

Essi Vilmilä

GENOMERA SARS-COV-2, FLU A/B + RSV 2.0-KITIN EVALUAATIO

GENOMERA SARS-COV-2, FLU A/B + RSV 2.0-KITIN EVALUAATIO

Essi Vilmilä
Opinnäytetyö
Syksy 2023
Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Tekijä(t): Essi Vilmilä

Opinnäytetyön nimi: GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV 2.0-kitin evaluaatio

Työn ohjaaja(t): Paula Reponen & Jaana Holappa-Girginkaya

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Syksy 2023

Sivumäärä: 24 + 2 liitettä

Vuonna 2020 SARS-CoV-2 viruksen aiheuttama Covid-19 pandemia aiheutti maailmanlaajuisen hätätilan. Viruksen leviämisen estämiseksi otettiin käyttöön laajamittaiset testaustoimet. Käytössä on antigeenitestejä, sekä reaaliaikaiseen, kvantitatiiviseen polymeerasiketjureaktioon (RT-qPCR) perustuvia testejä, jotka ovat todettu antigeenitestejä luotettavammiksi. Samaan aikaan Covid-19 pandemian kanssa normaalit kausittaiset virusepidemiat aiheuttavat väestössä sairastumisia. Kaikkien näiden neljän viruksen; severe acute respiratory syndrome coronavirus eli SARS-CoV-2, Influenssa A ja B, sekä respiratory syncytial virus eli RS-viruksen oireet ovat hyvin samankaltaisia. Näiden eri virusten erotusdiagnostiikan kehittyminen on avain nopeampaan hoidon aloittamiseen.

Opinnäytetyön tarkoitus oli suorittaa laadukas evaluaatio GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV 2.0 -testikitille. Evaluaatiossa keskityttiin testaamaan testikitin tarkkuutta ja herkkyyttä kaikkiin neljään eri virukseen. Opinnäytetyön aihe saatiin Pohjois-Suomen laboratorikeskuksen liikelaitoskuntayhtymältä, NordLab Rovaniemen toimipisteeltä. Evaluaatio tapahtui NordLab Rovaniemen mikrobiologian osastolla keväällä 2022. Evaluaation lopuksi testikitti sai CE-merkinnän.

Asiasanat: evaluaatio, Covid-19, RT-qPCR, influenssa A, influenssa B, RSV, SARS-CoV-2

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

Author(s): Essi Vilmilä

Title of thesis: GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV 2.0-kitin evaluaatio

Supervisor(s): Paula Reponen & Jaana Holappa-Girginkaya

Term and year when the thesis was submitted: Fall 2023

Number of pages: 24 + 2 appendices

In the year 2020 SARS-CoV-2 virus caused Covid-19 pandemic which led to international public health emergency. Extensive antigen and PCR testing started to prevent SARS-CoV-2 virus spreading. At the same time as Covid-19 pandemic normal seasonal viruses such as influenza A/B and RS-virus continued to cause respiratory diseases. All these four viruses cause similar symptoms so it is important to be able to separate them.

The purpose of this study was to perform a high-quality evaluation of GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV 2.0 testkit. Evaluation concentrated on analysing the accuracy and sensitivity of the testkit so that it could be used in clinical use. Evaluation was performed in spring 2022 in NordLab Rovaniemi.

Keywords: evaluation, Covid-19, influenza A, influenza B, RSV, Sars-Cov-2, RT-qPCR

SISÄLLYS

| | | |
|-----|--|----|
| 1 | JOHDANTO | 6 |
| 2 | VIRUKSET | 7 |
| 2.1 | Influenssa A ja B..... | 7 |
| 2.2 | Severe acute respiratory syndrome coronavirus eli Sars-Cov-2..... | 8 |
| 2.3 | Respiratory syncytial virus eli RSV..... | 8 |
| 3 | POLYMEERAASIKETJUREAKTIO ELI PCR | 10 |
| 3.1 | Reaaliaikainen käänteiskopiointi PCR eli RT-qPCR | 12 |
| 3.2 | Kynnysarvo eli ct-arvo | 12 |
| 4 | EVALUAATIO..... | 14 |
| 5 | GENOMERA SARS-COV-2, FLU A/B+RSV 2.0 NELITESTI..... | 15 |
| 5.1 | Referenssimenetelmät..... | 16 |
| 6 | OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS | 17 |
| 7 | EVALUAATION TULOKSET..... | 22 |
| 8 | POHDINTA | |
| | LÄHTEET | 25 |
| | LIITTEET..... | 23 |
| | LIITE 1 GenomEra Sars-Cov-2, Flu A/B + RSV 2.0 Assay Kit | |
| | LIITE 2 QIAstat-Dx Respiratory Panel Instructions for Use (Handbook) 06/2020 | |

1 JOHDANTO

Vuonna 2019 Sars-Cov-2 niminen virus lähti leviämään ympäri maailmaa aiheuttaen koronapandemian, joka tunnetaan myös nimellä covid-19. Virus oli täysin uusi koronavirusten perheessä, eikä siitä tiedetty vielä mitään. Sars-Cov-2 levisi tehokkaasti ja aiheutti suurimmaksi osaksi tyypillisiä ylähengitystieinfektion oireita, jolloin sitä ei voi kliinisten oireiden perusteilla diagnosoida. Covid-19 aiheutti Suomessa vuoden 2020 aikana 558 ja vuoden 2021 aikana 952 kuolemaa. Näiden kuolemien lisäksi virus myötävaikutti yli 200 muuhun kuolemaan. (Tilastokeskus, 2022.) Maailman laajuisesti covid-19 on aiheuttanut 6,8 miljoonaa kuolemaa maaliskuuhun 2023 mennessä (WHO, 2023). Suhteellisen korkean kuolleisuuden ja nopean leviämisen takia covid-19-taudin diagnosointiin tarvittiin nopeaa ja luotettavaa analytiikkaa.

Covid-19-taudin toteamiseen ja erottamiseen muista ylähengitystieviruksista on olemassa useita eri testausmenetelmiä, mutta luotettavin tulos saadaan PCR-menetelmällä. Toinen laajasti käytössä oleva menetelmä perustuu viruksen antigeenien tunnistamiseen näytteestä, mutta se ei vastaa tarkkuudelta ja herkkyydeltään PCR-menetelmää. PCR-menetelmä tunnistaa myös viruksen eri variantit ja samasta näytteestä voidaan tutkia useita eri viruksia samaan aikaan. Covid-19, influenssa A ja -B sekä RS-viruksen aiheuttaessa samankaltaisia oireita, on niitä järkevintä testata kaikkia samaan aikaan mahdollisimman nopean diagnoosin saamiseksi. (Duodecim, 2022.)

Abacus Diagnostica Oy (nykyinen Uniogen Oy) aloitti nelitestin evaluaatiosarjan vuonna 2022, jolloin testikittiä testattiin useissa eri Euroopan maissa. GenomEra laitteen Sars-Cov-2, Flu A/B & RSV testikitin toisen evaluoitavan version oli tarkoitus nopeuttaa diagnostiikkaa lyhentäen ajoaikaa ja näytteen käsittelyä. Testin näytemuotona on nenänielusta pumpulitikulla otettu näyte. Tässä opinnäytetyössä tarkastellaan NordLab Rovaniemen mikrobiologian laboratorion tiloissa suoritettua evaluaatiota. Evaluaation tuloksia verrataan aiempaan testikitin versioon.

Abacus Diagnostica Oy toimitti Rovaniemelle yhden GenomEra-laitteen, jolla evaluaatiota suurimmaksi osaksi suoritettiin. Rovaniemellä oli ennestään jo yksi vastaava laite, johon päivitettiin käyttöjärjestelmä, jotta saataisiin kerralla enemmän evaluaationäytteitä ajettua. Näytteitä analysoitiin yhteensä 100 kappaletta evaluaation aikana. Vertailumenetelmänä käytettiin GeneXpertillä ajettuja nenänielunäytteitä, jotka oli säilytetty syväjäässä pakastimessa -80 asteen lämpötilassa. Tarkoituksena oli selvittää, onko testikitti tarpeeksi herkkä ja tarkka potilasnäyteajoja varten.

2 VIRUKSET

Virukset ovat bakteereja pienempiä organismeja, jotka eroavat bakteerista niiden lisääntymisen perusteella. Virukset eivät pysty lisääntymään ilman isäntäsolua. Monet virukset aiheuttavat itselleen tyypillisen taudinkuvan, jonka perusteella voidaan päätellä aiheuttajavirus. Hengitystieinfektioita aiheuttavat virukset taas usein ovat taudinkuvaltaan hyvin samankaltaisia. Useimmiten ne aiheuttavat kuumetta, yskää ja tukkoisuutta. Useita viruksia vastaan on olemassa rokote, mutta vain muutamiin virustauteihin on olemassa lääke. (Vuento, 2020.)

2.1 Influenssa A ja B

Influenssoja on neljää eri päätyyppiä A, B, C ja D, joista A-, B- ja C-virukset aiheuttavat infektioita ihmisille. Influenssan huippukausi Suomessa on talvi, jolloin A-virus aiheuttaa suurimman osan infektioista B-viruksen ollessa taka-alalla. Arvioiden mukaan 4–50 miljoonaa ihmistä sairastaa influenssan Euroopassa, kun taas ennenaikaisia kuolemia influenssasta aiheutuu vuosittain noin 15000–70000. (THL, 2020.) Influenssa tarttuu pääosin pisaratartuntana, mutta tutkimusten mukaan aerosolitartunta on myös mahdollinen. Taudin itämisaika on noin 24–48 tuntia ja tartunnan saaneet voivat tartuttaa muita jo päivä tai kaksi ennen oireita. Tartuttavuus jatkuu viidestä seitsemään päivään oireiden alkamisesta. Influenssaan on olemassa vuosittainen rokote, jota muunnellaan vuosittaisten viruskantojen ennusteiden mukaan. (Dharmapalan, 2020.) Viruksia ympäröi glykoproteiineista koostuva vaippa, jonka perusteella ne voidaan jakaa eri alatyyppeihin sen mukaan, minkälaisia antigeenejä ne muodostavat (Kazakova 2019, 38).

Influenssa A eroaa muista influenssaviruksista siten, että se pystyy tartuttamaan niin ihmisiä kuin eläimiäkin. Eniten sitä tavataan ihmisten, lintujen ja sikojen keskuudessa. A-virus voi myös aiheuttaa ihmisille vakavan pandemian, mikäli se pääsee tarttumaan eläimestä ihmiseen ja muuntumaan siten, että se voi tarttua ihmisten välillä. Influenssa A-viruksen tartuttavuus perustuu sen nopeaan muuntautumiskykyyn. Virukset voivat muuntua RNA:n pistemutaatioiden, deleetioiden tai insertioiden kautta. Muihin influenssoihin verrattuna A-viruksella on kyky muuntua myös siirtämällä kokonainen jakso genomiaan alatyypistä toiseen. Tätä ei ole tavattu muiden influenssavirusten keskuudessa. (Kazakova 2019, 38–39.) Influenssa B aiheuttaa epidemioita, jotka ovat

lievempiä kuin Influenssa A:n aiheuttamat ja B:n aiheuttamat epidemiat sijoittuvat lähemmäs kevättä (THL, 2020).

2.2 Severe acute respiratory syndrome coronavirus eli Sars-Cov-2

Sars-Cov-2-virus kuuluu koronavirusten ryhmään. Viruksen aiheuttama Covid-19 tauti lähti leviämään ympäri maailmaa vuonna 2019. Koronavirukset ovat ennenkin aiheuttaneet laajoja epidemioita, kuten esimerkiksi SARS vuosina 2002–2003 ja MERS vuodesta 2012 lähtien. SARS:a ja MERS:a yhdistää niiden eläinperäisyys, jota on epäilty myös Sars-Cov-2 kohdalla. (Anttila, 2021.) Koronavirukset ovat muutoin yleisiä, kausittain hengitystieinfektioita aiheuttavia viruksia. Kausikoronaviruksia ovat muun muassa HCov-HKU1, HCov-NL63 ja HCov-OC43. (Ikonen, Savolainen-Kopra, Lakoma 2023.) Pääasiassa Covid-19 tarttuu pisara- ja aerosolivälitteisesti, mutta myös kosketustartunta kontaminoituneelta pinnalta on mahdollista. Tartunnan saanut henkilö voi tartuttaa infektiota muihin jo kaksi päivää ennen klinisiä oireita ja pysyä tartuttavana jopa viitentoista päivään asti, mikäli kyseessä on vakava tautimuoto. (Parkkila, Saari, Sormunen, Silander, Nenonen, Kakko & Nuorti 2021.) Covid-19 taudin aiheuttamat oireet ovat hyvin samankaltaisia, kuin muidenkin hengitystievirusten. Yleisimpiä oireita ovat kuume, yskä, lihaskivut ja nuha. Näiden lisäksi on myös raportoitu maku- ja hajuaistin häiriöistä. (Anttila, 2023.)

Sars-Cov-2- virus on vaippakuorinen virus, jossa on positiivinen yksijuosteinen RNA. Sen genomi on suurin kaikista RNA-viruksista. Viruksen tartuntamekanismeissa tärkeässä roolissa on S-proteiini, eli piikkiproteiini, sen pinnalla. Piikkiproteiini tarttuu isäntäsoluun, jonka pinnalla on reseptorimolekyylillä nimeltä ACE2, eli angiotensiinikonvertaasi 2. (Yang, Xiao, Ye, He, Sun, Qin, Yu, Yao, Wu, Bao & Zhao 2020.) Viruksen nopeaan leviämiseen ja herkkään tarttuvuuteen on vaikuttanut myös sen nopea muuntautumiskyky. Eri virusvariantteja ilmestyi tasaiseen tahtiin pandemian aikana, joidenkin ollessa herkemmin leviäviä, mutta ei niin vakavaa infektiota aiheuttavia. (Anttila, 2023.)

