktion voimakkuutta. Tyypillisesti, riippuen käytettävästä fluoresoivasta leimasta Ra-arvo on positiivisissa testituloksissa 2.0 ja 100 välillä. Tavallisimmin arvo on alle 10 ja nousee sen yli vain käytettäessä tiettyjä fluoresoivia leimoja (*Terbium* ja *Europium*) influenssa B- tai SARS-CoV-2 positiivisten tulosten yhteydessä. Negatiivisen testituloksen arvo on lähellä arvoa 1.0. Analyysin laadullinen arvo negatiivinen, borderline tai positiivinen määritetään analyysiohjelmassa Ra-arvon, lot- spesifisen raja-arvon ja vahvistuskäyrän muodon perusteella. Positiivisen testituloksen Ra-arvo on tyypillisesti 1.2 ja 2.0 välillä. Se ei kuitenkaan yksin vahvista positiivista tulosta. Jos vahvistusarvo on alle raja-arvon, mutta analyysikäyrä on vahvasti ei-lineaarinen, tulos on borderline. Toisaalta vaikka Ra-arvo on yli testin raja-arvon, voi tulos olla negatiivinen, jos testikäyrä on vahvasti lineaarinen.

Ra-arvoa ei voi käyttää määrällisenä indikaattorina. Se ilmoittaa lähinnä, kuinka voimakkaasti RT-qPCR reaktio on havainnut tutkittavan viruksen. Tähän arvoon vaikuttaa monia muitakin tekijöitä. Toisena numeerisena arvona on kynnysarvo (engl. *Cycle threshold*) eli Ct-arvo. Se ilmoittaa sen PCR-sykliden määrän, joka tarvitaan tutkittavan kohteen havaitsemiseen näytteessä. Genomera CDX analysaattorilla tehtyjen analyysien raportoidut Ct-arvot ovat aina 9 ja 45 välillä ja lasketaan vain positiivisista tuloksista. Muissa tapauksissa arvo on 0.0. (Abacus Diagnostica 2020:10.)

## 10 Evaluointitestaussarjan tulokset

Evaluointitestaussarja käsitti 61 aikaisemmin GeneXpert- järjestelmällä analysoitua potilasnäytettä sekä uusintana GenomEralla tehtynä varmistussarjana 22 testiä, joista osa tehtiin kahdella eri näytemäärällä (50 ja 100µl). Kuusi näytettä analysoitiin vertailuna kolmanteen menetelmään QIAstat-DX Respiratory SARS-CoV-2 Panel-menetelmällä, sekä kolme näytettä uudelleen GeneXpert Xpress Flu/ RSV- järjestelmällä. Yhteensä analyysijä tehtiin 92 kappaletta.

Varsinaisen 61 näytteen testituloksena saatiin 29 oikeaa positiivista tulosta, 18 oikeaa negatiivista tulosta, viisi PCR-inhibition tulosta (Flu neg 1 ja 5, Covid neg 4 ja 8, sekä RSV pos 10) ja yhdeksän virheellistä negatiivista tulosta (Flu A pos 3 ja 6, RSV pos 3,5, ja 6, Covid pos 1,3,8 ja 10). Borderline-, varsinaisia failed- tai väärä positiivisia tuloksia ei saatu koko evaluointitestaussarjan aikana. Vaakapalkkidiagrammi analyysituloksista ennen uusintasarjojen tekemistä. Kuviossa failed tulokset tarkoittavat PCR-inhibition tulosta (Kuvio 6).



Kuvio 6. Tulokset 61 näytteen analysoinnin jälkeen.

Näytteistä kolme analysoitiin uudelleen Xpert Xpress Flu/RSV testillä: Flu A pos 3 ja 6 joista uudella yhdistelmätestillä oli saatu negatiiviset tulokset, sekä RSV pos 10 josta yhdistelmätesti antoi uusinnan jälkeenkin PCR-Inhibition tuloksen. Kaikissa näissä kolmessa uusinnassa GeneXpert antoi positiivisen tuloksen. Vertailuna kolmanteen menetelmään tehtiin kuusi analyysiä QIAstat Respiratory SARS-CoV Panel-testillä: Flu A pos 6, RSV pos 3, 5, ja 6 sekä Covid pos 3. Näistä se antoi kahdessa poikkeavan negatiivisen tuloksen verrattuna GeneXpertillä tehtyihin analyysihin (Flu A- pos 6 ja Covid- pos 3). Genomeralla tehtiin 61 varsinaisesta näytteestä uusintana 22 varmistustestin sarja. Viidestä alkuperäisessä PCR-inhibition tuloksen antaneesta Genomera analyysistä uusittiin neljä pipetoimalla SPC-putkiin 50µl näytettä ja yksi (RSV pos 10) uusittiin kaksi kertaa pipetoimalla sekä 50µl että 100µl näytettä.

Kaikki analyysit, joista Genomera antoi väärän negatiivisen tuloksen verrattuna aikaisemmin GeneXpertillä tehtyihin analyysihin (Flu A pos 3 ja 6, RSV pos 3,5 ja 6 sekä Covid pos 1,3 ja 8) uusittiin sekä 50 että 100 mikrolitran näytemäärällä. Uusintana tehdyn varmistussarjan tekeminen kahdella erilaisella näytemäärällä oli perusteltua, koska Nor-

dLabin ohjeen mukaan GenomEra® SARS-CoV-2 menetelmällä tehtävät nenänielunäytteet analysoidaan 100µl näytemäärällä. Näin voitiin verrata, tuleeko samasta näytteestä erilaisella näytemäärällä analysoitaessa poikkeavia tuloksia. Myös Abacus Diagnostica Oy halusi dataa mahdollisesta näytemäärän vaikutuksesta testituloksiin.

GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestillä saadut tulokset kymmenestä positiivisesta Xpert Xpress Flu/RSV analyysistä. Näytteet olivat influenssa A-positiivisia. Xpert Xpress Flu/RSV testi ilmoittaa Ct-arvot influenssa A1 ja A2 viruksista. Genomeralla tehtyjen testien tuloksena oli kahdeksan oikeaa positiivista ja kaksi väärää negatiivista tulosta. Väärät negatiiviset tulokset uusittiin sekä 50µl että 100µl näytemäärillä. Uusintatesteissä Flu A pos 3 näytteistä saatiin positiivinen testitulos molemmilla näytemäärillä ja Flu A pos 6 näytteen tulos oli uusintatestaustenkin jälkeenkin negatiivinen. Samat testitulokset saatiin molemmilla näytemäärillä. Taulukkojen uusintasarakeissa on esitetty ensin Ra- ja Ct-arvot 50µl ja toisena 100µl näytemääriä käytettäessä. Flu A pos 6 analysoitiin kolmannella menetelmällä QIAstat SARS-CoV-2 Panel testillä, tulos väärä negatiivinen (Taulukko1).

Taulukko 1. Positiivisten influenssa A-näytteiden Genomera ja QIAStat testitulokset.

| Näyte        | GeneXpert A1 / A2 Ct | GenomEra tulos (Ra/Ct) | Uusinta (Ra/Ct)              | QIAstat tulos/Ct |
|--------------|----------------------|------------------------|------------------------------|------------------|
| Flu A pos 1  | 24 /24.7             | Pos (3.6/31.8)         |                              |                  |
| Flu A pos 2  | 25.4 /27.9           | Pos (1.8/32.5)         |                              |                  |
| Flu A pos 3  | 29.3/ 31             | Neg (1.0/0.0)          | Pos (1.9/33.7)<br>(2.4/32.3) |                  |
| Flu A pos 4  | 14.5 /16.4           | Pos (4.6/25.8)         |                              |                  |
| Flu A pos 5  | 34.4 / 36.1          | Pos (2.6/33.6)         |                              |                  |
| Flu A pos 6  | 32.9 /35.4           | Neg 1.0/0.0)           | Neg (1.0/0.0)<br>(1.0/0.0)   | Neg/ 0           |
| Flu A pos 7  | 29.1 / 30.2          | Pos (2.2/34.1)         |                              |                  |
| Flu A pos 8  | 29 / 30.7            | Pos (3.5/33.2)         |                              |                  |
| Flu A pos 9  | 27.6 / 30            | Pos (1.5/35.4)         |                              |                  |
| Flu A pos 10 | 20.6 / 22.4          | Pos (4.6/25.9)         |                              |                  |

Genomera antoi oikeat positiiviset testitulokset kaikista kymmenestä positiivisesta influenssa B-näytteestä. Näytteet on analysoitu aikaisemmin Xpert Xpress Flu/RSV järjestelmällä. (Taulukko 2).

Taulukko 2. Positiivisten influenssa B-näytteiden Genomera testitulokset.

| Näyte        | GeneXpert Ct tyyppi B | GenomEra tulos (Ra/Ct) |
|--------------|-----------------------|------------------------|
| Flu B pos 1  | 25.1                  | Pos (6.0/32.5)         |
| Flu B pos 2  | 25.5                  | Pos (26.9/32.2)        |
| Flu B pos 3  | 23.5                  | Pos (32.8/27.8)        |
| Flu B pos 4  | 18.6                  | Pos (24.6/27)          |
| Flu B pos 5  | 24.5                  | Pos (9.5/34.2)         |
| Flu B pos 6  | 15.5                  | Pos (30.1/28.1)        |
| Flu B pos 7  | 17.2                  | Pos (38.5/28.9)        |
| Flu B pos 8  | 21.5                  | Pos (25.3/31.6)        |
| Flu B pos 9  | 25.2                  | Pos (18.2/31.9)        |
| Flu B pos 10 | 33.1                  | Pos (12/36.1)          |

Testitulokset kymmenestä positiivisesta RS-virusnäytteestä. Näytteet on aikaisemmin analysoitu Xpert Xpress Flu/RSV järjestelmällä. Genomeralla saatiin testitulokseksi ensimmäisessä testisarjassa kuusi oikeaa positiivista tulosta ja kolme väärää negatiivista tulosta. RSV 10 näytteestä saatiin uusinnan jälkeenkin PCR-inhibition tulos. Koska emme saaneet kyseisestä näytteestä laadullista tulosta, se jätettiin pois myöhemmistä vertailuista. Näytteet RSV pos 3, RSV pos 5 ja RSV pos 6, joista tuli väärät negatiiviset testitulokset uusittiin sekä 50- että 100-mikrolitran näytemäärillä. Näiden kolmen näytteen testitulos pysyi vääränä negatiivisena riippumatta esikäsittelyssä käytetystä näytemäärästä. Vertailuna kolmanteen menetelmään RSV pos 10 näyte analysoitiin QIAstat-DX Respiratory SARS-CoV-2 Panel järjestelmällä. Tuloksena oikea positiivinen tulos Ct-arvolla 26,9 (Taulukko 3).

Taulukko 3. Positiivisten RSV-näytteiden Genomera ja QIAStat testitulokset.

| Näyte      | GeneXpert Ct | GenomEra (Ra/Ct) tulos | Uusinta (Ra/Ct) | QIAstat tulos/ Ct |
|------------|--------------|------------------------|-----------------|-------------------|
| RSV pos 1  | 21.9         | Pos (3.3/27)           |                 |                   |
| RSV pos 2  | 21.8         | Pos (3.8/26.8)         |                 |                   |
| RSV pos 3  | 23.8         | Neg (1.0/0.0)          | Neg (1.0/0.0)   | Pos/ 25,3         |
| RSV pos 4  | 18.6         | Pos (3.4/27)           |                 |                   |
| RSV pos 5  | 28.2         | Neg (1.0/0.0)          | Neg (1.0/0.0)   | Pos/ 29,7         |
| RSV pos 6  | 29.9         | Neg (1.0/0.0)          | Neg (1.0/0.0)   | Pos/ 33,3         |
| RSV pos 7  | 19.6         | Pos (2.9/29.3)         |                 |                   |
| RSV pos 8  | 21.6         | Pos (3.4/28)           |                 |                   |
| RSV pos 9  | 21.2         | Pos (3.9/26.1)         |                 |                   |
| RSV pos 10 | 27.1         | PCR INHIBITION         | PCR INHIBITION  | Pos/ 26,9         |

Testitulokset kymmenestä aikaisemmin Xpert Xpress SARS-CoV-2 järjestelmällä tehdystä positiivisesta SARS-CoV-2 näytteestä. GeneXpert järjestelmä tunnistaa SARS-CoV-2 viruksen geenien E- ja N2-nukleinihappoja sekä antaa Ct-arvot molemmista. Ensimmäisessä testisarjassa Genomeralla saatiin väärät negatiiviset testitulokset Covid pos 1, Covid pos 3, Covid pos 8 ja Covid pos 10 näytteistä. Näytteet, joista saatiin väärät negatiiviset testitulokset, uusittiin sekä 50µl että 10 µl näytemäärillä. Tulos oli molemmilla näytemäärillä sama. Uusintana tehdyssä varmistussarjassa saatiin Covid pos 1 ja Covid pos 8 näytteistä oikeat positiiviset testitulokset. Vertailuna kolmanteen menetelmään Covid pos 3 uusittiin QIAStat-DX Respiratory SARS-CoV-2 Panel menetelmällä, joka antoi kyseisestä näytteestä väärän negatiivisen tuloksen (Taulukko 4)



Taulukko 4. SARS-CoV-2 positiivisten näytteiden Genomera ja QIAstat testitulokset

| Näyte        | GeneXpert Ct-tyyppi E ja N2 | GenomEra tulos (Ra/Ct) | Uusinta (Ra/Ct)                | QIAstat tulos |
|--------------|-----------------------------|------------------------|--------------------------------|---------------|
| Covid pos 1  | 28.2 /30.8                  | Neg (1.0/0.0)          | Pos (25.4/36.1)<br>(6.7/37.9)  |               |
| Covid pos 2  | 23.7 /25.9                  | Pos (51.4/31.8)        |                                |               |
| Covid pos 3  | 0 / 40.2                    | Neg (1.4/0.0)          | Neg (1.2/0.0)<br>(1.4/0.0)     | Neg           |
| Covid pos4   | 17.8 /19.3                  | Pos (51.4/26.4)        |                                |               |
| Covid pos 5  | 14.7 / 17.2                 | Pos (67.5/24.6)        |                                |               |
| Covid pos 6  | 24 / 25.9                   | Pos (58.2/34.1)        |                                |               |
| Covid pos 7  | 29.1 / 32.4                 | Pos (17.4/35.8)        |                                |               |
| Covid pos 8  | 24.6 /26.6                  | Neg (1.3/0.0)          | Pos (18.6/37.7)<br>(48.2/35.3) |               |
| Covid pos 9  | 23.5 / 25.7                 | Pos (45/35.0)          |                                |               |
| Covid pos 10 | 17.7 /19.2                  | Neg (1.4/0.0)          |                                |               |
| Covid pos 11 | 22.9 / 35.2                 | Pos 59/31.0            |                                |               |

Evaluointitestaussarjassa käytettiin kymmentä aikaisemmin Xpert Xpress Flu/RSV järjestelmällä testattua negatiivista potilasnäytettä sekä kymmentä aikaisemmin Xpert Xpress SARS-CoV-2 järjestelmällä testattua negatiivista potilasnäytettä. Tavoitteena oli näiden testausten myötä mitata uuden GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestipohjan tarkkuutta eli spesifisyyttä.

