



Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije  
Štefanova 5  
1000 Ljubljana

Številka: 6000/8/2021

Datum: 17.1.2021

## **POROČILO O VERIFIKACIJI HITREGA ANTIGENSKEGA TESTA PROIZVAJALCA SHENZEN ULTRA – DIAGNOSTICS BIOTEC Co. Ltd.**

### **Uvod**

Po navodilu Ministrstva za zdravje Republike Slovenije (v nadaljevanju MZ) z dne, 4.1.2021 smo v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano pristopili k verifikaciji testa Antigen SARS-CoV-2 Test Kit proizvajalca Shenzhen Ultra – Diagnostics Biotech. Co., Ltd.. Test je MZ izbralo s postopkom javnega naročanja za namen množičnega testiranja 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.

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. V večernih urah, dne 7.1.2021 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 8. 1. 2021. Ocenila ga je kot etično sprejemljivega. Na podlagi dopisa št. 0120-1/2021-7 z dne 11. 1. 2021 smo v NLZOH še isti dan pristopili k izvajanju verifikacije po protokolu. Rok za oddajo verifikacijskega



## Opredelitev problema

Hitri antigenski test, ki ga je izbralo MZ s postopkom javnega naročanja, ima CE in IVD oznako. Da je test pridobil CE oznako, je bila po navedbah proizvajalca na 273 preiskovancih opravljena klinična validacija. Od 73 pozitivnih s PCR, je bilo 70 pozitivnih tudi s HAT. Vsi PCR pozitivni preiskovanci so bili po navedbah proizvajalca opredeljeni kot simptomatski. Vseh 200 PCR negativnih preiskovancev je bilo negativnih tudi s HAT in so bili opredeljeni kot brezsimptomni. Proizvajalec tako navaja 95,9 % občutljivost in >99,9 % 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.

Osnovni namen postopka verifikacije je potrditi analitske sposobnosti metode, kot jih je opredelil proizvajalec, saj v drugem testnem okolju na izvajanje testa vplivajo drugačni viri variabilnosti. Namen verifikacije pa je lahko tudi, da pridobimo dodatne informacije o performanci izbranega testa v različnih podskupinah preiskovancev.

Namen verifikacije testa Antigen SARS-CoV-2 Test Kit proizvajalca Shenzen Ultra – Diagnostics Biotec. Co., Ltd. je:

1. preveriti, ali test dosegata specifikacije, kot jih je navedel proizvajalec (95,9 % občutljivost in specifičnost > 99,9 %)
2. preveriti, ali test dosegata specifikacije, kot jih je določila nacionalna skupina za hitre teste (vsaj 90 % občutljivost v neodvisni verifikaciji in > 98 % specifičnost)
3. preveriti, ali test dosegata specifikacije, kot jih predlaga SZO (> 80 % občutljivost in specifičnost večja od 97 %).
4. ugotoviti, kakšni sta občutljivost in specifičnost testa v populaciji brezsimptomnih oseb.



## 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	Shenzen Ultra – Diagnostics Biotech. Co., Ltd.
IME TESTA	Antigen SARS-CoV-2 Test Kit
KODA PRODUKTA	SC0202
VELIKOST PAKIRANJA	25 testov
VSEBINA PAKIRANJA	Testne ploščice, pozitivna in negativna kontrola, ekstrakcijska tekočina v plastičnih epruvetkah (cca 300µl), brisi za odvzem vzorca, navodilo proizvajalca, prevedeno v slovenski jezik
DODATNI MATERIAL	Brisi za odvzem vzorca iz nazofarinksa.
POGOJI HRANJENJA	2 do 30°C
ROK UPORABNOSTI	1 leto
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, ali HAT dosega navedbe proizvajalca, ali HAT glede občutljivosti in specifičnosti testa dosega nacionalna priporočila za uporabo HAT, preveriti ali HAT izpolnjuje priporočila SZO in preveriti, kakšni sta občutljivost in specifičnost HAT v skupini



	brezsíptomnih okuženih oseb v primerjavi z metodo PCR
TRAJANJE VERIFIKACIJE	Od 11. 1. 2021 do 18.1. 2020
PODSKUPINE PREISKOVANCEV	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Brezsíptomni preiskovanci</li><li>2. Síptomatski preiskovanci<ol style="list-style-type: none"><li>a. Razvrstitev v skupine glede na Ct vrednost<ol style="list-style-type: none"><li>i. Ct vrednost pod ali enaka 25</li><li>ii. Ct vrednost pod ali enaka 30</li><li>iii. Ct vrednost pod ali enaka 33</li><li>iv. Ct vrednost nad 30</li></ol></li></ol></li></ol>
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"><li>1. Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, lokacije Murska Sobota, Maribor, Celje, Novo mesto, Ljubljana, Kranj, Koper Nova Gorica</li><li>2. Nacionalni inštitut za javno zdravje lokacija Ljubljana</li><li>3. Vstopna točka Zdravstvenega doma Kranj</li><li>4. Vstopna točka Zdravstvenega doma Celje</li><li>5. Vstopna točka Zdravstvenega doma Maribor</li><li>6. Vstopna točka Zdravstvenega doma Murska Sobota</li><li>7. Vstopna točka Zdravstvenega doma Krško</li><li>8. Vstopna točka Jesenice</li><li>9. Točka množičnega testiranja Kranj</li><li>10. Točka Množičnega testiranja Cerklje na Gorenjskem</li></ol> <p>V točkah 1 in 2 so sodelovali predvsem brezsíptomni preiskovanci, v ostalih točkah pa síptomatski preiskovanci.</p>



## 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 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 PCR negativnih vzorcev je s HAT negativen.

Rezultati bodo podani s 95 % intervalom zaupanja.

Metoda		PCR		Skupaj
HAT	Rezultat	Pozitiven	Negativen	
	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 11. 1. 2021 do 17. 1. 2021 smo zbrali in analizirali 1868 vzorcev pri 934 preiskovancih. Od tega smo 934 vzorcev analizirali z metodo PCR in 934 vzorcev s HAT.

V Tabeli 1 prikazujemo skladnost rezultatov med HAT in PCR pri vseh 934 preiskovancih.

**Tabela 1:** Skladnost rezultatov med HAT in PCR v celotni skupini preiskovancev

Metoda		PCR		Skupaj
HAT	Rezultat	Pozitiven	Negativen	
	Pozitiven	165	3	168
	Negativen	37	729	766
Skupaj		202	732	934

Občutljivost HAT v celotni skupini preiskovancev je 81,68 % (95 % CI 75,65-86,76%) in specifičnost 99,59 % (95 % CI 98,81-99,92 %).

V Tabeli 2 prikazujemo skladnost rezultatov med HAT in PCR v skupini 374 simptomatskih preiskovancev

**Tabela 2:** Skladnost rezultatov med HAT in PCR v skupini simptomatskih preiskovancev

Metoda		PCR		Skupaj
HAT	Rezultat	Pozitiven	Negativen	
	Pozitiven	157	3	160
	Negativen	27	187	214
Skupaj		184	190	374

Občutljivost HAT v celotni skupini simptomatskih preiskovancev je 85,33 % (95 % CI 79,37- 90,10 %) in specifičnost 98,42 % (95 % CI 95,46-99,67 %).



V Tabeli 3 prikazujemo skladnost rezultatov med HAT in PCR v skupini 560 preiskovancev brez izraženih bolezenskih znakov.

**Tabela 3:** Skladnost rezultatov med HAT in PCR v skupini brezsimptomnih preiskovancev

Metoda		PCR		Skupaj
HAT	Rezultat	Pozitiven	Negativen	
	Pozitiven	8	0	8
	Negativen	10	542	552
Skupaj		18	542	560

Občutljivost HAT v celotni skupini brezsimptomnih preiskovancev je 44,44 % (95 % CI 21,53-69,24 %) in in specifičnost 100 % (95 % CI 99,32-100 %).

V tej skupini v tednu, ko se je izvajalo testiranje, nismo dosegli ciljnega števila 50 PCR pozitivnih preiskovancev, zato bomo z vzorčenjem nadaljevali. Z visokim številom PCR negativnih pa smo zagotovo potrdili visoko specifičnost testa.

V Tabeli 4 prikazujemo deleže PCR pozitivnih simptomatskih preiskovancev glede na vrednosti Ct, ki so bili pozitivni s HAT. Upoštevali smo Ct vrednosti za E gen virusa SARS-CoV-2.

**Tabela 4:** Občutljivost HAT v skupinah simptomatskih preiskovancev z različnimi vrednostmi Ct v PCR

Podskupina preiskovancev	Število HAT pozitivnih v skupini	Število PCR pozitivnih v skupini	Občutljivost v %
Ct ≤ 25	81	83	97,59
Ct ≤ 30	134	138	97,10
Ct ≤ 33	157	169	92,89
Ct ≥ 30	32	58	52,24

Kot je razvidno iz rezultatov je občutljivost pričakovano najvišja v skupini simptomatskih PCR pozitivnih preiskovancev, ki imajo nizke Ct vrednosti, in sicer 97,59 %.



Meji 25. in 33. cikla smo izbrali skladno s priporočenim protokolom SZO, mejo 30. cikla pa smo izbrali glede na nekatera stališča, da je malo verjetno, da bi oseba s takšnim PCR rezultatom še izločala infektivne virusne delce in kriteriji SZO. Slednja priporoča, da naj test dosega več kot 80 % občutljivost in specifičnost večjo od 97 % pri Ct vrednostih do 30, in naj bo ob tem nad 80 % tudi spodnja meja 95 % intervala zaupanja za občutljivost.

V Tabeli 6 prikazujemo primerjavo rezultatov naše verifikacije (v stolpcu 1) z rezultati verifikacije testov drugih proizvajalcev navedenih v legendi tabele, kot so objavljeni na spletnem portalu SZO (<https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/>) dne 15.1. 2021.

**Tabela 6:** Primerjava rezultatov HAT različnih proizvajalcev izvedenih po protokolu SZO

Oznaka verificiranega testa po legendi	1	2	2	2	3	3	4	5	5
Država testiranja	Slovenija	Brazilija	Nemčija	Švica	Švica	Nemčija	Brazilija	Brazilija	Nemčija
Število vseh testiranih	934	400	1263	529	535	1108	400	476	1239
Delež simptomatskih v %	40	98,7	84,6	99,8	99,8	64,5	100	98,7	59,9
% pozitivnih s PCR med vsemi testiranimi	21,6	26,5	3,7	36,1	21,5	9,6	25,5	25	2
% HAT pozitivnih med vsemi PCR pozitivnimi (občutljivost)	81,7	88,7	76,6	89	85,5	90,8	89,2	74,4	52
% HAT pozitivnih v skupini PCR pozitivnih s Ct ≤ 33	92,89	91,9	87,8	91,8	89,7	88,3	91,4	82,5	61,9
% HAT pozitivnih v skupini PCR pozitivnih s Ct ≤ 25	97,59	95,9	100	97,2	96,8	95,8	94,8	90,9	80
% HAT negativnih med vsemi PCR negativnimi (specifičnost)	98,4	97,6	99,3	99,7	100	99,9	97,3	98,95	100

Legenda:

1 = Antigen SARS-CoV-2 Test Kit, Shenzen Ultra – Diagnostics Biotec. Co., Ltd.

2 = STANDARD Q COVID-19 Ag Test, SD Biosensor Inc

3 = Panbio COVID-19 Ag Rapid Test Device, Abbott

4 = NowCheck COVID-19 Ag Test, Bionote, Inc

5 = BIOCREDIT COVID-19 Ag, RapiGEN, Inc

Iz primerjave je razvidno, da imajo različni kvalitetni hitri antigeni testi praviloma dobro specifičnost, ki se s postopki verifikacije potrdi. Pri verifikaciji občutljivosti HAT pa se potrjuje domneva, da proizvajalci verjetno validacije izvedejo na preiskovancih z visokimi virusnimi bremenami. Rezultati pridobljeni v verifikacijskih postopkih se namreč proizvajalčevim približajo v skupini preiskovancev z nižjimi Ct vrednostmi in torej višjimi virusnimi bremenami. Če je v skupini preiskovancev delež tistih z nižjimi virusnimi bremenami





višji postopek verifikacije praviloma ne uspe potrditi proizvajalčevih navedb. Tako je tudi v našem primeru.

## Zaključki

Rezultati verifikacije so pokazali da:

1. Test dosega specifikacije proizvajalca glede občutljivosti testa v skupini simptomatskih preiskovancev s Ct vrednostmi do 30, glede specifičnosti pa v skupini brezsimptomnih preiskovancev.
2. Test zadošča kriterijem nacionalnih smernic za uporabo HAT, ko gre za rezultate neodvisnih verifikacij glede občutljivosti v skupini preiskovancev s Ct vrednostmi do 33, glede specifičnosti pa tako v celotni skupini preiskovancev, kot v skupinah simptomatskih in brezsimptomnih preiskovancev.
3. Test zadošča kriterijem SZO glede občutljivosti brez upoštevanja 95 % intervala zaupanja v skupini vseh preiskovancev in v skupini simptomatskih preiskovancev z upoštevanjem 95 % intervala zaupanja pa le v skupini simptomatskih preiskovancev. Glede specifičnosti izpolnjuje zahteve tako v celotni skupini preiskovancev kot v skupinah simptomatskih in brezsimptomnih preiskovancev.
4. V skupini brezsimptomnih preiskovancev se je potrdila visoka specifičnost HAT, kar ob pravilni izvedbi testa pomeni, da daje zelo malo lažno pozitivnih rezultatov. V skupini nismo dosegli ciljne vrednosti 50 PCR pozitivnih preiskovancev, zato bomo z vzorčenjem nadaljevali.

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.

Iz primerjave z rezultati drugih verifikacij, navedenih v Tabeli 6, lahko ugotovimo, da daje HAT primerljive rezultate z drugimi, že verificiranimi HAT.

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.



**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](http://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. Pray IW, Ford L, Cole D, et al. Performance of an antigen-based test for asymptomatic and symptomatic SARS-CoV-2 testing at two university campuses — Wisconsin, September–October 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2021;69:1642–1647. DOI: [http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm695152a3external icon](http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm695152a3external%20icon).
7. 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 člani delovne skupine za verifikacijo:

- prim. doc. dr. Irena Grmek Košnik, dr. med., spec. klin. mikrobiol., spec. javnega zdravja - vodja skupine,
- dr. Urška Dermota, univ. dipl. mikrobiol.
- mag. Tjaša Žohar Čretnik, dr. med., spec. klin. mikrobiol.,
- Barbara Zdolšek, dr. med., spec. klin. mikrobiol.,
- dr. Andrej Golle, dr. med., spec. klin. mikrobiol.,
- mag. Iztok Štrumbelj, dr. med., spec. klin. mikrobiol.,
- Helena Ribič, dr. med., spec. klin. mikrobiol.

Za delovno skupino:

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

Direktorica Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano