



Optimale pool grootte bij SARS-CoV2 diagnostiek

Auteur(s): 5.1.2e 5.1.2e 5.1.2e
Projectleider: 5.1.2e
Accountmanager: 5.1.2e
Datum: 2-7-2020
Opdrachtgever: Ministerie van VWS

Inhoud

Inleiding.....	3
Materiaal en methoden	4
Optimale poolgrootte (theoretisch)	4
Kosten	4
Gevoeligheid van de test	5
Resultaten	6
Optimale poolgrootte	6
Gevolgen voor diagnostische sensitiviteit.....	8
Impact van poolen op de infectie transmissie.....	12
Matrixpooling.....	13
Conclusies	14
Aanbevelingen	15
Referenties.....	16

Inleiding

Ten tijde van een ziekte uitbraak is het wenselijk om voorbereid te zijn om grote hoeveelheden diagnostische tests te kunnen uitvoeren om besmette individuen zo snel mogelijk te identificeren. Het poolen van monsters is hierbij een mogelijkheid, om de testcapaciteit te verhogen en de onderzoekskosten per monster te verlagen. Daarbij zijn er wel randvoorwaarden. Zo moet de test gevoelig genoeg zijn om één positief monster in een poolmonster nog aan te tonen. Verder kost het maken van een mengmonster extra tijd (geld) en moeten de individuele monsters van een positieve pool worden teruggezocht en getest. Daarom is het poolen van monsters alleen zinvol als de prevalentie laag genoeg is. Het omslagpunt ligt, afhankelijk van de kostprijzen van de screenings- en evt. bevestigingstest, meestal bij een prevalentie van 5%.

Poolen kan op verschillende manieren. De monsters kunnen sequentieel (bv op volgorde van binnenkomst) bij elkaar gevoegd worden, waarbij van een positief pool resultaat de individuele monsters teruggezocht en opnieuw moeten worden. Bij grote aantallen te testen monsters is dit vooral mogelijk met een geautomatiseerd systeem, met name om de kans op fouten bij het poolen en terugzoeken te voorkomen. In dat verband is matrix-pooling (pooling in twee dimensies) interessant bij erg lage prevalenties. Bij matrix-pooling worden (bijvoorbeeld) 100 monsters in een rek geplaatst van 10 rijen en 10 kolommen. Er worden pools gemaakt per rij en per kolom (in dit voorbeeld dus 20) en getest in de PCR. Daarna moeten de individuele monsters op de kruispunten van positieve rij-pools en kolom-pools ter confirmatie opnieuw worden getest in de PCR. Om matrix poolen routinematig te kunnen toepassen is er software nodig die de robot aanstuurt om het poolen uit te voeren. Deze is momenteel niet voorhanden wat betekent dat deze vorm van pooling nu niet in aanmerking komt.

In dit rapport is de mogelijkheid tot het poolen van humane neus- of keelwabs of sputum monsters onderzocht, welke bij meerdere Nederlandse labs onderzocht worden met de SARS-CoV-2 PCR-test. De optimale poolgrootte bij verschillende prevalenties is berekend alsmede de daarbij horende testcapaciteit en kostenbesparing.

Tenslotte is op basis van beschikbare Nederlandse testgegevens de impact van pooling op de sensitiviteit van de SARS-CoV-2 diagnostiek beoordeeld.

Materiaal en methoden

Optimale poolgrootte (theoretisch)

Het gepoold onderzoeken van monsters omvat de volgende onderdelen: individuele monsters worden bij binnenkomst in het laboratorium uitgepakt, ingeschreven, en materiaal van elke monsterbuis wordt verzameld in een poolbuis (in bijv. pools van 5 monsters). Daarna wordt van het poolmonster RNA isolatie en PCR uitgevoerd en worden van alleen de positieve poolmonsters de individuele monsters teruggezocht en getest in dezelfde PCR. Deze eenvoudige *one-stage* pooling strategie stamt uit de jaren '40 en is recent beschreven voor COVID-19 diagnostiek (Shani-Narkiss et al., 2020). De theoretisch optimale poolgrootte is de groepsindeling waarbij het totaal aantal PCR testen het laagst is en wordt berekend met de formule:

$$N_{\text{testen}} = N \left(\frac{1}{b} + 1 - (1 - p)^b \right)$$

met N het totaal aantal te poolen monsters, b de batch (pool) grootte, p de prevalentie op individu niveau, en waarbij $1 - (1 - p)^b$ de kans op een positieve pool is. In dit rapport is gewerkt met het scenario dat 1.000 monsters gepoold gaan worden in pools van maximaal 15 monsters, bij een prevalentie variërend van 1% tot 10%.

Kosten

De kosten van SARS-CoV-2 gepoold onderzoek zijn opgebouwd uit:

- 1) aanleveren van afname materialen en transport naar het laboratorium
- 2) het uitpakken, inscannen, pipetteren en opslaan van de individuele monsters,
- 3) het poolen van de monsters,
- 4) de kosten voor RNA-isolatie en PCR-testen van de poolmonsters,
- 5) bij positieve pools het terugzoeken van de individuele monsters,
- 6) bij positieve pools de kosten voor RNA-isolatie en PCR-testen van de individuele monsters.