Testattaessa kymmentä negatiivista influenssanäytettä yhdistelmätesti antoi ensimmäisessä evaluointitestaussarjassa positiivisen tuloksen kahdeksasta näytteestä kymmenestä. Kahdesta näytteestä: Flu neg 1 ja Flu neg 5 saatiin PCR-inhibition tulos. Nämä näytteet uusittiin testiohjeen mukaan ja myös niistä saatiin oikeat negatiiviset testitulokset (Taulukko 5).

Taulukko 5. Flu/RSV negatiivisten näytteiden Genomera testitulokset.

| Näyte      | GeneXpert tulos | GenomEra tulos | GenomEra uusinta |
|------------|-----------------|----------------|------------------|
| Flu neg 1  | Neg             | PCR-INHIB.     | Neg              |
| Flu neg 2  | Neg             | Neg            |                  |
| Flu neg 3  | Neg             | Neg            |                  |
| Flu neg 4  | Neg             | Neg            |                  |
| Flu neg 5  | Neg             | PCR-INHIB.     | Neg              |
| Flu neg 6  | Neg             | Neg            |                  |
| Flu neg 7  | Neg             | Neg            |                  |
| Flu neg 8  | Neg             | Neg            |                  |
| Flu neg 9  | Neg             | Neg            |                  |
| Flu neg 10 | Neg             | Neg            |                  |

Genomera antoi oikeat negatiiviset testitulokset kaikista kymmenestä negatiivisesta SARS-CoV-2 näytteestä (Taulukko 6).

Taulukko 6. SARS-CoV-2 negatiivisten näytteiden Genomera testitulokset.

| Näyte        | GeneXpert tulos | GenomEra tulos | GenomEra uusinta |
|--------------|-----------------|----------------|------------------|
| Covid neg 1  | Neg             | Neg            |                  |
| Covid neg 2  | Neg             | Neg            |                  |
| Covid neg 3  | Neg             | Neg            |                  |
| Covid neg 4  | Neg             | PCR-INHIBITION | Neg              |
| Covid neg 5  | Neg             | Neg            |                  |
| Covid neg 6  | Neg             | Neg            |                  |
| Covid neg 7  | Neg             | Neg            |                  |
| Covid neg 8  | Neg             | PCR-INHIBITION | Neg              |
| Covid neg 9  | Neg             | Neg            |                  |
| Covid neg 10 | Neg             | Neg            |                  |

GenomEralla uudelleen analysoidut väärät negatiiviset testitulokset. Vääriä positiivisia tuloksia ei koko testausarjassa saatu. Flu A pos 3 ja Covid pos 1 ja 8 näytteistä saatiin uusintasarjassa oikeat positiiviset tulokset. Muiden näytteiden tulokset olivat uusinta analysoinnin jälkeenkin negatiivisia riippumatta 50 µl tai 100 µl näytemäärästä (Taulukko 7).

Taulukko 7. Genomeralla saadut väärät negatiiviset tulokset ja niiden uusinta sekä varmistussarja. Xpertillä sekä QIAstatilla.

| Näyte        | GenomEra tulos | GeneXpert Ct arvo(t) | Varmistussarja Ct arvo(t) | Genomera uusinta Ra/Ct arvot |
|--------------|----------------|----------------------|---------------------------|------------------------------|
| Flu A pos 3  | Neg            | 29.3 / 23.1          | Xpert 29.8/29.6           | Pos (1.9/33.7)               |
| Flu A pos 6  | Neg            | 32.9 / 35.4          | Xpert 33.8/35.2           | Neg                          |
| RSV pos 3    | Neg            | 23.8 /               | QIAstat 25.3              | Neg                          |
| RSV pos 5    | Neg            | 28.2/                | QIAstat 29.7              | Neg                          |
| RSV pos 6    | Neg            | 29.9 /               | QIAstat 33.3              | Neg                          |
| Covid pos 1  | Neg            | 28.2 / 30.8          |                           | Pos (25.4/36.1)              |
| Covid pos 3  | Neg            | 0.0 / 40.2           | QIAstat 0,0 (Neg)         | Neg                          |
| Covid pos 8  | Neg            | 24.6 / 26.6          |                           | Pos (18.6/37.7)              |
| Covid pos 10 | Neg            | 17.7/ 19.2           |                           | Neg                          |

Tämän evaluointitestaussarjan referenssinä oli Xpert Xpress Flu/RSV ja Xpert Xpress SARS-CoV-2 testeillä potilasnäytteistä aikaisemmin saadut tulokset. Taulukkoon kahdeksaan on merkitty testisarjassa Genomeralla saadut oikeat positiiviset tulokset 31(34\*) sekä väärät negatiiviset tulokset (9). Koko testikokonaisuuden herkkyudeksi tuli 77,5 % (85 %\*) ja tarkkuudeksi 100 %.

Taulukko 8. Nelikenttäanalyysi evaluointitestaussarjasta.

|                        | GenomEra pos | GenomEra neg |                      |
|------------------------|--------------|--------------|----------------------|
| GeneXpert positiivinen | 31(34*)      | 9            | Yht.40 positiivista  |
| GeneXpert negatiivinen | 0            | 20           | Yht. 20 negatiivistä |

Nelikenttäänalyysi kymmenestä influenssa A positiivisesta näytteestä tehdyistä analyyseistä. Tulokseksi saatiin kahdeksan oikeaa positiivista tulosta ja kaksi väärää negatiivista tulosta. Varmistussarjassa Flu A pos 1 näytteestä saatiin positiivinen tulos. Sensitiivisyys 80 % (90 %\*) ja spesifisyys 100 % (Taulukko 9).

Taulukko 9. Influenssa A positiivisten näytteiden nelikenttäänalyysi.

|                      | <b>GenomEra pos</b> | <b>GenomEra neg</b> |
|----------------------|---------------------|---------------------|
| <b>GeneXpert pos</b> | 8(9*)               | 2                   |
| <b>GeneXpert neg</b> | 0                   | 0                   |

\*Tulokset väärin negatiivisten testitulosten uusimisen jälkeen.

Nelikenttäänalyysi kymmenestä positiivisesta influenssa B näytteestä. Yhdistelmäanalyysi tunnisti viruksen kaikista kymmenestä näytteestä, joten testien sensitiivisyys oli 100 % (Taulukko 10).

Taulukko 10. Influenssa B positiivisten näytteiden nelikenttäänalyysi.

|                            | <b>GenomEra Flu B pos</b> | <b>GenomEra Flu B neg</b> |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>GeneXpert Flu B pos</b> | 10                        | 0                         |
| <b>GeneXpert Flu B neg</b> | 0                         | 0                         |

Kymmenestä positiivisesta RSV-näytteestä tulokseksi saatiin kuusi positiivista, kolme väärää negatiivista ja yksi PCR-inhibition tulos (ei vertailussa). Yhdistelmätestin herkkyys 66,6 % (Taulukko 11).

Taulukko 11. RSV positiivisten näytteiden nelikenttäänalyysi

|                          | <b>GenomEra RSV pos</b> | <b>GenomEra RSV neg</b> |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>GeneXpert RSV pos</b> | 6                       | 3                       |
| <b>GeneXpert RSV neg</b> | 0                       | 0                       |

Nelikenttäänalyysi 10 positiivisesta SARS-CoV-2 näytteestä. Tuloksena seitsemän positiivista ja kolme väärää negatiivista tulosta. Uusintana tehdyssä varmistussarjassa kahden väärän negatiivisen testin tulos muuttui positiiviseksi, (Covid pos 1 ja 8) Testien sensitiivisyys 70 % (90 %\*) (Taulukko 12).

Taulukko 12. SARS-CoV-2 positiivisten näytteiden nelikenttäänalyysi.

|                          | <b>GenomEra CoV pos</b> | <b>GenomEra Cov neg</b> |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>GeneXpert CoV pos</b> | <b>7(9*)</b>            | <b>4(2*)</b>            |
| <b>GeneXpert CoV neg</b> | <b>0</b>                | <b>0</b>                |

\*Väärin negatiivisten uusimisen jälkeen.

Nelikenttäänalyysi negatiivisista aikaisemmin GeneXpert Flu/RSV testijärjestelmällä testatuista influenssanäytteistä. Kaksi näytettä uusittiin PCR-inhibition tuloksen vuoksi. Tarkkuus 100 % (Taulukko 13).

Taulukko 13. Negatiivisten influenssanäytteiden nelikenttäänalyysi.

|                               | <b>GenomEra Flu pos</b> | <b>GenomEra Flu neg</b> |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>GeneXpert Flu /RSV pos</b> | <b>0</b>                | <b>0</b>                |
| <b>GeneXpert Flu/RSV neg</b>  | <b>0</b>                | <b>10</b>               |

Nelikenttäänalyysi kymmenestä negatiivisesta SARS-CoV-2 näytteestä. Yhdistelmätesti antoi negatiivisen tuloksen kaikista kymmenestä näytteestä. Tarkkuus 100 %.

Taulukko 14. Negatiivisten SARS-CoV-2 näytteiden nelikenttäänalyysi.

|                                 | <b>GenomEra SARS-CoV-2 pos</b> | <b>GenomEra SARS-CoV-2 neg</b> |
|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>GeneXpert SARS-CoV-2 pos</b> | <b>0</b>                       | <b>0</b>                       |
| <b>GeneXpert SARS-CoV-2 neg</b> | <b>0</b>                       | <b>10</b>                      |

Yhteenveto Genomera® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestillä tehdyistä analyyseistä. Suluissa tulokset, kun otetaan huomioon Flu pos 3, Covid pos 1 ja Covid pos 8 näytteistä uusintana tehdyssä varmistussarjassa saadut oikeat positiiviset testitulokset (Taulukko 15).

Taulukko 15. Yhteenveto evaluointitestaussarjan tuloksista.

| Tutkittava virus | n  | OP    | ON | VP | VN    | OP%         | ON% |
|------------------|----|-------|----|----|-------|-------------|-----|
| Influenssa A     | 10 | 8     | 10 | 0  | 2(1*) | 80(90*)     | 100 |
| Influenssa B     | 10 | 10    | 10 | 0  | 0     | 100         | 100 |
| RSV              | 10 | 6     | 10 | 0  | 3     | 66,6        | 100 |
| SARS-CoV-2       | 11 | 7(9*) | 10 | 0  | 4(1*) | 63.6(81.8*) | 100 |

\*Tulokset väärin negatiivisten testitulosten uusimisen jälkeen.

n=näytemäärä; OP=oikeat positiiviset; ON=oikeat negatiiviset; VP=virheelliset positiiviset; VN=virheelliset negatiiviset; OP%=oikeiden positiivisten prosenttiosuus; ON%=oikeiden negatiivisten prosenttiosuus.

Influenssa A- virusten positiivisia näytteitä testattaessa yhdistelmätestin herkkyys oli 80(90\*) prosenttia ja tarkkuus 100 %. Influenssa B- positiivisen näytteitä testattaessa herkkyys ja tarkkuus oli 100 %. RS-positiivisia näytteitä testattaessa herkkyys oli 66,6 prosenttia ja tarkkuus 100 %. SARS-CoV-2 positiivisia näytteitä testattaessa herkkyys oli 63,6 % (81,2 %\*) ja tarkkuus 100 %. Koko 61 näytteen testisarjan herkkyudeksi tuli 77,5 % (85 %\*) ja tarkkuudeksi 100 %. Yhtään väärää positiivista tulosta ei saatu koko evaluointitestaussarjassa.

\*Tulokset väärin negatiivisten testitulosten uusimisen jälkeen.

## 11 Pohdinta

Tässä opinnäytetyössä suoritettiin uuden GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestin evaluointitestausta. Tavoitteena oli selvittää, onko uusi yhdistelmätesti riit-

tävän luotettava analyysien tekemiseen kliinisen tutkimuksen apuvälineenä. Päämääränä oli mitata yhdistelmätestin analyttistä herkkyyttä ja tarkkuutta sekä selvittää yhdistelmätestin herkkyyttä ja tarkkuutta jokaisen virustyyppin osalta erikseen. Opinnäytetyö tehtiin Pohjois-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymälle (NordLab) yhteistyössä kliinisen diagnostiikan laitejärjestelmiä valmistavan Abacus Diagnostica Oy:n kanssa.

Evaluointitestauksessa käytettiin kuuttakymmentä yhtä -80 asteeseen pakastettua potilasnäytettä. Vanhimmat testatut näytteet olivat tammikuulta 2020 ja tuoreimmat näytteet olivat kaksi päivää vanhoja. Varsinainen evaluointitestaus tehtiin 18-23.11.2020 NordLabin Kajaanin laboratorion mikrobiologian osastolla olevilla kolmella Genomera CDX analysaattorilla. Referenssinä olevat näytteet olivat aiemmin testattu Xpert Xpress Flu/RSV ja Xpert Xpress SARS-CoV-2 järjestelmillä. Mukana oli yhteensä 41 positiivista potilasnäytettä: Yksitoista SARS-CoV-2-näytettä, kymmenen influenssa A-näytettä, kymmenen influenssa B-näytettä sekä kymmenen RSV-näytettä. Negatiivisina vertailunäytteinä oli kymmenen negatiivista Xpert Xpress Flu/RSV menetelmällä testattua sekä kymmenen negatiivista Xpert Xpress SARS-CoV-2 menetelmällä testattua potilasnäytettä.

Näytteet esikäsiteltiin biosuojakaapissa, joka sijaitsi eri huoneessa, kuin analysaattorit. Työskentely oli aseptista ja siinä noudatettiin työohjeen mukaista menetelmää sekä työjärjestystä. Testitulokset kirjattiin ylös Excel - taulukoihin ja testijärjestelmän valmistaja Abacus Diagnostica Oy sai ne käyttöönsä osana heidän teettämäänsä laajempaa yhdistelmätestin evaluointia, jossa testattiin yhteensä 308 näytettä. Abacus Diagnostica Oy:lle toimitettiin myös testeistä Genomera CDX laiteohjelmistolle tallentunut raakadata. Varsinainen näytetulosten analysointi ja kuvaajien tekeminen suoritettiin IBM SPSS Statistic-25 ohjelman avulla.

### 11.1 Tulosten tarkastelu

Testisarjassa saatiin seuraavanlaisia tuloksia herkkyydelle ja tarkkuudelle: Influenssa A-positiivisten näytteiden osalta yhdistelmätestin herkkyys on 80 % (90 %\*). Influenssa B-positiivisten näytteiden herkkyudeksi 100 %, RSV-positiivisten näytteiden osalta herkkyys on 66,6 % ja SARS-CoV-2 positiivisten näytteiden osalta herkkyys on 63,6 % (81,8 %\*). Kaikkien virustyyppien osalta yhdistelmätestin tarkkuus on 100 %. Koko evaluointitestaussarjan herkkyudeksi tuli 77,5 % (85 %\*) Suluissa on tulokset yhdeksän väärän

negatiivisen tuloksen uusintana tehdyn varmistuksen jälkeen. Koko testisarjan herkkyysdeksi tuli 77,5 % (85 %\*) Suluissa on tulokset yhdeksän väärän negatiivisen tuloksen uusintana tehdyn varmistussarjan jälkeen.

GenomEra®SARS-CoV-2, Flu A/B +RSV yhdistelmätestin valmistajan Abacus Diagnostica Oy:n omien tutkimusten perusteella syynä väriin negatiivisiin tuloksiin voi olla muun muassa seuraavia syitä:

- Pakastinsäilytys ja sulatus heikentävät viruksia ja osa viruksista saattaa tässä yhteydessä hajota, jolloin RNA on vapaana ympäröivässä nenänielumatriisissa, joka sisältää runsaasti RNAaseja. Nämä voivat tehokkaasti tuhota vapaana olevan virus-RNA:n jo lyhyessä ajassa. Näyte pyritään pitämään suoraan PCR-yhteensopivana ja esikäsitteily yksinkertaisena. Tällöin pakastuksen seurauksena hajonnut näyte on alttiimpi heikentymiselle ilman suojaavia reagensseja.
- RSV on selvästi analyyttiseltä herkkyydeltään epäherkempi kuin yhdistelmätestin muiden analyyttinen herkkyys, kuten GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestin testipakkauksen tuoteselosteesta voi todeta. (Abacus Diagnostica 2020:11.) Tämä on ollut tietoinen kompromissivalinta testin kehityksen yhteydessä. Monianalyttinen kehitys on haastavaa, ja erityisen haastavaa testialustoille, joissa ei tehdä konsentroivaa näytteenkäsittelyä. Tällöin itse PCR-reagenssit on optimoitava erityisen herkiksi.
- Koronarajoitusten vuoksi kuluneen talven influenssakausi on jäänyt olemattomaksi verrattuna aikaisempiin vuosiin. Myös influenssarokotusten suosio on vaikuttanut tähän kehitykseen. Tämän vuoksi uuden yhdistelmätestin suorituskykytutkimusta tuoreilla näytteillä on ollut liki mahdotonta tehdä influenssan ja RSV:n osalta.

Kaikkein paras herkkyys yhdistelmätestillä oli influenssa B- viruksen osalta, jonka se tunnisti kaikista kymmenestä positiivisesta näytteestä, herkkyys 100 %. Seuraavaksi herkin se oli influenssa A- viruksen osalta, jonka se tunnisti yhdeksästä positiivisesta näytteestä kymmenestä, herkkyys 90 %. Kolmanneksi herkin yhdistelmätesti oli SARS-CoV-2 virus positiivisten näytteiden osalta, jonka se tunnisti yhdeksästä näytteestä yhdestätoista, herkkyys 81,8 % ja kaikkein heikoimmin yhdistelmätesti tunnisti RSV positii-



viset näytteet, joista oikea positiivinen tulos tuli varmistamisen jälkeenkin kuudesta näytteestä yhdeksästä ja jonka herkkyydeksi tuli väärin negatiivisten tulosten varmistamisen jälkeenkin 66,6 %.

Kun otetaan huomioon, että evaluointitestauksessa käytetyt näytteet olivat pakastettuja, voidaan testin herkkyyttä pitää riittävän hyvänä (85 %) sekä tarkkuutta erinomaisena (100 %). Pohdintaan jää se millaiseksi tulos olisi muodostunut, jos käytettävissä olisi ollut tuoreita, pakastamattomia potilasnäytteitä. Jos vertaa saatuja tuloksia talvikaudella 2018-2019 Poitiersin sairaalassa Ranskassa tehtyyn GenomEra Flu A/B + RSV testin evaluointitestaukseen, jonka sensitiivisyys jokaisella virustyypillä on vähintään yli 96 % ja spesifisyys jokaisella virustyypillä vähintään 98 %, voi olettaa uuden yhdistelmätestin herkkyyden tuoreilla, pakastamattomilla näytteillä olevan huomattavasti parempi kuin pakastetuilla.

## 11.2 Luotettavuus

Näytteiden huolellisesta esikäsittelystä ja pipetoinnista huolimatta ei voida sulkea pois inhimillisen virheen mahdollisuutta. Pienikin ilmakupla pipetoitaessa lastulle 35µl esikäsiteltyä näytettä voi häiritä testin lopputulosta. Tämän takia katsottiin tarpeelliseksi varmistaa paitsi kaikki testit, joista ei saatu laadullista tulosta, myös kaikki väärät negatiiviset tulokset varmistettiin.

Näytteiden sulatuksessa, esikäsittelyssä ja analysoinnissa tavoiteltiin mahdollisimman huolellista työskentelyä. Näytteet kuljetettiin suojauspusseissa -80 asteisesta pakastimesta ja niiden annettiin sulaa suojakaapissa tunnin ajan ennen esikäsittelyä. Näytteiden esikäsittelyssä toimitettiin aseptisesti desinfioimalla suojakaappi ennen näytteiden käsittelyä, käyttämällä suojaessua, puuterittomia nitrilikäsineitä sekä kirurgista hengityssuojaa. Ristikontaminaation syntymisen estämiseksi näytteitä käsiteltiin yhtä näyteputkea kerrallaan ja tekemällä työ tarkasti ohjeiden mukaisesti. Analysointi tehtiin neljän näytteen sarjoissa ja kolmella NordLabin Kajaanin mikrobiologian laboratoriossa käytössä olevilla Genomera CDX analysaattorilla.

### 11.3 Opinnäytetyön eettisten näkökohtien tarkastelu

Etiikalla tarkoitetaan, että tutkimus on luotettava ja tulosten uskottavuus edellyttää, että tutkimuksessa noudatetaan hyvää tieteellistä käytäntöä. Tutkimus oli vastuullista ja noudatimme hyvää tutkimusetiikkaa. Hyvän tieteellisen käytännön mukaisesti tutkimuksen tulee olla huolellista, tarkkaa sekä menetelmien toistettavia. Toistettavuus on tulosten yhtäpitävyyttä, kun näytteiden määritykset on tehty samoissa olosuhteissa ja samoista näytteistä. (Hägg 2016:31.)

Bioanalyttikko käsittelee kaikkea biologista näytemateriaalia näytteen luovuttajan yksityisyyttä ja oikeuksia kunnioittaen (Suomen Bioanalyttikkoliitto ry:2017.) Tutkimuksessa käytimme vanhoja potilasnäytteitä. Emme käsitelleet niissä olevia henkilötietoja. Normaalisti vanhojen potilasnäytteiden käyttö tutkimuksissa ei vaadi suostumuksen hakemista potilailta. (Tenk 2020:2-7.)

Noudatimme tätä tutkimusta tehtäessä hyvää tieteellistä käytäntöä. Olimme perehtyneet opinnäytetyön aiheeseen, sekä kokosimme teoriatietoa aiheeseen liittyen. Olimme tutustuneet opinnäytetyön tutkimuseettisiin ohjeisiin sekä henkilötietojen käsittelyyn ja tietosuojaperiaatteisiin (Arene 2020). Pyrimme käytännön tutkimuksessa mahdollisimman huolelliseen työskentelyyn. Saimme NordLabilta, Metropolia Ammattikorkeakoululta sekä Abacus Diagnosticalta ohjeita evaluointitestaussarjan suorittamista- sekä raportointia varten. Saimme NordLabilta, Metropolia Ammattikorkeakoululta sekä Abacus Diagnostica Oy:ltä ohjeita evaluointitestaussarjan suorittamista- sekä raportointia varten.

Tämän opinnäytetyön tekovaiheessa sekä valmiin työn tarkastamisessa käytimme Turnitin-plagioinnin tarkistamisohjelmaa. Se osoittaa, että tutkimuksellisenä työnä tekemämme opinnäytetyötä ei ole kopioitu toisesta materiaalista. Se auttaa osoittamaan tekemämme työn olevan luotettavaa ja tuottamamme materiaalin olevan omaa tekemäämme. Turnitin- prosentti muodostui suurimmalta osin Metropolia Ammattikorkeakoulun valmiista opinnäytetyön pohjasta sekä lähdeluettelosta.

NordLabin johtava lääkäri hyväksyi ja allekirjoitti tutkimuslupahakemuksen 16.11.2020. Lupa vanhojen potilasnäytteiden käyttöön evaluoinnissa saatiin Kainuun sosiaali- ja terveydenhuollon kuntayhtymän (Kainuun sote) johtavalta lääkäriltä.

## 11.4 Johtopäätökset

Kajaanin NordLabin mikrobiologian laboratoriossa suoritettu evaluointitestausta on ollut osana kliinisen diagnostiikan laite- ja analyysijärjestelmiä valmistavan Abacus Diagnostica Oy:n teettämää laajempaa Genomera® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestin evaluointia, jota on tehty neljässä eri tutkimuslaitoksessa Euroopassa vuoden 2020 viimeisestä vuosineljänneksestä alkaen. Evaluointitestaussarja on ollut osana suurempaa kaikkiaan 308 analyysin sarjaa. Näistä 100 on testattu tuoreilla pakastamattomilla potilasnäytteillä ja 208 pakastetuilla potilasnäytteillä. Näitä tuloksia tarkasteltaessa voidaan huomata Kajaanissa tehdyn evaluointitestaussarjan olevan hyvin linjassa osana GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestin koko evaluointitestaussarjassa pakastetuista näytteistä saatuja tuloksia. Laajempi evaluointikonaisuus on jatkunut eurooppalaisissa tutkimuslaitoksissa kevääseen 2021 saakka (Abacus Diagnostica 2020:11-13).

Vertailuna kolmanteen menetelmään Flu A pos 6, RSV pos 3,5,6 ja 10 sekä Covid pos 3 näytteet uusittiin QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel- järjestelmällä. Kaikista neljästä RSV-pos näytteestä saatiin oikeat positiiviset tulokset, ja niiden Ct-arvot olivat välillä 25,3-33,3. Flu A pos 6 sekä Covid pos 3 näytteistä QIAstatilla saatiin väärät negatiiviset tulokset. Genomeralla tehdyn varmistussarjan tuloksena oli väärät negatiiviset tulokset RSV pos 3,5 ja 6 näytteistä sekä 50µl että 100µl näytemäärillä. RSV pos 10 näytteestä ei Genomeralla saatu laadullista tulosta ja se jätettiin pois vertailuista.

Kun tarkastellaan Kajaanissa testeissä saatujen väärin negatiivisten tulosten listaa, voi huomata kyseisten testien GeneXpertillä saatujen Ct-arvojen olevan suurimmaksi osaksi niin sanottuja heikkoja positiivisia tuloksia eli kyseisten tutkimusten PCR-syklien määrä on suhteellisen suuri (>25).

Väärät negatiiviset tulokset antaneille näytteille tehtiin uusinta-analysit 50µl ja 100µl näytemäärillä. Flu A pos 3, Covid pos 1 ja 8 vääristä negatiivisista tuloksista tuli varmistussarjassa oikeat positiiviset tulokset näytemääristä riippumatta. Muiden varmistussarjassa uusittujen väärin negatiivisten varmistussarjan tulos pysyi vääränä negatiivisena riippumatta, oliko ne uusittu 50µl tai 100µl näytemäärillä (Flu A pos 6, Covid pos 3,10 ja RSV pos 3,5 ja 6).

### 11.5 Tutkimuksen hyötyjä

NordLabin Kajaanin mikrobiologian laboratoriossa suoritettu evaluointitestaus oli osana suurempaa neljässä eurooppalaisessa tutkimuslaitoksessa tehtyä GenomEra® SARS-CoV-2, FLU A/B + RSV yhdistelmätestin laajempaa evaluointia. Tämän avulla uusi yhdistelmätesti sai CE-merkinnän 30.11.2020 ja kansainvälisen myyntiluvan joulukuussa 2020. Tämän myötä Genomera CDX- järjestelmällä voidaan tutkia laboratorioissa influenssa A-, influenssa B-, RSV ja SARS-CoV-2 virustyyppien esiintymistä näytteessä yhdellä testillä. Tämä nopeuttaa potilaalle tehtävän kliinisen diagnoosin tekemistä sekä oikeanlaisen hoidon nopeaa aloittamista.

### 11.6 Jatkotutkimuksia

Abacus Diagnostica Oy:n mukaan GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestille tullaan pohtimaan jatkoevaluointeja edelleen ensi kesällä 2021. Testin herkkyyttä halutaan parantaa edelleen erityisesti RSV:n osalta. Abacus Diagnostica on kehittänyt myös maaliskuussa 2021 tutkimuskäyttöön tulevan uuden RT-qPCR pohjaisen RUO-SARS-CoV-2 + VOC- testin. Tällä testillä voidaan tehdä SARS-CoV-2 viruksen epidemiologista tutkimusta ja määrittää virusvarianttien genomien vaihtelua. Testi ilmoittaa SARS-CoV-2 viruksen RdRP-geenin esiintymisen näytteessä, joka on erityinen piirre kaikissa SARS-CoV-2 viruksen RNA-juosteissa. Tämän lisäksi RUO SARS-CoV-2 + VOC testi erottaa tarkasti piikkiproteiini 69/70 ja ORF1a 3675-3677 virusmuunnokset, joista on useita eri virusvariantteja. Ensimmäistä kertaa virusmuunnokset eristettiin Englannissa (B.1.1.7), Etelä-Afrikassa (B.1.351) ja Brasiliassa (P.1). (Abacus Diagnostica 2021:1.)

Näiden tulevien GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV yhdistelmätestin mahdollisten jatkoevaluointien ja nyt tutkimuskäytössä olevan RUO-SARS-CoV-2 + VOC varianttitestin evaluoinnissa voisi olla mielenkiintoisia opinnäytetyön aiheita bioanalyttikko - opiskelijoille. Jos kiinnostusta riittää, kannattaa olla aktiivinen ja ottaa yhteyttä Abacus Diagnostica Oy yhtiöön ja Genomera CDX järjestelmää käyttävään laboratorioon, sekä kysyä mahdollisuutta osallistua evaluointitestaukseen, niin kuin mekin teimme.

## 11.7 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyössämme jäsensimme NordLabilta saamamme aiheen sisällön, jonka jälkeen laadimme suunnitelman työn toteuttamista varten. Suunnitelman valmistumisen ja hyväksymisen jälkeen evaluointiin liittyvät testaukset analysoitiin NordLabin Kajaanin mikrobiologian laboratoriossa ja niistä kirjoitettiin kokeellisena tutkimuksena suoritettu opinnäytetyöraportti. Ryhmätyönä tehty opinnäytetyöprosessi edellytti aikataulujen hallintaa, työn organisointia, työajan ja aikataulun hallintaa sekä yhteneväisten tavoitetasojen asettamista. Osasimme myös joustaa molempien elämäntilanteiden myötä tarvittaessa ja molempien vastuullinen asenne työtä kohtaan mahdollisti työmäärän tasaisen jakamisen ja työn edistymiseen tähtäävän työnjaon.

Opinnäytetyömme tavoitteena oli suorittaa laadukasta evaluointitestausta sekä sen myötä kirjoitetun raportin myötä osoittaa ammattitaitoamme ja osaamistamme bioanalyttikkoina. Perehdyimme influenssa A-, influenssa B-, RS- ja SARS-CoV-2-virusista tehtyihin tutkimuksiin sekä näiden virusten aiheuttamiin infektoihin. Tutustuimme myös PCR-, RT-PCR ja RT-qPCR- pohjaisten tutkimusten periaatteisiin ja toteuttamiseen. Teimme evaluointiin liittyviä analyysitestejä GenomEra®SARS-CoV-2, Flu A/B+RSV yhdistelmätestin lisäksi GeneXpert® Xpert Xpress Flu/RSV, GeneXpert® Xpert Xpress SARS-CoV-2 sekä QIAstat-DX® SARS-CoV-2 Respiratory Panel järjestelmillä. Tiedonhaussa käytimme lähteinä oppikirjoja, tieteellisiä tutkimuksia ja artikkeleita, käyttöohje-kirjoja sekä sähköisiä dokumentteja. Tutkimuksellisena työnä tehtyä opinnäytetyötä varten teimme vastuullista evaluointitestausta noudattamalla ohjeita ja hyvää tutkimusetiikkaa. Kirjasimme saamamme tulokset välittömästi ylös. Tekemämme testaukset ovat helposti toistettavia. Emme tinkineet missään vaiheessa työmme laadusta ja teimme tulosten vertailun hyväksytyjen normien mukaisesti. Koimme tähän opinnäytetyöhön liittyvän evaluointitestaussarjan tekemisen, tulosten dokumentoinnin ja tulkinnan olevan tärkeä osa ammatillista kehitystämme. Saimme tehdä tutkimusta hyvin ajankohtaisesta aiheesta.

Tämä NordLabin Kajaanin mikrobiologian laboratoriossa tehty evaluointitestaussarja oli osana laajempaa Genomera®SARS-CoV-2, Flu A/B+RSV yhdistelmätestin evaluointia, jota tehtiin neljässä eurooppalaisessa tutkimuslaitoksessa syksyn 2020 ja kevään 2021 aikana. Tämä NordLabin Kajaanin mikrobiologian laboratoriossa tehty evaluointitestaussarja oli osana laajempaa Genomera®SARS-CoV-2, Flu A/B+RSV yhdistelmätestin eva-

luointia, jota tehtiin neljässä eurooppalaisessa tutkimuslaitoksessa syksyn 2020 ja kevään 2021 aikana. Tämä myötävaikutti siihen, että GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B+RSV yhdistelmätesti sai CE-IVD merkinnän 30.11.2020, sekä kansainvälisen myyntiluvan joulukuussa 2020. Tämä myötävaikutti siihen, että GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B+RSV yhdistelmätesti sai CE-merkinnän 30.11.2020, sekä kansainvälisen myyntiluvan joulukuussa 2020. Pystyimme tämän opinnäytetyön myötä hyödyntämään ja kehittämään ammatillista osaamistamme sekä koimme olevamme pieneltä osaltamme hyödyksi COVID-19 taudin aiheuttaman pandemian kuriin saattamiseksi.

## Lähteet

Abacus Diagnostica 2020. Genomera®: SARS-CoV-2, Flu A/B +RSV Assay Kit. Package Insert. Version 1.0 CE IVD, 2020-11. Testiohjekirja. Luettu 18.11.2020.

Abacus Diagnostica 2021:1. RUO-SARS-COV-2 + VOC. Verkkodokumentti. Saatavilla sähköisesti. < <https://www.abacusdiagnostica.com/products/ruo-sars-cov-2-voc/>> Luettu 28.3.2021.

Anttila, Pirkko 2005:270-271. Tutkiva toiminta ja ilmaisu, teos, tekeminen. 2.painos. Hamina: Akatiimi Oy.

Bio-Rad Laboratories 2021:1. Verkkodokumentti. <https://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/presentations-activities-for-workshops-teaching?ID=NISQQ7E8Z> Luettu 24.1.2021

Boktor, Sameh W-Hafner, John W 2020:1. Influenza. National Library of Medicine. Verkkodokumentti. Julkaistu 21.11.2020. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29083802/>> Luettu 9.1.2021.

Centers for Disease Control and Prevention 2020. About COVID-19. Verkkodokumentti. Julkaistu 1.9.2020. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cdcrsponse/about-COVID-19.html> Luettu 16.2.2021.

Cepheid 2020:1 a. Datasheet. [https://www.cepheid.com/en\\_US/tests/Critical-Infectious-Diseases/Xpert-Xpress-SARS-CoV-2-F](https://www.cepheid.com/en_US/tests/Critical-Infectious-Diseases/Xpert-Xpress-SARS-CoV-2-F). Luettu 2.3.2021.

Cepheid 2020:1 b. Datasheet. <https://p.widencdn.net/nbgftl/Cepheid-Xpert-Xpress-Flu-RSV-Datasheet-CE-IVD-3078-English> Luettu 2.3.2021.

Chan, Jasper Fuk - Woo-Kok, Kin - Hang, Zhu, Zheng - Chu, Hin-Wang To, Kelvin Kai-Yuan, Shuofeng - Yuen, Kwok - Yung 2020:221-225. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. Artikkeliteoksessa: Emerging Microbes&Infections. (2020;9(1):221-236). Bethesda USA. National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine. Julkaistu verkossa 28.1.2020.Pub med. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7067204/>

Choquet, Emeline - Chessa, Celine - Lariviere, Andy – Beby - Defaux, Agnes - Leveque, Nicolas-Pichon, Maxime 201):1. Evaluation of GenomEra® CDX System for Influenza and RSV Infections. Posterisitys. European Society for Clinical Virology. Tanska. Tutkimus julkaistu syyskuussa 2019.< [https://www.abacusdiagnostica.com/wp-content/uploads/2019/09/Choquet\\_ESCV\\_2019.pdf](https://www.abacusdiagnostica.com/wp-content/uploads/2019/09/Choquet_ESCV_2019.pdf)> Luettu 19.3.2021.

Copan 2021:1-5. Copan® UTM: Viral transport. Verkkójulkaisu. <https://www.copanusa.com/sample-collection-transport-processing/utm-viral-transport/> Luettu 20.3.2021.

Cycle Threshold Values-Public Health Ontario 2020. Nettijulkaisu. Julkaistu 17.9.2020.< <https://www.publichealthontario.ca/-/media/documents/ncov/main/2020/09/cycle-threshold-values-sars-cov2-pcr.pdf?la=en>> Luettu 16.11.2020.

de Wilde, Adriaan H-Snijder Eric J – Kikkert, Marjolein-van Hemert, Martijn J 2018. Host Factors in Coronavirus Replication. Curr Top Microbiol Immunol. 2018; 419:1-42. Luettu 24.9.2020.

European Centre for Disease Prevention and Control.2020:1. Diagnostic testing and screening for SARS-CoV-2. Saatavilla sähköisesti. Julkaistu 11.1.2020.< <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/diagnostic-testing>> Luettu 12.12.2020.

Gao, Shuman-Zhang, Wenyu-Lu, Congyu- Cao, Mengmeng-Cen, Shan-Peng, Yousong-Deng, Tao.2019:1. Identification of a Type-Specific Promoter Element That Differentiates between Influenza A and B Viruses. Bethesda.Journal of Virology. 2019 Dec 1;93(23):e01164-19. Julkaistu sähköisesti 13.11.2019. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6854497/>> Luettu 31.3.2021.

Genomera® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit.2020. Package Insert. Turku. Abacus Diagnostica. <[www.abacusdiagnostica.com](http://www.abacusdiagnostica.com)>

Haajanen, Kari - Pelkonen, Jani – Pärssinen, Raimo – Suominen, Ilari 2010:154-158. Geenitekniikka. Turku: Turun Ammattikorkeakoulu. Luettu 12.3.2021.

Hägg, Margareta 2016:31. Validoinnin suunnittelun opas. Espoo. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. Luettu 12.3.2021.

Heikkinen, Terho - Julkunen, Ilkka 2020: 530. Infektiosairaudet. Artikkeliteoksesta Heikkinen, Terho – Järvinen Asko – Meri Esko – Vapalahti Olli – Vuopio Jaana (toim.): Mikrobiologia – mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet kirja1. Helsinki: Kustannus Duodecim Oy. Luettu 23.12.2020.

Heikkinen, Terho - Ojala, Emilia - Waris, Matti. 2016:132. RS-virus merkittävä taudinaiheuttaja myös imeväisiän jälkeen. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim. Saatavilla sähköisesti. < <https://www.duodecimlehti.fi/duo13455>> Luettu 16.3.2021.

Hetemäki, Iivo 2020:1-4.Todennäköisyysajattelu koronavirusinfektion diagnostiikassa. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. 2020;135(16):1830-7.Saatavilla sähköisesti. <https://www.duodecimlehti.fi/duo15670> Luettu 17.3.2021.

Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. 2012. Tutkimuseettinen Neuvottelukunta. Saatavilla sähköisesti. [https://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK\\_ohje2012.pdf](https://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje2012.pdf) Luettu 20.9.2020

Jääskeläinen, AnneMarjut J.- Lappalainen, Maija - Kurkela, Satu 2020:1-5. COVID-19-taudin vasta-ainediagnostiikka. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. Julkaistu



3.2.2021. Saatavilla sähköisesti. < <https://www.duodecimlehti.fi/duo16036>> Luettu 31.3.2021.

Jawerth, Nicole 2020:1-2. How is the COVID-19 Virus Detected using Real Time RT-PCR? IAEA, International Atomic Energy Agency. Saatavilla sähköisesti. Julkaistu 27.3.2020. Päivitetty 18.11.2020.< <https://www.iaea.org/newscenter/news/how-is-the-covid-19-virus-detected-using-real-time-rt-pcr>> Luettu 17.3.2021.

Karagöz, Joonas. 2020 Influenssa A- ja B-virusantigeeniosoitus- pikatestin ja nukleinihaponosoitustestin vertailu HUSLABissa. Opinnäytetyö Theseuksessa. Saatavilla sähköisesti. Päivitetty 17.4.2020. [https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/336912/karagoz\\_Joonas.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/336912/karagoz_Joonas.pdf?sequence=2&isAllowed=y) Luettu 17.3.2021.

Khot, Prasanna D-Fredricks, David N 2009:1-7. PCR-based diagnosis of human fungal infections. Expert Rev Anti Infect Ther.2009 Dec;7(10):1201-1221. Saatavilla sähköisesti. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2845394/>>luettu 16.3.2021.

Laboline 2021:3-8. Laboline vetokaapit. Labo Line Oy. Helsinki. Saatavilla sähköisesti. Päivitetty 25.2.2021. < [https://laboline.fi/wp-content/uploads/woocomerce\\_uploads/2021/03/labmodul-vetokaapit-fy6dby.pdf](https://laboline.fi/wp-content/uploads/woocomerce_uploads/2021/03/labmodul-vetokaapit-fy6dby.pdf)> Luettu 16.3.2021.

Laham, R Federico-Mansbach, Jonathan M-Pedra, Pedro A-Hasegava, Kohei-Sullivan. Ashley F-Espinola, Janice A-Camarco, Carlos 2017:808-810. Clinical Profiles of Respiratory Syncytial Virus Subtypes A and B among Children Hospitalized with Bronchiolitis. Pediatr Infect Dis J.2017 Aug, 36(8);808-810. Bethesda USA. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Saatavilla sähköisesti. Päivitetty 1.8.2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5556381/> Luettu 19.3.2021.

## Lähteet

Laki terveydenhuollon laitteista ja tarvikkeista.2010/629. Annettu Naantalissa 24.6.2010. Saatavilla sähköisesti. < <https://finlex.fi/fi/laki/alkup/2010/20100629>> Luettu 1.4.2021.

Lumio, Jukka 2020:1-3. Infektioiden aiheuttajat: Loiset, bakteerit, arkit, sienet, alkueläimet, virukset ja prionit. Helsinki. Kustannus Duodecim Oy. Päivitetty 28.4.2020 [https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00562#s6;luettu](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00562#s6;luettu) Luettu 10.9.2020.

NordLab 2020. Ohjeita ammattikorkeakoulun ja ammattiopiston opiskelijoille. Verkkojulkaisu. <[www.nordlab.fi](http://www.nordlab.fi)>Päivitetty 11.2.2020. Luettu 26.2.2021.

Peltola, Ville - Aittoniemi, Janne 2014. Onko influenssavirusten ja muiden hengitystievirusten testaaminen tarpeen? Suomalainen lääkärisseura Duodecim. 2019. Verkkodokumentti. Päivitetty 12.6.2014.< <https://www.kaypahoito.fi/nix02071>> Luettu 17.3.2021.

Pitkäniemi, Janne 2005. Kurssimoniste (luku 3). Biostatistiikkaa esimerkkien avulla. Helsingin Yliopisto, Kansanterveystieteen laitos. Helsinki.

Public Health Ontario 2020:1-6; 4; 6. An Overview of Threshold Values and their Role in SARS-CoV-2 Real-Time PCR Test Interpretation. Queens printer for Ontario. Saatavilla sähköisesti. Päivitetty 17.9.2020.< <https://www.publichealthontario.ca/-/media/documents/ncov/main/2020/09/cycle-threshold-values-sars-cov2-pcr.pdf?la=en>> Luettu 23.12.2021.

Qiagen 2019:15. QIAstat-Dx Analyzer 1.0 User Manual 2019. Käyttöohjekirja. Julkaistu 4/2019.Saatavilla sähköisesti. < [file:///C:/Users/mikko/Downloads/HB-2636-001\\_MDx\\_UM\\_QIAstat-Dx\\_Analyzer\\_SW\\_1-2\\_0419\\_ROW-print.pdf](file:///C:/Users/mikko/Downloads/HB-2636-001_MDx_UM_QIAstat-Dx_Analyzer_SW_1-2_0419_ROW-print.pdf)> Luettu 18.2.2021.

Qiagen 2020:42-45. QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel Instructions for Use (Handbook)2020. Käyttöohjekirja. Julkaistu syyskuussa 2020. Saatavilla sähköisesti.><https://www.fda.gov/media/136571/download>> Luettu 18.2.2021.

Saksela, Kalle – Söderlund – Venermo, Maria 2020:479-487. Virusten yleiset ominaisuudet, rakenne ja luokittelu. Teoksessa: Mikrobiologia immunologia ja infektiosairaudet 1. (Toim.): 2020.Helsinki: Kustannus Duodecim Oy. Luettu 16.2.2021.

Shereen, Muhammad Adnan - Khan, Suliman - Kazmi, Abeer - Bashir, Nadia - Siddique, Rabeea 2020:1-8. Covid-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. Journal of Advanced Research. Julkaistu 24.7.2020. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123220300540> Luettu 12.1.2021.

Singanayagam, Anika - Patel, Monika - Charlett, Andre - Lopez Bernal, Jamie - Saliba, Vanessa - Ellis, Joanne - Ladhani, Shamez - Zambon, Maria - Gopal, Robin 2020:25-29.Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. Euro Surveill. 13.8.2020:25-32. Saatavilla sähköisesti <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7427302/> Luettu 9.3.2021.

Solunetti 2006:1. Virusten rakenne. Saatavilla sähköisesti. < [https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/virusten\\_rakenne/](https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/virusten_rakenne/)> Luettu 20.3.2021.

Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2017. Bioanalytikon, Laboratorionhoitajan Eettiset ohjeet. Saatavana sähköisesti. Päivitetty 26.8.2017 [https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaatteet\\_FI\\_print\\_2017.pdf](https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaatteet_FI_print_2017.pdf). Luettu 13.3.2021.

Suomisanakirja 2021.Evaluointi. Verkkojulkaisu. Luettavissa sähköisesti.<  
<https://www.suomisanakirja.fi/evaluointi>> Luettu 17.4.2021.

TENK. 2020:2-7. Ihmistieteiden eettisen ennakoarvioinnin ohje. Tutkimuseettinen Neuvottelukunta (TENK). Saatavilla sähköisesti. Päivitetty 10.12.2020.< [https://tenk.fi/fi/ohjeet-ja-aineistot/ihmistieteiden-eettisen-ennakoarvioinnin-ohje#3\\_1](https://tenk.fi/fi/ohjeet-ja-aineistot/ihmistieteiden-eettisen-ennakoarvioinnin-ohje#3_1)> Luettu 11.12.2020.

THL 2019:1. RSV laboratoriotutkimukset. Infektiotaudit ja rokotukset. Verkkojulkaisu. Päivitetty 4.12.2019. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/rsv/rsv-laboratoriotutkimukset> Luettu 19.3.2021.

THL 2020. 1 d. Infektiotaudit ja rokotukset. Influenssa. Terveysten- ja hyvinvoinnin laitos. Saatavilla sähköisesti. Päivitetty 24.2.2020. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/influenssa> Luettu 17.4.2021.

THL 2020:1 a. Antigeenitestillä koronatartunnan saaneet voi tunnistaa nopeasti. Saatavilla sähköisesti. Julkaistu 24.11.2020. <https://thl.fi/fi/-/antigeenitestilla-koronatartunnan-saaneet-voi-tunnistaa-nopeasti> Luettu 31.3.2021.

THL 2020:1 b. Infektiotaudit ja rokotukset. Verkkodokumentti. Päivitetty 24.2.2020. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/influenssa> Luettu 19.12.2020

THL 2020:1 c. Infektiotaudit ja rokotukset: Oireet ja hoito-koronavirus. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos. Verkkodokumentti. Päivitetty 9.2.2021. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/ajankohtaista-koronaviruksesta-covid-19/oireet-ja-hoito-koronavirus> Luettu 16.2.2021.

THL 2021:1. Ajankohtainen influenssakatsaus. Infektiotaudit ja rokotukset. Saatavilla sähköisesti. Päivitetty 12.2.2021. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/influenssa/ajantasainen-influenssakatsaus> Luettu 28.3.2021.

Trochim, William M.K. Introduction to Evaluation. Research Methods Knowledge Base. Verkkodokumentti. Päivitetty 10.3.2020. < <https://conjointly.com/kb/introduction-to-evaluation/> > Luettu 22.3.2021.

Turkulov, V- Madle -Samardzija, N. 2000:154-158. Influenza - always present among us. National Library of Medicine. Mar-Apr 2000;53(3-4):154-8. Saatavilla sähköisesti. Pub Med. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10965680/> Luettu 9.11.2020.

Uhari, Matti - Nieminen, Pentti 2014. Sensitiivisyys ja spesifisyys lasketaan nelikenttätaulukosta. Artikkeliteoksessa Epidemiologia ja biostatistiikka / kliininen epidemiologia. Verkkodokumentti. Duodecim Oppiportti Julkaistu 24.2.2014. Luettu 4.2.2021.

Vacurette 2020:1. Vacurette Virus Stabilization Tube. Verkkodokumentti. <<https://image.tigermedical.com/Manuals/GRE456161-20201019101832911.pdf>> Luettu 20.3.2021.

What are the differences between PCR, RT-PCR, qPCR, and RT-qPCR? 2017:1-2. Enzo. Saatavilla sähköisesti. <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technologies/2017/march/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr?/> Luettu 20.3.2021.

WHO 2018:1. Influenza (Seasonal). Saatavilla sähköisesti. Päivitetty 6.11.2018. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)). Luettu 21.3.2021.

WHO 2020:1 b. Coronavirus disease (COVID-19): How is it transmitted? Verkkodokumentti. Päivitetty 9.7.2020. <https://www.who.int/news-room/q-adeail/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted> Luettu 16.2.2021.

WHO 2020:2 a. Diagnostic testing for SARS-CoV-2. Interim guidance 11 September 2020. Verkkodokumentti. < <file:///C:/Users/mikko/Downloads/WHO-2019-nCoV-laboratory-2020.6-eng.pdf> > Luettu 31.3.2021.

Yu, Xia - Sun, Shanshan, Sun - Yu, Shi-Wang, Hao - Ruihong, Zhao - Jifang, Sheng 2020:1-4. Sars-CoV-2 viral load in sputum correlates with risk of COVID-19 progression. Tutkimusartikkeli. Critical Care 2020.24:170. Julkaistu 26.3.2020. Saatavilla sähköisesti < <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/s13054-020-02893-8.pdf> > Luettu 6.3.2021.

Ziegler, Theti - Heikkinen, Terho 2010:472; 481-483. Influenssavirukset. Artikkeliteoksesta mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Toim: Hedman, Klaus - Heikkinen, Terho - Huovinen, Pentti-Järvinen, Asko - Meri, Seppo - Vaara, Martti. Helsinki. Duodecim oppiportti. Luettu 20.12.2020.

**Genomera SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit. Test Manual.**

**ABACUS** Diagnostica



**GENOMERA® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV  
ASSAY KIT**

PACKAGE INSERT



CDX-140-01-20  
CDX-140-01-40  
CDX-140-01-100

ENGLISH

CONTENTS

|             |  |          |            |
|-------------|--|----------|------------|
| 1           | INTENDED USE AND INTENDED USER.....  | <u>3</u> | <u>2</u>   |
|             | SUMMARY AND EXPLANATION.....   | 3        | 3          |
|             | PRINCIPLE OF THE PROCEDURE.....  | 4        | 4          |
|             | MATERIALS PROVIDED.....  | 4        | 5          |
|             | MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.....   | 4        | 6          |
|             | WARNINGS AND PRECAUTIONS.....  | 4        | 7          |
|             | STORAGE, STABILITY AND HANDLING.....   | 5        | 8          |
|             | DIRECTIONS FOR USE.....  | 6        |            |
| 8.1         | Specimen collection and preparation.....   | 6        |            |
| 8.2         | Storage of specimens.....  | 6        |            |
| 8.3         | Test procedure.....  | 7        |            |
| 9           | INTERPRETATION OF RESULTS.....   |          |            |
|             | .....  | 7        | 9.1        |
|             | .....  | 7        | 9.2        |
|             | .....  | 8        |            |
|             | .....  | 8        |            |
|             | .....  | 8        |            |
| 9.3         | Troubleshooting guide for Borderline, PCR inhibition, Assay failed and Run failed results..... | <u>8</u> | <u>9.4</u> |
|             | Export of results to Laboratory Information System (LIS).....                                  | 9        |            |
| 10          | QUALITY CONTROL (QC).....  |          | <u>10</u>  |
| <u>10.1</u> | Sample processing control (SPC).....   |          | <u>10</u>  |
| 10.2        | External quality assessment (EQA).....   |          | 10         |
| 10.3        | Control samples.....   |          | 10         |
| 11          | PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....   |          | 11         |
| 11.1        | Clinical performance.....  |          | 11         |
| 11.2        | Analytical sensitivity (Limit of Detection).....   |          | 12         |
| 11.3        | Analytical reactivity (Inclusivity).....   |          | 13         |
| 11.4        | Analytical specificity (Exclusivity).....  |          | 14         |
| 11.5        | Interfering substances.....  |          | 14         |
| 11.6        | Reproducibility.....   |          | 15         |
| 11.7        | Sample stability.....  |          | 15         |
| 12          | LIMITATIONS OF THE TEST.....   |          | 16         |
| 12.1        | Inhibitors in clinical samples.....  |          | <u>16</u>  |
| <u>12.2</u> | Competitive interference.....  |          | <u>16</u>  |
| 12.3        | Other limitations.....   |          | 16         |
| 13          | INSTRUCTIONS FOR DISPOSAL.....   |          | 16         |
|             | LITERATURE REFERENCES.....   |          | 17         |
|             | MANUFACTURER.....  |          | 18         |
|             | SYMBOLS.....   |          | 18         |

ENGLISH

## 1 INTENDED USE AND INTENDED USER

The GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit is a rapid *in vitro* diagnostic (IVD) test for simultaneous qualitative detection and differentiation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2), influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus (RSV) nucleic acids. The assay utilizes multiplex real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to amplify viral RNA on the GenomEra CDX system from upper respiratory swab samples collected into Copan eSwab, Universal Transport Medium (UTM) or phosphate buffered saline (PBS) from individuals suspected of respiratory viral infection consistent with symptoms of SARS-CoV-2, influenza A, influenza B or RSV infection.

GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit is intended to aid in the diagnosis of SARS-CoV-2, influenza A/B, and RSV infections in humans when used in conjunction with clinical evaluation, laboratory findings, and epidemiological information. Positive results indicate the presence of viral target RNA in the sample. RNA is generally detectable in upper respiratory specimens during infection. Positive results are indicative of active infection, and do not rule out (co-)infections from bacteria or other viruses not detected by the test. The agent detected may not be the definite cause of disease. Clinical correlation with patient history and other diagnostic information is necessary to determine patient infection status.

Negative results do not preclude SARS-CoV-2, influenza A, influenza B and/or RSV infection and should not be used as the sole basis for diagnosis, treatment, or other patient management decisions. Negative results must be combined with clinical observations, patient history, and epidemiological information.

The intended place of use is a laboratory not necessarily having a specialist in molecular biology but rather personnel who routinely perform assays and analyses in the field of e.g. microbiology, virology, or clinical diagnostics. GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV test is intended to be used in a laboratory environment by laboratory personnel, e.g. laboratory technicians accustomed to normal laboratory methods such as pipetting, vortex mixing and using heating blocks.

## 2 SUMMARY AND EXPLANATION

SARS-CoV-2 is the cause of the ongoing pandemic of COVID-19 respiratory illness that has been designated a public health emergency of international concern by the World Health Organization (WHO).<sup>1,2</sup> As COVID-19 continues to spread globally posing a major public health threat, seasonal respiratory viruses including influenza A, influenza B, and RSV continue to circulate, also causing acute respiratory disease. Clinical manifestations of the diseases can be similar, ranging from asymptomatic or mild illness in a majority of individuals to more severe and life-threatening disease.<sup>3,4</sup> No effective treatment has yet been established for COVID-19 and severe morbidity and mortality has been reported in the elderly and patients with underlying diseases.<sup>5</sup> Therefore, it is crucial to be able to differentiate between SARS-CoV-2 and other common respiratory viruses, and also investigate the clinical features and impact of co-infections.<sup>6</sup>

Since the sensitivity of different rapid diagnostic tests (RDTs) compared to RT-PCR from respiratory specimens appears to be highly variable, and data on RDTs' performance in clinical settings is still limited, WHO recommends that suspected active SARS-CoV-2 infections should be tested with nucleic acid amplification tests such as RT-PCR wherever possible.<sup>7</sup> In suspicion of influenza infection, WHO states that molecular assays should be used in conjunction with clinical and epidemiological information as a primary diagnostic method to screen for viral RNA from respiratory specimens of symptomatic patients.<sup>8,9</sup> In case of RSV, highly sensitive RT-PCR methods are especially recommended for testing older children, adolescents and adults as antigen tests present adequate sensitivity only for infants and young children.<sup>10</sup>



ENGLISH

**3 PRINCIPLE OF THE PROCEDURE**

GenomEra CDX is a molecular diagnostics analyzer consisting of an integrated thermal cycler and a time-resolved fluorometer. The Instrument is operated via the GenomEra CDX Software.

The Instrument is used to run analyte-specific, ready-to-use GenomEra Test Chips that have been developed for the detection of specific nucleic acid sequence(s) in different direct clinical or cultured sample matrices. All reagents required for performing the homogeneous amplification and detection steps are readily contained in dry form in the Test Chips.

The GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit utilizes real-time RT-PCR and hydrolysis probes to detect unique sequence regions of SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase (RdRP), influenza A matrix (M), influenza B hemagglutinin (HA), and RSV nucleocapsid (N) protein genes.

The assay also contains a sample processing control which is included in the GenomEra SPC Tube. The control ensures that the sample preparation is performed according to instructions and functions as an amplification control to monitor assay inhibition. The control contains a small amount of MS2 bacteriophage which mimics the analyte viruses and contains a specific RNA sequence which is detected during the assay run. In the beginning of the automated assay run, the Test Chips are irreversibly sealed in the Instrument to minimize the risk of cross contamination. The target sequences are amplified and detected if present. The assay sequence takes approximately 70 minutes and ends with the reporting of results.

**4 MATERIALS PROVIDED**

The GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV assay kit contains:

- 20/40/100x GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Test Chips
- 20/40/100x GenomEra 1 ml Buffer Ampoule
- 20/40/100x GenomEra SPC Tubes
- Re-usable chip holder

**5 MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

- Transport media and swabs for oropharyngeal specimens e.g.:
  - Copan Catalog No. 482CE. Conical tube filled with 1 mL eSwab™ Liquid Amies medium packaged with one flexible miniti-Nylon-flocked swab, sterile
  - Copan Catalog No. 380C. Conical tube filled with 1mL UTM™ medium packaged with one flexible miniti-FLOQSwab™ sterile
  - Copan Catalog No. 305C. Conical tube filled with 3 mL UTM™ medium packaged with one flexible miniti-FLOQSwab™ sterile
- Thermal Block for 2 mL conical bottom tubes Biosan Bio TDB-100 **Do not use other thermal blocks!**
- GenomEra CDX System (Instrument and Software), Abacus Diagnostica, Order No. CDX-10-020
- Vortex, e.g. Scientific Industries, Inc. Vortex Genie 2, Catalog No. G560E
- Micropipette (middle-range including 35 µL), e.g. Sartorius µJette pipette 10–100 µL, Catalog No. 725050
- Sterile filter-blocked tips, e.g. Thermo Fisher Scientific ART-100, Catalog No. 2065
- Disposable gloves, powderless
- GenomEra CDX software version 1.3.34 or above
- Optical filter package for 5-plex update, Abacus Diagnostica, Order No. CDX-10-039
  - Note! Already installed in GenomEra CDX instruments shipped in 2020 and later.

