

Spolupráce s Nemocnicí na Bulovce¹ na klinické validaci



Nemocnice
Na Bulovce



DIANA
BIOTECHNOLOGIES

2 klinické studie

Studie č.1: (stěry)

Validace DBdirect COVID-19 multiplex RT-PCR na odběrech stěry z nosohltanu²

Srovnání se standardní metodou RNA izolace + RT-qPCR ze stejného vzorku

Cíl: prokázat ekvivalentní citlivost přímé RT-PCR detekce pro klinickou diagnostiku COVID-19

Studie č.2: (sliny)

Validace DBdirect COVID-19 multiplex RT-PCR na odběrech slin (s využitím odběrových sad DIANA Biotech)

Srovnání s párovými odběry stěry z nosohltanu a standardní metodou RNA izolace + RT-qPCR

Cíl: určit citlivost testů ze slin a zjistit zda mohou nahradit stěry pro klinickou diagnostiku COVID-19

1. Děkujeme za spolupráci celému týmu nemocnice na Bulovce, zejména MUDr. Elka Nyčová, MUDr. Anna Poláková (Oddělení klinické mikrobiologie), Mgr. Hana Středová (odběrové místo), JUDr. Jozef Tutka, Mgr. Tomáš Bazala (projektové vedení)

2. Obdobná studie (se stejnými závěry) proběhla již před 3 týdny také na Zdravotním ústavu Ostrava



Studie č.1: validace metody přímé PCR detekce ze stěrů

Odebrané a testované vzorky

537 vzorků stěrů z nosohltanu

- Odebráno do univerzálního transportního média na odběrovém místě FN Bulovka dle standardního odběrového protokolu
- Průřezová „real-life data“ studie bez předvýběru účastníků – pouze nutný souhlas s účastí ve studii. Většina testovaných referováno k testu lékařem (menší část samoplátci)
- Pro větší vypovídací hodnotu vybráno a přidáno cca dalších 30 vzorků pozitivních v referenční metodě
- Odběry probíhaly v období pěti dnů 14.-19. listopadu
- 1 odběr – následně rozděleno na dvě části pro dvě srovnávané metody analýzy

Srovnávané metody

1) Stěry: RNA izolace + RT-PCR (reference)

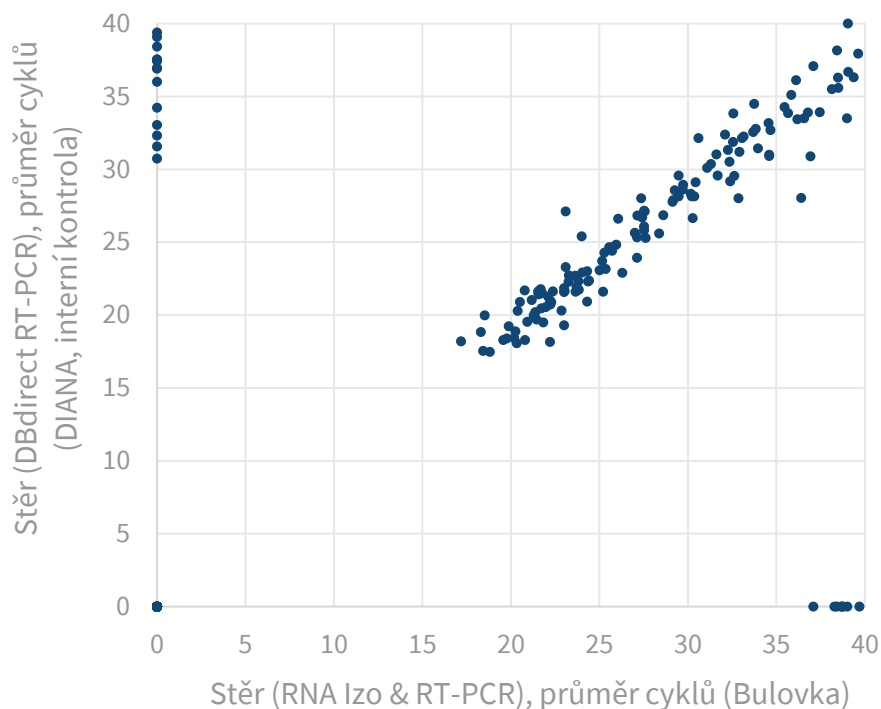
- RNA izolace s využitím CE-IVD soupravy Automated RNA isolation on Agilent Bravo (DIANA Biotech) ve spojení s RT-PCR analýzou s využitím CE IVD souprav COVID-19 Multiplex RT-PCR kit (DIANA Biotech)
- nebo RNA izolace na Nextractor (Genolution) a RT-PCR pomocí COVID-19 Allplex kit (Seegene)
- Analyzováno na FN Bulovka do 24 hodin po odběru

2) Stěry: Přímé RT-PCR (DBdirect kit)

- Analýza dle protokolu pro stěry DBdirect COVID-19 Multiplex RT-PCR kit s využitím automatizované manipulace se vzorky s použitím Agilent Bravo
- Vzorky analyzovány 1-4 dny po odběru (skladovány v 4°C)

Výsledek: Přímé PCR ze stěrů může nahradit „zlatý standard“

Přímé PCR vs RNA izolace + PCR – stěry ...



Poznámka: negativní vzorky v každé metodě jsou zobrazeny jako cyklus nula, tj. vzorky pozitivní pouze v referenční metodě jsou na ose x, vzorky pozitivní pouze v DIANA Direct jsou na ose y

... přímé RT-PCR ukázalo robustní detekci

- RNA Izolace + RT-PCR (reference)
 - 142 vzorků (z 537) diagnostikováno COVID-19 pozitivní
- Přímé RT-PCR (DBdirect RT-PCR kit)
 - 148 vzorků (z 537) diagnostikováno COVID-19 pozitivní
 - Identifikováno 14 pozitivních vzorků, které nebyly odhaleny referenční metodou, přitom 5 bylo slabých (30. až 35. cyklus) a zbytek velmi slabých (>35. cyklus)
 - Naopak všech 8 vzorků, které detekovala jako pozitivní pouze referenční metoda, byly velmi slabé (nad 37. cyklem)

Počet pozitivních a negativních vzorků		Stěr RNA Izolace & RT-PCR	
		Pozitivní	Negativní
Stěr DBdirect RT-PCR	Pozitivní	134	14
	Negativní	8	381

DBdirect COVID-19 RT-PCR kit je více robustní než standardní testy



Studie č.2: validace detekce ze slin

Srovnávané vzorky

- **494 vzorků stěrů z nosohltanu**
 - Odebráno do universálního transportního média na odběrovém místě FN Bulovka dle standardního odběrového protokolu
- **494 párových vzorků slin**
 - Sliny odebrány před stěrem **s využitím DIANA odběrových sad – samoodběř** s využitím unikátního trychtýřku do malých vialek s čárovými kódy, které jsou vhodné pro následné **automatické zpracování**
- Průřezová „real-life data“ studie bez předvýběru účastníků – pouze nutný souhlas s účastí ve studii
- Odběry probíhaly v období pěti dnů 14.-19. listopadu

Metody analýzy

1) Stěry: RNA izolace + RT-PCR (reference)

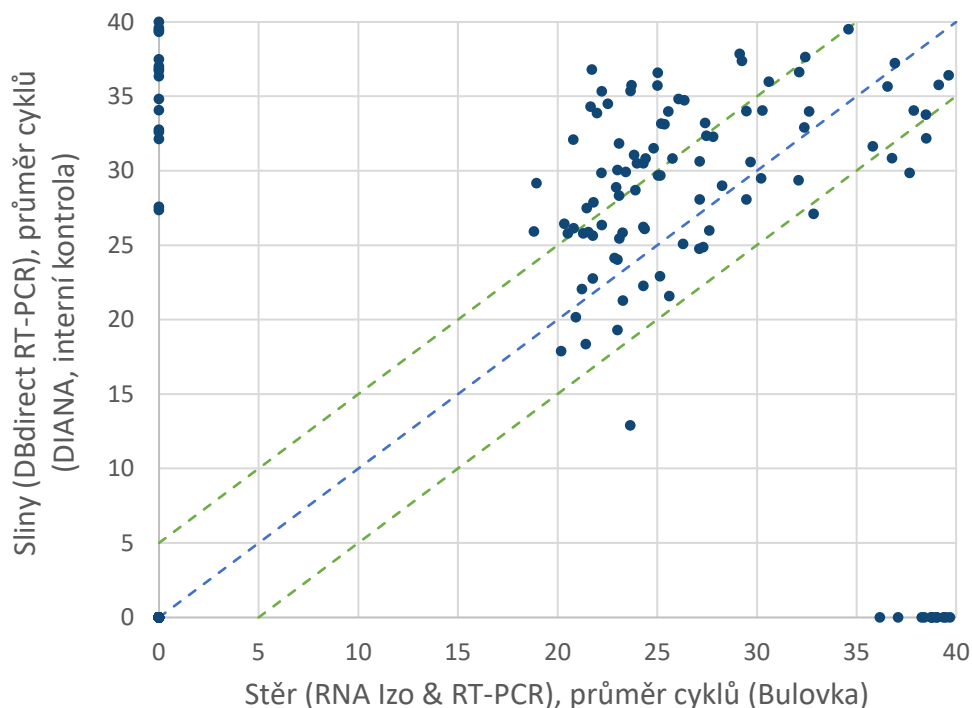
- RNA izolace s využitím CE-IVD soupravy Automated RNA isolation on Agilent Bravo (DIANA Biotech) ve spojení s RT-PCR analýzou s využitím CE IVD souprav COVID-19 Multiplex RT-PCR kit (DIANA Biotech)
- nebo RNA izolace na Nextractor (Genolution) a RT-PCR pomocí COVID-19 Allplex kit (Seegene)
- Analyzováno na FN Bulovka do 24 hodin po odběru

2) Sliny: Přímé RT-PCR (DBdirect kit)

- Analýza dle protokolu pro sliny DBdirect COVID-19 Multiplex RT-PCR kit s využitím automatizované manipulace se vzorky s použitím Agilent Bravo
- Vzorky analyzovány 1-4 dny po odběru (skladovány v 4°C)

Výsledek: Detekce ze slin ekvivalentní diagnostice ze stěrů

Přímá detekce ze slin vs standardní detekce ze stěrů



Poznámka: negativní vzorky v každé metodě jsou zobrazeny jako cyklus nula, tj. vzorky pozitivní pouze ve stěrech jsou na ose x, vzorky pozitivní pouze ve slinách jsou na ose y

... prokázána diagnostická citlivost testu ze slin

- **Detekce ze stěrů (reference: RNA Izolace + RT-PCR)**
 - 105 vzorků (z 494) diagnostikováno COVID-19 pozitivní
- **Detekce ze slin (přímé RT-PCR: DBdirect RT-PCR kit)**
 - 109 vzorků (z 494) diagnostikováno COVID-19 pozitivní
 - Identifikováno 16 pozitivních vzorků, které nebyly odhaleny ze stěrů, přitom 2 byly středně silné (<30. cyklus) a 5 slabých (30. až 35. cyklus)
 - Naopak všech 12 vzorků, které detekovaly jako pozitivní pouze stěry, byly velmi slabé (nad 36. cyklem)

Počet pozitivních a negativních vzorků		Stěr (RNA Izo & RT-PCR)	
		Pozitivní	Negativní
Sliny (DBdirect RT- PCR)	Pozitivní	93	16
	Negativní	12	371

Přímé RT-PCR ze slin ukázalo diagnostickou citlivost (dokonce lepší než stěry)

Shrnutí výsledků: DBdirect RT-PCR technologie validována pro diagnostiku COVID-19 ze stěrů i ze slin

- **Jedna z největších a nejlépe kontrolovaných studií diagnostiky COVID-19 v ČR**
 - Analyzováno ~500 párových vzorků nosohltanových stěrů a slin odebraných od náhodných lidí, kteří přišli na vyšetření („real life data“) – studie ve spolupráci s odborným týmem Nemocnice na Bulovce
- **DBdirect přímé PCR testy ze stěrů (bez předchozí izolace RNA) prokázaly 100% citlivost**
 - Dokonce vyšší záchyt pozitivních než referenční metoda
 - Výrazné zjednodušení laboratorního procesu -> umožní většině laboratoří další navýšení kapacit a zlevnění testů
- **DBdirect testy ze slin prokázaly diagnostickou citlivost a velké výhody oproti standardním stěrům**
 - Dokonce mírně vyšší záchyt pozitivních než referenční odběr ze stěrů
 - Některé navíc zachycené vzorky měly vyšší virovou zátěž a nositelé by mohly nakazit další lidi
 - Pouze v malém procentu testy ze slin nezachytily pozitivní odběry ze stěrů
 - Všechny vzorky „ztracené“ ve slinách však byly ve stěrech slabé a blízko hranice detekce
 - Virová koncentrace ve slinách může mít výrazně větší vypovídací hodnotu o nakažlivosti a vést k prioritizaci trasování v rámci chytré karantény
 - Testy umožňují jednoduchý samoodběr - zmenší tak odpor lidí k opakovanému testování
 - Vhodné i pro pravidelné testování vybraných skupin (oproti antigenním testům vyšší citlivost a jednodušší odběr)