

Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu **PP-COVID-20-0116****Vývoj vysoko výkonného, citlivého RT-qPCR testu a rýchleho RT-LAMP testu na rozlíšenie SARS-CoV-2 a chrípky**Zodpovedný riešiteľ **Pavol Čekan, PhD.**Prijemca **MultiplexDX, s.r.o.****Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený**MultiplexDX, s.r.o.
Ilkovičova 8, 84104, Bratislava, Slovenská republika**Zoznam spolupracujúcich organizácií zo zahraničia, ktoré sa zapojili do riešenia projektu (uveďte názov, sídlo, štát a identifikačné číslo ak je dostupné)**

Žiadne zahraničné organizácie sa do riešenia projektu nezapojili.

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

Európska patentová prihláška

Číslo podania: 20 206 643.7

Názov: LOOP MEDIATED ISOTHERMAL NUCLEIC ACID AMPLIFICATION (LAMP) USING LNA-MODIFIED PRIMERS AND A METAL-BASED COLORIMETRIC METHOD FOR DETECTING AN AMPLIFICATION PRODUCT

Predbežná patentová prihláška na USPTO (United States Patent and Trademark Office)

Číslo podania: 63120652

Názov: LOOP MEDIATED ISOTHERMAL NUCLEIC ACID AMPLIFICATION (LAMP) USING LNA-MODIFIED PRIMERS AND A METAL-BASED COLORIMETRIC METHOD FOR DETECTING AN AMPLIFICATION PRODUCT

Medzinárodná patentová prihláška (PCT)

Číslo podania: PCT/EP2021/061742

Názov: Means and methods for detecting novel coronavirus (SARS-CoV-2)

Medzinárodná patentová prihláška (PCT)

Číslo podania: PCT/EP2021/081230

Názov: LOOP MEDIATED ISOTHERMAL NUCLEIC ACID AMPLIFICATION (LAMP) USING LNA-MODIFIED PRIMERS AND A METAL-BASED COLORIMETRIC METHOD FOR DETECTING AN AMPLIFICATION PRODUCT

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Boršová, K., Paul, E.D., Kováčová, V. et al. Surveillance of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in Slovakia using a novel, multiplexed RT-qPCR assay. Sci Rep 11, 20494 (2021). doi: 10.1038/s41598-021-99661-7.

Brejová B, Boršová K, Hodorová V, et al. A SARS-CoV-2 mutant from B.1.258 lineage with

Uplatnenie výsledkov projektu

Hlavným a plánovaným praktickým uplatnením projektu je klinické využívanie nasledujúcich diagnostických kitov, ktoré vzišli z komercializácie testov vyvinutých počas riešenia projektu:

1. rTEST COVID-19 qPCR kit (IVD-CE)
2. rTEST COVID-19 qPCR Multiplex kit (IVD-CE)
3. rTEST COVID-19 qPCR Allplex kit (IVD-CE)
4. rTEST COVID-19/FLU qPCR kit (IVD-CE)
5. rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7 kit (IVD-CE)
6. rTEST COVID-19 qPCR Multivariant kit (RUO)
7. Vivid COVID-19 LAMP Direct-G kit (IVD-CE)

Okrem klinického používania na komerčnej báze boli niektoré vyvinuté testy taktiež darované v rámci humanitárnej pomoci:

1. Darovanie 50,000 RT-qPCR diagnostických testov do Kene 27. júla 2020
2. Darovanie 7,200 RT-qPCR diagnostických testov do Ukrajiny on 3.-4. decembra 2020
3. Darovanie 10,000 RT-qPCR diagnostických testov do Vatikánu on 14. decembra 2020
4. Darovanie 30,000 RT-qPCR diagnostických testov do Srbska a Čiernej Hory vo februári 2021