**6 WARNINGS AND PRECAUTIONS**

- Do not run other than GenomEra viral tests within the same assay run. Other assays are not compatible.
- Wear protective clothing and disposable gloves while handling the kit and the samples.
- Handle the infectious samples in accordance with safe microbiological laboratory procedures. Follow safety procedures set by your institution for working with chemicals and handling biological specimens.
- Do not use the kit after the expiration date.
- Do not use the Test Chips if their foil pouch is torn upon arrival, desiccant is not present or is broken inside the chip pouch, dried reagents are detached, or the barcode or label is missing.
- Do not use the GenomEra 1 ml Buffer Ampoules if the liquid is not clear, the tubes have leaked, or the caps are broken or open upon arrival.
- Do not use the GenomEra SPC Tubes if the caps are broken or open upon arrival.
- Reagents are not interchangeable between lots.
- Do not remove the desiccant from opened Test Chip pouches.
- To avoid cross-contamination by amplification products, never open or pierce used Test Chips.
- The dried reagents start to dissolve as soon as the samples have been inserted to the Test Chips. The assay run should be started immediately (within 3 minutes) from the addition of the sample.
- Do not use calcium alginate swabs, as they may contain substances that inhibit PCR testing.
- Sigma Viral transport medium (Medical Wire & Equipment, England) is incompatible and should not be used.
- All transport media containing denaturing agents such as guanidine-based reagents are incompatible and should not be used.



ENGLISH

- Other than validated sample types or transport media can have adverse effects on assay performance and should not be used. •
- The effect of interfering substances has only been evaluated for those listed within the labeling. Interference by substances other than those described can lead to erroneous results.
- Cross-reactivity with respiratory tract organisms other than those described herein can lead to erroneous results.
- The reported Ct values should not be used to determine the viral loads or infectivity of the samples. See Limitations section 12.3. •
- Clinical samples are heterogeneous and combined effects of individual clinical samples and potentially interfering substances can be unpredictable.
- In co-infections with two or more target analytes and when one of the target analytes is expected to be present at a high level, the detection of another target present at low levels can be impaired. See Limitations section 12.2.

#### 7 STORAGE, STABILITY AND HANDLING

The storage temperature of the kit is from +2 to +8 °C. See the package for the expiration date. Store opened pouches closed at temperature from +2 to +8 °C up to 14 days. Do not remove the desiccant from the pouch.

ENGLISH

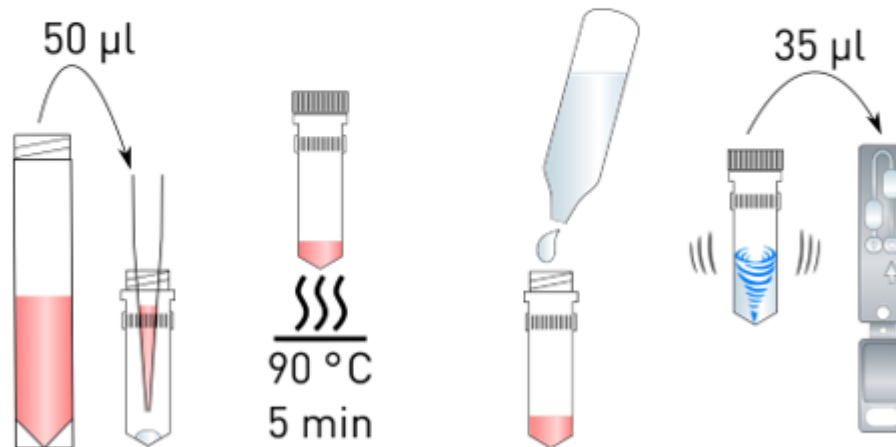
## 8 DIRECTIONS FOR USE

### 8.1 Specimen collection and preparation

The samples used with the assay comprise of respiratory swab samples which have been collected into compatible transport media. Mix the specimen received in sample collection tube by vortexing for 5 seconds.

**Note:** 2-3 mL transport media tubes can be used but 1 mL tubes are more recommendable to ensure optimal sensitivity.

**Sample preparation:**



1. Vortex the original sample for 5 seconds. Pipette 50 µl of the specimen into the bottom of the Ciprofloxacin SPC tube to rehydrate the dried sample processing control. **Avoid pipetting mucus and solid secretions.**
2. Close the sample tube and heat the sample for 5 minutes at 90 °C.
3. Empty the contents of the 1 ml Buffer Ampoule into the sample tube.
4. Vortex the sample for 5 seconds, pipette 35 µl of the sample to the Test Chip and start the assay. **Avoid pipetting precipitates which may form during the heating step.**

**Note:** Prepare all specimens for the assay run before pipetting to Test Chips. To run the assay, continue to section 8.3.

### 8.2 Storage of specimens

Specimens should be transported on ice and stored at +2 to +8 °C. For long term storage specimens may be frozen at -70 °C or colder.

Coplan UTM™ specimens: Store in refrigerator (+2 °C to +8 °C) up to 48 hours.

Coplan eSwab™ specimens: Store in refrigerator (+2 °C to +8 °C) up to 48 hours.

PBS specimens: Store in refrigerator (+2 °C to +8 °C) up to 48 hours.

Heat-treated specimens: Storage is not recommended.

**Note:** Prior analysis, store specimens in original sample collection tube.

ENGLISH

### 8.3 Test procedure

Prepare all samples for the same assay run as instructed above before starting any of the steps below. Ensure that the Instrument is in [standby](#) (the indicator LED light on the top cover of the Instrument is green and the 'Run assays...' button is visible). Also, ensure that the [kit code](#) of the kit has been downloaded to the Software. Please see further instructions in the [GenomEra CDX User Manual](#).

The arrow on the chip indicates the correct opening. The dried reagents can be seen within the reaction chamber. The second [chamber](#) is an expansion chamber for accommodating [vacuum](#) pressure created during the PCR heating-cooling cycles and is not to be filled.

1. Pipette 35 µL of the prepared sample per Test Chip. Use one chip per sample. If necessary, use Dummy chips to fill in empty positions in the chip holder.
2. Close the lids of the Test Chips and the lid of the chip holder.
3. Start the assay run with 4 chips by pressing the 'Run assays...' button in the [GenomEra CDX Software](#).

#### Important notes:

**Carefully avoid forming bubbles while pipetting.** Insert the filled pipette tip into the sample opening of the Test Chip in an [upright position](#) and ensure that the tip is firmly in place in the opening. Use a pipette that ranges below the target volume of 35 µL, e.g. down to 10 µL. If the pipette still easily produces bubbles, use the reverse pipetting technique. In case of visible bubbles in the reaction [chamber](#), [discard](#) the chip and start again with a new one.

**Note the order of the chips in the chip holder!** The positions are numbered based on the direction the chips are moved within [the instrument](#). The numbering is shown on the chip holder. Carefully check that the naming of samples is in accordance with their position [in the chip holder](#). Use the sample-ID sheet for tracking the samples.

**Start the analysis within 3 minutes** from adding the sample into the first Test Chip. The dried reagents start to dissolve immediately [after contact](#) with liquid.

## 9 INTERPRETATION OF RESULTS

### 9.1 Result interpretation by the [GenomEra CDX software](#)

Results are automatically reported in approximately 70 minutes and are given both in written and numerical forms.

- A plus sign (+) in front of the result and a [red colour](#) indicate that the obtained result was **positive**, and the target [sequence was found](#) in the sample.
- A minus sign (-) in front of the result and a [green colour](#) indicate that the obtained result was **negative**, and the target sequence **was not found** in the sample.
- A question mark (?) in front of the result and an [orange colour](#) indicate that the obtained result was a **borderline** result. [The presence](#) of the target sequence **cannot be reliably derived**, and the result is **Inconclusive**.

The possible result interpretation alternatives of the [GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV test](#) are listed in Table 1. Please note [that the GenomEra CDX Software](#) automatically calculates and reports the results. Numerical result values are explained in section 0

**Table 1. Result interpretation with the [GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV test](#).**

| Result type  | SARS-CoV-2                                   | Influenza A                                  | Influenza B                                  | RSV  | SPC              |
|--|--|--|--|--|------------------|
| Result combination with at least one positive result | + POSITIVE /<br>- NEGATIVE /<br>? BORDERLINE | + POSITIVE /<br>- NEGATIVE /<br>? BORDERLINE | + POSITIVE /<br>- NEGATIVE /<br>? BORDERLINE | + POSITIVE /<br>- NEGATIVE /<br>? BORDERLINE | N/A <sup>1</sup> |
| Result combination with no positive results          | - NEGATIVE /<br>? BORDERLINE                 | - NEGATIVE /<br>? BORDERLINE                 | - NEGATIVE /<br>? BORDERLINE                 | - NEGATIVE /<br>? BORDERLINE                 | Detected         |
| PCR INHIBITION <sup>2</sup>                          | Not detected                                 | Not detected                                 | Not detected                                 | Not detected                                 | Not detected     |
| FAILED <sup>3</sup>                                  | Failed                                       | Failed                                       | Failed                                       | Failed                                       | Failed           |
| Run failed <sup>4</sup>                              | No result                                    | No result                                    | No result                                    | No result                                    | No result        |

<sup>1</sup> N/A, not applicable/required

<sup>2</sup> A borderline result is reported if the amplification ratio (first part of the result value) is below the cut-off limit but the amplification curve is strongly non-linear, indicating possible target specific amplification.

<sup>3</sup> PCR inhibition result is reported if none of the target sequences nor the SPC is detected.

<sup>4</sup> Failed result is reported if the sample is not compatible with the system or the dry chemistry of the Test Chip fails.

<sup>5</sup> Run failed is not a result interpretation per se because no results are available for any of the Test Chips in the assay run. The entire run can fail only in case of a malfunction of the instrument. In such cases, please contact Technical Support.

ENGLISH

## 9.2 Result value – amplification ratio (Ra) and threshold cycle (Ct)

In addition to the qualitative result, a two-part quantitative result value is calculated for each analyte. Both parts of the result value are reported with one decimal accuracy and separated by a forward slash character (/). Example of a result value for a single analyte:

5.2/32.6

### 9.2.1 Amplification ratio

Amplification ratio is the signal ratio of the last and first measurement points of the real-time PCR. It can be used to estimate the amplification efficiency of the PCR reaction and is reported as the first part of the result value (5.2 in the example above).

Typically, depending on the fluorescence label used, a positive sample produces Ra values from 2.0 up to 100.0 (values significantly above 10 are possible only with Terbium and Europium labels; in this case SARS-CoV-2 and influenza B analytes), whereas negative samples are close to 1.0. The actual qualitative result (NEG/BOR/POS) is determined by the software with a combination of the amplification ratio, a lot-specific cut-off limit and a shape analysis of the amplification curve.

A cut-off value is a lot-specific limit which is determined for each amplicon during production and quality control. Cut-offs are typically between 1.2 and 2.0. However, cut-off values do not solely determine the result. If the amplification ratio is below the cut-off but the amplification curve is strongly non-linear, a borderline result is reported. An amplification ratio above the cut-off can produce a negative result if the amplification curve is strongly linear.

NOTE: Reported amplification ratio is **not to be used as a quantitative indicator** of the viral load in the sample; it merely reflects how efficiently the target was amplified. This is always affected by a variety of unknown factors.

### 9.2.2 Threshold cycle

Threshold cycle is reported as the second part of the result value (32.6 in the example above) and can be used to estimate at which PCR cycle target amplification begins to be detectable. Reported Ct values are always in the range of 9.0 to 44.0 and are calculated only for positive results and reported as 0.0 in all the other cases.

NOTE: Some PCR instruments report high Ct values for negative results. However, unspecific amplification is eliminated in GenoEra viral assays and therefore amplification curves for negative samples are typically flat and there is no meaningful Ct value to report.

NOTE: Low Ct values (below 35) together with low Ra values (below 3.0) are an indication of slowly rising PCR curve. Such curves are occasionally encountered and are perfectly valid.

## 9.3 Troubleshooting guide for Borderline, PCR inhibition, Assay failed and Run failed results

### Borderline result

Borderline result is reported if the result value is below the cut-off limit but the amplification curve is strongly non-linear. In this case, the presence of the target cannot be reliably derived, and the result is inconclusive. It is likely that there were not enough viral RNA copies in the reaction. However, inhibitors in the specimen may also impair the amplification reaction resulting in a borderline result. **Please start again by preparing a new sample from the original specimen.**

### PCR inhibition

None of the target sequences nor the sample processing control were detected. It is likely that there were too much of original sample in the reaction or the sample contained an excessive amount of inhibitors which impaired the amplification reaction. **Please start again by preparing a new sample from the original specimen.**

**Note:** Unheated specimens result in PCR inhibition. Also heat-treated specimens which have been stored can result in PCR inhibition.

### Failed

The sample is not compatible with the system or the dry chemistry of the Test Chip has failed. Typically, the measured fluorescence signal has exceeded or fallen below acceptance limits. It is likely that the sample was missing, or the amount of original sample was too high. Failed result may also be encountered if the sample contains high amounts of blood. In case of Failed result, **start again by preparing a new sample from the original specimen.**

### Run failed

In case of a malfunction in the GenoEra CDX system, the entire run will be failed, and no results will be available. In such a rare case, the system will display the reason for the malfunction and instructions on how to proceed. Contact Technical Support.

**9.4 Export of results to Laboratory Information System (LIS)**

For the comprehensive description of the GenomEra LIS support, please refer to the GenomEra User Manual.

LIS reports are exported as text files in which one line of text represents one Test Chip. Each line contains 18 data fields, separated by a user configurable LIS-separator character (symbol | in the example below).

```
"Sample 1"|"2021022-05"|"20180147"|"27003"|"1"|"SARS-CoV-2"|"Influenza A"|"Influenza B"|"RSV"|"Positive"|"Negative"|"Negative"|"Negative"|"POS"|"NEG"|"NEG"|"NEG"|"8.2/30.3"|"1.0/0.0"|"1.1/0.0"|"1.0/0.0"|"+"QCPASS"|" "|" "|"
```

```
"Sample 2"|"2021022-05"|"20180147"|"27003"|"2"|"SARS-CoV-2"|"Influenza A"|"Influenza B"|"RSV"|"Negative"|"Positive"|"Negative"|"Negative"|"NEG"|"POS"|"NEG"|"NEG"|"1.1/0.0"|"80.9/28.5"|"1.0/0.0"|"1.0/0.0"|" "+"QCPASS"|" "|" "|"
```

The GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV assay specific LIS report fields are listed in Table 2.

**Table 2. LIS report fields.**

| Field # | Field name                                    | Field value     | Field # | Field name                          | Field value           |
|---------|---|-----------------|---------|-------------------------------------|-----------------------|
| 1       | Sample name                                   | User added text | 14      | Analyte #1 short result             | POS / BOR / NEG       |
| 2       | Run number                                    | YYYYMMDD-NN     | 15      | Analyte #2 short result             | POS / BOR / NEG       |
| 3       | Instrument serial number                      | XXXXXXXX        | 16      | Analyte #3 short result             | POS / BOR / NEG       |
| 4       | LOT number                                    | 27XXX           | 17      | Analyte #4 short result             | POS / BOR / NEG       |
| 5       | Chip position                                 | 1 / 2 / 3 / 4   | 18      | Analyte #1 numeric result           | Ra/Ct                 |
| 6       | Analyte #1 name                               | SARS-CoV-2      | 19      | Analyte #2 numeric result           | Ra/Ct                 |
| 7       | Analyte #2 name                               | Influenza A     | 20      | Analyte #3 numeric result           | Ra/Ct                 |
| 8       | Analyte #3 name                               | Influenza B     | 21      | Analyte #4 numeric result           | Ra/Ct                 |
| 9       | Analyte #4 name                               | RSV             | 22      | Analyte #1 QC result (if available) | +/-QCPASS / +/-QCFAIL |
| 10      | (Language dependent) Result interpretation #1 | See Table 1     | 23      | Analyte #2 QC result (if available) | +/-QCPASS / +/-QCFAIL |
| 11      | (Language dependent) Result interpretation #2 | See Table 1     | 24      | Analyte #3 QC result                |                       |
| 12      | (Language dependent) Result interpretation #3 | See Table 1     | 25      | Analyte #4 QC result (if available) | +/-QCPASS / +/-QCFAIL |
| 13      | (Language dependent) Result interpretation #4 |                 |         |                                     |                       |

Ra/Ct = amplification ratio / threshold cycle (see section 0)

(19)

ENGLISH

**10 QUALITY CONTROL (QC)**

**10.1 Sample processing control (SPC)**

SPC is designed to monitor the assay performance. SPC ensures that the sample preparation is performed according to instructions and also functions as an internal amplification control to monitor assay inhibition and reagent integrity for each specimen. PCR inhibition result is reported if none of the target sequences nor SPC have been detected.

**10.2 External quality assessment (EQA)**

It is specifically recommended that users of this assay kit participate regularly in external quality assessment programs for molecular diagnostic testing of SARS-CoV-2, influenza A/B and/or RSV. Recommended providers for such programs are e.g.:

~~Labquality~~ <https://www.labquality.fi/>

~~Instand~~ e.V.: <https://www.instand-ev.de/>

**Note!** QCMD sample matrices of respiratory panels are incompatible with the direct sample preparation method of ~~GenoEqa~~ SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV test. QCMD EQA panels will require separate nucleic acid extraction.

**10.3 Control samples**

The running of control samples in each assay run or at specific intervals is not required. Positive and negative controls can, however, be run anytime. Follow the laboratory policy regarding the recommended frequency of QC runs.

Control samples can be identified using +/- QC checkboxes after starting an assay run. Control samples can be included in a conventional assay run or run separately. The use of commercially available reference strains for external QC is recommended but well characterized, positive and negative samples are also suitable to be used as controls.

(19)

ENGLISH

11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1 Clinical performance

GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit was evaluated at four institutions across Europe during Q4/2020. Depending on the site, study specimens consisted of fresh and frozen respiratory swab samples collected in Copan ~~CSwab~~ or UTM or phosphate buffered saline (PBS) from patients with signs and symptoms of respiratory infection. Reference test methods (primary and confirmatory, respectively) were; custom in-house RT-PCR assays ~~Qiagen QIAstat Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel (Site 1), Seegene Allelex™ 2019 Assay / Xpert Xpress SARS-CoV-2 and Flu/RSV assays / cobas SARS-CoV-2 / Abbott RealTime SARS-CoV-2, LDT in-house assay according to Corman et al. 2019 (Site 2), Seegene Allelex™ 2019-nCoV / SARS-CoV-2 / RV Essential Assay, VIASURE SARS-CoV-2 / Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit performed on BD MAX™ system (Site 3), Xpert Xpress SARS-CoV-2, QIAstat Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel (Site 4). Results of the clinical performance evaluation are presented in Tables 3–5.~~

NOTE: Confirmatory testing has not yet been performed at Sites 2 and 3.

Table 3. Overall performance of GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit on prospective and retrospective clinical specimens.

| Specimen type | Target      | n   | TP | TN  | FP | FN | PPA %<br>(CI 95)    | NPA %<br>(CI 95)  |
|---------------|-------------|-----|----|-----|----|----|---------------------|-------------------|
| Fresh         | SARS-CoV-2  | 100 | 57 | 33  | 0  | 10 | 85.1<br>(74.3–92.0) | 100<br>(89.4–100) |
|               | Influenza A | 100 | 1  | 99  | 0  | 0  | 100<br>(97.0–100)   | 100<br>(96.3–100) |
|               | Influenza B | 100 | 0  | 100 | 0  | 0  | -                   | 100<br>(99.4–100) |
|               | RSV         | 100 | 0  | 100 | 0  | 0  | -                   | 100<br>(99.4–100) |
| Frozen        | SARS-CoV-2  | 208 | 26 | 181 | 0  | 1  | 96.3<br>(91.0–99.0) | 100<br>(98.0–100) |
|               | Influenza A | 208 | 65 | 138 | 0  | 5  | 92.9<br>(89.1–97.0) | 100<br>(97.4–100) |
|               | Influenza B | 208 | 27 | 181 | 0  | 0  | 100<br>(97.2–100)   | 100<br>(98.0–100) |
|               | RSV         | 208 | 41 | 163 | 0  | 4  | 100<br>(97.0–100)   | 100<br>(97.8–100) |

| TP = True Positive; TN = True Negative; FP = False Positive; FN = False Negative; PPA = Positive Percent Agreement; NPA = Negative Percent Agreement. | Reference method<br>Ct value(s) | Confirmatory method<br>Ct value(s) | Sample matrix |
|---|---------------------------------|------------------------------------|---------------|
| Table 4. False negative samples on GenomEra.  | 32.9 / 35.4                     | 33.8 / 35.2                        | UTM (3 ml)    |
| K545  | 28.2                            | 29.7                               | UTM (3 ml)    |
| K85   | 29.9                            | 33.3                               | UTM (3 ml)    |
| K86   | 37.22 / 36.49                   | *                                  | PBS           |
| M156041   | 37.72 / 31.31 / 36.25           | *                                  | PBS           |
| Z188880   | 34.0                            | *                                  | UTM (3 ml)    |
| Z219913   | - / 36.54 / 36.84               | *                                  | PBS           |
| Z503344   | 35.3 / 35.45                    | *                                  | PBS           |
| Z504894   | - / 37.03 / 37.88               | *                                  | PBS           |
| Z510589   | 33.5 / 34.5                     | *                                  | UTM (3 ml)    |
| Z216679   | 29.06 / 29.3                    | *                                  | PBS           |
| Z511832   | 31.49 / 31.58                   | *                                  | PBS           |
| Z511829   | 33.0                            | *                                  | UTM (3 ml)    |
| Z168084   | 33.4 / 36.2                     | *                                  | UTM (3 ml)    |
| Z193345   | 38.5 / 39.2                     | *                                  | UTM (3 ml)    |
| Z205982   | 34.9 / 35.0                     | *                                  | UTM (3 ml)    |
| Z206328   | 32.62 / 33.18                   | *                                  | PBS           |
| Z530234   | 31.68 / 32.6                    | *                                  | PBS           |
| M178192   | 34.61 / 36.25                   | *                                  | PBS           |
| Z527471   | 33.96                           | 34.9                               | UTM           |
| 0064  |                                 |                                    |               |

\* Confirmatory testing has not yet been performed.

A total of 308 specimens were analysed of which a valid result was obtained in 300 cases while eight specimens resulted in PCR inhibition. All of the inhibitory samples were successfully resolved by re-analysis on first attempt. For one of these samples, the result was discrepant with the reference method (GenomEra: RSV NEG, reference: RSV POS). Inhibition rate was 2.6 %. No borderline or failed results were encountered.

(19)

ENGLISH

**Table 5. GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit performance on different sample collection media.**

| Sample collection medium | Target      | TP  | FP | FN  | FP | FN | LOD (CI 95)      | NPA % (CI 95)   |
|--------------------------|-------------|-----|----|-----|----|----|------------------|-----------------|
| eSwab                    | SARS-CoV-2  | 43  | 0  | 43  | 0  | 0  | 100 (78.2-100)   | 100 (87.66-100) |
|                          | Influenza A | 43  | 0  | 43  | 0  | 0  | -                | 100 (91.0-100)  |
|                          | Influenza B | 43  | 0  | 43  | 0  | 0  | -                | 100 (91.0-100)  |
|                          | RSV         | 43  | 0  | 43  | 0  | 0  | -                | 100 (91.0-100)  |
| PBS                      | SARS-CoV-2  | 66  | 0  | 66  | 0  | 0  | 100 (78.1-100)   | 100 (86.4-100)  |
|                          | Influenza A | 66  | 0  | 66  | 0  | 0  | -                | 100 (94.0-100)  |
|                          | Influenza B | 66  | 0  | 66  | 0  | 0  | -                | 100 (94.0-100)  |
|                          | RSV         | 66  | 0  | 66  | 0  | 0  | -                | 100 (94.0-100)  |
| UTM                      | SARS-CoV-2  | 199 | 21 | 177 | 0  | 1  | 95.5 (91.2-99.9) | 100 (97.9-100)  |
|                          | Influenza A | 199 | 41 | 154 | 0  | 4  | 91.1 (86.9-95.3) | 100 (97.6-100)  |
|                          | Influenza B | 199 | 66 | 128 | 0  | 5  | 93.0 (89.3-96.7) | 100 (97.1-100)  |
|                          | RSV         | 199 | 41 | 154 | 0  | 4  | 91.1 (86.9-95.3) | 100 (97.6-100)  |

**11.2 Analytical sensitivity (Limit of Detection)**

Analytical sensitivity of the GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit was evaluated with viral genomic RNA (Amplified products of Viracel, Granada, Spain) spiked into pooled negative clinical sample matrices (Copan eSwab, UTM and phosphate buffered saline (i.e. PBS). Samples used for preparing pooled matrices were originally collected with nasopharyngeal (NP) swabs. The limit of detection (LoD) was defined as the lowest RNA concentration per sample which could be reproducibly distinguished from negative samples with 95 % confidence. Four replicates per each dilution were analysed to determine LoD estimates, which were subsequently confirmed by testing a total of 20 replicates. Copan eSwab is the most recommended sample collection and preservation medium to be used with GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit. Table 6 represents the analysed concentrations and the acquired results during the determination of LoD. The following viral strains were used in LoD studies:

- SARS-CoV-2/Spain/MD-FISABIO-Vircell001/2020
- A/Perth/16/2009 (H3N2)
- A/California/7/2009 (H1N1)
- B/Brisbane/60/2008 (Victoria)
- RSV-A (strain ATCC VR-26)
- RSV-B (strain 9320)



(19)

ENGLISH

Table 6. Determination of LoD for different sample matrices for GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit.

| Target analyte     | copies/mL original specimen | copies/reaction | Result (replicates positive) |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|------------------------------|
| <b>oSwab</b>       |                             |                 |                              |
| SARS-CoV-2         | 2667                        | 5               | 19/20                        |
| Influenza A (H3N2) | 5714                        | 10              | 20/20                        |
| Influenza A (H1N1) | 11429                       | 20              | 19/20                        |
| Influenza B        | 5714                        | 10              | 19/20                        |
| RSVA               | 57143                       | 100             | 20/20                        |
| RSVB               | 57143                       | 100             | 20/20                        |
| <b>ITM</b>         |                             |                 |                              |
| SARS-CoV-2         | 2667                        | 5               | 18/20                        |
| Influenza A (H3N2) | 5714                        | 10              | 20/20                        |
| Influenza A (H1N1) | 11429                       | 20              | 19/20                        |
| Influenza B        | 17143                       | 30              | 20/20                        |
| RSVA               | 57143                       | 100             | 18/20                        |
| RSVB               | 114296                      | 200             | 19/20                        |
| <b>RES</b>         |                             |                 |                              |
| SARS-CoV-2         | 2667                        | 5               | 20/20                        |
| Influenza A (H3N2) | 5714                        | 10              | 20/20                        |
| Influenza A (H1N1) | 11429                       | 20              | 19/20                        |
| Influenza B        | 5714                        | 10              | 19/20                        |
| RSVA               | 57143                       | 100             | 19/20                        |
| RSVB               | 114296                      | 200             | 20/20                        |

11.3 Analytical reactivity (Inclusivity)

In silico strain coverage analysis of the oligonucleotide sequences for SARS-CoV-2 (taxid: 2697049) was performed against all available sequences of the corresponding target organisms in the GenBank Nucleotide Database as of November 25, 2020. In case of SARS-CoV-2, results showed that none of the target sequences contained more than a single mismatch with a single primer or probe, i.e. the vast majority of target sequences were 100 % homological with all the primers and probes. None of the mismatches are predicted to have a negative impact on the assay performance.

In addition, the following SARS-CoV-2 strains were tested in vitro and detected correctly:

- SARS-CoV-2/human/AUS/VIC01/2020
- SARS-CoV-2/Wuhan-Hu-1/2019

Comprehensive strain coverage for influenza A, influenza B and RSV was confirmed by in silico analysis. In addition to the strains used in LoD studies, the following influenza and RSV strains were tested in vitro for strain coverage and detected correctly:

- A/Singapore/63/04 (H1N1)
- A/NY/02/09 (H1N1)
- A/PR/8/34 (H1N1)
- A/Thüringen/5/2017 (H3N2)
- A/Hong Kong/4801/14 (H3N2)
- A/Brisbane/10/07 (H3N2)
- A/Viet Nam/1194/2004 x Puerto Rico/8/1934 (H5N1)
- A/DK/41/2015
- A/DK/3377/2019
- A/DK/5/2020
- B/Florida/02/06 (Victoria-lineage)
- B/Malaysia/2506/2004 (Victoria)
- B/Florida/02/06 (Yamagata)
- B/DK/22/2016
- B/DK/257/2018
- B/DK/65/2020
- RSVA Long strain
- RSVA 3/2015 Isolate #3
- RSVB 3/2015 Isolate #2

(19)

ENGLISH

**11.4 Analytical specificity (Exclusivity)**

An *in silico* cross-reactivity analysis was conducted by screening all GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV primer and probe sequences individually against the sequences of the organisms listed in Table 2 of WHO document Instructions for Submission Requirements: In vitro diagnostics (IVDs) Detecting SARS-CoV-2 Nucleic Acid\*. All cross-reactivity hits resulting in potential amplification were individually assessed. Hits to HCoV-SARS and bat coronavirus sequences were omitted as there are numerous hits with  $\geq 80\%$  homology. Still, there are several mismatches within primer and probe sequences which should hamper the amplification of these off-target viruses completely. Cross-reactivity hits to other remaining organisms are listed in Table 7. The hits were considered amplifiable if primers cross-reacting with opposite non-target strands, or at least one primer and a probe cross-reacting with the same non-target strand, anneal within 1000 bases from each other on the non-target sequence. *In silico* results suggest that no such cases exist that more than a single primer or probe would cross-react with a same non-target sequence. In conclusion, *in silico* cross-reactivity analysis indicates that there is a limited number of oligonucleotide hits to non-target sequences with  $\geq 80\%$  homology, and all of those are non-amplifiable.

**Table 7. Summary of *in silico* cross-reactivity analysis results for the oligonucleotides used in GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit.** Note that only the hits with  $\geq 80\%$  homology are presented. See the complete list of pathogens from WHO document.\*

| Organism                        | GenBank taxid | Oligonucleotide(s) | Homology % (NCBI Nucleotide BLAST) |
|---------------------------------|---------------|--------------------|------------------------------------|
| <i>Bacillus anthracis</i>       | 1392          | BaRC-FWD           | 85                                 |
| <i>Candida albicans</i>         | 5476          | FluA-REV           | 85-100                             |
| <i>Legionella chagoti</i>       | 28084 (445)   | FluA-FWD           | 82                                 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | 287           | FluA-FWD           | 82-94                              |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 1313          | FluA-REV           | 85-90                              |

In addition, analytical specificity of GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit was evaluated at the evaluation Site 1 by testing viruses which may be commonly encountered in respiratory specimens. Reference method threshold cycle (Ct) value range is presented for each pathogen (multiple samples analysed). None of the tested viruses caused cross-reactivity (Table 7).

**Table 8. Potentially cross-reacting microorganisms tested with the GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit.**

| Organism                           | Reference method Ct values / concentration    | Result (for all target analytes) |
|------------------------------------|---|----------------------------------|
| Coronavirus 229E                   | 20.64-27.66                                   | Neg/Neg/Neg/Neg                  |
| Coronavirus HKU1                   | 17.58-22.76                                   | Neg/Neg/Neg/Neg                  |
| Coronavirus NL63                   | 20.83-23.38                                   | Neg/Neg/Neg/Neg                  |
| Coronavirus OC43                   | 20.19-26.65                                   | Neg/Neg/Neg/Neg                  |
| SARS-CoV (RNA) <sup>1</sup>        | 10 <sup>4</sup> and 10 <sup>6</sup> copies/mL | Neg/Neg/Neg/Neg                  |
| MERS-CoV (RNA)                     | 26 646 copies/mL                              | Neg/Neg/Neg/Neg                  |
| Rhinovirus                         | 19.71-21.19                                   | Neg/Neg/Neg/Neg                  |
| Adenovirus                         | 22.02-22.19                                   | Neg/Neg/Neg/Neg                  |
| Enterovirus D68 (RNA) <sup>2</sup> | 7.1 × 10 <sup>6</sup> copies/mL               | Neg/Neg/Neg/Neg                  |

<sup>1</sup> Evaluated at evaluation Site 1 during performance evaluations of GenomEra SARS-CoV-2 Assay Kit which utilizes the same BaRC oligonucleotides for SARS-CoV-2 detection.

<sup>2</sup> EQA sample from Igstapf, Coronavirus panel June/July 2020, analysed in-house.

<sup>3</sup> RNA from Virocell (Granada, Spain), analysed in-house.

**11.5 Interfering substances**

Potentially interfering substances which may be present in respiratory sample matrices were tested during the analytical studies of GenomEra SARS-CoV-2 and GenomEra Flu A/B + RSV Assay Kits. Reagent composition of these assay kits are identical when compared to GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit except for the oligonucleotide composition. Thus, it is expected that the potential interference of the tested substances will be similar. Note however, that clinical samples are heterogeneous and combined effects of individual clinical samples and potentially interfering substances can be unpredictable.

Potentially interfering substances were added into negative and spiked low positive (2 x LOD) sample matrices and tested as normal samples. None of the endo- or exogenous substances had negative effects on the amplification of the target analyte nor the sample processing control. However, mucin may have negative effects on assay performance if its concentration in the sample is greater than 2.5 % (w/v).

Common laboratory disinfectants were also screened for inhibitory effects. Isopropyl alcohol was the only substance which had a discernible interfering effect by inducing a failed result due to abnormally low signal levels. All the substances and their tested concentrations are presented in Table 9.

(19)

ENGLISH

Table 9. Potentially interfering substances tested with the GenomEra SARS-CoV-2 Assay Kit.

| Endogenous substances                         | Substance commercial trade name                           | Active Ingredient      | Tested concentration in transport medium |
|---|---|------------------------|--|
|   | Aldrich Cat. No M1778<br>Mucin from porcine stomach Sigma | Purified mucin protein | 1.5-2.5 % (w/v)                          |
| Blood (human)                                 | N/A   | Blood (human)          | 2 % (v/v)                                |
| Exogenous substances                          |   |                        |  |
| Nasal corticosteroid                          | Beconase 50 µg/dose                                       | Beclomethasone         | 5 % (v/v)                                |
| Nasal corticosteroid                          | Flixonase 50 µg/dose                                      | Fluticasone            | 5 % (v/v)                                |
| Throat lozenge, oral anesthetic and analgesic | Bafucip   | Benzocaine             | 5 mg/mL                                  |
| Anti-viral drug                               | Tamiflu   | Oseltamivir            | 7.5 mg/mL                                |
| Antibiotic, nasal ointment                    | Bactroban nasal 2 %                                       | Mupirocin              | 10 mg/mL                                 |
| Beta-adrenergic bronchodilator                | Ventoline Diskus  | Salbutamol             | 10 mg/mL                                 |
| Nasal adrenergic receptor agonist             | Vicks Sinex   | Oxymetazoline          | 5 % (v/v)                                |
| Laboratory disinfectants                      |   |                        |  |
| Ethanol                                       | Etax A12  | Ethanol                | 2 % (v/v)                                |
| Hypochlorite                                  | N/A   | Sodium hypochlorite    | 0.01 % (v/v)                             |
| Aseptic disinfectant                          | Neo-Duocid  | Isopropyl alcohol      | 1.5 % (v/v)                              |

### 11.6 Reproducibility

Reproducibility of the GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit was evaluated at three sites, one being an in-house site. Identical sample panels consisting of a low positive clinical sample per each target analyte, and one negative clinical sample were tested at all three sites over 5 days. Positive samples were prepared by diluting inactivated NATrol SARS-CoV-2 (Zenonmetrix, USA) stock into Copan eSwab. Negative sample was eSwab. Samples included in the reproducibility study and the results of the study are presented in Table 10.

Table 10. Samples and results of the reproducibility study.

| Samples                           | Site 1<br># of correct results<br>per replicates | Site 2<br># of correct results<br>per replicates | In-house<br># of correct results<br>per replicates | Total                   |
|-----------------------------------|--|--|--|-------------------------|
| SARS-CoV-2 Low positive (2 x LoD) | 5/5  | 5/5  | 5/5  | 15/15                   |
| Flu A Low positive (2 x LoD)      | 5/5  | 5/5  | 5/5  | 15/15                   |
| Flu B Low positive (2 x LoD)      | 5/5  | 5/5  | 5/5  | 15/15                   |
| RSV Low positive (2 x LoD)        | 5/5  | 5/5  | 5/5  | 15/15                   |
| Negative sample                   | 5/5<br>(SPC positive)                            | 5/5<br>(SPC positive)                            | 5/5<br>(SPC positive)                              | 15/15<br>(SPC positive) |

### 11.7 Sample stability

Sample stabilities were studied during the performance evaluations of GenomEra SARS-CoV-2 and GenomEra Flu A/B + RSV Assay Kits. Same sample matrices and samples types are also used with GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit and thus sample stabilities are expected to be the same. For safety, only shortest stabilities are claimed.

All original untreated samples should be stored refrigerated (+2 °C to +8 °C) and tested within 48 h after collection. It is expected that heat-treated samples with free RNA in solution are not stable. Thus, storage of heat-treated samples is not recommended.

(19)

ENGLISH

**12 LIMITATIONS OF THE TEST****12.1 Inhibitors in clinical samples**

The ~~GenomEra~~ SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV assay has been developed for the detection of viral RNA from respiratory swab specimens. The amount of inhibitors in clinical samples can be highly variable. It is important that only the instructed sample volume is used for sample preparation. When the sample preparation is performed according to the instructions, PCR inhibition is rarely encountered. However, if PCR inhibition or assay failure is detected, follow the instructions given in section 9.3.

**12.2 Competitive Interference**

In co-infections with two or more target analytes and when one of the target analytes is expected to be present at a high level, the detection of another target present at low levels could be impaired. According to competitive interference studies performed with the ~~GenomEra~~ SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV Assay Kit, there is a risk of a false negative result for the target analyte present in low levels in such cases.

**12.3 Other limitations**

It should be noted that the evolution and mutations of viral species is extremely rapid and aberrant sequence variants resulting in unspecific or hampered nucleic acid amplification may cause decrease in assay performance.

Errors in following the assay procedure may lead to false negative results.

Improper collection, storage or transport of specimens or assay kits may lead to false negative or positive results.

Negative results do not preclude the possibility of infection and should not be used as only basis for treatment or other patient management decisions. Improper collection, storage or transport of specimens or assay kits may lead to false negative or positive results.

A competent health care professional should interpret assay results in conjunction with the patient's medical history, clinical signs and symptoms, and the results of other diagnostic tests.

Viral RNA of the analyte may persist in samples independent of the viability of the virus. Detection of viral RNA of the analyte in samples does not imply that the corresponding virus is infectious or that they are the cause of clinical symptoms.

There is a risk of false negative values due to the presence of sequence variants in the viral target of the assay, procedural errors, amplification inhibitors in specimens, or inadequate numbers of organism for amplification.

Positive results should be interpreted in conjunction with other laboratory findings and clinical signs or symptoms. Positive results do NOT rule out other non-target analyte causes of infection. Negative results do not exclude other types of viral or bacterial infection. Co-infections with multiple viral, bacterial, or other agents are also possible.

False negative results may occur if a specimen is improperly collected, transported, or handled. False negative results may occur if inadequate numbers of virus are present in the specimen.

The Ra/Ct (amplification ratio / threshold cycle) combination is a simple parameterization of an amplification curve. While the curve itself can be used to estimate the efficiency (Ra) and time of onset (Ct) of the amplification, these variables may not be of clinical significance in practice and comparison between amplification curves of different methods is difficult.

**13 INSTRUCTIONS FOR DISPOSAL**

Dispose of infectious waste in accordance with the laboratory regulations. Do not open, pierce or grind used Test Chips.

(19)

ENGLISH

LITERATURE REFERENCES

1. Wu P, Cao B, Gao Y, Lu S, Yang H, Xu J, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 2020. PMID: 32236945.
2. World Health Organization. WHO Director General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March, 2020. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19--11-march-2020>.
3. Ding Q, Lu P, Fan Y, Xia Y, Liu M. The clinical characteristics of pneumonia patients coinfecting with 2019 novel coronavirus and influenza virus in Wuhan, China. *J Med Virol* 2020. PMID: 32196707.
4. Zhang N, Wang L, Deng X, et al. Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. *J Med Virol* 2020;92(4):408–417.
5. Lian J, Ju X, Hao S., Cai H., Zhang S., Zheng L. Analysis of epidemiological and clinical features in older patients with corona virus disease 2019 (COVID-19) out of Wuhan. *Clin Infect Dis* 2020 Jul 28;71(15):740–747.
6. Yue H, Zhang M, Xing L, et al. The epidemiology and clinical characteristics of co-infection of SARS-CoV-2 and influenza viruses in patients during COVID-19 outbreak. *J Med Virol* 2020 Jun 12. doi: 10.1092/jmvi.20163.
7. Diagnostic testing for SARS-CoV-2. World Health Organization (WHO). Interim guidance 11 September 2020. <https://www.who.int/publications/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>.
8. WHO information for molecular diagnosis of influenza virus – update, 6- revision on January 2020. [https://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/molecular\\_diagnosis/en/](https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis/en/).
9. WHO Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011. ISBN 9789241548090. [https://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/manual\\_diagnosis\\_surveillance\\_influenza/en/](https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/).
10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Respiratory Syncytial Virus Infection (RSV). For Healthcare Professionals. <https://www.cdc.gov/rsv/clinical/>.
11. Hagan V, von Lode P, Saito A, Saito T, Uchida T, Saito H, Nishi J. An automated PCR platform with homogeneous time-resolved fluorescence detection and dry chemistry assay kits. *Anal Biochem* 2008 Mar;374(2):411–416.
12. Corman VM, Ladd D, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, Bleckwede J, Böhm S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DGJC, Haagmans BL, van der Veer B, van den Brink S, Wilsma L, Godtsis G, Borczyk JL, Ellis J, Zambono M, Peiris M, Goossens H, Beusker C, Koopmans MPG, Drosten C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020 Jan;25(3).
13. Ward CL, Dempsey MH, Ring CJA, Goppsen RE, Zhang L, Gao D, Snowden BW, Tisdale M. Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. *J Clin Virol*; 29: 179–188, 2004.
14. Munster VJ, Webster A, Baas C, Simonsen L, Govaert M, Olsen B, Osterhaus AD, Couderc RA. Mallards and highly pathogenic avian influenza ancestral viruses, northern Europe. *Euro J Infect Dis* 11: 1545-1551, 2005.
15. Templeton KE, Sobel SA, Boonin MF, Koss AC, Glass EC. Rapid and sensitive method us- ing multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol*. 2004 Apr; 42(4): 1564-1566.
16. WHO. Instructions and requirements for Emergency Use Listing (EUL) submission: In vitro diagnostics detecting SARS-CoV-2 nucleic acid and rapid diagnostics tests detecting SARS-CoV-2 antigens. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/diagnostics>. 347 version 4. 9th June 2020.

(19)

ENGLISH

MANUFACTURER



Abacus Diagnostics Oy  
Tukkipolku 4D  
FI-20520 TURKU  
FINLAND  
www.abacusdiagnostica.com

SYMBOLS



Manufacturer



Catalogue number



Batch code



Consult instructions for use



Shelf life, following the first opening (dd)



*In vitro* diagnostic medical device



Do not re-use



Contents sufficient for <math>n+1</math> test



Temperature limitation



Use by end of the month



CE-marked product

This Product incorporates technologies (Dyes, Quenchers, MGB) sublicensed by Kaneka Eurogentec S.A. exclusively for [diagnostic purposes](#). Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting [licensing@eurogentec.com](mailto:licensing@eurogentec.com).

(19)

**ABACUS** Diagnostica

**Abacus Diagnostica**

Tykistökatu 4D, Electrocity  
FI-20520 Turku, FINLAND

Tel. +358(0)20 7188 380  
Fax +358(0)20 7188 381

E-mail [info@abacusdiagnostica.com](mailto:info@abacusdiagnostica.com)  
[www.abacusdiagnostica.com](http://www.abacusdiagnostica.com)

---

