



Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije
Štefanova 5
1000 Ljubljana

Številka: 6000/051/2021

Datum: 26.4.2021

POROČILO O VERIFIKACIJI HITREGA ANTIGENSKEGA TESTA PROIZVAJALCA JOYSBIO (TIANJIN) BIOTECHNOLOGY Co., LTD.

Uvod

Po navodilu Ministrstva za zdravje Republike Slovenije (v nadaljevanju MZ) z dne, 2. 4. 2021 smo v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano pristopili k verifikaciji testa SARS-CoV-2 Antigen Rapid Test Kit (Colloidal Gold) proizvajalca Joysbio (Tianjin) Biotechnology Co., Ltd. Test je MZ nabavilo v okviru enotnega postopka javnega naročanja na nivoju Evropske unije. Ker test temelji na analizi brisa odvzetega iz sprednjega dela nosu, je bil sprožen postopek za ugotavljanje primernosti testa za namen samotestiranja določenih skupin prebivalcev Slovenije na okužbo z virusom SARS-CoV-2.

Temelj mikrobiološke diagnostike bolezni COVID-19 je dokazovanje ribonukleinske kisline virusa SARS-CoV-2 z metodo RT-PCR po ekstrakciji nukleinske kisline in reverzni transkripciji (v nadaljevanju PCR), ki se uporablja kot »zlati standard« pri oceni drugih metod. Zaradi različnih, zlasti logističnih razlogov, uporaba PCR ni vedno možna.

Hitri antigeni testi za dokazovanje antigenov SARS-CoV-2 (v nadaljevanju HAT) so dopolnilo PCR. So cenejši, čas izvedbe je krajši (do 30 minut), lahko ga izvaja osebje brez predhodne temeljite laboratorijske izobrazbe, praviloma se izvajajo ob preiskovancu. Izkušnje nekaterih držav kažejo, da je teste mogoče uporabiti tudi na način, ko preiskovanec sam sebi odvzame vzorec, sam izvede test in odčita rezultat. S primerno frekvenco testiranja je do določene mere mogoče nadomesti manjšo občutljivost detekcije povzročitelja, ki nastane zaradi uporabe hitrega antigenega testa namesto RT-PCR metode, odvzema brisa sprednjega dela nosu namesto brisa nosnožrelnega prostora, samoodvzema vzorca namesto odvzema s strani usposobljene osebe in izvedbe hitrega antigenega testa s strani laika namesto s strani usposobljenega zdravstvenega delavca.

Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano (v nadaljevanju NLZOH) je v skladu z navodilom MZ nemudoma pristopil k izdelavi verifikacijskega protokola in vloge za oceno etične sprejemljivosti. Dne 12. 4. 2021 smo Komisiji Republike Slovenije za medicinsko etiko oddali vlogo za pridobitev soglasja Komisije k protokolu verifikacije. Komisija ga je prejela in na dopisni seji obravnavala 13. 4. 2021. Ocenila ga je kot etično



sprejemljivega. Na podlagi dopisa št. 0120-177/2021-7 z dne 13. 4. 2021 smo v NLZOH pristopili k izvajanju verifikacije po protokolu.

Opredelitev problema

Hitri antigenski test, ki je bil izbran s postopkom javnega naročanja na nivoju EU, ima CE in IVD oznako. Da je test pridobil CE oznako, je bila po navedbah proizvajalca opravljena klinična validacija s strani Centro Diagnostico Delta S.r.l., Apollosa (Benevento), Italija, kjer je bil kot testni vzorec uporabljen bris nosnožrelnega prostora, in neodvisna verifikacija s strani University Hospital of Geneva v Švici, kjer je bil kot vzorec uporabljen bris prednjega dela nosu.

Proizvajalec tako navaja 98,13 % občutljivost in 99,22 % specifičnost testa, s čimer je test glede analitskih sposobnosti zadostil razpisnim pogojem v postopku javnega naročanja, nacionalnim priporočilom za uporabo HAT (> 95 % občutljivost in >98 % specifičnost po podatkih v navodilu proizvajalca) in priporočilom Svetovne zdravstvene organizacije (> 80 % občutljivost in > 97 % specifičnost).