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Hlavnou náplňou projektu bolo vyvinúť a klinicky validovať nové senzitivné diagnostické testy na detekciu SARS-CoV-2 a chrípky využívajúc inovatívne prístupy v dizajne diagnostických kitov založených na RT-qPCR s jednoduchou prípravou (multiplexovanie) a skladovaním (pri izbovej teplote) ako aj testy vhodné na PoC testovanie pomocou metódy RT-LAMP s vysokou senzitivitou, minimalistickým spracovaním vzorky a neinvazívnym spôsobom odberu. Boli naplnené všetky tri hlavné ciele stanovené v originálnej žiadosti ako aj dodatočné ciele stanovené v aktualizácii za rok 2020. Úspešne sme implementovali technológiu duálnych sond do dizajnu RT-qPCR (rTEST COVID-19 qPCR kit), čo viedlo k značnému zvýšeniu citlivosti a uľahčenie interpretovania výsledku reakcie pri nízkych množstvách vstupného templátu. Reakcie boli ďalej zjednodušené a vylepšené zavedením duplexovania (rTEST COVID-19 qPCR Multiplex kit) a neskôr i triplexovania (rTEST COVID-19 qPCR Allplex kit) a to v kombinácii s mesačnou stabilitou komponentov kitu pri izbovej teplote. Nadstavbou bol skrining a vyvinutie nových RT-qPCR testov na detekciu chrípky A/B, ktoré sme multiplexovali s testami na detekciu SARS-CoV-2 (rTEST COVID-19/FLU qPCR kit), čím sme priniesli testovací kit schopný rozlíšiť dve úplne rozličné respiračné ochorenia s podobnou symptomatológiou. Pandemická situácia sa začala dynamicky meniť koncom roku 2020 a rozšírenie nových variantov SARS-CoV-2 urobilo tlak na vyvinutie rýchlych a vysokopriepustných diferenciálnych testov. Pružne sme na túto výzvu zareagovali a dodatočne sme vyvinuli variant-špecifické diferenciálne testy najprv na špecifickú detekciu variantu B.1.1.7 a neskôr na odlíšenie viacerých variantov (B.1.1.7, B.1.351, B.1.258 a iné). Okrem RT-qPCR testov sme vyvinuli aj novú technológiu kolorimetrickej detekcie amplifikácie, na ktorej sme založili senzitivné RT-LAMP testy na detekciu SARS-CoV-2 bez nutnosti extrakcie RNA zo vzoriek získaných kloktaním. Obdobne ako pri RT-qPCR sme aj navrhli RT-LAMP testy na detekciu chrípky A/B. V spolupráci s BMC SAV a ÚVZ SR sme vykonali klinické validácie vyvinutých testov, ktorých výsledkom je komercializácia 7 produktov (6 z nich IVD-CE) a jeden produkt v štádiu internej validácie (RT-LAMP na chrípku A/B). Okrem komercializácie sme vypracovali patentové prihlášky pokrývajúce inovácie vyvinuté pre vyššie spomínané RT-qPCR a RT-LAMP testy. V neposlednom rade sme spolu s našimi spolupracovníkmi z BMC SAV a ÚVZ SR spísali dva vedecké manuskripty týkajúce sa vyvinutých RT-qPCR testov, ktoré boli v roku 2021 úspešne odpublikované.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The main aim of the project was to develop and clinically validate new sensitive diagnostic tests for the detection of SARS-CoV-2 and influenza using innovative approaches in the design of diagnostic kits based on RT-qPCR with simple preparation (multiplexing) and storage (at room temperature) as well as tests suitable for PoC testing using the RT-LAMP method with high sensitivity, minimalistic sample processing and non-invasive sampling method. All three main objectives set out in the original application as well as additional objectives set out in the 2020 update were met. We successfully implemented dual probe technology in RT-qPCR design (rTEST COVID-19 qPCR kit), which led to a significant increase in sensitivity and ease of result interpretation especially with low amounts of template. The reactions were further simplified and improved by the introduction of duplexing (rTEST COVID-19 qPCR Multiplex kit) and later triplexing (rTEST COVID-19 qPCR Allplex kit) in combination with room temperature stability of kit components for at least a month. Built on top of these results was the screening and development of new RT-qPCR tests for influenza A/B, which we multiplexed with the SARS-CoV-2 detection tests (rTEST COVID-19/FLU qPCR kit), delivering a test kit capable of distinguishing two completely different respiratory diseases with similar symptoms. The pandemic situation began to change dynamically at the end of 2020 and the spread of new variants of SARS-CoV-2 brought the need for quick and high-throughput differential testing. We quickly responded to this challenge and additionally developed variant-specific differential tests, first for the specific detection of variant B.1.1.7 and later for the differentiation of several variants (B.1.1.7, B.1.351, B.1.258 and others). In addition to RT-qPCR assays, we have developed a new colorimetric amplification detection technology, on which we have based sensitive RT-LAMP assays for the detection of SARS-CoV-2 without the need to extract RNA from gargle samples. Additionally, similar to RT-qPCR, we also designed RT-LAMP assays to detect influenza A/B. In cooperation with BMC SAV and ÚVZ SR, we performed clinical validations of developed tests, which resulted in the commercialization of 7 products (6 of them IVD-CE) and one product in the stage of internal validation (RT-LAMP for influenza A/B). In addition to commercialization, we have submitted patent applications covering innovations developed for the above-mentioned RT-qPCR and RT-LAMP assays. Last but not least, together with our colleagues from BMC SAV a ÚVZ SR, we co-authored two scientific manuscripts pertaining to the developed RT-qPCR tests, which were successfully published in 2021.