2.3 Respiratory syncytial virus eli RSV

Respiratory syncytial virus eli RSV on paramyxovirus, joka kuuluu pneumovirusten ryhmään. RSV esiintyy Suomessa talvikuukausina, aiheuttaen hengitystieinfektioita. Taudin tarttuminen

tapahtuu pisaratartuntana ja sen itämisaika on 4–5 päivää. Yleensä RSV:n oireina ovat kuume, nuha ja kurkkukipu, mutta vanhuksilla ja pienillä lapsilla se voi aiheuttaa jopa keuhkokuumeen tai bronkioliitin, eli pienten keuhkoputkien tulehdustaudin alle 1-vuotiailla lapsilla. (THL, 2019.) RSV on etenkin lasten keskuudessa yleinen virus, mutta se voi aiheuttaa vakavan sairaalahoitoa vaativan taudin 0–5-vuotiaille. RSV voi aiheuttaa pitkällä aikavälillä jopa astmaa. RSV-infektioiden seuraaminen maanlaajuisesti ei ole aina ollut täysin aukotonta, mutta vuoden 2015 raportin mukaan jopa 59 600 alle 5-vuotiasta lasta kuoli RSV:n aiheuttamaan alempien hengitysteiden tulehdukseen. (Alonso, Bont, Bozzola, Herting, Lega, Mader, Nunes, Ramiro, Valiotis, Olivier, Yates & Faust 2021.)

RSV jaetaan kahteen alatyyppiin, A ja B, riippuen viruksen pinta-antigeeneistä. RSV:n pinnalla on kolme pääproteiinia, pieni hydrofobinen proteiini (SH), kiinnittymisglykoproteiini (G) ja fuusioproteiini (F). Jako alatyyppeihin tapahtuu G-proteiinin mukaan. RSV:hen ei ole vielä olemassa rokotetta tai lääkettä, mutta niitä kehitellään parhaillaan. (Azzari, Baraldi, Bonanni, Bozzola, Coscia, Lanari, Manzoni, Mazzone, Sandri, Lisi, Parisi, Piacentini & Mosca 2021.)

3 POLYMEERAASIKETJUREAKTIO ELI PCR

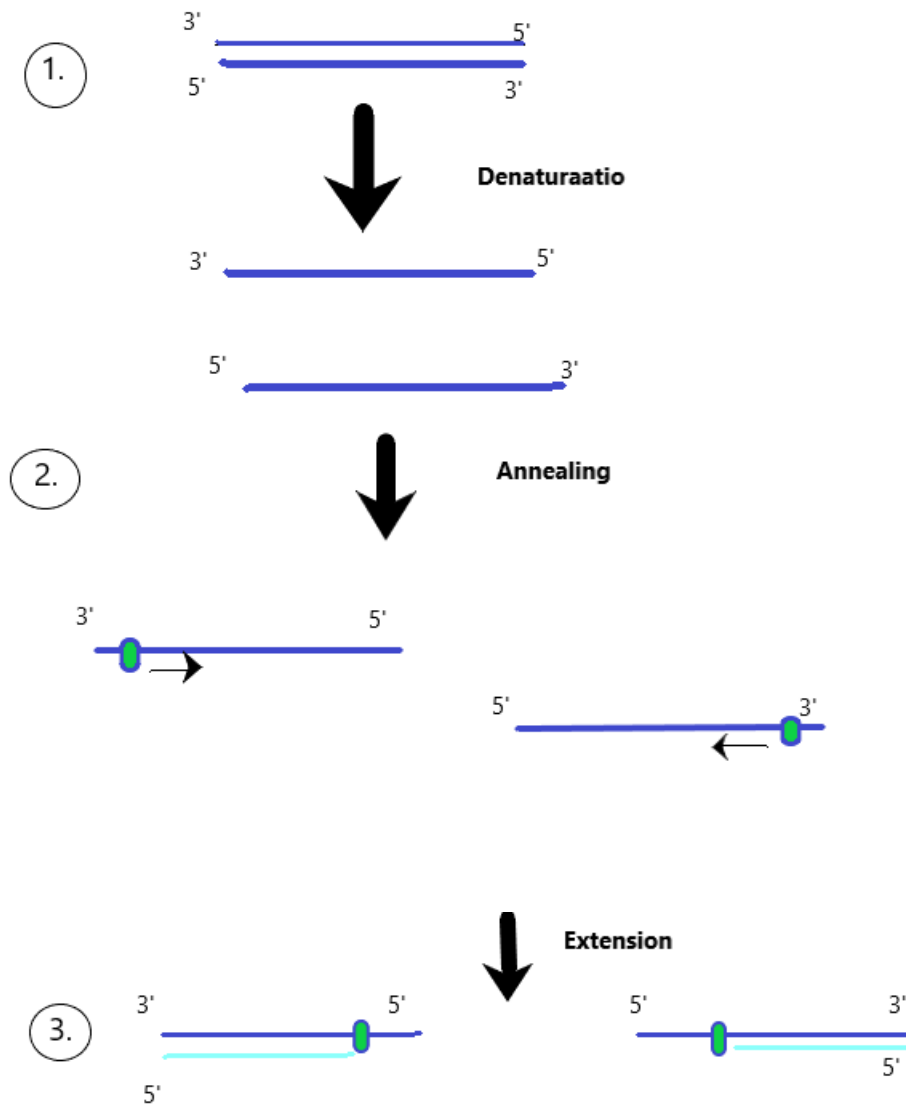
Polymeraasiketjureaktio eli PCR on paljon käytetty väline laboratoriodiagnostiikassa. PCR kehitettiin yli 30 vuotta sitten ja se on edelleen tärkeä osa molekyylibiologiaa, bioteknologiaa ja mikrobiologiaa. PCR menetelmällä voidaan monistaa geenialueen mielenkiinnon kohteesta miljoonia kopioita, joka mahdollistaa myös hyvin niukan näytteen tutkimisen. PCR:n heikkous on se, että sillä pystytään monistamaan suhteellisen lyhyitä alueita geenialueita, joten se soveltuu vain pienten mutaatioiden tutkimiseen kuten esimerkiksi pistemutaatiot. (Horelli-Kuitunen, Orpana 2016.)

Reaktio tapahtuu koeputkessa, jonka lämpötilaa vaihdellaan eri vaiheiden mukaan. Menetelmää varten tarvitaan tieto DNA:n sekvenssistä, jotta sitä voidaan monistaa. Koeputkeen tulee näytteen lisäksi puskuriliuosta, joka edesauttaa polymeraasireaktiota, dNTP- partikkeleita, eli deoksinukleotiditrifosfaatteja, joiden avulla DNA-juosteen kopiota luodaan ja DNA-polymeraasientsyymiä, joka rakentaa uutta juostetta. Näiden lisäksi reaktioon tarvitaan alukkeet, jotka ovat määriteltä siten, että DNA-polymeraasientsyymi osaa alkaa monistaa alkuperäistä DNA-juostetta eli templaattia halutusta kohtaa. (Brunstein, 2013.) Aluke määritellään tekemällä halutun DNA-sekvenssin 3-pilkkupäistä 17–20 nukleotidin mittainen komplementaarinen aluke (Horelli-Kuitunen, Orpana 2016).

Reaktion alussa PCR-putkea lämmitetään, kunnes se saavuttaa 95 celsiusasteen lämpötilan, jolloin templaatti-DNA denaturoituu kahdeksi erilliseksi juosteeksi (Brunstein, 2013). Tämän jälkeen näyte jäähdytetään 50–60 asteeseen, jolloin alukkeet pääsevät kiinnittymään juosteeseen (Horelli-Kuitunen, Orpana 2016). Tätä vaihetta kutsutaan annealingiksi. Seuraavassa vaiheessa, jonka nimi on extension, lämpötila nostetaan noin 72 asteeseen, jolloin DNA-polymeraasi alkaa toimia ja rakentaa kopiota juosteesta. DNA-polymeraasi rakentaa juostetta alukkeiden rajaamalta alueelta dNTP-partikkeleiden avulla. (Brunstein, 2013.) Kun tätä sykliä toistetaan kerta toisensa jälkeen jopa 30–40 kertaa, saadaan tuotettua eksponentiaalisesti kasvava määrä kopioita DNA-templaattista, jopa miljoonia kopioita. Jokaisessa denaturointivaiheessa myös kopioitu DNA-juoste denaturoituu ja toimii niin sanotusti uutena mallina, josta voidaan rakentaa lisää samanlaisia kopioita. Kuviossa 1 esitetty PCR syklien vaiheet. (Horelli-Kuitunen, Orpana 2016.)

PCR-menetelmä on hyvin herkkä, jo 40 monistussyklillä voidaan saada riittävästi DNA:ta analyysia varten, vaikka vain yhdestä alkuperäisestä DNA-juosteesta. Yhden syklin kestäessä 3–5 mi-

nuuttia ja koko monistuksen 2–4 tuntia, tekee se menetelmästä myös nopean. Menetelmän herkkyys on myös sen haittapuoli. Mikäli esimerkiksi näytteeseen tai tarvittaviin välineisiin kuten pipetteihin pääsee kontaminaatio, voi PCR:n tuloksena olla halutun DNA:n lisäksi kontaminantin DNA:ta. (Horelli-Kuitunen, Orpana 2016.)



KUVIO 1. PCR syklit vaihe vaiheelta (mukaillen Horelli-Kuitunen, Orpana, 2016.)

1. Monistettava DNA-juoste aukaistaan lämpötilan vaikutuksesta denaturaatiovaiheessa.
2. Annealing-vaiheessa alukkeet sitoutuvat yksijuosteiseen DNA:han spesifiseen kohtaan.

3. *Extension-vaiheessa DNA-polymeraasientsyymi rakentaa dNTP-partikkeleiden avulla uutta juostetta.*

3.1 Reaaliaikainen käänteiskopiointi PCR eli RT-qPCR

Reaaliaikainen käänteiskopiointi PCR eli RT-qPCR on PCR:n variaatio. Se mahdollistaa eri patogeenien, kuten virusten tutkimisen näytteestä nopeasti, sillä tulokset ovat nähtävissä jo ajon aikana. RT-PCR-menetelmä on nopeutensa lisäksi hyvin luotettava, sillä koko analyysi voidaan suorittaa suljetussa näyteputkessa, joten kontaminaatiovaara pienenee. Suurimmat virheet menetelmää käytettäessä ovat siis preanalyttisiä. (Jawerth, 2020.)

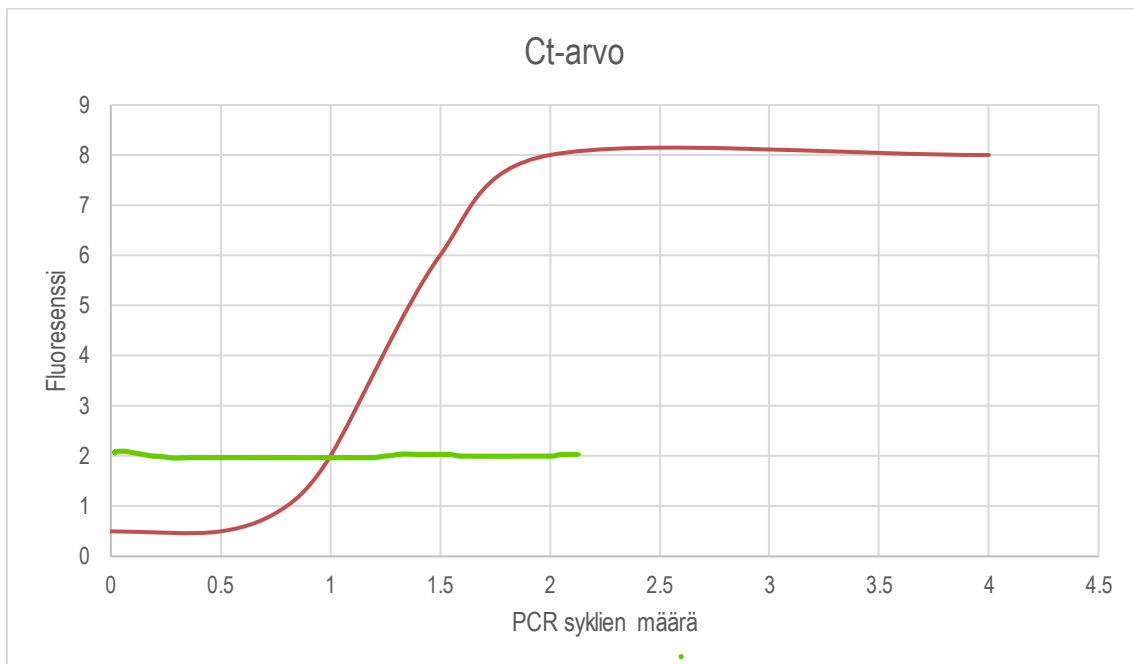
Useimmat virukset sisältävät DNA:n sijasta pelkästään RNA:ta, kuten myös Sars-Cov-2. PCR:n perusperiaate on se, että DNA:ta kopioidaan useita kertoja, joten viruksen sisältämä RNA tulee muuttua kaksijuosteiseksi DNA:ksi. RNA muutetaan spesifisellä entsyymillä DNA:ksi, jonka jälkeen voidaan PCR syklejä alkaa ajamaan. Osa alukkeista, jotka tarttuvat virusperäisen DNA:n komplementaariseen kohtaan on leimattu fluoresoivalla väriaineella. PCR-laitteen tietokone ohjelma tunnistaa ja mittaa näytteestä tulevaa fluoresointia. Fluoresointi mitataan jokaisen syklin päätteeksi ja kun laitteelle asetettu ct-arvo eli kynnyсарvo ylittyy, näyte voidaan todeta positiiviseksi tutkittavalle virukselle. (Jawerth, 2020.)

3.2 Kynnyсарvo eli ct-arvo

Cut off value, eli ct-arvo on numeerinen arvo, joka kuvaa montako PCR sykliä on tehty ennen kuin kohde DNA:ta on monistettu niin paljon, että sen fluoresointisignaali pystytään havaitsemaan taustasignaalin ylitse. Taustasignaali on havaittavissa jokaisessa ajossa riippumatta siitä, onko näytteessä kohde-DNA:ta vai ei. Ct-arvo on siis toisin sanoen se määritetty arvo, jonka ylitse menevät tulokset ovat positiivisia. (Public Health Ontario, 2020.)

Näytteen fluoresoiva signaali kasvaa nopeasti, mikäli näytteessä on kohde-DNA:ta. Fluoresoivan signaalin vahvuus on suoraan verrannollinen viruksen määrään näytteessä. Laitteen mitatessa fluoresoivaa signaalia, voidaan siitä piirtää kuvaaja, joka kasvaa eksponentiaalisesti, esimerkiksi kuvaajasta kuviossa 2. Ct-arvo on asetettu yleensä keskivaiheille kuvaajan käyrää. Testilaitetta

tai -kittiä kehitettäessä ja validoitaessa tulee määrittää LOD (limit of detection)-arvo. Se määritetään laimentamalla näytettä, jonka pitoisuus tiedetään, niin pitkään että kohde-DNA:ta ei ole enää havaittavissa. Näin voidaan määrittää korkein ct-arvo eli cut off piste. Cut off piste on vähäisin fluoresoivan signaalin määrä, jonka mukaan näyte voidaan luotettavasti todeta positiiviseksi. (Public Health Ontario, 2020.)



KUVIO 2. Esimerkki kuvaaja ct-arvosta. Vihreä viiva kuvaa cut off-pistettä, jonka alle jäävät tulokset ovat negatiivisia ja yli menevät positiivisia.

4 EVALUAATIO

Evaluaatio tarkoittaa jonkin asian arviointia (Kotimaisten kielten keskus, 2022). Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli arvioida GenomEran uuden nelitestin testikitin soveltuvuutta in vitro- diagnostiikkaan potilaskäytössä. Lait ohjaavat myös lääkinnällisiä laitteita. Evaluaation tarkoituksena oli saada CE-merkintä uudelle testikitille, jotta se voidaan saattaa markkinoille. In vitro- diagnostiikkaan tarkoitettuihin lääkinnällisiin laitteisiin sovelletaan IVD-direktiivin vaatimuksia. (Laki terveydenhuollon laitteista ja tarvikkeista annetun lain muuttamisesta 720/2021.)

Oleellista diagnostisia testijärjestelmiä evaluoitaessa on määrittää niiden spesifisyys eli tarkkuus ja sensitiivisyys eli herkkyys. Näitä kahta arvoa tutkittaessa on kuitenkin huomattava, että ne eivät anna täysin tarkkaa kuvaa RT-PCR menetelmästä, sillä ct-arvoa muuttamalla voidaan lisätä testin spesifisyyttä, jolloin sensitiivisyys laskee ja päinvastoin (Public Health Ontario, 2020). Spesifisyys ja sensitiivisyys voidaan laskea nelikenttätaulukosta, jossa sensitiivisyys määritellään niiden osuudeksi sairasta, jotka ovat saaneet positiivisen testituloksen ja spesifisyys niiden osuudeksi terveistä, jotka ovat saaneet negatiivisen testituloksen. Nelikenttätaulukon laskentakaava sensitiivisyydelle on $a/(a+b)$ ja spesifisyydelle $d/(c+d)$. (Kuvio 3) (Uhari & Nieminen, 2014.)

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

KUVIO 3. Kuvassa nelikenttätaulukko sensitiivisyyden ja spesifisyyden laskemiseksi. (Uhari, Nieminen, 2014.)

5 GENOMERA SARS-COV-2, FLU A/B+RSV 2.0 NELITESTI

GenomEra CDX on Abacus Diagnostica Oy:n valmistama analyysilaitteisto, joka on tarkoitettu kliinisen laboratorion työhön. Sillä voidaan tutkia bakteereita, sekä virusten nukleiinihappoja reaaliaikaisen polymeerasiketjureaktion avulla. Laite koostuu integroidusta lämmitysjärjestelmästä ja aikaresoluutioisesta fluorometristä, sekä tietokoneesta, johon on asennettu GenomEra CDX:n laiteohjelmisto, jonka avulla laitetta ohjataan. Analyyseihin käytetään testilastuja, joiden sisällä ovat kaikki reagenssit kuivattuna. (Abacus Diagnostica 2022, 2.)

GenomEra Sars-Cov-2, Flu A/B+RSV 2.0 yhdistelmätesti on Abacus Diagnostica Oy:n kehittämä testimenetelmä, jonka avulla voidaan testata vakavia ylähengitystieinfektioita aiheuttavia viruksia; Sars-Cov-2, influenssa A ja B, sekä RS-virusta. Yhdistelmätestin ensimmäinen versio kehitettiin vuonna 2020. Toinen versio yhdistelmätestistä kehitettiin, jotta testin ajoaikaa saataisiin lyhyemmäksi ja diagnosointia nopeammaksi. Näytteen valmistelua muutettiin myös käyttäjäystävällisempään suuntaan. Yhdistelmätestin menetelmä perustuu RT-qPCR:n ja hydrolyysikoettiin, joiden avulla voidaan havaita kullekin virukselle ominaiset geenisekvenssit. Näitä ovat Sars-Cov-2:n RNA-riippuvainen RNA polymeerasi (RdRP), influenssa A-matriisi (M), influenssa B-hemagglutiniini (HA) ja RS-viruksen nukleotidikapseli (N) proteiinin geenit. Näyte suositellaan otettavaksi nenänielusta Copan eNAT- viruskuljetusputkeen, joka sisältää kuljetusnesteen, joka stabiloi viruksia ja ehkäisee muun muassa bakteerien kasvua. Muihin viruskuljetusputkiin kerätyt näytteet tulee laimentaa 1:1 eNAT:lla. (Abacus Diagnostica 2022, 2.)

Yhdistelmätesti sisältää sisäisen kontrollin (SPC), jonka avulla mitataan jokaisen testin toimivuutta. SPC on tässä menetelmässä ihmisperäinen mRNA, jota esiintyy luontaisesti oikein kerätyissä näytteissä. SPC:n avulla varmistetaan, että näyte on kerätty oikein ja että sitä on riittävästi, sekä näytteen esikäsittelyohjeita on noudatettu. Mikäli analysointiprosessissa jonkin on mennyt vikaan, eikä minkään tutkittavan viruksen sekvenssejä tai SPC:tä ole havaittu monistuvan, antaa laite vastauksen PCR inhibition. Ulkoisen laadunvalvonnan, kuten esimerkiksi LabQualityn järjestämiin laaduntarkkailukierroksiin on suositeltavaa osallistua, mutta muutoin kontrollinäytteiden ajaminen on laboratoriokohtaista. (Abacus Diagnostica 2022, 8.)

5.1 Referenssimenetelmät

Referenssimenetelminä toimivat Qiagenin QiaStat-Dx-analysointilaitteisto ja Cepheidin GeneXpert-analysointilaitteisto. QiaStat-analysointilaitteiston Respiratory Panel-testiin kuuluu Sars-Cov-2, influenssa A:n ja B:n sekä RS-viruksen lisäksi muitakin ylähengitystieinfektioita aiheuttavia viruksia ja bakteereja. GeneXpert-analysointilaitteistolla näytteet ajettiin GenomEra Sars-Cov-2, FLU A/B + RSV 2.0- testikitillä vastaavalla Xpert Xpress Sars-Cov-2/Flu/RSV-testikitillä. Molemmat referenssimenetelmät käyttävät samaa RT-qPCR tekniikkaa, kuin GenomEra-analysointilaitteistonkin. Molempien referenssimenetelmien testitulokset olivat kvalitatiivisia. Laitevalmistaja Cepheid ilmoittaa GeneXpertin yhdistelmätestin tarkkuudeksi 100 % ja herkkyudeksi 97,9–100 % riippuen viruksesta. Qiagen ilmoittaa testikitin herkkyudeksi 85,1–100 % riippuen viruksesta. Tarkkuudeksi Qiagen ilmoittaa 96,8–100 % riippuen viruksesta. (Qiagen 2020, 7, 51–54.) (Cepheid 2022, 3, 20.)

6 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kerätä tietoa yhdistelmätestillä analysoitavista viruksista Sars-Cov-2, influenssa A ja B, sekä RS-viruksesta. Tietoa kerättiin myös testin RT-qPCR menetelmäs- tä ja virologiasta. Opinnäytetyön tavoitteena oli suorittaa mahdollisimman laadukas evaluaatio, jonka avulla yhdistelmätestin herkkyyttä ja tarkkuutta voitiin arvioida. Suoritettu evaluaatio oli osa suurempaa evaluaatiokokonaisuutta, jota suoritettiin ympäri Eurooppaa. Opinnäytetyön tutkimus- kysymyksiä olivat:

1. Onko GenomEra Sars-Cov-2, Flu A/B + RSV 2.0 yhdistelmätesti riittävän tarkka ja herkkä poti- lasnäytteiden testaamiseen
2. Mikä on yhdistelmätestin herkkyys ja tarkkuus
3. Onko yhdistelmätestin versio 2.0 kehittynyt ensimmäisestä versiosta ja jos on, niin miten.

6.1 Opinnäytetyön toiminnallinen osuus

Evaluaatiotestaus suoritettiin NordLab Rovaniemen mikrobiologian laboratoriossa keväällä 2022. Evaluaatiota varten Abacus Diagnostica Oy lähetti GenomEra-analysaattorin ja siihen yhdistelmä- testin 2.0 version laiteohjelmiston asennettavaksi. Myös yhdistelmätestikitit toimitettiin evaluaatio- ta varten. Ennen evaluaation aloittamista järjestettiin etäperehdytystilaisuus, jossa käytiin läpi ohjeistukset näytteen esikäsittelyyn ja tietojen keräämiseen. Evaluaation tiedot kerättiin Abacus Diagnostican toimittamaan Excel-taulukkoon. NordLabin opinnäytetyönohjaaja toimitti Abacus Diagnosticalle myös GenomEran tuottaman raakadatan testeistä, sekä QiaStatilla ja GeneXpertil- lä analysoitujen näytteiden Ct-arvot.

Testauksen referenssinäytteinä käytettiin potilasnäytteitä, jotka oli analysoitu QiaStatilla ja tämän jälkeen säilötty -80 asteessa. Näytteiden säilöntäaika otettiin huomioon kirjattaessa evaluaation tuloksia. Potilasnäytteiden käyttämiseen ei tarvittu näytteitä luovuttaneiden potilaiden lupaa, sillä henkilötietoja ei käsitelty. GenomEra Sars-Cov-2, Flu A/B + RSV 2.0 negatiivisia sekä positiivisia tuloksia verrattiin QiaStatilla ja GeneXpertillä aiemmin saatuihin tuloksiin.

6.1 Aineiston kerääminen

Näytteet evaluaatiotestausta varten saatiin NordLab Rovaniemen mikrobiologian laboratoriosta. Positiivisten influenssa näytteiden saatavuudessa oli ongelmia, joten evaluaatiota varten valittiin 100 positiivista Sars-Cov-2 ja RS-virus näytettä, 50 kumpaakin. Positiivisia vertailunäytteitä oli siis 50 Sars-Cov-2:ta ja 50 RS-virusta. Negatiivisia vertailunäytteitä oli 100 influenssa A ja B-näytettä, sekä 50 Sars-Cov-2 ja 50 RS-virusta.

Näytteet oli analysoitu QiaStat- ja GeneXpert-analysaattoreilla, jonka jälkeen ne oli säilöty -80 asteen lämpötilassa. Vanhimmat näytteet olivat kuusi kuukautta vanhoja. Kaikki näytteet oli kerätty pumpulipuikolla nenänielusta Copan UTM nimisiin viruskuljetusputkiin. UTM-viruskuljetusputken säilytysneste sisältää viruksia stabiloivia proteiineja, bakteerien ja hiivojen kasvua estäviä antibiootteja sekä puskuriliuosta, joka pitää pH-arvon neutraalina. Viruskuljetusputki säilyy +2–25 asteen lämpötilassa 72 tuntia, jonka jälkeen sitä voidaan säilyttää -70 asteessa tai kylmemmässä. (Copan 2021, 2–3.) GenomEra Sars-Cov-2, Flu A/B + RSV 2.0 yhdistelmätestillä voidaan analysoida näytteitä, jotka ovat kerätty viruskuljetusputkiin ja säilytetty +2–8 asteen lämpötilassa korkeintaan 96 tuntia. Tätä pidempään säilytetyt näytteet tulee pakastaa vähintään -70 asteen lämpötilassa. (Abacus Diagnostica 2022, 5.)

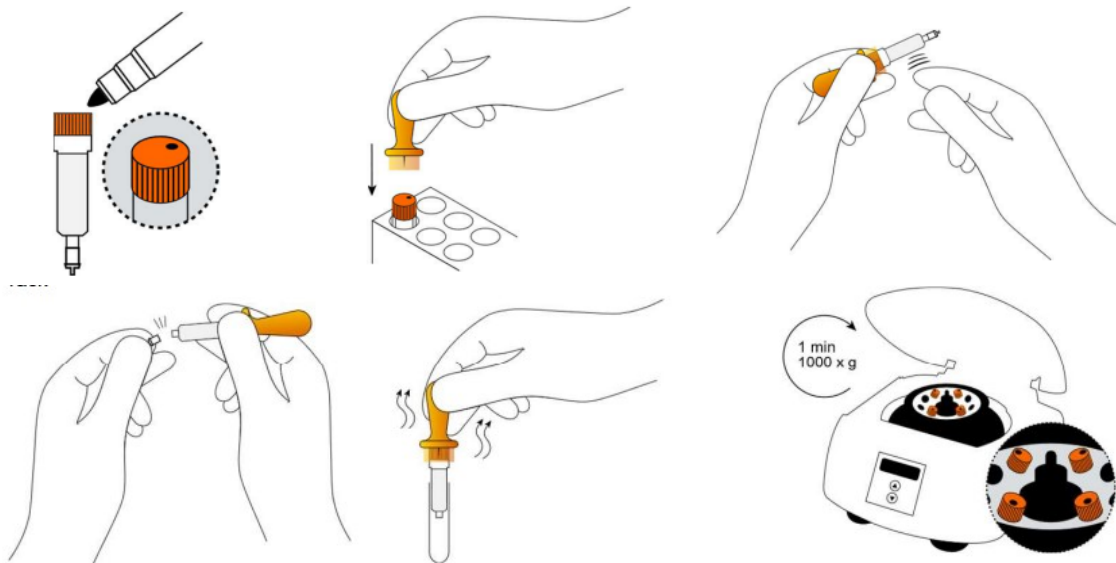
6.1 Näytteiden esikäsittely ja analysointi

Näytteiden käsittelyä ja tulosten taulukointia varten näytteet merkattiin juoksevalla numeroinnilla 1–100. Ensimmäiset 50 näytettä olivat RSV positiivisia ja seuraavat 50 olivat Sars-Cov-2 positiivisia. Tämä helpotti näytteiden mahdollista uudelleen analysointia ja selkeytti tulostaulukkoa.

Evaluaatiota varten tarvittavat näytteet olivat kerätty omiin telineisiinsä -80 asteiseen pakkaseen. Näytteiden annettiin sulaa biosuojakaapissa tunti ennen näytteen esikäsittelyä. Analysoinnin jälkeen näytteitä säilytettiin +4 asteisessa jääkaapissa siihen asti, kunnes tulokset olivat valmistuneet ja NordLabin opinnäytetyönohjaaja oli tarkistanut kunkin näytteen referenssimenetelmän ct-arvon. Tämän jälkeen näytteet kuljetettiin takaisin -80 asteen pakkaseen. Kaikissa näytteen käsittelyn vaiheissa noudatettiin aseptista työtapaa pitämällä suojaesiliinaa ja suojakäsineitä. Kaikki työvaiheet suoritettiin biosuojakaapissa Abacus Diagnostican antamia ohjeita tarkasti noudattaen. Näytteet käsiteltiin ja analysoitiin neljän näytteen sarjoissa, joten näytteiden käsittelyssä noudatettiin tarkkaa ja järjestelmällistä työskentelyä kontaminaatioiden välttämiseksi. Näytesarjojen

tulokset tulostettiin ja säilöttiin kansioon, jonka jälkeen tulokset siirrettiin Abacus Diagnostican Excel-taulukkoon.

Näytteiden esikäsittely aloitettiin valmistamalla uuttoputkia kunkin päivän tarpeeseen nähden. Uuttoputkien valmistelu aloitettiin merkitsemällä korkkeihin tussilla merkit, joiden avulla tiedettiin, miten päin putket laitetaan sentrifuugiin. Tämän jälkeen korkkeihin tehtiin reikä testikitin pakkauksen mukana tulevalla lävistimellä, jotta putkiin ei kehittyisi tyhjiötä sentrifugoinnin aikana. Tämän jälkeen uuttoputken sisällä oleva liuos sekoitettiin napauttamalla putkea, jonka jälkeen putken alaosa katkaistiin ja putki laitettiin puhtaan eppendorfputken sisään. Tämän jälkeen uuttoputket sijoitettiin sentrifuugiin niin, että korkkeihin merkatut kohdat osoittivat ulospäin sentrifuugin keskustasta. Putkia sentrifugoitiin minuutin ajan 1000 g nopeudella, jonka jälkeen uuttoputket laitettiin näyte-eluutioputkien sisälle ja jäteputkina toimineet eppendorf-putket hävitettiin. Valmiiksi esikäsitellyt uuttoputket säilyivät käyttökelpoisina 8 tuntia huoneenlämmössä ja viisi vuorokautta jääkaappilämpötilassa (Abacus Diagnostica 2022, 4).

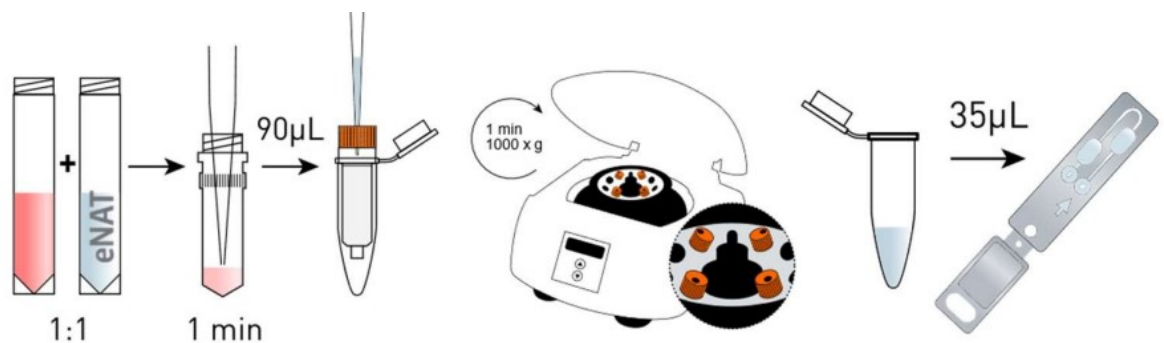


KUVIO 4. Kuvasarja uuttoputkien esikäsitelystä. (Abacus Diagnostica 2022, 4.)

Uuttoputkien esikäsitelystä siirryttiin varsinaisen näytteen esikäsitelyyn. Evaluaatiossa käytettävät näytteet oli kerätty Copanin UTM-viruskuljetusputkiin, joten näytteestä tuli tehdä 1:1 laimennos Copanin eNAT-säilytysnesteeseen. Copan eNAT-säilytysnesteettä pipetoitiin 90 µl neljään puhtaaseen juoksevalle numeroinnilla numeroituun eppendorfputkeen, jonka jälkeen kor-

kit suljettiin. Näytteitä sekoitettiin juuri ennen pipetointia vortexilla viiden sekunnin ajan, jonka jälkeen näytettä pipetoitiin 90 µl näytenumeroa vastaavaan eppendorfutkeen. Korkki suljettiin heti pipetoinnin jälkeen. Näyteliuosten annettiin seisoa minuutin ajan, jonka jälkeen ne sekoitettiin vortexilla. Tämän jälkeen näyteliuokset pipetoitiin yksi kerrallaan numeroitujen eluutioputkien sisälle laitettuihin uuttoputkiin. Näyteliuosta pipetoitiin 90 µl uuttoputkeen tehtyyn reikään. Pipetointi tuli suorittaa kohtisuoraan uuttoputken korkkiin nähden ja hitaasti, jotta pipetoitava näyte ei kupli korkin reiästä ulos. Tämän jälkeen putket sijoitettiin sentrifuugiin kuten aiemminkin, korkeihin merkatut kohdat ulospäin sentrifuugin keskustasta. Putkia sentrifugoitiin minuutin ajan 1000 g nopeudella, jolloin näytteestä saatiin erotettua virusten nukleiinihapot eluutioputken pohjalle.

Näytteiden pipetoiminen eluutioputkesta testikasetille tuli suorittaa tarkasti ja nopeasti, joten kaikki edellä mainitut vaiheet oli täytynyt suorittaa loppuun asti tarkasti kaikkien neljän ajettavan näytteen osalta. Aikaa näytteiden pipetoimiseen ja analyysin aloittamiseen oli kolme minuuttia, lähtien ensimmäisen näytteen pipetoinnista testikasetille. Näytteet säilytettiin numerojärjestyksessä telineessä ja vain yhtä näytettä käsiteltiin kerrallaan korkki auki. Näytettä pipetoitiin käänteisellä menetelmällä 35 µl kohtisuorassa testikasetin kaivoon, jonka jälkeen luukku suljettiin. Mikäli pipetoinnin yhteydessä testikasetin kaivoon pääsi ilmakuplia, piti pipetointi aloittaa alusta uudelle testikasetille. Kun kaikki näytteet oli pipetoitu, asetettiin testikasetti GenomEra laitteeseen ja aloitettiin analyysi.



KUVIO 5. Kuvasarja muussa kuin eNAT-säilytysmediumissa olevalle näytteen esikäsitteilylle. (Abacus Diagnostica Oy 2022, 5.)

Yhden näytesarjan ajaminen kestää noin 50 minuuttia. Analysaattori antaa näytteistä kvalitatiivisen tuloksen. Positiivista testitulosta kuvaa +-merkki ja punaisella oleva teksti "POSITIVE". Negatiivista testitulosta kuvaa – merkki ja vihreällä oleva teksti "NEGATIVE". Tulos, jonka edessä on ?-

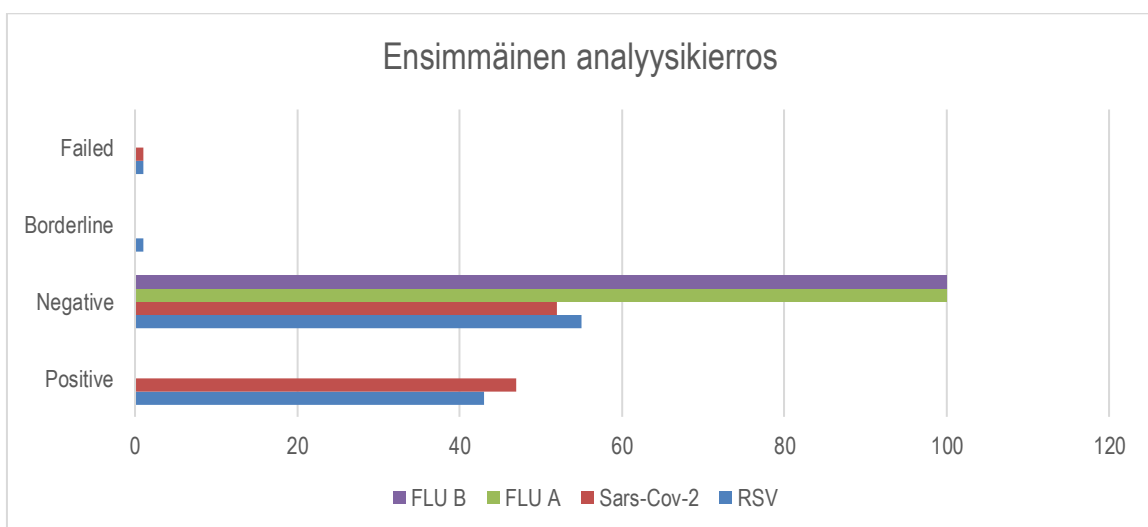
merkki ja oranssilla oleva teksti "BORDERLINE" kuvaa tulosta, joka on epäluotettava. Tällöin tulos on raja-arvon alapuolella, mutta amplifikaatiokäyrä on epälineaarinen. Tämä voi johtua siitä, että tutkittavaa virusa ei ole näytteessä riittävästi tai näytteessä on inhibiittoreita, jotka ovat estäneet virussekvenssin monistumisen. Muita analysaattorin ilmoittavia tuloksia voivat olla "PCR-INHIBITION", "FAILED" tai "Run failed". "PCR-INHIBITION"- tulos tulee tilanteessa, jossa analysaattori ei ole havainnut mitään tutkittavista viruksista eikä SPC:tä eli sisäistä kontrollia. "Failed"- tulos johtuu tilanteesta, jossa näyte ei ole yhteensopiva analyysimenetelmän kanssa tai testikasetin kuivatuissa reagensseissa on vikaa. "Run failed"- tulos johtuu laitteen toimintahäiriöstä, jolloin mitään tuloksia ei ole saatavilla. (Abacus Diagnostica Oy 2022, 6.)

Kvalitatiivinen tulos koostuu laiteohjelmiston keräämistä tiedoista, joita ovat PCR-monistuksen käyrä, testikitin eränumero spesifi cut-off arvo ja Ra-arvo (eng. Amplification ratio), jota käytetään arvioimaan PCR-reaktion voimakkuutta. Mikäli Ra-arvo ylittää cut-off arvon, on tulos yleensä positiivinen, mutta näin ei aina ole. Mikäli Ra-arvo jää cut-off arvon alapuolelle, mutta monistuskäyrä on epälineaarinen, saadaan tulos "BORDERLINE". Samoin tulos "NEGATIVE" saadaan, mikäli monistuskäyrä on lineaarinen ja ylittää cut-off arvon. Ra-arvoa ei siis voida käyttää määrällisenä indikaattorina. Kvalitatiivisen tuloksen lisäksi laiteohjelmisto laskee positiivisten tulosten ct-arvon yhden desimaalin tarkkuudella. Ct-arvo kuvaa montako PCR-sykliä on ajettu, kunnes monistettava virussekvenssi on havaittu. Positiivisten tulosten ct-arvot ovat aina välillä 10.0–44.0 ja muiden tulosten ct-arvo ilmoitetaan 0.0. (Abacus Diagnostica Oy 2022, 7).

7 EVALUAATION TULOKSET

Evaluaatiotestaussarjassa ajettiin 50 positiivista RS-virusnäytettä, joista 17 oli aiemmin ajettu QiaStat-analysaattorilla ja loput 23 GeneXpert-analysaattorilla. Toiset 50 näytettä olivat Sars-Cov-2 positiivisia ja niistä 5 oli ajettu QiaStat-analysaattorilla ja 45 GeneXpert-analysaattorilla. GenomEra-analysaattorilta saatuja tuloksia verrattiin referenssimenetelmien antamiin tuloksiin ja mikäli ne eivät täsmänneet, toistettiin analyysi uudestaan. Yhteensä analyysyjä tehtiin 111 kappaletta.

RS-virus näytteiden osalta saatiin 42 oikeaa positiivista tulosta ensimmäisellä analyysikerralla. Vääriä negatiivisia tuloksia tuli kuusi, joista kahdesta saatiin oikea positiivinen tulos uusinta-analyysin jälkeen. Kaksi tulosta oli "Failed" ja "BORDERLINE", yksi kumpaakin, joista molemmista saatiin oikea positiivinen tulos uusinta-analyysissä. Sars-Cov-2 osalta oikeiden positiivisten tulosten määrä oli 47 ensimmäisellä analyysikerralla. Vääriä negatiivisia tuloksia tuli kaksi, josta toinen oli ensimmäisellä analyysikerralla "Failed" ja toisesta saatiin uusinta analyysissä oikea positiivinen. Yksi näyte oli sekä RSV, että Sars-Cov-2 positiivinen, josta tulokseksi saatiin Sars-Cov-2 osalta negatiivinen ja RS-viruksen osalta positiivinen molemmilla analyysikerroilla. Näytteiden uusinta-analyysit toteutettiin noudattamalla samoja ohjeita kuin ensimmäiselläkin analyysikerralla. Kaikki näytteet olivat influenssa A:n ja B:n osalta negatiivisia, joten niiden osalta saatiin kustakin 100 oikeaa negatiivista. Kuviossa 6 esitetään tulokset ennen uusinta-analyysien tekemistä.



KUVIO 6. Pylväskaavio evaluaation ensimmäisen analyysikierroksen tuloksista.

Testin herkkyyttä ja tarkkuutta voidaan arvioida nelikenttätaulukon avulla. Taulukkoon 1 on merkitty vain ensimmäisen analyysikierroksen tulokset, joista GenomEralla saatiin 89 oikeaa positiivista ja 8 väärää negatiivista, joiden lisäksi kolme "Failed" tulosta. Oikeita negatiivisia tuloksia oli 300. Nelikentälaskentataulukon mukaan testisarjalle saatiin tarkkuudeksi 100 % ja herkkyydeksi 91,7 %. Herkkyyden laskemisessa ei huomioitu kolmea tulosta, jotka olivat "Failed".

TAULUKKO 1. GenomEra:n herkkyyden ja tarkkuuden laskeminen nelikenttätaulukossa.

| | GenomEra pos | GenomEra neg/(Failed) | Näytteitä yhteensä |
|-----------------------|---------------------|------------------------------|--------------------|
| Referenssi pos | 89 | 8 (3) | 100 |
| Referenssi neg | 0 | 300 | 300 |

8. POHDINTA

Opinnäytön tarkoituksena oli selvittää, onko GenomEra Sars-Cov-2, Flu A/B +RSV 2.0 riittävän tarkka sekä herkkä potilasnäytteiden ajamiseen. Samalla arvioitiin testikitin käyttäjäystävällisyyttä ja kehitystä testikitin ensimmäiseen versioon verrattuna. Evaluaation päätyttyä Abacus Diagnostica Oy ilmoitti saaneensa CE-merkinnän testikitille, eli sen tarkkuus ja herkkyys oli riittävä potilasnäytteiden ajamiseen. Evaluaation suorittaja koki näytteiden esikäsittelyn liian monivaiheisena ja hitaana päivystyslaboratorion toimintaan. Testikitin ensimmäiseen versioon verrattuna uusi versio vaikutti monimutkaisemmalle käyttäjä. Testin analysointi-aika analysaattorilla on riittävän nopea verrattuna referenssimenetelmiin. Evaluaation suorittaja arvioisi GenomEra Sars-Cov-2, Flu A/B + RSV 2.0 sopivan pienten aluelaboratorioiden käyttöön.

Analyysijärjestelmien jatkuva kehittyminen on tärkeää terveydenhuollon toiminnan kannalta. Nopeammat ja tarkemmat analyysitulokset helpottavat kuormittuneen terveydenhuollon toimintaa ja takaavat potilaalle oikean hoidon aloittamisen lyhyemmällä aikataululla. Myös testien laaja saataavuus eri toimittajilta on tärkeää.

Huoltovarmuus tarkoittaa kykyä selviytyä erilaisissa häiriötilanteissa siten, että toiminta jatkuisi mahdollisimman häiriöttömästi ja ilman erityisiä järjestelyitä. Huoltovarmuus on monen osatekijän summa ja sitä voidaan ennalta parantaa esimerkiksi arvioimalla riskejä ja tekemällä tarvittavia toimenpiteitä häiriötilanteiden varalle. (Huoltovarmuuskeskus, 2023.) Koronapandemian aikana myös terveydenhuollon laboratorioiden huoltovarmuus korostui, sillä tavaroiden toimituksessa ja raaka-aineiden saamisessa oli häiriöitä. Huoltovarmuuden takaamiseksi, tulisi jatkossakin kehittää sekä uusia testikittejä, että uusia versioita jo olemassa olevista ja evaluoida niitä potilaskäyttöä varten.

LÄHTEET

Alonso, Jose Antonio Navarro; Bont, Louis J.; Bozzola, Elena; Herting, Egbert; Lega, Federico; Mader, Silke; Nunes, Marta C.; Ramilo, Octavio; Valiotis, George; Olivier, Catherine Weil; Yates, Ann; Faust, Saul N. 2021. RSV: perspectives to strengthen the need for protection in all infants. Emerging Themes in Epidemiology. Biomed Central. Hakupäivä 30.3.2023. <https://etonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12982-021-00104-5>

Anttila, Veli-Jukka & Eerola, Hannaleena, 2022. Covid-19-testit, koronatestit (-CV19NhO, -pocCV19, S -CV19Ab, vasta-aineet seerumista). Terveyskirjasto. Duodecim. Hakupäivä 22.3.2023. <https://www.terveyskirjasto.fi/snk99005/covid-19-testit-koronatestit-cv19nho-poccv19-s-cv19ab-vasta-aineet-seerumista>

Anttila, Veli-Jukka, 2021. SARS ja MERS. Terveyskirjasto. Duodecim. Hakupäivä 27.3.2023. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00603>

Anttila, Veli-Jukka, 2023. Koronavirus (Sars-Cov-2, Covid-19). Terveyskirjasto. Duodecim. Hakupäivä 27.3.2023. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk01257/koronavirus-sars-cov-2-covid-19>

Azzari, Chiara; Baraldi, Eugenio; Bonanni, Paolo; Bozzola, Elena; Coscia, Alessandra; Lanari, Marcello; Manzoni, Paolo; Mazzone, Teresa; Sandri, Fabrizio; Lisi, Giovanni Checcucci; Parisi, Salvatore; Piacentini, Giorgio; Mosca, Fabio 2021. Epidemiology and prevention of respiratory syncytial virus infections in children in Italy. Italian Journal of Pediatrics. Biomed Central. Hakupäivä 30.3.2023. <https://ijponline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13052-021-01148-8>

Brunstein, John 2013. PCR: the basics of the polymerase chain reaction. MLO: Medical Laboratory Observer. Ebsco. Hakupäivä 31.3.2023. <https://web-s-ebsohost.com.ezp.oamk.fi:2047/ehost/detail/detail?vid=5&sid=3c90f425-1428-4d41-8d8d-b2e7ff3ee12a%40redis&bdata=JnNpdGU9ZWhvc3QtG12ZQ%3d%3d#AN=86674386&db=aph>

Cepheid, 2022. Xpert® Xpress SARS-CoV-2/ Flu/RSV. Hakupäivä 20.7.2023. <https://www.cepheid.com/content/dam/www-cepheid-com/documents/package-insert-files/xpress->

sars-cov-2-flu-rsv/Xpert%20Xpress%20SARS-CoV-2%20Flu%20RSV%20CE%20IVD%20FINNISH%20Package%20Insert%20302-5159-FI%20Rev.%20D.pdf

Copan Diagnostics, 2021. Copan Universal Transport Medium (UTM-RT®) System Instructions for use. Hakupäivä 17.7.2023. <https://www.copanusa.com/wp-content/uploads/2021/11/HPC212R04-Date-2021.05-PRINT.pdf>

Dharmapalan, Dhanya, 2020. Influenza. Indian J Pediatr. National Library of Medicine. Hakupäivä 22.3.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7091034/>

Horelli-Kuitunen, Nina & Orpana Arto, 2016. Geenitestauksen menetelmiä. Lääketieteellinen geneetiikka. Oppiportti. Duodecim. Hakupäivä 31.3.2023. https://www.oppiportti.fi/op/ltg00905/do?p_haku=pcr#q=pcr

Huoltovarmuuskeskus, 2023. Usein kysyttyä. Hakupäivä 6.10.2023. <https://www.huoltovarmuuskeskus.fi/usein-kysyttya>

Ikonen, Niina; Savolainen-Kopra, Carita; Lakoma, Leif 2023. Miten testaan influenssaa avohoidossa? Lääkärilehti. Hakupäivä 27.3.2023. <https://www-laakarilehti-fi.ezp.oamk.fi:2047/tieteessa/kaytannot/miten-testaan-influenssaa-avohoidossa/>

Kazakova, Anna 2019. MULTIPLEX DIAGNOSTICS: Development of serological dual-mode multiplex microarray immunoassay and analysis of influenza and respiratory syncytial virus disease burden in early childhood. Turku Doctoral Programme of Molecular Medicine. Turun yliopisto. Väitöskirja. Hakupäivä 27.3.2023. <https://www.utupub.fi/bitstream/handle/10024/148663/AnnalesD1456Kazakova.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Kotimaisten kielten keskus ja Kielikone Oy, 2022. Evaluaatio. Kielitoimiston sanakirja. Hakupäivä 2.4.2023. <https://www.kielitoimistonsanakirja.fi/#/evaluaatio?searchMode=all>

Laki terveydenhuollon laitteista ja tarvikkeista annetun lain muuttamisesta 720/2021. Hakupäivä 3.4.2023.

<https://finlex.fi/fi/laki/alkup/2021/20210720?search%5Btype%5D=pika&search%5Bpika%5D=ivd-direktiivi>

Nicole, Jawerth 2020. How Is the COVID-19 Virus Detected using Real Time RT-PCR? International Atomic Energy Agency. Hakupäivä 2.4.2023. <https://www.iaea.org/newscenter/news/how-is-the-covid-19-virus-detected-using-real-time-rt-pcr>

Parkkila, Seppo; Saari, Sampo; Sormunen, Piia; Silander, Heidi; Nenonen, Suvi; Kakko, Leila; Nuorti, Pekka 2021. Sars-Cov-2:n tartunta ja leviäminen. Duodecim lehti. Hakupäivä 27.3.2023. <https://www-duodecimlehti-fi.ezp.oamk.fi:2047/xmedia/duo/duo16328.pdf>

Public Health Ontario, 2020. An Overview of Cycle Threshold Values and their Role in SARS-CoV-2 Real-Time PCR Test Interpretation. Hakupäivä 2.4.2023. <https://www.publichealthontario.ca/-/media/documents/ncov/main/2020/09/cycle-threshold-values-sars-cov2-pcr.pdf?la=en>

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, 2019. RSV. Hakupäivä 30.3.2023. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/rsv>

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, 2020. Influenssa. Hakupäivä 22.3.2023. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/influenssa>

Uhari, Matti & Nieminen, Pentti, 2014. Sensitiivisyys ja spesifisyys lasketaan nelikenttätaulukosta. Epidemiologia ja biostatistiikka. Duodecim Oppiportti. Hakupäivä 5.7.2023. https://www.oppiportti.fi/op/ebi00008/do?p_haku=sensitiivisyys#q=sensitiivisyys

Vuento, Risto, 2020. Infektioiden aiheuttajat: loiset, bakteerit, arkit, sienet, alkueläimet, virukset ja prionit. Terveyskirjasto. Duodecim. Hakupäivä 22.3.2023. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00562/infektioiden-aiheuttajat-loiset-bakteerit-arkit-sienet-alkuelaimet-virukset-ja-prionit?q=virus>

Yang, Yicheng; Xiao, Zhiqiang; Ye, Kaiyan; He, Xiaoen; Sun, Bo; Qin, Zhiran; Yu, Jianghai; Yao, Jinxiu; Wu, Qinghua; Bao, Zhang; Zhao, Wei 2020. SARS-CoV-2: characteristics and current

advances in research. Virology Journal. Biomed Central. Hakupäivä 30.3.2023.
<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-020-01369-z>

LIITTEET

LIITE 1

ABACUS Diagnostica



For IVD performance evaluation use only

**GENOMERA[®] SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV
2.0
ASSAY KIT**

PACKAGE INSERT

REF CDX-160-01-20
CDX-160-01-100

| Document review | | | |
|--|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Document name Package insert (IVD evaluation) | | Document number 0021 | |
| Project name GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV 2.0 | | Project number 3520 | |
| Composed by (name/signature) Salla Laine / Jari Martelin / Antti-Heikki Tapio / Jiri Vainio / | | Date 31.1.2022 | Reviewed version 1.0 |
| Approved by (name/signature) Elina Tuomola / | | Date 15.2.2022 | |
| Comments | | | |
| | | | |
| Version history | | | |
| Version | Description of changes | Author(s) | Date |
| 1.0 | First official version | SL, JM, A-HT, JV | 15.2.2022 |

CONTENTS

| | | |
|------|--|----|
| 1 | INTENDED USE AND INTENDED USER | 1 |
| 2 | SUMMARY AND EXPLANATION | 1 |
| 3 | PRINCIPLE OF THE PROCEDURE | 2 |
| 4 | MATERIALS PROVIDED | 2 |
| 5 | MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED | 2 |
| 6 | WARNINGS AND PRECAUTIONS | 3 |
| 7 | STORAGE, STABILITY AND HANDLING | 3 |
| 8 | DIRECTIONS FOR USE | 4 |
| 8.1 | Preparation of the GenomEra Extraction Column..... | 4 |
| 8.2 | Sample preparation for samples collected in Copan eNAT | 5 |
| 8.3 | Sample preparation for samples collected in various sample collection/viral transport media..... | 5 |
| 8.4 | Storage of specimens..... | 5 |
| 8.5 | Test procedure | 5 |
| 9 | INTERPRETATION OF RESULTS..... | 6 |
| 9.1 | Result interpretation by the GenomEra CDX software | 6 |
| 9.2 | Threshold cycle value (Ct) | 7 |
| 9.3 | Cut-off values | 7 |
| 9.4 | Troubleshooting guide for Borderline, PCR inhibition, Assay failed and Run failed results | 7 |
| 9.5 | Export of results to Laboratory Information System (LIS) | 7 |
| 10 | QUALITY CONTROL (QC)..... | 8 |
| 10.1 | Sample processing control (SPC)..... | 8 |
| 10.2 | External quality assessment..... | 8 |
| 10.3 | Control samples..... | 8 |
| 11 | PERFORMANCE CHARACTERISTICS..... | 9 |
| 11.1 | Clinical performance..... | 9 |
| 11.2 | Analytical sensitivity (Limit of Detection)..... | 9 |
| 11.3 | Analytical reactivity (Inclusivity)..... | 9 |
| 11.4 | Analytical specificity (Exclusivity)..... | 9 |
| 11.5 | Interfering substances | 9 |
| 11.6 | Reproducibility | 9 |
| 11.7 | Pre-treated sample stability | 9 |
| 12 | LIMITATIONS OF THE TEST | 9 |
| 12.1 | Inhibitors in clinical samples | 9 |
| 12.2 | Other limitations..... | 9 |
| 13 | INSTRUCTIONS FOR DISPOSAL | 9 |
| 14 | LITERATURE REFERENCES..... | 10 |
| | MANUFACTURER | 11 |
| | SYMBOLS | 11 |

1 INTENDED USE AND INTENDED USER

The GenomEra[®] SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV 2.0 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 (rRT-PCR) to amplify viral RNA on the GenomEra CDX system from upper respiratory tract specimens collected from patients who meet clinical and/or epidemiological criteria for coronavirus disease 2019 (COVID-19), influenza, or RSV.

The GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV 2.0 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 SARS-CoV-2, influenza A, influenza B, and/or RSV RNA in the sample and are, thus, indicative of active infection. Clinical correlation with patient history and other diagnostic information is necessary to determine patient's infection status. Positive results do not rule out (co-)infections from bacteria or other viruses. The agent detected may not be the definite cause of disease.

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 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. The Product is for professional use, *i.e.*, to be used in a laboratory environment by trained laboratory personnel, *e.g.*, laboratory technicians accustomed to normal laboratory methods such as pipetting, vortex mixing, and centrifuging. The assay results should be interpreted by a competent health care professional in conjunction with the patient's medical history, clinical signs and symptoms, and the results of other diagnostic tests.

For IVD performance evaluation use only. Not for diagnostic purposes.

2 SUMMARY AND EXPLANATION

Since its emergence in 2019, coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by SARS-CoV-2, has become a global concern with hundreds of millions of confirmed cases and millions of deaths worldwide.^{1,2} While in most cases, COVID-19 presents as a mild to moderate upper respiratory illness, with signs and symptoms compatible with those of other respiratory viruses, the spectrum of SARS-CoV-2 infection can vary widely from asymptomatic infection to lower respiratory tract illnesses with life-threatening complications.^{2,3} Human to human transmission occurs primarily via respiratory droplets from coughs and sneezes.^{4,5} Although, some COVID-19 patients have shown to shed SARS-CoV-2 RNA in stool indicating a probable faecal-oral or faecal aerosol transmission route.⁵ Indirect contact via contaminated surfaces is another possible cause of infection.^{4,5}

SARS-CoV-2 belongs to the genus Betacoronaviruses within family Coronaviridae. Members of the family are enveloped, positive-sense single-stranded RNA (+ssRNA) viruses.¹ SARS-CoV-2 is closely related to the members of a viral species of zoonotic origin termed severe acute respiratory syndrome related CoV (SARSr-CoV), a species defined by the agent of the 2002/03 outbreak of SARS in humans.^{6,7} SARS-CoV-2 shares 96%, 80%, and 50% sequence identities with bat coronavirus (RaTG13), SARS-CoV-1, and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), respectively.^{8,9} It encodes approximately 27 proteins including the structural proteins named as spike (S) glycoprotein, hemagglutinin-esterase (HE) protein, nucleocapsid (N) protein, membrane (M) protein, and small envelope (E) protein.⁸⁻¹⁰ These are translated from the virus subgenomic messenger RNAs (mRNAs) by the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The genes encoding these structural proteins are the most widely used target sequences for SARS-CoV-2 rRT-PCR detection.¹⁰

Influenza (flu), caused by human influenza virus types A and B, is a contagious respiratory illness that infect the nose, throat, and lungs.¹¹ Similarly to SARS-CoV-2, the symptoms can vary from mild to severe illness. Older people, young children, and people with certain chronic health conditions, are typically at higher risk of getting serious flu complications.¹¹ The transmission of seasonal flu occurs in similar ways as COVID-19, most commonly via respiratory droplets from coughs and sneezes.¹²

Influenza viruses are members of the family Orthomyxoviridae. This family represents enveloped, segmented negative-sense single-stranded RNA (-ssRNA) viruses.¹³ There are four genera of this family: types A, B, C and D, of which, only types A and B are clinically relevant for humans.^{11,13} Influenza A viruses are divided into subtypes based on two proteins on the surface of the virus: hemagglutinin (H) and neuraminidase (N).^{11,13} There are numerous different hemagglutinin and neuraminidase subtype combinations identified on the surface of influenza A subtypes to date. Current subtypes of influenza A viruses that circulate seasonally in people include A(H1N1) and A(H3N2).¹¹ Influenza B viruses, which generally change more slowly in terms of their genetic and antigenic properties than influenza A viruses, are classified into two lineages, B/Yamagata and B/Victoria.^{11,13}

Human respiratory syncytial virus (RSV) causes usually mild, cold-like symptoms but can also be serious, especially for infants and older adults. RSV spreads via coughs or sneezes, similarly to SARS-CoV-2 and influenza viruses and can survive for many hours on hard surfaces.¹⁴

Since 2018, RSV has been reclassified under the species name Human orthopneumovirus within the family of Pneumoviridae.¹⁵ The single-stranded negative sense RNA (-ssRNA) genome of RSV is composed of ten genes which code for eleven proteins.^{14,15} Three of the proteins are transmembrane glycoproteins (F, G, SH), two function as matrix proteins (M, M2), and three are associated with the nucleocapsid (N, P, L). The additional two proteins (NS1, NS2) have nonstructural functions.¹⁵

Since the clinical symptoms of all these viruses may be nonspecific and can overlap with each other, as well as with some bacterial infections it is crucial to be able to differentiate them reliably.^{10,12,16} Therefore, rapid tests are needed to accelerate clinical decision-making and to alleviate the workload of centralized test laboratories. RT-PCR-based assays, also recommended by the WHO, are the standard

ENGLISH

approach for detection of viral respiratory pathogens and will remain as such especially for the acute phase diagnostics from symptomatic patients.^{10,12,16}

3 PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

GenomEra CDX is a molecular diagnostics analyzer consisting of an integrated thermal cycler and a time-resolved fluorometer.¹⁷ 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 2.0 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 uses a specific human housekeeping gene mRNA target as sample extraction and sufficiency control. It also controls that the sample collection has been performed adequately and there is detectable amount of human mRNA in the sample. The control also functions as an amplification control to monitor assay inhibition and is later denoted as SPC (sample processing control).

The respiratory swab specimens are collected and stored in viral transport medium, preferably eNAT (Copan, Italy). Swab specimens collected in any other collection medium than eNAT are diluted in 1:1 ratio with eNAT for sample lysis. Sample preparation is based on size exclusion purification of nucleic acids. First, the storage buffer is removed from the Extraction Column by a short 1-minute centrifugation. Next, the lysed sample is loaded onto the Extraction Column, followed by an additional centrifugation to purify the sample. The purified high molecular weight nucleic acids are eluted, while all debris, cellular compartments, inhibitors, small nucleic acid fragments (< 50 bp), nucleotides, and salts are retained in the column matrix.

In the beginning of the automated assay run, the GenomEra 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 protocol takes approximately 50 minutes and ends with the reporting of results. In addition to the colour-coded qualitative results, GenomEra CDX Software calculates threshold cycle values (Ct, see section 9.2) for each positive analyte.

4 MATERIALS PROVIDED

The GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV 2.0 Assay Kit contains:

- 20/100x GenomEra® SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV 2.0 Test Chips
- 20/100x GenomEra® Extraction Columns
- 20/100x GenomEra® Waste Tubes
- 20/100x GenomEra® Sample Elution Tubes
- 1x Re-usable Chip Holder

5 MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 1.5 mL or 2.0 mL PCR clean microtubes for sample lysis (if the original sample IS NOT collected in Copan eNAT™)
- FastGene High Speed Mini Centrifuge (Nippon Genetics Catalogue No. NG003)
 - **NOTE:** FastGene High Speed Mini Centrifuge can be purchased from Abacus Diagnostica, REF: CDX-10-041
- Copan eNAT™ medium for sample lysis and preservation
 - **NOTE:** Copan eNAT™ can be purchased from Abacus Diagnostica, REF: CDX-608C-50
- Transport media and swabs for specimens e.g.
 - Copan Catalogue No. 482CE. Conical tube filled with 1 mL eSwab™ Liquid Amies medium packaged with one flexible minitip Nylon® flocced swab, sterile
 - Copan Catalogue No. 360C. Conical tube filled with 1 mL UTM™ medium packaged with one flexible minitip FLOQSwab™, sterile
 - Copan Catalogue No. 305C. Conical tube filled with 3 mL UTM™ medium packaged with one flexible minitip FLOQSwab™, sterile
 - Greiner Bio-One Catalogue No. 456162. Vacuette Virus Stabilization Tube filled with 2 mL PBS
- Cap Puncher (optional tool)
 - **NOTE:** Cap Puncher can be purchased from Abacus Diagnostica, REF: CDX-20-730
- GenomEra® CDX System (Instrument and Software), Abacus Diagnostica, Order No. CDX-10-020
- Vortex, e.g. Scientific Industries, Inc. Vortex Genie 2, Catalogue No. G560E
- Micropipette (middle-range including 35 µL), e.g.
 - Sarorius mLine pipette 10–100 µL, Catalogue No. 725050
- Sterile filter-blocked tips (range 10–100 µL), e.g.
 - Thermo Fisher Scientific ART-100, Catalogue No. 2065
 - VWR sterile aerosol pipet tip with extra length (5–180 µL), Catalogue No. 732-1107
 - StarLab 200 µL XL Filter Tip, Catalogue No. I1011-0830 (extended length tip suitable for pipetting from eNAT tubes)
- Disposable gloves, powderless
- GenomEra® CDX software version 1.3.45 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

- Other GenomEra Assay Kits may not be compatible with the same (RT-)PCR protocol. Confirm from the assay manufacturer which test kits may be used within the same assay run when needed.
- Wear protective clothing and disposable gloves while handling the kit and the samples.
- Handle all biological specimens as potentially infectious using microbiology laboratory safety procedures. Follow safety procedures set by your institution for working with chemicals and handling biological specimens.
- Avoid contact of eNAT medium with skin and mucous membranes. If contact does occur, immediately wash with plenty of water.
- eNAT medium contains guanidine thiocyanate. Avoid direct contact between guanidine thiocyanate and sodium hypochlorite (bleach) or other highly reactive reagents such as acids and bases. These mixtures could release noxious gas.
- See Copan eNAT package insert for the complete safety information for handling eNAT.
- Do not use calcium alginate swabs, as they may contain substances that inhibit PCR.
- Other than validated sample types or transport media can have adverse effects on assay performance.
- Do not use the assay 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, or the barcode or label is missing or damaged.
- 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 applied to the Test Chips. The assay run should be started immediately (within 3 minutes) from the addition of the sample.
- Do not use the Extraction Columns if the columns have leaked, or the caps are broken or open upon arrival.
- Do not exceed the 1000 x g centrifugal force or 1 minute centrifugation time. Excessive centrifugal force or time will impair the purification.
- Reagents are not interchangeable between lots. Only the Extraction Columns can be used interchangeably with different GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV 2.0 lots and previously launched GenomEra SARS-CoV-2 2.0 Assay Kit lots.
- The reported Ct values do not solely determine the viral load in sample and are thus only estimates of the viral load.
- Incident notice: Any serious incident that has occurred in relation to the GenomEra SARS CoV-2, Flu A/B + RSV 2.0 Assay Kit shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

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

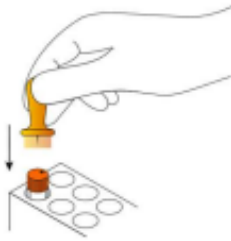
8 DIRECTIONS FOR USE

8.1 Preparation of the GenomEra Extraction Column

NOTE: During centrifugation steps, the column caps must be punched OR loosened 1/8 turn to avoid generation of a vacuum.



1. Make a small marking to the cap of the Extraction Column to ensure correct positioning of the column in the centrifuge.



2. Place the column into a Waste Tube. Punch a hole through the cap of the column by pushing the cap puncher all the way down while keeping the tube in a rack.



3. Lift the column with the Cap Puncher and mix the column by tapping. (Instead of tapping, the column can be mixed by vortexing upside down before marking.)



4. Break off the bottom closure of the Extraction Column. When breaking hold the column tightly. Place the Extraction Column into the Waste Tube and detach the Cap Puncher by turning it back and forth a little while lifting. (**Note:** if cap puncher is not used, loosen the cap 1/8 turn.)



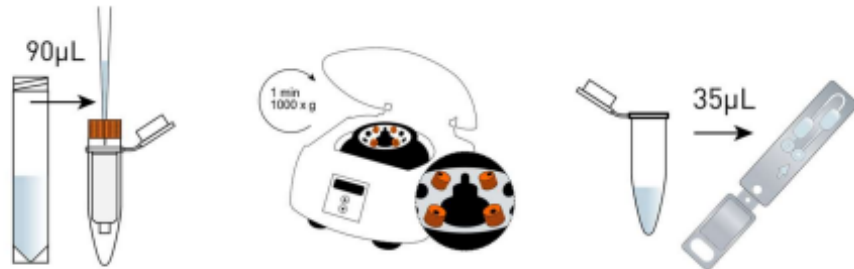
5. Place the columns into the centrifuge with markings facing the outer rim of the rotor. Centrifuge for 1 minute at 1000 x g to remove storage buffer. Discard the Waste Tube and place the Extraction Column into a Sample Elution Tube. **Note:** Pre-prepared Extraction RT can be stored in an upright position at RT for up to 8 hours or at +2 - +8°C for up to 5 days.

NOTE: Columns can be stored at room temperature for up to 8 hours or in refrigerator (+2 °C to +8 °C) up to 5 days after the removal of the storage buffer. **IMPORTANT!** Store the prepared columns in upright position placed in the Sample Elution Tubes.

Continue to section 8.2 or 8.3 depending on the used transport medium.

8.2 Sample preparation for samples collected in Copan eNAT

Use the illustrated protocol below if the samples have been collected in Copan eNAT.



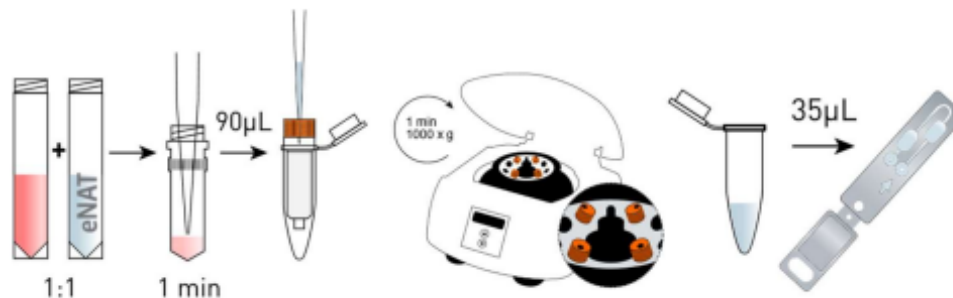
1. Place the prepared column into a Sample Elution Tube and pipet 90 µL of sample slowly and vertically onto the center of the column through the hole (or open the cap).

2. Place the columns into the centrifuge with markings facing the outer rim of the rotor. Centrifuge for 1 minute at 1000 x g to elute nucleic acid. (Or cap ½ turn loosened if puncher was not used.)

3. Pipette 35 µL of the flow-through (viral RNA) to GenomEra Test Chip and start the assay.

8.3 Sample preparation for samples collected in various sample collection/viral transport media

Use the illustrated protocol below if the samples have been collected in any other collection media than Copan eNAT.



1. Mix the sample and Copan eNAT 1:1, let stand for at least 1 minute and mix (pipette/vortex). Place the prepared column into a Sample Elution Tube and pipet 90 µL of sample slowly and vertically onto the center of the column through the hole (or open the cap).

2. Place the columns into the centrifuge with markings facing the outer rim of the rotor. Centrifuge for 1 minute at 1000 x g to elute nucleic acid. (Or cap ½ turn loosened if puncher was not used.)

3. Pipette 35 µL of the flow-through (viral RNA) to GenomEra Test Chip and start the assay.

NOTE: Prepare all specimens for the assay run before pipetting to Test Chips. To run the assay, continue to section 8.5.

8.4 Storage of specimens

In general, specimens should always be stored at +2 to +8 °C. For long term storage, specimens may be frozen at -70 °C or colder.

Specimens collected in Copan eNAT™: Store at room temperature (+25 °C) or in refrigerator (+2 °C to +8 °C) up to 4 weeks.

Specimens collected in Copan UTM™: Store in refrigerator (+2 °C to +8 °C) up to 96 hours.

Specimens collected in Copan eSwab™: Store in refrigerator (+2 °C to +8 °C) up to 96 hours.

Saline specimens: Store in refrigerator (+2 °C to +8 °C) up to 96 hours.

Specimens collected in VACUETTE® Virus Stabilization Tube (PBS): Store in refrigerator (+2 °C to +8 °C) up to 96 hours.

Pretreated specimens: Purified RNA is known to be unstable and should not be stored.

8.5 Test procedure

ENGLISH

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 lot 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 for sample application. The dried reagents can be seen within the reaction chamber. The second chamber is an expansion chamber for accommodating vapour 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. Four chips can be run at the same time. 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 aliquot of sample. Please see further instructions in the GenomEra CDX User Manual.

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 sample IDs 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 the contact with liquid.

9 INTERPRETATION OF RESULTS

9.1 Result interpretation by the GenomEra CDX Software

Results are automatically reported in approximately 50 minutes. In addition to the coloured texts representing the qualitative results, GenomEra software calculates threshold cycle values (Ct, see section 9.2) for each positive analyte.

- 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 2.0 Assay Kit are listed in Table 1. Please note that the GenomEra CDX Software automatically calculates and reports the results. Threshold cycle (Ct) and cut-off values are explained in sections 9.2 and 9.3, respectively.

Table 1. Result interpretation with the GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV 2.0 Assay Kit.

| Result type | SARS-CoV-2 | Influenza A | Influenza B | RSV | SPC ¹ |
|---|---|---|---|---|------------------|
| Result combination with <u>at least one positive result</u> | + POSITIVE / - NEGATIVE / ? BORDERLINE ² | + POSITIVE / - NEGATIVE / ? BORDERLINE ⁴ | + POSITIVE / - NEGATIVE / ? BORDERLINE ³ | + POSITIVE / - NEGATIVE / ? BORDERLINE ⁴ | N/A ² |
| Result combination with <u>no positive results</u> | - NEGATIVE / ? BORDERLINE | - NEGATIVE / ? BORDERLINE | - NEGATIVE / ? BORDERLINE | - NEGATIVE / ? BORDERLINE | Detected |
| ! PCR INHIBITION ⁵ | Not detected | Not detected | Not detected | Not detected | Not detected |
| ! FAILED ⁶ | Failed | Failed | Failed | Failed | Failed |
| Run failed ⁷ | No result | No result | No result | No result | No result |

¹ Sample processing control (SPC). The assay uses a specific human housekeeping gene mRNA target as sample extraction and adequacy control. The control also functions as an internal amplification control (IAC) to monitor assay inhibition.

² N/A, not applicable/required.

³ For SARS-CoV-2 and influenza B target analytes, a borderline result is reported if the amplification ratio is < 5% below the cut-off limit.

⁴ For influenza A and RSV target analytes, a borderline result is reported if the amplification ratio is below the cut-off limit but the amplification curve is strongly non-linear, indicating possible target-specific amplification.

⁵ PCR inhibition result is reported if none of the target sequences nor the SPC is detected. This may also indicate that sample collection has failed (see section 9.4 for further information).

⁶ Failed result is reported if the sample is not compatible with the system, or the dry-reagent chemistry of the Test Chip fails.

⁷ 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 (support@abacusdiagnostica.com).

9.2 Threshold cycle value (Ct)

In addition to the qualitative result, a threshold cycle value (Ct) is calculated for each analyte and is reported with one decimal accuracy. It represents the PCR cycle number at which target replication begins to be detectable. Reported Ct values are always in the range of 10.0 to 44.0 and are calculated only for positive results and reported as 0.0 in all the other cases.

9.3 Cut-off values

The actual qualitative result (POS/BOR/NEG) is determined by the GenomEra CDX Software with a combination of the end-point amplification ratio, a lot-specific cut-off limit and a shape analysis of the amplification curve. A cut-off value is a test chip lot-specific limit which is determined for each target amplicon during production and quality control of the test kit. If the end-point amplification ratio exceeds the cut-off value, the result is usually positive. However, cut-off values do not solely determine the result. If the end-point amplification ratio is below the cut-off but the amplification curve is strongly non-linear, a borderline result is reported. Similarly, a negative result is reported if the amplification curve is strongly linear and rises above the cut-off limit.

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

Borderline result

For influenza A and RSV, a borderline result will be reported if the end-point amplification ratio is below the cut-off limit, but the amplification curve is strongly non-linear. For SARS-CoV-2 and influenza B, a borderline result will be reported if the end-point amplification ratio is < 5% below the cut-off limit. In case of a borderline, 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 the sample contained an excessive amount of inhibitors which impaired the amplification reaction. It is also possible that the sample collection was not performed adequately and there is not detectable amounts of human/target nucleic acids in the sample. **Please start again by preparing a new sample from the original specimen, but pipette only 50 µL of lysed sample onto the Extraction Column. This may improve sample purification.**

NOTE: If inhibition persists, please collect a new sample, and ensure correct orientation of the Extraction Columns in the centrifuge.

Failed

The sample is not compatible with the system, or the dry-reagent 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. If you forgot to add the sample to the Test Chip prior to starting the analysis, take a new chip and perform a new assay. In case of Failed result, **please start again by preparing a new sample from the original specimen, but pipette only 50 µL of lysed sample onto the Extraction Column. This may improve sample purification.**

Run failed

In case of a malfunction in the GenomEra 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. In such case, please contact Technical Support (support@abacusdiagnostica.com).

9.5 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"|"20220212-05"|"20180147"|"30003"|"1"|"SARS-CoV-2"|"Influenza A"|"Influenza B" |
"RSV"|" + Positive"|" - Negative"|" - Negative"|" - Negative"|"POS"|"NEG"|"NEG"|"NEG" |
"30.3"|"0.0"|"0.0"|"0.0"|" +QC PASS"|" ""|" "" |
|"Sample 2"|"20220212-05"|"20180147"|"30003"|"2"|"SARS-CoV-2"|"Influenza A"|"Influenza B" |
"RSV"|" - Negative"|" + Positive"|" - Negative"|" - Negative"|"NEG"|"POS"|"NEG"|"NEG" |
"0.0"|"28.5"|"0.0"|"0.0"|" ""|" +QC PASS"|" ""|" "" |
```

The GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV 2.0 Assay Kit 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 |

ENGLISH

| | | | | | |
|----|--|---------------|----|--|----------------------------|
| 3 | Instrument serial number | XXXXXXXX | 16 | Analyte #3 short result | POS / BOR / NEG |
| 4 | LOT number | 30XXX | 17 | Analyte #4 short result | POS / BOR / NEG |
| 5 | Chip position | 1 / 2 / 3 / 4 | 18 | Analyte #1 numeric result | Threshold cycle value (Ct) |
| 6 | Analyte #1 name | SARS-CoV-2 | 19 | Analyte #2 numeric result | Threshold cycle value (Ct) |
| 7 | Analyte #2 name | Influenza A | 20 | Analyte #3 numeric result | Threshold cycle value (Ct) |
| 8 | Analyte #3 name | Influenza B | 21 | Analyte #4 numeric result | Threshold cycle value (Ct) |
| 9 | Analyte #4 name | RSV | 22 | Analyte #1 QC result (if available) | +/-QCPASS / +/-QCFAIL |
| 10 | Result interpretation #1 (language-dependent) | See Table 1 | 23 | Analyte #2 QC result (if available) | +/-QCPASS / +/-QCFAIL |
| 11 | Result interpretation #2 (language-dependent) | See Table 1 | 24 | Analyte #3 QC result (if available) | +/-QCPASS / +/-QCFAIL |
| 12 | Result interpretation #3 (language-dependent) | See Table 1 | 25 | Analyte #4 QC result (if available) | +/-QCPASS / +/-QCFAIL |
| 13 | Result interpretation #4 (language-dependent) | See Table 1 | | | |

10 QUALITY CONTROL (QC)**10.1 Sample processing control (SPC)**

SPC, in this case human endogenous mRNA inherently present in samples, is designed to monitor the assay performance. SPC ensures that the specimen collection has been performed properly and sample preparation is performed according to instructions. SPC 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

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/>

QCMD: <https://www.qcmd.org/>

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.

NOTE: If there is no material of human origin present in negative control samples, the result will be PCR inhibition.

11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1 Clinical performance

Pending

11.2 Analytical sensitivity (Limit of Detection)

Pending

11.3 Analytical reactivity (Inclusivity)

Pending

11.4 Analytical specificity (Exclusivity)

Pending

11.5 Interfering substances

Pending

11.6 Reproducibility

Pending

11.7 Pre-treated sample stability

Pending

12 LIMITATIONS OF THE TEST

12.1 Inhibitors in clinical samples

The GenomEra SARS-CoV-2, Flu A/B + RSV 2.0 Assay Kit has been developed for the detection of viral nucleic acids 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 9.4.

12.2 Other limitations

It should be noted that the evolution and mutation 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 incorrect storage of the Assay Kit may lead to a false result or PCR inhibition.

Negative results do not preclude the possibility of infection and should not be used as only basis for treatment or other patient management decisions.

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

There is a risk of false negative result due to the presence of sequence variants in the viral target of the assay, procedural errors, amplification inhibitors in specimens, or inadequate amount 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 co-infection with other undetected target or non-target analytes. Negative results do not exclude other types of viral or bacterial infection. Co-infections with multiple viral, bacterial or other agents are also possible.

Improper sample collection may result in PCR inhibition if there is no detectable amount of human mRNA in the sample.

13 INSTRUCTIONS FOR DISPOSAL

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

14 LITERATURE REFERENCES











1. Zhang Y-Z. Novel 2019 coronavirus genome. *Virological*. [Accessed 25 Mar 2020]. Available from: <http://virological.org/1novel-2019-coronavirus-genome/319>
2. "Coronavirus disease (COVID-19)". World Health Organization (WHO). 2022. Retrieved 5 January 2022. https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_3
3. Ortiz-Prado E, Simbaña-Rivera K, Gómez-Barreno L, Rubio-Neira M, Guaman LP, Kyriakidis NC, Mustin C, Jaramillo AMG, Barba-Ostria C, Cevallos-Robalino D, Sanches-SanMiguel H, Unigarro L, Zalakevicute R, Gadian N, López-Cortés A. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the coronavirus disease 2019 (COVID-19): a comprehensive literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2020;98:115094.
4. Chan JF, Yuan S, Kok KH, To KK, Chu H, Yang J et al. (February 2020). "A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster". *The Lancet*. 395 (10223): 514–523.
5. "How COVID-19 Spreads". U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Last Updated July 14, 2021. Retrieved 27 January 2022. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/prevent-transmission.html>
6. de Groot RJ, Baker SC, Baric R, Enjuanes L, Gorbalenya AE, Holmes KV, et al. Family Coronaviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London; Waltham: Academic Press; 2012. p. 806-820.
7. Peiris JS, Yuen KY, Osterhaus AD, Stöhr K. The severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003;349(25):2431-2441.
8. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DGJC, Haagmans BL, van der Veer B, van den Brink S, Wjisman L, Goderski G, Romette JL, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans MPG, Drosten C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020 Jan;25(3).
9. Tang X, Wu C, Li X, Song Y, Yao X, Wu X, Duan Y, Zhang H, Wang Y, Qian Z, Cui J, Lu J. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Nat Sci Rev* 2020;7:1012–1023.
10. Safabadi Tall SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, Oyewunmi OD, Camargo C, Nikipour B, Amanfarid N, Sagan SM, Jahanshahi-Anbuhi S. Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clin Microbiol Rev*. 2021;12;34(3):e00228-20. Review.
11. "Influenza (Flu)". Centers for Disease Control and Prevention (CDC), National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD). Last Updated November 18, 2021. Retrieved 27 January 2022.
12. Clementi N, Ghosh S, De Santis M, Castelli M, Criscuolo E, Zanoni I, Clementi M, Mancini N. Viral Respiratory Pathogens and Lung Injury. *Clin Microbiol Rev*. 2021;31;34(3):e00103-20. Review.
13. Terrier O, Si-Tahar M, Ducatez M, Chevalier C, Pizzorno A, Le Goffic R, Crépin T, Simon G, Naffakh N. Influenza viruses and coronaviruses: Knowns, unknowns, and common research challenges. *PLoS Pathog*. 2021;30;17(12):e1010106.
14. "Respiratory Syncytial Virus Infection (RSV)". Centers for Disease Control and Prevention (CDC), National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD). Last Updated December 18, 2020. Retrieved 27 January 2022.
15. Ramaekers K, Rector A, Cuyppers L, Lemey P, Keyaerts E, Van Ranst M. Towards a unified classification for human respiratory syncytial virus genotypes. *Virus Evol*. 2020;24;6(2):veaa052.
16. Recommendations for national SARS-CoV-2 testing strategies and diagnostic capacities. World Health Organization (WHO). Interim guidance 25 June 2021. WHO REFERENCE NUMBER: WHO-2019-nCoV-lab-testing-2021.1-eng. Retrieved 5 January 2022. <https://www.who.int/publications/item/WHO-2019-nCoV-lab-testing-2021.1-eng>
17. Hagren V, von Lode P, Syrjäälä A, Soukka T, Lövgren T, Kojola H, Nummi J. An automated PCR platform with homogeneous time-resolved fluorescence detection and dry chemistry assay kits. *Anal Biochem*. 2008 Mar;374(2):411–416.
18. Medical Device Coordination Group Document (MDCG 2021-21) Guidance on performance evaluation of SARS-CoV-2 in vitro diagnostic medical devices (August 2021) https://ec.europa.eu/health/system/files/2021-08/mdcg_2021-21_en_0.pdf

MANUFACTURER



Abacus Diagnostica Oy
 Tykistökatu 4D
 FI-20520 TURKU
 FINLAND
www.abacusdiagnostica.com

SYMBOLS

| | | | |
|---|-------------------------------|---|-------------------------------------|
|  | Manufacturer |  | Do not re-use |
|  | Catalogue number |  | Contains sufficient for <n> test |
|  | Batch code |  | Temperature limitation |
|  | Consult instructions for use |  | Use by end of this month |
|  | Stability after first opening |  | For IVD performance evaluation only |

ABACUS Diagnostica

Abacus Diagnostica

Tykistökatu 4D, Electrocity
FI-20520 Turku, FINLAND

Tel. +358(0)20 7188 380

E-mail info@abacusdiagnostica.com
www.abacusdiagnostica.com

After the QIAstat-Dx Respiratory Panel Cartridge containing the sample is introduced into the QIAstat-Dx Analyzer 1.0, the following assay steps occur automatically:

- Resuspension of Internal Control
- Cell lysis using mechanical and/or chemical means
- Membrane-based nucleic acid purification
- Mixing of the purified nucleic acid with lyophilized master mix reagents
- Transfer of defined aliquots of eluate/master mix to different reaction chambers
- Performance of multiplex real-time RT-PCR testing within each reaction chamber.

Note: An increase in fluorescence, indicating detection of the target analyte, is detected directly within each reaction chamber.

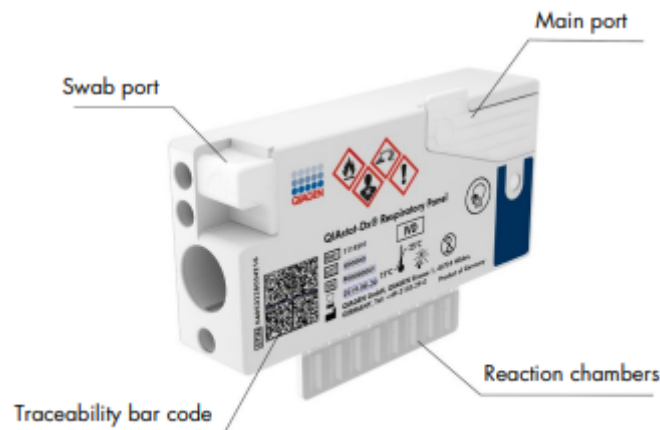


Figure 1. Layout of the QIAstat-Dx Respiratory Panel Cartridge and its features.

Note: The swab port is not used for the QIAstat-Dx Respiratory Panel assay.

Table 5. QIAstat-Dx Respiratory Panel prospective clinical performance summary

| Analyte | | TP/(TP+FN) | Sensitivity/PPA | 95% CI | TN/(TN+FP) | Specificity/NPA | 95% CI |
|-------------------------------|---------|------------|-----------------|------------|------------|-----------------|------------|
| Viruses | | | | | | | |
| Adenovirus ^a | Fresh | 55/58 | 94.8% | 85.9–98.2 | 833/839 | 99.3% | 98.4–99.7 |
| | Frozen | 31/32 | 96.9% | 84.3–99.4 | 1047/1057 | 99.1% | 98.3–99.5 |
| | Overall | 86/90 | 95.6% | 89.1–98.3 | 1880/1896 | 99.2% | 98.6–99.5 |
| Coronavirus 229E | Fresh | 8/9 | 88.9% | 56.5–98.0 | 886/886 | 100.0% | 99.6–100.0 |
| | Frozen | 0/0 | N/A | N/A | 1089/1089 | 100.0% | 99.6–100.0 |
| | Overall | 8/9 | 88.9% | 56.5–98.0 | 1975/1975 | 100.0% | 99.8–100.0 |
| Coronavirus HKU1 ^b | Fresh | 3/3 | 100.0% | 43.8–100.0 | 890/892 | 99.8% | 99.2–99.9 |
| | Frozen | 48/49 | 98.0% | 89.3–99.6 | 1035/1040 | 99.5% | 98.9–99.8 |
| | Overall | 51/52 | 98.1% | 89.9–99.7 | 1925/1932 | 99.6% | 99.3–99.8 |
| Coronavirus NL63 ^c | Fresh | 4/5 | 80.0% | 37.6–96.4 | 890/890 | 100.0% | 99.6–100.0 |
| | Frozen | 36/42 | 85.7% | 72.2–93.3 | 1046/1048 | 99.8% | 99.3–99.9 |
| | Overall | 40/47 | 85.1% | 72.3–92.6 | 1936/1938 | 99.9% | 99.6–100.0 |
| Coronavirus OC43 ^d | Fresh | 3/3 | 100.0% | 43.8–100.0 | 892/892 | 100.0% | 99.6–100.0 |
| | Frozen | 23/26 | 88.5% | 71.0–96.0 | 1059/1063 | 99.6% | 99.0–99.9 |
| | Overall | 26/29 | 89.7% | 73.6–96.4 | 1951/1955 | 99.8% | 99.5–99.9 |

(Table 5 continued)

| Analyte | | TP/(TP+FN) | Sensitivity/PPA | 95% CI | TN/(TN+FP) | Specificity/NPA | 95% CI |
|-------------------------------------|---------|------------|-----------------|------------|------------|-----------------|------------|
| Viruses (continued) | | | | | | | |
| Human Meta-pneumovirus ^e | Fresh | 62/67 | 92.5% | 83.7–96.8 | 828/829 | 99.9% | 99.3–100.0 |
| | Frozen | 53/55 | 96.4% | 87.7–99.0 | 1030/1034 | 99.6% | 99.0–99.8 |
| | Overall | 115/122 | 94.3% | 88.6–97.2 | 1858/1863 | 99.7% | 99.4–99.9 |
| Rhinovirus/Enterovirus ^f | Fresh | 144/157 | 91.7% | 86.3–95.1 | 715/739 | 96.8% | 95.2–97.8 |
| | Frozen | 124/137 | 90.5% | 84.4–94.4 | 941/953 | 98.7% | 97.8–99.3 |
| | Overall | 268/294 | 91.2% | 87.4–93.9 | 1656/1692 | 97.9% | 97.1–98.5 |
| Influenza A ^g | Fresh | 132/133 | 99.2% | 95.8–99.9 | 753/757 | 99.5% | 98.6–99.8 |
| | Frozen | 110/111 | 99.1% | 95.1–99.8 | 972/977 | 99.5% | 98.8–99.8 |
| | Overall | 242/244 | 99.2% | 97.0–99.8 | 1725/1734 | 99.5% | 99.0–99.7 |
| Influenza A H1 ^h | Fresh | 0/1 | 0.0% | 0.0–79.3 | 894/894 | 100.0% | 99.6–100.0 |
| | Frozen | 0/0 | N/A | N/A | 1089/1089 | 100.0% | 99.6–100.0 |
| | Overall | 0/1 | 0.0% | 0.0–79.3 | 1983/1983 | 100.0% | 99.8–100.0 |
| Influenza A H1N1/pdm09 ⁱ | Fresh | 62/63 | 98.4% | 91.5–99.7 | 826/831 | 99.4% | 98.6–99.7 |
| | Frozen | 18/18 | 100.0% | 82.4–100.0 | 1071/1071 | 100.0% | 99.6–100.0 |
| | Overall | 80/81 | 98.8% | 93.3–99.8 | 1897/1902 | 99.7% | 99.4–99.9 |

(Table 5 continued)

| Analyte | | TP/(TP+FN) | Sensitivity/PPA | 95% CI | TN/(TN+FP) | Specificity/NPA | 95% CI |
|------------------------------------|---------|------------|-----------------|------------|------------|-----------------|------------|
| Viruses (continued) | | | | | | | |
| Influenza A H3 ¹ | Fresh | 67/67 | 100.0% | 94.5–100.0 | 825/826 | 99.9% | 99.3–100.0 |
| | Frozen | 89/90 | 98.9% | 82.4–100.0 | 992/998 | 99.4% | 98.7–99.7 |
| | Overall | 156/157 | 99.4% | 93.3–99.8 | 1817/1824 | 99.6% | 99.2–99.8 |
| Influenza B ¹ | Fresh | 64/67 | 95.5% | 87.6–98.5 | 827/828 | 99.9% | 99.3–100.0 |
| | Frozen | 58/62 | 93.5% | 84.6–97.5 | 1026/1026 | 100.0% | 99.6–100.0 |
| | Overall | 122/129 | 94.6% | 89.2–97.3 | 1853/1854 | 99.9% | 99.7–100.0 |
| Parainfluenza virus 1 ¹ | Fresh | 3/3 | 100.0% | 43.8–100.0 | 892/892 | 100.0% | 99.6–100.0 |
| | Frozen | 13/14 | 92.9% | 68.5–98.7 | 1072/1075 | 99.7% | 99.2–99.9 |
| | Overall | 16/17 | 94.1% | 73.0–99.0 | 1964/1967 | 99.8% | 99.6–99.9 |
| Parainfluenza virus 2 | Fresh | 2/2 | 100.0% | 34.2–100.0 | 893/893 | 100.0% | 99.6–100.0 |
| | Frozen | 0/0 | N/A | N/A | 1089/1089 | 100.0% | 99.6–100.0 |
| | Overall | 2/2 | 100.0% | 34.2–100.0 | 1982/1982 | 100.0% | 99.8–100.0 |
| Parainfluenza virus 3 ² | Fresh | 102/104 | 98.1% | 93.3–99.5 | 788/793 | 99.4% | 98.5–99.7 |
| | Frozen | 9/9 | 100.0% | 70.1–100.0 | 1081/1081 | 100.0% | 99.6–100.0 |
| | Overall | 111/113 | 98.2% | 93.8–99.5 | 1869/1874 | 99.7% | 99.4–99.9 |

(Table 5 continued)

| Analyte | | TP/(TP+FN) | Sensitivity/PPA | 95% CI | TN/(TN+FP) | Specificity/NPA | 95% CI |
|--|---------|------------|-----------------|------------|------------|-----------------|------------|
| Viruses (continued) | | | | | | | |
| Parainfluenza virus 4 ^a | Fresh | 3/3 | 100.0% | 43.8–100.0 | 892/892 | 100.0% | 99.6–100.0 |
| | Frozen | 0/0 | N/A | N/A | 1087/1089 | 99.8% | 99.3–99.9 |
| | Overall | 3/3 | 100.0% | 43.8–100.0 | 1979/1981 | 99.9% | 99.6–100.0 |
| Respiratory Syncytial Virus (RSV) ^a | Fresh | 73/76 | 96.1% | 88.9–98.6 | 819/820 | 99.9% | 99.3–100.0 |
| | Frozen | 139/144 | 96.5% | 92.1–98.5 | 941/945 | 99.6% | 98.9–99.8 |
| | Overall | 212/220 | 96.4% | 93.0–98.1 | 1760/1765 | 99.7% | 99.3–99.9 |
| Bacteria | | | | | | | |
| <i>Bordetella pertussis</i> ^a | Fresh | 2/2 | 100.0% | 34.2–100.0 | 893/893 | 100.0% | 99.6–100.0 |
| | Frozen | 1/1 | 100.0% | 20.7–100.0 | 1082/1088 | 99.4% | 98.8–99.7 |
| | Overall | 3/3 | 100.0% | 43.8–100.0 | 1975/1981 | 99.7% | 99.3–99.9 |
| <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> ^a | Fresh | 4/4 | 100.0% | 51.0–100.0 | 891/891 | 100.0% | 99.6–100.0 |
| | Frozen | 1/1 | 100.0% | 20.7–100.0 | 1087/1088 | 99.9% | 99.5–100.0 |
| | Overall | 5/5 | 100.0% | 56.6–100.0 | 1978/1979 | 99.9% | 99.7–100.0 |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | Fresh | 18/18 | 100.0% | 82.4–100.0 | 875/877 | 99.8% | 99.2–100.0 |
| | Frozen | 1/1 | 100.0% | 20.7–100.0 | 1085/1088 | 99.7% | 99.2–99.9 |
| | Overall | 19/19 | 100.0% | 83.2–100.0 | 1960/1965 | 99.7% | 99.4–99.9 |

^a Adenovirus was detected in 3/4 FN specimens using an independent molecular method. Adenovirus was detected in 6/16 FP specimens using an independent molecular method.