Hitri antigenski test, ki je predmet verifikacije, sodi v skupino imunokromatografskih testov, ki temeljijo na reakciji protitelesa, ki je vezano na testno polje, in za virus specifičnega antigena, ki se nahaja v vzorcu. Reakcija je sposobna zaznati le toliko virusnih sestavin/kopij, kot jih je vzorcu. Običajno je potrebnih več kot milijon kopij virusa, da bo HAT pozitiven.

PCR metoda pa omogoča, da se v reakciji iskana tarča pomnoži. Skozi cca 40 ciklov pomnoževanja se v vsakem ciklu število kopij tarče podvoji, kar omogoča, da lahko pozitivno reakcijo daje že 100 kopij virusa. Koncentracijo virusa v vzorcu lahko približno ocenimo s pomočjo Ct vrednostji pozitivnega vzorca. Ct vrednost je številka cikla, pri katerem se tarča pomnoži do te mere, da je merjeni signal presegel prag, ki loči negativno od pozitivne reakcije. Ct vrednosti med različnimi PCR testi niso povsem primerljive zaradi številnih tehničnih razlogov. Kljub temu približna korelacija obstaja: nižja kot je Ct vrednost, večja je koncentracija virusa v vzorcu.

Povsem razumljivo je torej, da HAT bolj uspešno odkriva okužene med tistimi preiskovanci, pri katerih se je virus namnožil do visokih koncentracij in je izračunana občutljivost testa posledično odvisna od strukture populacije preiskovancev.

Namen verifikacije testa Antigen SARS-CoV-2 Test Kit proizvajalca Joysbio (Tianjin) Biotechnology Co., je oceniti učinkovitost hitrega antigeneskega testa (HAT) za antero-nasalne brise z namenom samotestiranja oseb na okužbo SARS-CoV-2 v primerjavi z metodo RT-PCR, pri čemer so si preiskovanci bris sprednjega dela nosu odvzeli sami pod nadzorom zdravstvenega delavca.



Protokol verifikacije

Za izvedbo verifikacije smo v NLZOH sledili protokolu, ki ga priporoča SZO in so rezultati neodvisnih verifikacij, izvedenih po tem protokolu, objavljeni na naslednji povezavi: <https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/>.

Podatki o hitrem antigenem testu, ki je predmet verifikacije

IME PROIZVAJALCA	Joysbio (Tianjin) Biotechnology Co., Ltd.
IME TESTA	SARS-CoV-2 Antigen Rapid Test Kit (Colloidal Gold)
KODA PRODUKTA	COV-AG-20/G10313
VELIKOST PAKIRANJA	20 testov
VSEBINA PAKIRANJA	Testne ploščice, pozitivna in negativna kontrola, ekstrakcijska tekočina v plastičnih epruvetkah (cca 300µl), brisi za odvzem vzorca, navodilo proizvajalca v slovenskem jeziku
DODATNI MATERIAL	Brisi za odvzem vzorca iz nosnožrelnega prostora
POGOJI HRANJENJA	2 do 30°C
ROK UPORABNOSTI	24 mesecev
DRŽAVA PROIZVODNJE	Kitajska

Podatki o protokolu verifikacije

VRSTA ŠTUDIJE	Prospektivna, kohortna; poteka na večih neodvisnih mestih vzorčenja, kjer se v študijo preiskovanci vključujejo zaporedno glede na podano soglasje o sodelovanju
NAMEN ŠTUDIJE	Preveriti učinkovitost hitrega antigenega testa (HAT) za antero-nasalne brise z namenom samotestiranja oseb na okužbo SARS-CoV-2 v primerjavi vzorcem odvzetim iz nosnožrelnega prostora



	analiziranega z RT-PCR
TRAJANJE VERIFIKACIJE	Od 14. 4. 2021 do 26.4. 2021
PODSKUPINE PREISKOVANCEV	<ol style="list-style-type: none">1. Brezsimplomni preiskovanci<ol style="list-style-type: none">a. Celotna skupinab. Preiskovanci s Ct vrednostjo pod 25 in pod 302. Simptomatski preiskovanci<ol style="list-style-type: none">a. Razvrstitev v skupine glede na naslednje kriterije:<ol style="list-style-type: none">i. Trajanje bolezenskih znakov 0-3 dni,ii. Trajanje bolezenskih znakov 4-7 dni,iii. Trajanje bolezenskih znakov 8 ali več dni,iv. Ct vrednost pod ali enaka 30,v. Ct vrednost pod ali enaka 253. Skupina otrok<ol style="list-style-type: none">a. Celotna skupinab. Simptomatski
VRSTA ZBRANIH PODATKOV PRI PREISKOVANCIH	Podatki o prisotnosti/odsotnosti in vrsti bolezenskih znakov, podatki o trajanju bolezenskih znakov, o starosti, spolu.
FORMAT VERIFICIRANEGA HAT	Imunokromatografski test, ki poteka po principu lateralnega toka, kot detekcijski reagent je na protitelesa vezano koloidno zlato.
REFERENČNA RT-PCR METODA	Metoda PCR v realnem času po reverzni transkripciji Allplex 2019-nCoV, proizvajalca Seegene Inc., Južna Koreja
MESTA ODVZEMOV VZORCEV	<ol style="list-style-type: none">1. Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, lokacija Maribor2. Univerzitetni klinični center Ljubljana3. Univerzitetni klinični center Maribor4. Vstopna točka Zdravstvenega doma Kranj5. Vstopna točka Zdravstvenega doma Maribor



Način izračuna

Občutljivost in specifičnost testa izračunamo iz podatkov o številu preiskovancev predstavljenih v vzorčni tabeli.

Občutljivost izražena v odstotkih se izračuna po naslednji formuli: $(A/E) \times 100$.

Občutljivost HAT pove, kolikšen delež s RT-PCR pozitivnih vzorcev je s HAT pozitiven.

Specifičnost izražena v odstotkih se izračuna po naslednji formuli: $(D/F) \times 100$.

Specifičnost HAT pove, kolikšen delež s RT-PCR negativnih vzorcev je s HAT negativen.

Rezultati bodo podani s 95 % intervalom zaupanja.

Metoda		RT-PCR		Skupaj
	Rezultat	Pozitiven	Negativen	
HAT	Pozitiven	A	B	G
	Negativen	C	D	H
Skupaj		E	F	I

Legenda:

A – pravilno pozitiven rezultat HAT

B – lažno pozitiven rezultat HAT

C – lažno negativen rezultat HAT

D – pravilno negativen rezultat HAT



Rezultati in ugotovitve

V obdobju od 14. 4. 2021 do 26. 4. 2021 smo zbrali in analizirali 986 vzorcev pri 493 preiskovancih. Od tega smo 493 vzorcev nosnožrelnega prostora analizirali z metodo RT-PCR in 493 vzorcev iz sprednjega dela nosu pa s HAT. Med preiskovanci je bilo 348 preiskovancev, ki so navajali bolezenske znake in 145 preiskovancev brez bolezenskih znakov. V raziskavo je bilo vključenih tudi 40 otrok, med njimi jih je 20 kazalo bolezenske znake. Iz raziskave smo 9 simptomatskih preiskovancev izključili zaradi mejnih vrednosti rezultata RT-PCR metode.

V Tabeli 1 prikazujemo skladnost rezultatov med HAT iz brisa sprednjega dela nosu in RT-PCR iz brisa nosnožrelnega prostora pri 348 simptomatskih preiskovancih.

Tabela 1: Skladnost rezultatov med HAT in RT-PCR v skupini simptomatskih preiskovancev

Metoda		RT-PCR		Skupaj
HAT	Rezultat	Pozitiven	Negativen	
	Pozitiven	115	1	116
	Negativen	51	172	223
Skupaj		166	173	339

Občutljivost HAT v celotni skupini simptomatskih preiskovancev je **69,28** % (95 % CI 60,85-77,71 %) in specifičnost **99,42** % (95 % CI 98,28-100 %).

Med 166 simptomatskimi RT-PCR pozitivnimi preiskovanci je 143 takšnih, pri katerih so bile Ct vrednosti pod 30 in 121 takšnih, pri katerih so bile Ct vrednosti pod 25. V skupini 143 preiskovancev je bilo s HAT iz sprednjega dela nosu 113 pozitivnih, kar pomeni **79,02** % občutljivost HAT in v skupini 121 preiskovancev 105 pozitivnih iz brisa sprednjega dela nosu, kar pomeni **86,77** % občutljivost HAT.