De mate van het geautomatiseerd kunnen aansturen van het pool- en testproces is bepalend voor de kosten van gepoold onderzoek. In dit rapport is van het gunstige scenario uitgegaan dat waar mogelijk een robot met bijbehorende software wordt ingezet voor bovenstaande stappen, waardoor de extra kosten van het terugzoeken van individuele monsters uit positieve pools beperkt zullen zijn en de foutgevoeligheid het laagst.

In dit rapport is gerekend met een fictieve totaalprijs van 100 eenheden voor het aanleveren, verwerken en uitvoeren van een PCR-test op een enkel monster. Dit bedrag bestaat bij pandemie lab A voor grofweg 90% uit de daadwerkelijke PCR-kosten (RNA-extractie en PCR) en 10% uit materialen en voorbereidende handelingen (ontvangen, ontdoppen, swab uitnemen, pipetteren, etc.). Voor de te poolen monsters is per individueel monster 10 eenheden gerekend voordat overgegaan kan worden tot het testen van het poolmonster. Vervolgens is per poolmonster 90 eenheden gerekend voor het daadwerkelijke PCR-onderzoek. Daarnaast wordt in deze fictieve

berekening 0,70 eenheid per monster gerekend voor elk monster dat uit een positieve pool teruggezocht moet worden. Voor het PCR-testen van de individuele monsters uit positieve pools is alleen het 90% gedeelte van het uitvoeren van een PCR-test gerekend; de voorbereidende handelingen hoeven immers niet nogmaals gedaan te worden.

Gevoeligheid van de test

Een voorwaarde voor gepoold onderzoek is dat de gevoeligheid van de PCR voldoende goed is om er zeker van te zijn dat een pool van één positief monster en verder negatieve monsters nog een positief resultaat zal geven. Gepoold onderzoek zou daarmee in principe mogelijk zijn en zal de testcapaciteit verhogen en de kosten verlagen als de prevalentie laag is. Het poolen van monsters resulteert in het slechtste scenario in een verspreiding van alle positieve monsters over pools met verder negatieve monsters; het poolen is dan niet meer dan een verdere verdunning van het positieve monster. Van de SARS-CoV-2 PCR is bekend welke gevolgen één of meerdere verdunningsstappen heeft op de Ct-waarde van het monster. Deze verdunningsstappen zijn gebruikt om in te schatten wat het gevolg van poolen is voor de gevoeligheid om positieve monsters te detecteren. Laboratorium A gebruikt hierbij de volgende afkapwaarden:

Ct $\geq$ 45	Negatief (N)
Ct $\geq$ 36-44	Laagpositief / dubieus (LP). Monster wordt over getest. Bij gelijke bevinding Laagpositief.
Ct $\geq$ 30-35	Positief (P)
Ct $<$ 30	Hoogpositief (HP)

Er waren Ct waarde gegevens beschikbaar van een viertal laboratoria die elk met een ander diagnostisch systeem werken. Het is dan ook duidelijk dat de precieze impact van poolen op de sensitiviteit van de testen per laboratorium bekeken moet worden. De vier laboratoria waarvan de gegevens hier gebruikt zijn maken gebruik van de volgende diagnostische methoden:

Laboratorium	Diagnostische methode
A	in-house PCR op kingfisher en Quantstudio
B	COBASS 4800 en Corman PCR
C	Magna pure extractie en Corman PCR
D	Seegene PCR

Resultaten

Optimale poolgrootte

In onderstaande tabellen is weergegeven wat het totale aantal testen zal zijn bij verschillende combinaties van poolgrootte en prevalentie, in het scenario dat er op een dag 1.000 monsters getest moeten worden (Tabel 1). In groen staat voor elke prevalentie de optimale pool grootte gemarkeerd, al zijn de verschillen met aangrenzende pool groottes vaak klein. Bij individueel testen worden positieve monsters niet geconfirmeerd.

Ter illustratie: Bij een prevalentie van 1% (0.01) en een pool grootte van 2 monsters, is de kans op een positieve pool (d.w.z. een pool met minstens 1 positief monster) $1-(1-0.01)^2 = 2\%$. Dus van de 500 pools zullen er $500 \times 0,02 = 10$ positief zijn. Het totaal aantal testen bij het poolen van 1.000 monsters in pools van 2, bij een prevalentie van 1%, is 500 gepoolde monsters + de individuele monsters van de positieve monsters (10×2) = 520 testen.

Tabel 1. Optimale poolgrootte per prevalentie, afgeleid van het minimaal aantal testen bij pool groottes variërend van 1 tot 15. Totaal aantal individuele monsters: 1.000

Optimal pool size (theoretical)		Total number of samples per day: 1000									
Total number of samples to test:											
Poolsize	No. Pools	Prevalence									
		0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1
1	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
2	500	520	540	559	578	598	616	635	654	672	690
3	333	363	392	421	449	476	503	529	555	580	604
4	250	289	328	365	401	435	469	502	534	564	594
5	200	249	296	341	385	426	466	504	541	576	610
6	167	225	281	334	384	432	477	520	560	599	635
7	143	211	275	335	391	445	494	541	585	626	665
8	125	202	274	341	404	462	515	565	612	655	695
9	111	198	277	351	419	481	538	591	639	683	724
10	100	196	283	363	435	501	561	616	666	711	751
11	91	196	290	376	453	522	585	641	691	737	777
12	83	197	299	389	471	543	607	665	716	761	801
13	77	199	308	404	489	564	630	688	739	783	823
14	71	203	318	419	507	584	651	709	760	804	843
15	67	207	328	433	525	603	671	730	780	824	861
Optimal pool size		10	8	6	6	5	5	4	4	4	4

In Tabel 2 is het effect van poolen op de capaciteit van het laboratorium uitgedrukt als een ratio tussen de individuele testen (uitgaande van 1.000 monsters, zonder confirmatie van positieve monsters) en het aantal poolmonsters + individuele testen van monsters uit positieve pools. In groen staat voor elke prevalentie de optimale poolgrootte gemarkeerd (de grootste ratio tussen individueel en gepoold testen). Hieruit blijkt dat er bij lage prevalenties maar kleine verschillen zijn tussen optimale poolgroottes; meerdere poolgroottes leiden tot nagenoeg dezelfde reductie in aantal testen. en dus in verhoging van de capaciteit.

Tabel 2. Optimale poolgrootte per prevalentie, uitgedrukt als ratio van a) het aantal individuele testen en b) het aantal poolmonsters + individuele testen van positieve pools.

Optimal pool size (theoretical)		Total number of samples per day: 1000									
Ratio of individual testing vs. pooled testing											
Poolsize	No. Pools	Prevalence									
		0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1
2	500	1.9	1.9	1.8	1.7	1.7	1.6	1.6	1.5	1.5	1.4
3	333	2.8	2.6	2.4	2.2	2.1	2.0	1.9	1.8	1.7	1.7
4	250	3.5	3.1	2.7	2.5	2.3	2.1	2.0	1.9	1.8	1.7
5	200	4.0	3.4	2.9	2.6	2.3	2.1	2.0	1.8	1.7	1.6
6	167	4.4	3.6	3.0	2.6	2.3	2.1	1.9	1.8	1.7	1.6
7	143	4.7	3.6	3.0	2.6	2.2	2.0	1.8	1.7	1.6	1.5
8	125	4.9	3.6	2.9	2.5	2.2	1.9	1.8	1.6	1.5	1.4
9	111	5.1	3.6	2.8	2.4	2.1	1.9	1.7	1.6	1.5	1.4
10	100	5.1	3.5	2.8	2.3	2.0	1.8	1.6	1.5	1.4	1.3
11	91	5.1	3.4	2.7	2.2	1.9	1.7	1.6	1.4	1.4	1.3
12	83	5.1	3.3	2.6	2.1	1.8	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2
13	77	5.0	3.2	2.5	2.0	1.8	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2
14	71	4.9	3.1	2.4	2.0	1.7	1.5	1.4	1.3	1.2	1.2
15	67	4.8	3.0	2.3	1.9	1.7	1.5	1.4	1.3	1.2	1.2
Optimal pool size		9-12	6-9	6-7	5-7	4-6	4-6	4-5	4	4	3-4

In Tabel 3 zijn de totale kosten van het poolen weergegeven in een situatie van 1.000 te poolen monsters. In de tabel zijn de kosten van diagnostiek op 1.000 individuele monsters equivalent gesteld aan 100%. In groen staat voor elke prevalentie de optimale pool grootte gemarkeerd (laagste kosten). Bij deze berekening is er vanuit gegaan dat de kosten van het ontvangen, ontdoppen en pipetteren van de individuele monsters een kost heeft van 10 eenheden, terwijl het uitvoeren van de RNA extractie en PCR test een kost heeft van 90 eenheden.

Tabel 3. Optimale poolgrootte per prevalentie, uitgedrukt als de relatieve afname in kosten bij het testen van pools en de kosten voor het terugzoeken en testen van individuele monsters uit positieve pools. (90/10 verhouding van vaste en variabele kosten).

Total costs for individual samples:		100 %									
Total costs for in pools:											
Poolsize	No. Pools	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1
1	1000	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	500	56.8	58.6	60.4	62.1	63.8	65.6	67.3	68.9	70.6	72.2
3	333	42.7	45.3	47.9	50.5	52.9	55.4	57.7	60.1	62.4	64.6
4	250	36.1	39.5	42.9	46.2	49.3	52.4	55.4	58.2	61.0	63.7
5	200	32.4	36.7	40.8	44.7	48.5	52.1	55.6	58.9	62.1	65.1
6	167	30.3	35.4	40.1	44.7	49.0	53.1	57.0	60.7	64.2	67.5
7	143	29.0	34.8	40.3	45.4	50.2	54.7	59.0	63.0	66.7	70.2
8	125	28.3	34.8	40.9	46.5	51.8	56.7	61.2	65.4	69.3	72.9
9	111	27.8	35.1	41.7	47.9	53.5	58.7	63.5	67.9	71.9	75.6
10	100	27.7	35.6	42.8	49.4	55.4	60.8	65.8	70.3	74.4	78.1
11	91	27.7	36.3	44.0	51.0	57.3	63.0	68.1	72.6	76.7	80.4
12	83	27.8	37.0	45.3	52.6	59.2	65.0	70.2	74.9	79.0	82.6
13	77	28.0	37.9	46.6	54.3	61.1	67.0	72.3	76.9	81.0	84.6
14	71	28.3	38.8	47.9	55.9	62.9	69.0	74.3	78.9	82.9	86.4
15	67	28.7	39.7	49.3	57.5	64.7	70.8	76.2	80.7	84.7	88.0
Optimal pool size		10-11	7-8	6	5-6	5	5	4	4	4	4

De inrichting van het logistieke proces voor de aanlevering van de buizen, het pre-analytisch proces, de wijze van poolen en het uitsplitsen van pools t.b.v. individuele testen, doorlooptijden en de benodigde laboratoriumruimte zijn van invloed op de kosten, en kunnen sterk per laboratorium variëren. Daarom is in Tabel 4 niet met een 90/10 verhouding in kosten maar een 80/20 verhouding gerekend. De totale kosten stijgen daarbij.

Tabel 4. Optimale poolgrootte per prevalentie, uitgedrukt als de relatieve afname in kosten bij het testen van pools en de kosten voor het terugzoeken en testen van individuele monsters uit positieve pools (80/20 verhouding van vaste en variabele kosten).

Total costs for		individual samples: 100 %									
Total costs for		in pools:									
Poolsizes	No. Pools	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1
1	1000	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	500	61.6	63.2	64.8	66.3	67.9	69.4	70.9	72.4	73.9	75.3
3	333	49.1	51.4	53.7	56.0	58.2	60.3	62.5	64.5	66.6	68.5
4	250	43.2	46.3	49.3	52.2	55.0	57.7	60.3	62.9	65.4	67.8
5	200	40.0	43.8	47.4	50.9	54.3	57.5	60.6	63.5	66.3	69.0
6	167	38.1	42.5	46.8	50.9	54.7	58.4	61.8	65.1	68.2	71.1
7	143	36.9	42.1	46.9	51.5	55.8	59.8	63.6	67.1	70.4	73.5
8	125	36.2	42.0	47.5	52.5	57.2	61.5	65.5	69.3	72.8	76.0
9	111	35.9	42.3	48.2	53.7	58.7	63.3	67.6	71.5	75.1	78.3
10	100	35.7	42.8	49.2	55.0	60.4	65.2	69.6	73.6	77.3	80.6
11	91	35.7	43.4	50.2	56.5	62.1	67.1	71.6	75.7	79.4	82.6
12	83	35.8	44.0	51.4	57.9	63.8	69.0	73.6	77.7	81.3	84.6
13	77	36.0	44.8	52.5	59.4	65.4	70.8	75.4	79.6	83.2	86.3
14	71	36.3	45.6	53.7	60.8	67.1	72.5	77.2	81.3	84.9	88.0
15	67	36.6	46.4	54.9	62.3	68.6	74.1	78.9	82.9	86.4	89.4
Optimal pool size		10-11	8	6	5-6	5	5	4	4	4	4

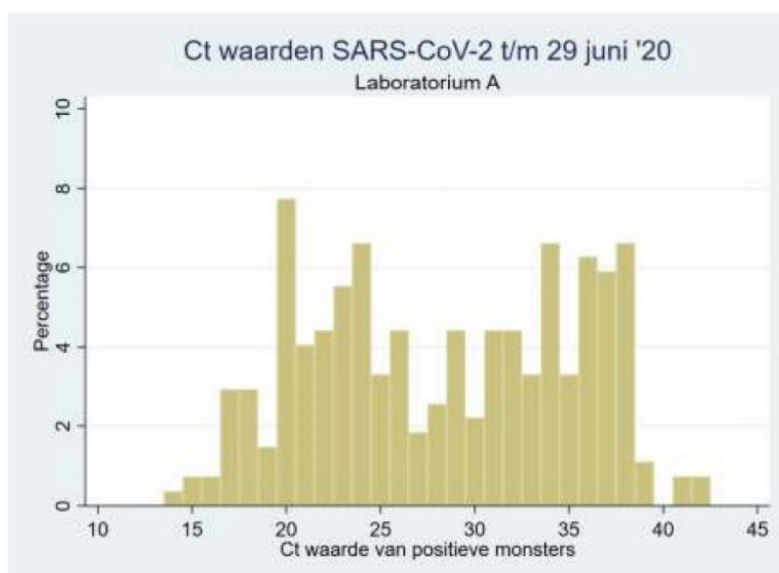
Geconcludeerd kan worden dat de optimale poolgrootte rond de 4 monsters per pool ligt bij een prevalentie van 10% en rond de 10 monsters per pool ligt bij een prevalentie van 1%. Deze poolgroottes resulteren in de grootste capaciteitsvergroting en kostenbesparing. Vanuit tabel 3 en 4 kan ook gelezen worden dat als poolgrootte van 10 gekozen wordt en de werkelijke prevalentie hoger is dan 1%, de totale kosten van de diagnostiek snel oplopen relatief ten opzichte van een poolgrootte van 5 of 6 monsters. Naarmate de prevalentie in de populatie stijgt of wanneer de prevalentie niet volledig voorspelbaar is, is het raadzaam om monsters in kleinere pools te testen.

Bij stabiel lage prevalenties (1-2%) wordt de grootste 'winst' geboekt in de reductie van het aantal testen en totale kosten (60-70% besparing). Daarbij is het ook duidelijk dat de relatieve kost van ontvangen van monsters, het ontdopen en pipetteren invloed heeft op de uiteindelijke besparing in totale diagnostiek kosten. Hoe hoger deze vaste kosten per monster zijn, hoe hoger de totale kosten.

Gevolgen voor diagnostische sensitiviteit

Van de SARS-CoV-2 PCR is bekend welke gevolgen één of meerdere verdunningstappen heeft op de Ct-waarde van het monster. Dit staat weergegeven in Tabel 5. De frequentie van de verschillende Ct-waarden in de GGD-

monsterstroom bij laboratorium A t/m 29 juni 2020 is als een percentage weergegeven in Tabel 5, evenals in Figuur 1 (alleen positieve monsters zijn hier weergegeven). In Figuur 1 is zichtbaar dat de meerderheid van de Ct-waarden van positieve monsters bij laboratorium A zich bevinden in het gebied 20-38 Ct. Als deze monsters in het ongunstigste geval verdeeld zijn over pools met enkel negatieve monsters, zal de Ct-waarde van de pool variëren van Ct 22-40 in een pool van 5, en van Ct 23-41 in een pool van 6-10 monsters (Tabel 5). Geconcludeerd kan worden dat een enkel positief monster met een Ct t/m 41 (=99% van positieve samples bij laboratorium A) in een pool met een poolgrootte t/m 10 met grote zekerheid gedetecteerd zal worden, tenminste als (laag)positief. Dit is waarbij de afkapwaarde voor een positief monster een Ct waarde kleiner dan 45 is. Laagpositieve monsters met een Ct 42-44 (<1% van de positieve samples bij laboratorium A) kunnen worden gemist in een pool van 6 monsters of meer. Dit is in overeenkomst met recente literatuur (Yelin et al., 2020).

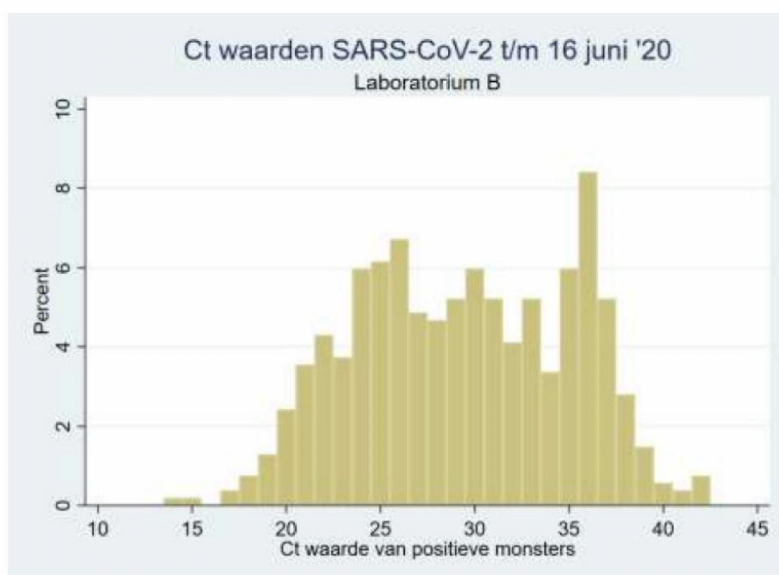


Figuur 1. Frequentieverdeling van Ct-waarden van humane SARS-CoV-2 diagnostiek bij laboratorium A t/m 29 juni 2020 (N=271 positieve samples).

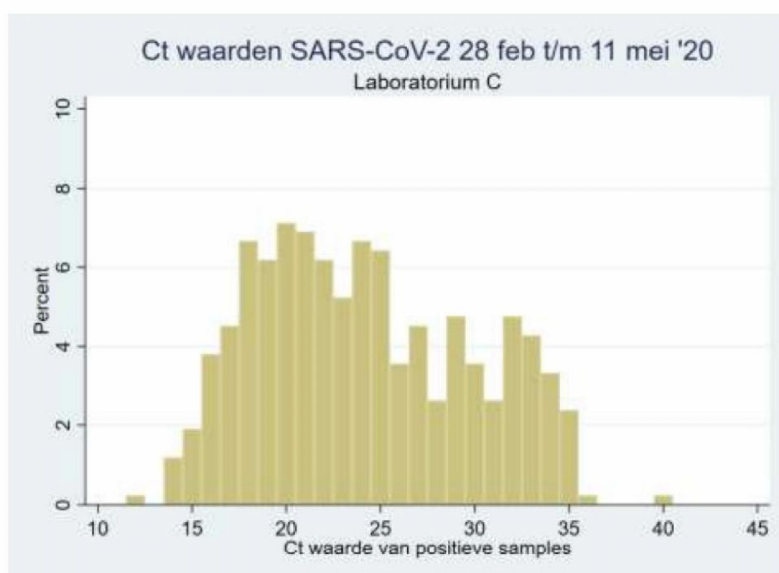
In Figuur 2 t/m 4 zijn de frequentieverdeling van Ct waarden van positieve monsters van 3 andere laboratoria weergegeven (B t/m D).

Tabel 5. Overzicht van de relatie tussen de Ct-waarde van een individueel monster en de toename in Ct-waarde wanneer een dergelijk monster gepoold wordt met negatieve monsters in pools van 2 tot 15 monsters. De kleur van de Ct heeft de kwalitatieve uitslag weer (groen = N; roze = LP; oranje = P; bruinrood = HP).

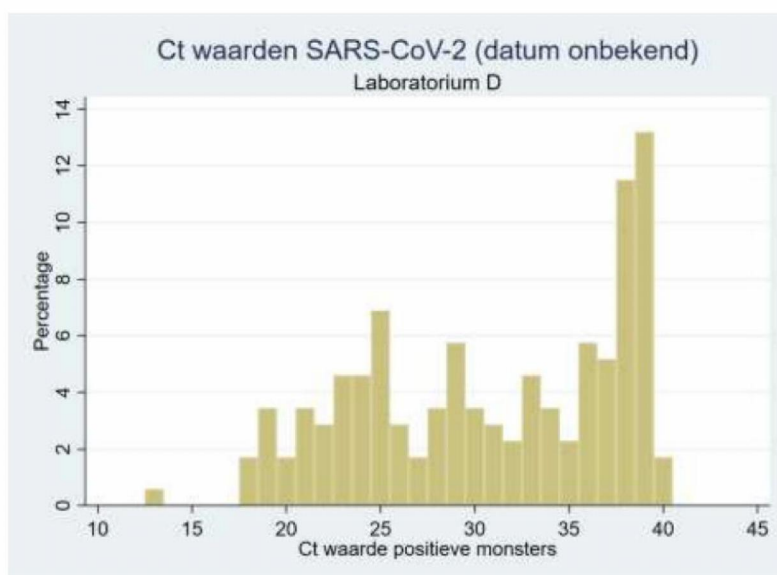
Individual		Pool size														
Result	Ct	Freq (%)	2 =+1Ct	3 =+1,5Ct	4 =+2Ct	5 =+2,3Ct	6 =+2,6Ct	7 =+2,8Ct	8 =+3Ct	9 =+3,2Ct	10 =+3,3Ct	11 =+3,5Ct	12 =+3,3Ct	13 =+3,7Ct	14 =+3,8Ct	15 =+3,9Ct
LP	44	0.00	45	46	46	46	47	47	47	47	47	48	48	48	48	48
LP	43	0.00	44	45	45	45	46	46	46	46	47	47	47	47	47	47
LP	42	0.74	43	44	44	44	45	45	45	45	46	46	46	46	46	46
LP	41	0.74	42	43	43	43	44	44	44	44	45	45	45	45	45	45
LP	40	0.00	41	42	42	42	43	43	43	43	43	44	44	44	44	44
LP	39	1.11	40	41	41	41	42	42	42	42	42	43	43	43	43	43
LP	38	6.64	39	40	40	40	41	41	41	41	41	42	42	42	42	42
LP	37	5.90	38	39	39	39	40	40	40	40	40	41	41	41	41	41
LP	36	6.27	37	38	38	38	39	39	39	39	39	40	40	40	40	40
P	35	3.32	36	37	37	37	38	38	38	38	38	39	39	39	39	39
P	34	6.64	35	36	36	36	37	37	37	37	37	38	38	38	38	38
P	33	3.32	34	35	35	35	36	36	36	36	36	37	37	37	37	37
P	32	4.43	33	34	34	34	35	35	35	35	35	36	36	36	36	36
P	31	4.43	32	33	33	33	34	34	34	34	34	35	35	35	35	35
P	30	2.21	31	32	32	32	33	33	33	33	33	34	34	34	34	34
HP	29	4.43	30	31	31	31	32	32	32	32	32	33	33	33	33	33
HP	28	2.58	29	30	30	30	31	31	31	31	31	32	32	32	32	32
HP	27	1.85	28	29	29	29	30	30	30	30	30	31	31	31	31	31
HP	26	4.43	27	28	28	28	29	29	29	29	29	30	30	30	30	30
HP	25	3.32	26	27	27	27	28	28	28	28	28	29	29	29	29	29
HP	24	6.64	25	26	26	26	27	27	27	27	27	28	28	28	28	28
HP	23	5.54	24	25	25	25	26	26	26	26	26	27	27	27	27	27
HP	22	4.43	23	24	24	24	25	25	25	25	25	26	26	26	26	26
HP	21	4.06	22	23	23	23	24	24	24	24	24	25	25	25	25	25
HP	20	7.75	21	22	22	22	23	23	23	23	23	24	24	24	24	24
HP	19	1.48	20	21	21	21	22	22	22	22	22	23	23	23	23	23
HP	18	2.95	19	20	20	20	21	21	21	21	21	22	22	22	22	22
HP	17	2.95	18	19	19	19	20	20	20	20	20	21	21	21	21	21
HP	16	0.74	17	18	18	18	19	19	19	19	19	20	20	20	20	20
HP	15	0.74	16	17	17	17	18	18	18	18	18	19	19	19	19	19
HP	14	0.37	15	16	16	16	17	17	17	17	17	18	18	18	18	18



Figuur 2. Frequentieverdeling van Ct-waarden van humane SARS-CoV-2 diagnostiek t/m 16 juni bij laboratorium B (N=535 positieve samples).



Figuur 3. Frequentieverdeling van Ct-waarden van humane SARS-CoV-2 diagnostiek bij laboratorium C tussen 28 feb en 11 mei 2020 (N=420 positieve samples).



Figuur 4. Frequentieverdeling van Ct-waarden van humane SARS-CoV-2 diagnostiek bij laboratorium D (datum onbekend) (N=174 positieve samples).

De individuele Ct waarden van de monsters uitgevoerd bij laboratoria B en D (Figuur 2 en 4) laten in grote lijnen een vergelijkbare verdeling zien als de verdeling van laboratorium A. Ook bij de monsters van laboratorium B en D zal bij een poolgrootte van 5 of 6 monsters slechts in een heel beperkt aantal gevallen een diagnose gemist worden. Bij de monsters uit de diagnostiek gerapporteerd door laboratorium C (Figuur 3) zal bij pooling geen of misschien een enkel monster gemist worden.

Uit deze Nederlandse gegevens kan geconcludeerd worden dat de daling in sensitiviteit bij een poolgrootte van 5 tot 6 monsters beperkt zal blijven tot maximaal 1-2%.

Impact van poolen op de infectie transmissie

Een hele beperkte daling van de sensitiviteit zal waarschijnlijk geen of een zeer beperkte invloed hebben op de transmissie van infectie in de populatie. De virale load verandert gedurende de infectie (Wölfel et al. 2020, Kampen et al. 2020). Vanaf het moment dat symptomen ontstaan loopt de virale load in RNA kopiën terug van 10^3 tot 10^{10} /ml/wattenstok in de bovenste luchtwegmonster in de eerste 10 dagen tot een waarde die varieert van negatief tot 10^7 /ml/wattenstok in de 30 dagen na begin van de symptomen bij in ziekenhuis opgenomen patiënten. Na dag 10 van de infectie begint het percentage positieve monsters sterk af te nemen en lukt het in veel gevallen niet meer virus te kweken uit bovenste luchtwegmonsters. De virale load is dan teruggelopen tot een waarde die varieert van negatief tot 10^6 /ml. Ook kort na start van klinische symptomen bij een virale load van minder dan 10^6 /ml blijkt virus niet kweekbaar (Kampen et al. 2020). Seroconversie met neutraliserende antilichamen die rond dag 6-10 opkomen

spelen waarschijnlijk een rol bij het niet meer kweekbaar zijn van het virus. Het Ct waarden profiel voor milde en ernstige gevallen laten een vergelijkbare trend in de tijd zien, alhoewel een hogere virale load bij begin van de infectie geassocieerd is met ernstigere ziekte. Met gebruik van een smoothing spline lopen de Ct waarden van (ver) onder de 30 op de dag van begin symptomen op tot boven de 35 vanaf dag 4-5 na begin symptomen (He et al. 2020). Door combineren van resultaten uit deze bronnen is het zeer onwaarschijnlijk dat patiënten met een Ct waarde in bovenste luchtwegmonster ≥ 38 een bijdrage leveren aan infectie transmissie. Hierbij moet wel opgemerkt worden dat een patiënt op moment van bemonsteren, voordat de symptomen duidelijk beginnen, ook een positieve PCR met hoge Ct waarde kan hebben. Bij een dergelijke patient kan de Ct waarde in de volgende dagen verlagen tot onder de 35 en kan de patiënt full-blown klinisch COVID-19 ontwikkelen. Het transmissie risico lijkt het hoogst rond de start van symptomen, wanneer de virale load in bovenste luchtwegmonster het hoogst is (Cheng et al. 2020). Het missen van een patiënt met lage load boven de Ct 38 is zeker acceptabel als de behandelaar de patiënt met klachten bij een negatieve SARS-CoV-2 PCR test optimaal informeert en adviseert bij toename van klinische symptomen opnieuw te testen.

Matrixpooling

Vooralsnog is er momenteel niet de beschikking over software waarmee matrixpooling op de robot geautomatiseerd kan worden. Dit betekent dat op dit moment deze vorm van pooling niet in aanmerking komt gezien de relatieve complexiteit van het terugzoeken van de individuele monsters.

Conclusies

Poolen van monsters is geanalyseerd gebaseerd op gegevens uit de Nederlandse screening door pandemie lab A van SARS-CoV-2 monsters. Met behulp van kansrekening zijn positieve uitslagen toegewezen aan pools variërend van 2 tot 14 monsters per pool. Daarbij is de prevalentie van positieve monsters gevarieerd tussen 1% en 10%.

Geconcludeerd kan worden dat de optimale poolgrootte varieert van rond de 4 monsters per pool bij een prevalentie van 10% tot 10 monsters per pool ligt bij een prevalentie van 1%. Echter, aangezien de prevalentie bij voorbaat niet gekend is, is het risico van een grote poolgrootte dat de kostenbesparing snel afneemt als de prevalentie toch hoger blijkt te zijn. Vandaar dat een poolgrootte van 5 of 6 als een goede keus gezien kan worden. Deze poolgroottes resulteren in de grootste gemiddelde capaciteitsvergroting en kostenbesparing.

Bij lage prevalenties (2%-3%) wordt het grootste voordeel geboekt in de reductie van het aantal testen: 65-70% besparing bij een poolgrootte van 5-6. De daling in kosten hangt deels af van de hoogte van de kosten per ontvangen monster en de kosten van het uitvoeren van de PCR test. Bij een lage prevalentie en een poolgrootte van 5-6 monsters zal de kosten reductie ongeveer 60% bedragen.

Bij een poolgrootte van 5 of 6 zal er een beperkte reductie in sensitiviteit optreden ten gevolge van het pool proces. Bij een Ct-afkapwaarde van <45 zal een enkel positief monster met een Ct tot 41 een pool met een poolgrootte tot 10 nog met zekerheid gedetecteerd worden als positief. Laagpositieve individuele monsters met een Ct waarde tussen 42-44 kunnen wel worden gemist in een pool van 5 monsters of meer. Afhankelijk van de interpretatie van Ct waarden in een individueel laboratorium kan geconcludeerd worden dat de daling in sensitiviteit bij een poolgrootte van 5 tot 6 monsters beperkt zal blijven tot maximaal 1-2%.

Omstandigheden zullen tussen laboratoria verschillen, het is dan aan te bevelen dat elk laboratorium dat pooling van monsters toepast een adequate validatie van het pooling proces uitvoert en documenteert.

De impact van een iets verlaagde sensitiviteit in de hoogste Ct waarden heeft waarschijnlijk geen of minimaal effect op het risico van transmissie van infectie in de populatie. Het missen van een enkele patiënt met een hele lage virale load is acceptabel als de behandelaar de patiënt met klachten bij een negatieve SARS-CoV-2 PCR test goed informeert en adviseert om bij toename van klinische symptomen opnieuw te testen.

Aanbevelingen

Het is aan te bevelen om bij de een prevalentie in de bemonsterde populatie van onder de 5% een poolgrootte van 5 of 6 te kiezen. Als de prevalentie stabiel veel lager dan 3% is, is het te overwegen om de poolgrootte verder te verhogen tot 8 of 10.

Poolen zal bij een poolgrootte van 5 of 6 monsters leiden tot een daling van van ruim 65% van het totaal aantal uit te voeren testen.

Poolen leidt dan tot een reductie in kosten van ongeveer 60%. De inrichting van het logistieke proces voor de aanlevering van de buizen, het pre-analytisch proces, de wijze van poolen, doorlooptijden en de benodigde laboratoriumruimte zijn mede van invloed op deze kosten, en kunnen per laboratorium variëren.

Omstandigheden zullen tussen laboratoria verschillen, het is dan aan te bevelen dat elk laboratorium dat pooling van monsters toepast een adequate validatie van het pooling proces uitvoert en documenteert.

Bij een poolgrootte van 5 of 6 zal er geen of een hele beperkte reductie in sensitiviteit optreden ten gevolge van verdunning van de primaire monsters in het pool proces. Afhankelijk van de interpretatie van Ct waarden in een individueel laboratorium kan geconcludeerd worden dat de daling in sensitiviteit bij een poolgrootte van 5 tot 6 monsters beperkt zal blijven tot maximaal 1-2%. Het is de verwachting dat een dergelijke daling in sensitiviteit geen of nauwelijks impact zal hebben op het risico van transmissie van infectie in de populatie.

Referenties

1. Cheng et al. High transmissibility of COVID-19 near symptom onset. medRxiv 2020.03.18.20034561; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.20034561>.
2. He, X., Lau, E.H.Y., Wu, P. et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. Nat Med 26, 672–675 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>.
3. Kampen et al. Shedding of infectious virus in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19): duration and key determinants. medRxiv 2020.06.08.20125310; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.08.20125310>.
4. Shani-Narkiss H, David Gilday O, Yaron N, Daniel Landau I, 2020. Efficient and Practical Sample Pooling for High-Throughput PCR Diagnosis of COVID-19. medRxiv preprint (published online April 14).2020; Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.04.06.20052159>.
5. Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W. et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature 581, 465–469 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>.
6. Yelin I, Aharoni N, Shaer Tamar E, Argoetti A, Messer E, Berenbaum D, Shafran E, Kuzli A, Gandali N, Shkedi O, Hashimshony T, Mandel-Gutfreund Y, Halberthal M, Geffen Y, Szwarcwort-Cohen M, Kishony R, 2020. Evaluation of COVID-19 RT-qPCR test in multi-sample pools. Clin Infect Dis 2020, May 2, doi: 10.1093/cid/ciaa531.