Nadalje je bilo med 118 simptomatskimi RT-PCR pozitivnimi preiskovanci, ki so kazali bolezenske znake od 0 do 7 dni in so imeli Ct vrednosti pod 30 in 105 pozitivnih iz brisa sprednjega dela nosu, kar pomeni **88,98** % občutljivost HAT. Med 111 simptomatskimi RT-PCR pozitivnimi preiskovanci, ki so kazali bolezenske znake od 0 do 7 dni in so imeli Ct vrednosti pod 25 pa je bilo 100 pozitivnih iz brisa sprednjega dela nosu, kar pomeni **90,09** % občutljivost HAT.

V Tabeli 2 prikazujemo skladnost rezultatov med HAT iz brisa sprednjega dela nosu in RT-PCR iz brisa nosnožrelnega prostora pri 202 simptomatskih preiskovancih, pri



katerih so se bolezenski znaki pojavili isti dan ali največ tretji dan pred odvzemom vzorcev.

Tabela 2: Skladnost rezultatov med HAT in RT-PCR v skupini simptomatskih preiskovancev s trajanjem bolezenskih znakov od 0 do 3 dni

Metoda		RT-PCR		Skupaj
HAT	Rezultat	Pozitiven	Negativen	
	Pozitiven	86	0	86
	Negativen	9	107	116
Skupaj		95	107	202

Občutljivost HAT skupini simptomatskih preiskovancev s trajanjem bolezenskih znakov od 0 do 3 dni je **90,53** % (95 % CI 84,34-96,72 %) in specifičnost **100** %.

V Tabeli 3 prikazujemo skladnost rezultatov med HAT iz brisa sprednjega dela nosu in RT-PCR iz brisa nosnožrelnega prostora pri 64 simptomatskih preiskovancih, pri katerih so bolezenski znaki trajali 4 do 7 dni pred odvzemom vzorcev.

Tabela 3: Skladnost rezultatov med HAT in RT-PCR v skupini simptomatskih preiskovancev s trajanjem bolezenskih znakov od 4 do 7 dni

Metoda		RT-PCR		Skupaj
HAT	Rezultat	Pozitiven	Negativen	
	Pozitiven	21	0	21
	Negativen	8	35	43
Skupaj		29	35	64

Občutljivost HAT skupini simptomatskih preiskovancev s trajanjem bolezenskih znakov od 4 do 7 dni je **72,41** % (95 % CI 53,3 -91,53 %) in specifičnost **100** %.

V Tabeli 4 prikazujemo skladnost rezultatov med HAT iz brisa sprednjega dela nosu in RT-PCR iz brisa nosnožrelnega prostora pri 63 simptomatskih preiskovancih, pri katerih so bolezenski znaki trajali 8 dni in več.



Tabela 4: Skladnost rezultatov med HAT in RT-PCR v skupini simptomatskih preiskovancev s trajanjem bolezenskih znakov 8 dni in več

Metoda		RT-PCR		Skupaj
HAT	Rezultat	Pozitiven	Negativen	
	Pozitiven	11	1	12
	Negativen	32	19	51
Skupaj		43	20	63

Občutljivost HAT skupini simptomatskih preiskovancev s trajanjem bolezenskih znakov od 8 dni in več je **25,58 %** (95 % CI -0,2-51,36 %) in specifičnost **95,00 %** (95 % CI 85,2-100 %).

V Tabeli 5 prikazujemo skladnost rezultatov med HAT iz sprednjega dela nosu in RT-PCR iz nosnožrelnega prostora v skupini 145 brezsimptomnih preiskovancev.

Tabela 5: Skladnost rezultatov med HAT in RT-PCR v skupini brezsimptomnih preiskovancev

Metoda		RT-PCR		Skupaj
HAT	Rezultat	Pozitiven	Negativen	
	Pozitiven	13	0	13
	Negativen	5	127	132
Skupaj		18	127	145

Občutljivost HAT v celotni skupini brezsimptomnih preiskovancev je **72,22 %** (95 % CI 47,88-96,57 %) in specifičnost **100 %**.

Med 18 RT-PCR pozitivnimi brezsimptomnimi preiskovanci smo pri 15 preiskovancih zabeležili Ct vrednosti pod 30. Pri 12 preiskovancih je bil HAT iz sprednjega dela nosu pozitiven, kar pomeni **80,00 %** občutljivost. Pri 12 RT-PCR pozitivnih preiskovancih s Ct vrednostmi pod 25 je bilo 10 pozitivnih iz brisa sprednjega dela nosu, kar pomeni **83,33 %** občutljivost HAT.



V Tabeli 6 prikazujemo skladnost rezultatov med HAT iz sprednjega dela nosu in RT-PCR iz nosnožrelnega prostora v celotni skupini 40 otrok.

Tabela 6: Skladnost rezultatov med HAT in RT-PCR v celotni skupini otrok

Metoda		RT-PCR		Skupaj
HAT	Rezultat	Pozitiven	Negativen	
	Pozitiven	10	0	10
	Negativen	1	29	30
Skupaj		11	29	40

Občutljivost HAT v celotni skupini otrok je **90,91** % (95 % CI 73,09-100 %) in specifičnost **100** %.

V Tabeli 7 prikazujemo skladnost rezultatov med HAT iz sprednjega dela nosu in RT-PCR iz nosnožrelnega prostora v skupini simptomatskih otrok.

Tabela 7: Skladnost rezultatov med HAT in RT-PCR v simptomatski skupini otrok

Metoda		RT-PCR		Skupaj
HAT	Rezultat	Pozitiven	Negativen	
	Pozitiven	8	0	8
	Negativen	1	11	12
Skupaj		9	11	20

Občutljivost HAT v celotni skupini otrok je **88,89** % (95 % CI 67,09-100 %) in specifičnost **100** %.

Med 20 brezsimptomnimi otroci sta bila RT-PCR pozitivna dva. Pri obeh je bil pozitiven tudi HAT iz sprednjega dela nosu.

Kot je razvidno iz rezultatov je občutljivost pričakovano najvišja v skupini simptomatskih PCR pozitivnih preiskovancev, ki imajo nizke Ct vrednosti.



Meji 25. in 30. cikla smo izbrali skladno s priporočenim protokolom SZO in glede na nekatera stališča, da je malo verjetno, da bi oseba s takšnim PCR rezultatom še izločala infektivne virusne delce.

Zaključki

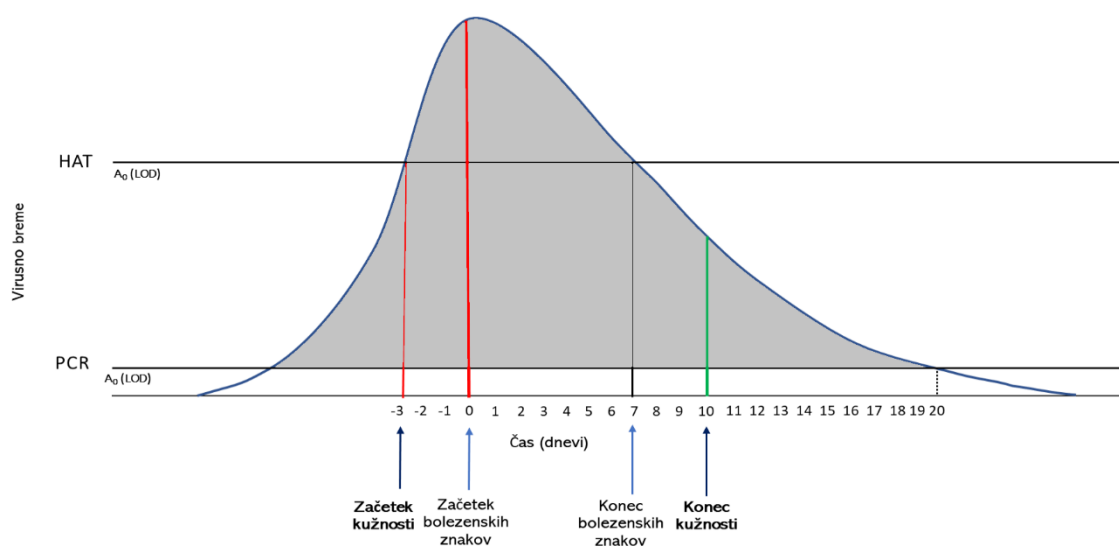
Rezultati verifikacije so pokazali da:

1. Test ne dosega specifikacij proizvajalca glede občutljivosti v nobeni skupini preiskovancev, glede specifičnosti pa v vseh skupinah preiskovancev, vendar je potrebno izrecno poudariti, da navedbe proizvajalca temeljijo na primerjavi rezultatov med RT-PCR iz brisa nosnožrelnega prostora in HAT iz brisa nosno žrelnega prostora in zato rezultati niso neposredno primerljivi.
2. Test zadošča kriterijem nacionalnih smernic za uporabo HAT, ko gre za rezultate neodvisnih verifikacij glede občutljivosti v skupini preiskovancev s Ct vrednostmi do 25, v skupini preiskovancev, ki so kazali bolezenske znake od 0 do 3 dni ter v celotni skupini otrok. Glede specifičnosti odstopa le v skupini simptomatskih, ki so kazali bolezenske znake 8 dni ali več.

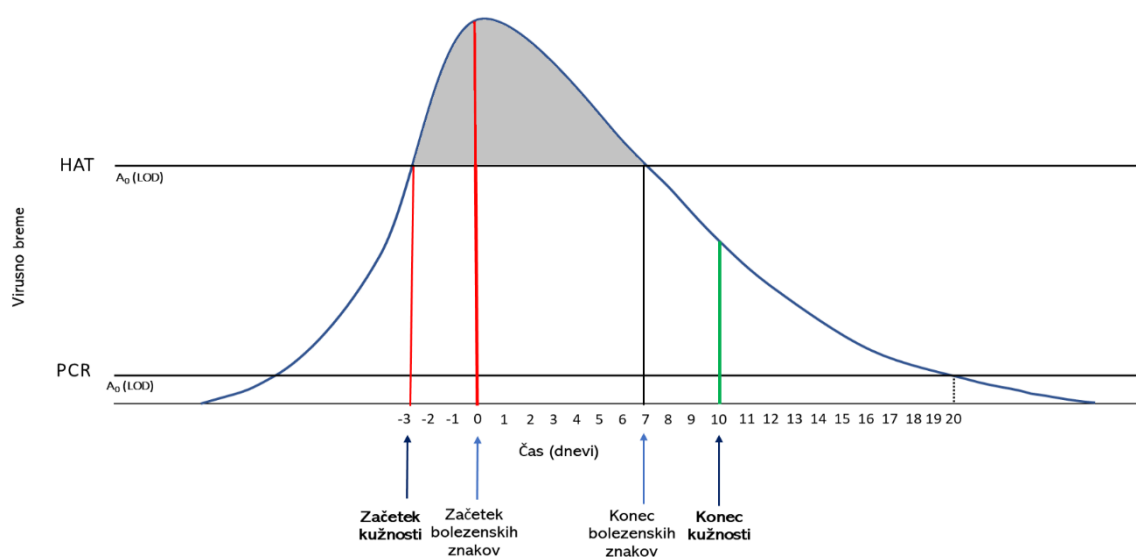
Da test dosega največjo občutljivost in se izračunana vrednost najbolj približa specifikaciji proizvajalca v skupini simptomatskih preiskovancev, pri katerih so Ct vrednosti v PCR nižje, je pričakovan rezultat, saj so to preiskovanci z najvišjim virusnim bremenom.

Za boljšo ponazoritev vloge posameznih testov v odkrivanju okuženih z virusom SARS-CoV-2 prikazujemo grafe od 1 do 3. Poudarjamo, da je prikaz shematski in površine pod krivuljo virusnega bremena le približno odražajo dejanski obseg pozitivnih bodisi s HAT, bodisi z RT-PCR.

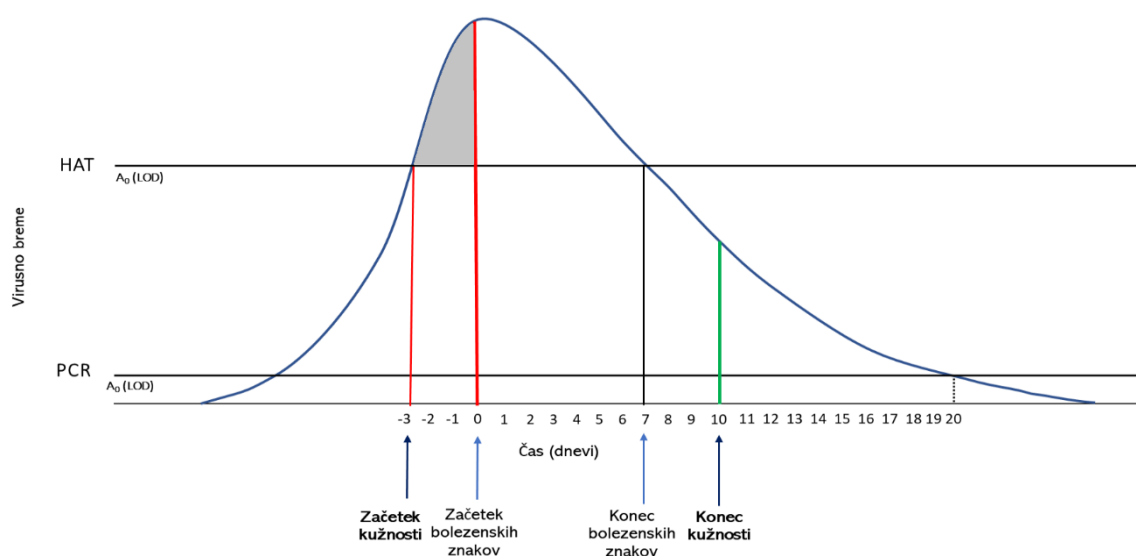
Graf 1: Vzorci (obarvano sivo), ki jih lahko kot pozitivne prepoznamo s pomočjo RT-PCR glede na prag detekcije metode in krivuljo rasti in padanja virusnega bremena



Graf 2: Vzorci (obarvano sivo), ki jih lahko kot pozitivne prepoznamo s pomočjo HAT glede na prag detekcije metode in krivuljo rasti in padanja virusnega bremena



Graf 3: Vzorci (obarvano sivo), ki jih lahko kot pozitivne prepoznamo med brezsimptomnimi s pomočjo HAT glede na prag detekcije metode in krivuljo rasti in padanja virusnega bremena in predstavljajo dodano vrednost samotestiranja



Verifikacija potrjuje, da je pri uporabi HAT je izjemnega pomena, da se preiskovancem pravilno predstavi vrednost negativnega rezultata, ki ne sme povzročiti občutka lažne varnosti. Osnovni namen uporabe HAT je namreč čim hitrejša napotitev oseb z visokim virusnim bremenom v samoizolacijo v populacijah, ki jih ne zmoremo testirati s PCR metodo.

Ugotavljamo, da kljub višjemu pragu detekcije metode in kljub temu, da preiskovanec odvzame vzorec, ki ne velja za zlati standard v diagnostiki, test z več kot 90 % občutljivostjo zazna osebe z visokim virusnim bremenom ob začetku bolezni. Velja tudi, da je visoko virusno breme pri okužbi z virusom SARS-CoV-2 prisotno že najmanj dva dneva pred pojavom bolezenskih znakov. Verifikacija potrjuje, da s samoodvzemom brisa nosu osebo z visokim virusnim bremenom, ki ne kaže bolezenskih znakov, odkrijemo enako učinkovito kot osebo, z visokim virusnim bremenom, ki kaže bolezenske znake. Torej imajo tudi ti testi svoje mesto v diagnostiki SARS-CoV-2.

Viri:

1. World Health Organisation. Diagnostic testing for SARS-CoV-2. Interim guidance. 11 September 2020. Internet: <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>
2. World Health Organisation. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays Interim guidance. 11 September 2020 Internet: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>
3. FIND evaluation of SARS-CoV-2 antigen (Ag) detecting tests. Internet: <https://www.finddx.org/covid-19-old/sarscov2-eval-antigen>
4. FIND. Rapid diagnostic tests for COVID-19. Internet: www.finddx.org/covid-19



5. FIND. Comparative evaluation of lateral flow assay tests that directly detect antigens of SARS-CoV-2. Protocol synopsis. Internet: <https://www.finddx.org/covid-19-old/sarscov2-eval-antigen>
6. World Health Organisation. Target product profiles for priority diagnostics to support response to the COVID-19 pandemic v.1.0. 28 September, 2020 Geneva, Switzerland <https://www.who.int/publications>

Poročilo smo pripravili:

- mag. Tjaša Žohar Čretnik, dr. med., spec.,
- prim. doc. dr. Irena Grmek Košnik, dr. med., spec.,
- Alenka Štorman, dr. med., spec.,
- Mateja Borinc, univ. dipl. biol.,
- asist. dr. Valerija Tkalec, univ. dipl. mikrobiol.

Za delovno skupino:

mag. Tjaša Žohar Čretnik, dr. med., spec. klin. mikrobiol.

Direktorica Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano