

Document Poolen SARS-CoV-2 analyses

LCDK "Pooling team": (10)(2e), (10)(2e), (10)(2e), (10)(2e), (10)(2e), (10)(2e), (10)(2e), (10)(2e) en (10)(2e)

Inhoud

Introductie.....	1
Criteria voor laboratoria om succesvol te kunnen gaan poolen	2
Management van protocol onderdelen voor het poolproces	3
Appendix I. LCDK rapport poolen van SARS-CoV-2 monsters	6
Inleiding.....	6
Materiaal en methoden	6
Optimale poolgrootte (theoretisch).....	6
Kosten	7
Gevoeligheid van de test.....	7
Resultaten	8
Optimale poolgrootte	8
Gevolgen voor diagnostische sensitiviteit.....	10
Impact van poolen op de infectie transmissie.....	14
Matrixpooling	15
Conclusies.....	15
Aanbevelingen.....	16
Referenties	16
Appendix II. FDA aanbeveling over poolen van monsters:	17

Introductie

Het poolen van monsters voor de diagnostiek van SARS-CoV-2 in individuele personen is mogelijk aantrekkelijk om met dezelfde materialen en personele inzet een groter aantal testen te kunnen uitvoeren. Dit is vooral aantrekkelijk als de prevalentie van infectie in de geteste populatie relatief laag is. Poolen van monsters gaat echter ook gepaard met een, zij het beperkte, daling van de sensitiviteit van het diagnostisch proces. Meer informatie over de voor- en nadelen van poolen staat beschreven in het recent uitgebrachte rapport aan het LCDK (Appendix I).

Het poolen van monsters vraagt wel de nodige aanpassingen in diagnostische laboratoria en zal niet voor alle laboratoria een makkelijke of zelfs gewenste procedure zijn.

In dit document definiëren we een aantal criteria voor laboratoria om te kunnen afwegen of het poolen een realistische optie is en bespreken we een aantal belangrijke onderdelen van het pool proces. Daarbij gaan we er van uit dat poolen vooral toegepast gaat worden op grotere stromen monsters. Te denken valt aan tenminste 1000 monsters per dag waarbij er nog steeds minstens 50% capaciteit extra beschikbaar is om schommelingen in aantallen monsters en testen op te kunnen vangen zodat het verleggen van monsterstromen zoveel mogelijk voorkomen kan worden. Denk daarbij ook aan de normale variatie in infectieprevalentie: bij een poolgrootte van 5 met een prevalentie van 1% worden 249 monsters getest, bij een prevalentie van 3% is dit 341 en bij een prevalentie van 5% is dit 426, een variatie van 177 testen (~70% stijging).

Daarnaast dient rekening gehouden te worden met de benodigde capaciteit, en de variaties in aanbod daarin, voor non-COVID19 diagnostiek.

Criteria voor laboratoria om succesvol te kunnen gaan poolen

Het is voor een laboratorium verstandig om een aantal criteria te beoordelen alvorens een besluit te nemen om wel of niet gepoolde monsters te gaan verwerken. Een aantal van deze criteria worden hier benoemd.

- Kunnen beslissen over noodzakelijke investeringen

Substantiële investeringen in apparatuur en mensen kunnen nodig zijn om als laboratorium relatief grote aantallen monsters te kunnen gaan poolen. Het is dan belangrijk dat besluitvorming rond investeringen op relatief korte termijn genomen kunnen worden. Denk daarbij aan investeringen in laboratorium capaciteit en apparatuur, vastleggen van procedures in SOPs, aannemen en trainen van personeel en het valideren van het poolproces.

- Beschikbaarheid adequate monster ontvangst en opslag faciliteiten

Voor grotere aantallen diagnostische monsters moet voldoende ruimte in flowkasten of een andere BSL-2 waardige omgeving beschikbaar zijn om een veilige monsterontvangst te kunnen garanderen. Daarbij geldt dat bij handmatige verwerking ~600 monsters per flowkast per fte verwerkt kunnen worden. Bij gerobotiseerde processen kunnen andere aantallen per flowkast verwerkt worden, deze aantallen zijn specifiek per robotstraat.

Voldoende opslagruimte om monsters onder adequate condities op te slaan moet beschikbaar zijn om alle ontvangen monsters gedurende een aantal dagen op te kunnen slaan. Voor monsters met een negatieve uitslag geldt een opslagtermijn van enkele dagen, voor monsters met een positieve of dubieuze uitslag geldt een opslagtermijn van tenminste twee weken. Een alternatief voor het opslaan van de originele monsters is het verwerken van de monsters in 96-well platen met voldoende volume om monsters te kunnen hertesten.

- Adequaat Laboratorium Informatie Management Systeem [LIMS]

Het is essentieel dat een LIMS programma [en de programma's rondom het LIMS programma, zgn 'middleware'] beschikbaar is dat in staat is met gepoolde monsters om te gaan. Alternatief is dat het laboratorium beschikt over een eigen software programmeer team met voldoende capaciteit om het poolen in de laboratorium software te kunnen programmeren. Het software systeem moet in staat zijn om adequaat te communiceren met het CoronIT systeem om uitslagen op individu niveau te kunnen rapporteren.

Belangrijke onderdelen van het software programma zijn uiteraard de ontvangst en inschrijven van de monsters, selectie van de juiste diagnostische test, maar daarna het aansturen van ontdoppen, het pipetteren van de monsters in moederplaten en in de gepoolde monsters, het aansturen van de PCR diagnostiek, bij positieve pools het terugzoeken van de individuele monsters in de pools en uiteindelijk het rapporteren van pool uitslagen [bij negatief] of individuele uitslagen [bij positief] via CoronIT terug naar de inzender. Tenslotte is het aansturen van de verrekening nodig om de juiste factuur bij de juiste inzender te krijgen.

- Capaciteit om test aantallen op te kunnen schalen

Het laboratorium is er toe uitgerust om grotere monsterstromen, minimaal 1000 SARS-CoV-2 monsters, dagelijks te verwerken. Het laboratorium is in staat om snel medewerkers aan te nemen en op te leiden zodat de medewerkers capabel zijn om in monsterontvangst en PCR afdeling adequaat processen uit te voeren. Verwerken van grote aantallen monsters vraagt in veel gevallen een robotisering van processen. Denk daarbij aan inscannen van monsters, ontdoppen van monsters en het pipetteren van monstermateriaal in diagnostiek platen.

- Uitvoeren van validatie van het pool proces

Het pool proces vraagt een eigen validatie, het laboratorium moet in staat om de validatie voor poolen te kunnen uitvoeren. Deze validatie is de verantwoordelijkheid van het individuele laboratorium. Het laboratorium is verantwoordelijk voor de kwaliteit van het volledige proces en de testresultaten die via poolen worden verkregen. Voor elk soort medium dat gebruikt wordt in het poolproces dient een afzonderlijk validatie uitgevoerd te worden in het pool-proces.

Het verdient aanbeveling dat het RIVM met een richtlijn komt voor de validatie van gepoolde monsters. Een voorbeeld van een validatie protocol voor gepoolde monsters is weergegeven in Appendix II.

Management van protocol onderdelen voor het poolproces.

Hier worden de verschillende stappen in het pool proces doorlopen en waar relevant de wijzigingen als gevolg van het poolen toegelicht.

- Aanleveren van monsters

Het aanleveren van monsters vraagt een uniform proces waarbij het type buis, de [lysis] buffer en de documentatie [barcode] op de buis gestandaardiseerd is. De organisatie en uitvoering van de logistiek van monsterontvangst is de verantwoordelijkheid van het laboratorium.

Monsterstromen moeten zodanig gescheiden kunnen worden in monsters die voor individuele diagnostiek bedoeld zijn en monsters die voor gepoolde diagnostiek bedoeld zijn. Dit geschiedt bij voorkeur in de test-afname straat zodat het onderscheiden van beide stromen reeds voor ontvangst van de monsters in het laboratorium duidelijk is.

Bij ontvangst in het laboratorium moeten de individuele monsters in het LIMS systeem ingeschreven kunnen worden. Daarbij moet het mogelijk zijn om zowel een individuele SARS-CoV-2 PCR test aan te vragen als een gepoolde SARS-CoV-2 PCR test.

De monsterontvangst moet onder voldoende veilige omstandigheden uitgevoerd kunnen worden. Het laboratorium moet hiervoor een risico analyse uit kunnen voeren.

- Ontdoppen

Na ontvangst van de monsterbuizen moeten de buizen op een voldoende veilige manier ontdopt kunnen worden. Bij het gebruik van gerobotiseerde systeem is een validatie met een zogenaamde schaakbordpatroon, of een ander adequaat proces, om het risico op contaminatie te kunnen beoordelen essentieel. Daarbij is het belangrijk dat bij deze validatie monsters gebruikt worden met een lage Ct waarde [15 of lager] om relevante risico's op kruiscontaminatie te kunnen uitsluiten.

- Pipetteren

Het pipetteren van individuele monsters naar een moederplaat en vervolgens vanuit de moederplaat naar gepoolde monsters zal in veel gevallen vooral gerobotiseerd gebeuren. Bij het gebruik van gerobotiseerde systeem is een validatie met een zogenaamde schaakbordpatroon, of een ander adequaat proces, om contaminatie te kunnen beoordelen essentieel. Daarbij is het belangrijk dat bij deze validatie monsters gebruikt worden met een lage Ct waarde [15 of lager] om relevante risico's op kruiscontaminatie te kunnen uitsluiten.

- PCR diagnostiek van gepoolde monsters

Het PCR proces van gepoolde monsters gebeurt op een manier die identiek is aan het PCR proces op individuele monsters. Het mogelijke verlies aan sensitiviteit ten gevolge van poolen dient in de validatie gekwantificeerd te worden. Zoals gebruikelijk maakt testen van kwalificatie monsters van RIVM deel uit van het PCR validatieproces.

- Terugzoeken van individuele monsters uit een positieve pool

Bij positieve pools moeten de individuele monsters makkelijk teruggevonden kunnen worden. Ook hierbij is adequate identificatie van zowel poolmonsters als de individuele monsters of de moederplaten van essentieel belang. In het ICT systeem moeten dan alle monsters in een positieve pool opnieuw ingeschreven kunnen worden op basis van de productcode voor individuele SARS-CoV-2 diagnostiek en individueel opnieuw getest worden. Daarbij mogen geen uitslagen dubbel gerapporteerd worden (dus niet rapportage van de pool en individuele uitslag).

- Opslaan van monsters

Voor monsters met een negatieve uitslag geldt een opslag van *X-aantal weken*, voor monsters met een positieve of dubieuze uitslag geldt een opslagtermijn van tenminste *Y-aantal weken*. Een alternatief voor het opslaan van de originele monsters is het verwerken van de monsters in 96-well platen met voldoende volume om monsters te kunnen hertesten.

- Rapportage resultaten

De uitslagen worden als individuele uitslag gerapporteerd. Daarbij moet het voor de ontvangende partij (bijvoorbeeld GGD) duidelijk zijn dat een negatieve uitslag verkregen is op basis van een gepoold monster. Het valt voor de rapporterende instantie te overwegen om bij een negatieve uitslag een algemene interpretatie van negatieve poolresultaten toe te voegen.

Bij een positieve uitslag is het niet nodig om te vermelden dat de uitslag verkregen is na het pool proces. Deze uitslagen zijn immers gebaseerd op het testen van individuele monsters.

Bij het uitvoeren van diagnostiek in gepoolde monsters is het noodzakelijk om aan de inzender aan te geven dat de tijd tot een einduitslag langer kan duren. Bij een positieve pool moet een tweede serie testen uitgevoerd

worden. Als resultaten normaliter binnen 24 uur beschikbaar zijn, wordt er met de inzender afgesproken dat resultaten van gepoolde monsters binnen 36 uur beschikbaar zijn.

Rapportage in CoronIT dient zo ingericht te worden dat het duidelijk is dat de uitslag gebaseerd is op gepoolde monsters of op individueel geteste monsters.

Discussie en conclusies

Het uitvoeren van diagnostiek op gepoolde monsters vraagt een serie extra stappen in het diagnostisch proces. Hiervoor zullen een aantal belangrijke beslissingen van het laboratorium aan ten grondslag liggen. In dit document hebben we geprobeerd om deze beslispunten in kaart te brengen.

Uiteindelijk zal elk laboratorium zelf besluiten of het poolen van monsters adequaat kan geschieden en of de daarbij behorende investeringen in faciliteiten, materiaal en mensen de moeite waard zijn.

Appendix I. LCDK rapport poolen van SARS-CoV-2 monsters

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	10-12	10-12	10-12	10-12	10-12	10-12	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, ontstoppen 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:											
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	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

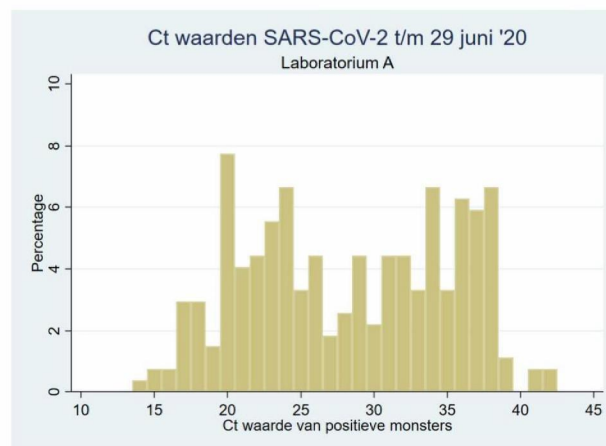
Geconcludeerd kan worden dat de optimale poolgrootte rond de 4 monsters per pool ligt bij een prevalentie van 10% en rond de 10 monsters per pool ligt bij een prevalentie van 1%. Deze poolgroottes resulteren in de grootste capaciteitsvergroting en kostenbesparing. Vanuit tabel 3 en 4 kan ook gelezen 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 ontstoppen 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

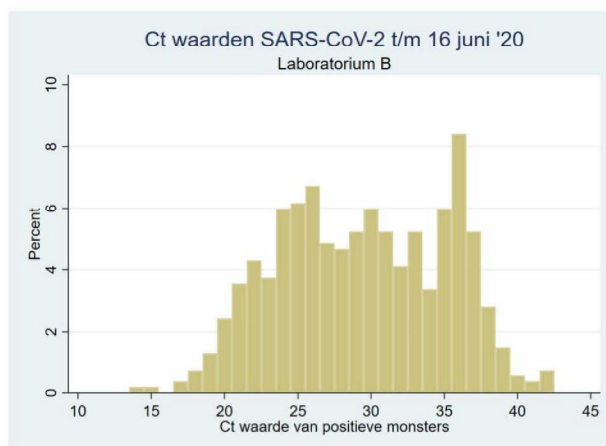
Van de SARS-CoV-2 PCR is bekend welke gevolgen één of meerdere verdunningstappen heeft op de Ct-waarde van het monster. Dit staat weergegeven in Tabel 5. De frequentie van de verschillende Ct-waarden in de GGD-monsterstroom bij laboratorium A t/m 29 juni 2020 is als een percentage weergegeven in Tabel 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).

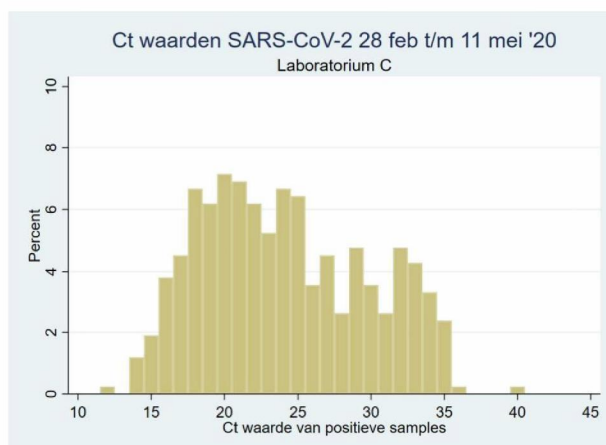


Figuur 1. Frequentieverdeling van Ct-waarden van humane SARS-CoV-2 diagnostiek bij laboratorium A t/m 29 juni 2020 (N=271 positieve samples).

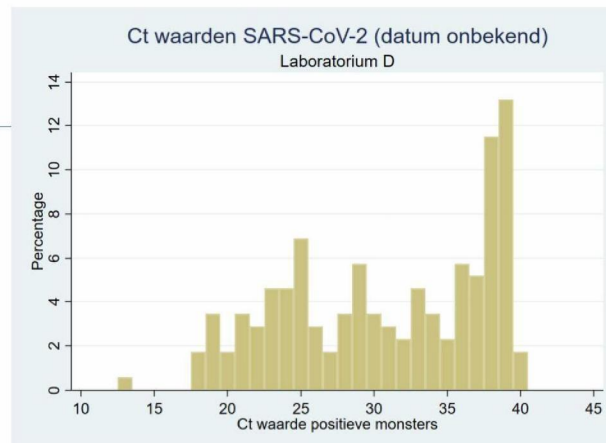
In Figuur 2 t/m 4 zijn de frequentieverdeling van Ct waarden van positieve monsters van 3 andere laboratoria weergegeven (B t/m D).



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 10^8 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, Yayon 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, Aharony 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.

Appendix II. FDA aanbeveling over poolen van monsters:

<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-facilitating-diagnostic-test-availability-asymptomatic-testing-and>

Sample Pooling

- The recommendations in this template are for a simple, or Dorfman, approach to testing an “n-sample pool,” where n is the number of samples included in the pool. In this type of pooling, samples are combined into non-overlapping pools of n samples and each n-sample pool is tested. A negative result implies that all samples in the pool are negative. A positive result indicates that at least one sample in the pool is positive. When an n-sample pool is positive, each sample within the pool must be individually tested to determine which is/are positive. Therefore, the volume of samples initially collected from an individual must be sufficient for both the pooled testing and individual follow-up testing, if needed. When used effectively, n-sample pooling can enable testing of more individuals despite limited testing resources.
- N-sample pooling should be considered in the context of the positivity rate of a test in the test population, analytical sensitivity of the test, and the percent of weak positive subjects in the tested population. Pooling of n samples reduces the analytical sensitivity of the test (increase in the LoD) because samples are diluted. The impact of decreased analytical sensitivity depends on the percent of subject specimens with viral genetic material concentrations close to the LoD (weak positives) in the tested population. Therefore, analytical sensitivity of the test with n-sample pools should be evaluated.
- FDA believes an n=5 is a reasonable starting point for validation of pooling for a high-sensitivity test in populations with a positivity rate of approximately 5% to 6%. In populations with lower prevalence, larger sample pools may be feasible. In populations with higher prevalence, smaller sample pools may be needed. FDA recommends that developers begin by validating their tests for pooling using an n=5. Tests validated and authorized for n=5 can then be used with any n≤5 depending on testing needs and taking into consideration local prevalence. In cases where a developer wants to validate an n>5, or is considering alternate pooling schemes such as pooling multiple swabs into a single VTM, FDA recommends that developers reach out to FDA at CDRH-EUA-Templates@fda.hhs.gov to discuss their approach and validation plan.
- Different specimen types should not be pooled together.

- FDA recommends that your procedures specify a sample volume great enough to allow for individual and pooled testing so that, during clinical use, any samples in a positive pool can be re-tested without the need for a second sample collection.

-
- Due to the reduction in analytical sensitivity, a pooling strategy should include risk mitigations such as additional language in the report noting that pooling was used during testing.

Monitoring:

- Laboratories should incorporate ongoing monitoring of the n-sample pooling strategy by addressing the following in their procedures:
 - Before implementation of n-sample pooling, evaluate existing test data in the testing population from the previous 7-10 days to estimate the initial positivity rate.
 - When implementing an n-sample pooling strategy, continue to test a random sampling of patient samples without pooling to:
 - evaluate the positivity rate and percent of weak positive samples in the testing population and
 - identify differences in positivity rate between those tested individually and those tested through pooling.
 - Calculate the percent of positive results after implementation of n-sample pooling using a moving average (such as a rolling average updated daily using data from the previous 7-10 days) to determine whether there is a change in the positivity rates between individual testing and pooled testing. Reevaluate testing strategy if the moving average of the positivity rate for pooled samples starts trending in a positive or negative direction.
 - Finally, when resource availability is sufficient to meet testing demand, consider whether the risks of reduced test sensitivity with pooling continue to outweigh the benefits of resource conservation.

Validation:

- Test developers should characterize the reduction in assay analytical sensitivity (i.e., shift in Ct score for RT-PCR assays) with respect to the number (n) of samples to be pooled to ensure the selected n-sample pooling strategy will maintain appropriate sensitivity. This maximum number of samples acceptable to pool should be determined and validated using the recommendations below for each specimen type you intend to pool.
- To establish performance of your test with n-sample pooling, FDA recommends conducting a clinical validation study in the intended use population that includes testing each sample individually and using your proposed pooling strategy.

A) Sample pooling: adding a pooling strategy to a previously authorized (EUA) test

When requesting to add a pooling strategy to the authorized uses and the authorized procedures for your own previously authorized assay, you should submit an EUA amendment request with the appropriate validation as described below. When requesting to add a pooling strategy to the authorized uses and the authorized procedures for another developer's authorized assay, you should submit a new EUA request with the appropriate validation as described below. To leverage the previous individual sample testing validation data for a different developer's assay, please provide a Right of Reference from that EUA holder. To add a pooling strategy to a previously authorized test, you do not need to establish performance with a separate comparator assay.

You should conduct a clinical study with at least 20 individual positive samples, comparing the performance of the EUA-authorized assay when testing single specimens according to the authorized procedures to the performance of the assay when testing n-sample pools. We strongly encourage you to work with your customers to gather existing data (e.g., 100 Ct scores from individually tested positive patient samples) and evaluate the percentage of samples with Ct scores close to your assay LoD (i.e., weak positives). A theoretical Ct shift of $\text{Log}_2(n)$ can be estimated for most RT-PCR tests (e.g., for $n=5$, a Ct shift of 2.3 would be expected). Therefore, if a large percentage of positive patient samples are close to your assay LoD, you may want to consider a smaller n , which will reduce the observed Ct shift and maintain higher sensitivity.

Please consider the following when designing your clinical validation study with 20 individually tested positive samples:

- If archived individual samples are available and have enough volume for testing with n-sample pools, we recommend that you use at least 20 archived positive samples. If these samples are not available with sufficient volume, we recommend that you enroll enough patients to collect at least 20 positive samples and an appropriate number of individual negative samples from the intended use population. For a 5-sample pooling strategy, a total of 80 unique comparator method negative samples are recommended in order to make up 20 5-sample pools with the 20 positive samples (20 positives + 4x20 negatives). Additionally, 100 comparator method negative samples are recommended to make up 20 5-sample negative pools (5x20 negatives) as described below. If there is sufficient volume, the same negative patient samples can be used to create positive and negative pooled samples.
- We recommend that at least 25% of the validation samples be within 2-3 Ct of the cut off, and no more than within 2-4 Ct.
- Samples should be collected according to the procedures, keeping in mind that additional sample volume will be needed to test using an n-sample pooling strategy (n-sample pooling will need $1+1/n$ times the volume needed for individual testing).
- All samples should be individually tested by your assay, either previously for archived specimens or prospectively, and have recorded Ct values if using an RT-PCR test.
- To characterize the performance of your assay when testing pooled samples, those samples with positive results when tested individually should each be pooled with n-1 (e.g., where $n=5$, $n-1=4$) randomly selected negative samples. The resulting 20 pools, each consisting of 1 positive sample and n-1 negative samples, should be tested by your assay.

- To confirm that negative samples remain negative in n-sample pools, we recommend testing 20 pools each consisting of n (e.g., n=5) negative samples. If there is sufficient volume, the same negative patient samples can be used to create positive and negative pooled samples.
-

Analysis of data

- You should report estimates of positive and negative agreement comparing the performance of your test for pooled samples to the expected result. Using a study design with 20 positives, all samples that were identified individually as positive by your test should still be positive when tested in pools with n-1 negative samples.
- Additionally, for RT-PCR tests, you should provide an analysis of Ct values of each target detected by your test. We recommend presenting the Ct values for the n-sample pools on the Y-axis and Ct values for the individually tested samples on the X-axis. The clinical validation study should demonstrate that individual positive samples with viral load close to the assay's LoD (i.e., weak positives) are accurately detected by your test in a pool with (n-1) negative samples.
- We recommend that you provide an appropriate type of regression analysis with slope and intercept along with 95% confidence interval. Using regression analysis, we recommend that you evaluate the shift in Ct values for the positive patient samples diluted with negative patient samples.

B) Sample pooling: new test (not previously authorized)

When requesting to include a pooling strategy for a new test, you should submit an EUA request with the appropriate validation data for individual testing in your proposed intended use population and for pooled testing, as described below. This should involve using a high-sensitivity comparator assay to characterize performance of your candidate test.

You should conduct a clinical study with at least 30 individual positive samples, as identified by the comparator assay, comparing the performance of the candidate assay both when testing single specimens and when testing n-sample pools to the performance of the comparator assay.

Please consider the following when designing your clinical validation study:

- The number of enrolled patient specimens should be sufficient to ensure at least 30 comparator method positive samples and an appropriate number of comparator method negative samples are collected from the intended use population. The number of comparator method negative samples depends on the pooling strategy. For instance, for a 5-sample pooling strategy, a total of 120 unique comparator method negative samples are recommended in order to make up 30 5-sample pools with the 30 positive samples (30 positives + 4x30 negatives). Additionally, 150 comparator method negative samples should make up 30 5-sample negative pools (5x30 negatives) as described below. If there

is sufficient volume, the same negative patient samples can be used to create positive and negative pooled samples.

- We recommend that at least 25% of the validation samples should be within 2-3 Ct of the cut off, and no more than within 2-4 Ct.
-
- Samples for comparator method testing should be healthcare provider collected NP swabs. If an NP swab cannot be collected, a nasal swab can be used however both anterior nares should be sampled with the same swab. Sampling for the candidate test and comparator method should occur within a short timeframe, such as during the same visit, to avoid biological variability in viral load.
 - If available, FDA recommends selecting a comparator assay that has established high sensitivity with an internationally recognized standard or the FDA SARS-CoV-2 Reference Panel. Please contact (10)(2e) @fda.hhs.gov to discuss options to establish sensitivity.
 - Samples for the candidate test should be collected according to the procedures. Depending on the sample volume required for your test, a single specimen collected from each study participant may be sufficient for individual and pooled sample testing.
 - In general, we recommend that you collect samples at a minimum of three geographically diverse sites, especially if you are planning to use the same data to support a subsequent De novo/510k submission. If this is not possible, FDA recommends samples collected at one or two sites in the context of an EUA.
 - It may be possible to use archived positive samples that were collected from the intended use population. We recommend you contact FDA to discuss such an approach prior to initiating your study.
 - All samples should be individually tested by the comparator assay and individually tested by the candidate assay to characterize the performance of your assay when testing individual samples.
 - To characterize the performance of your assay when testing n-sample pools, those samples with positive results by the comparator method should each be pooled with n-1 (e.g., where n=5, n-1=4) randomly selected comparator method negative samples. The resulting 30 pools, each consisting of 1 comparator method positive sample and n-1 comparator method negative samples, should be tested by your candidate assay.
 - To confirm that samples with comparator method negative results remain negative in n-sample pools, we recommend testing 30 pools each consisting of n (e.g., n=5) comparator method negative samples.

Analysis of data

- You should report estimates of positive and negative agreement comparing individual results from your test and the comparator test, as well as performance of pooled samples to the expected results (i.e., a pool which includes a comparator method positive sample is expected to remain positive when pooled). Using a study design with 30 positives, all samples that were identified individually as positive should still be positive when tested in pools with n-1 negative samples.

- Additionally, for RT-PCR tests, you should provide an analysis of Ct values of each target detected by your test. We recommend presenting the Ct values for the n-sample pools on the Y-axis and Ct values for the individually tested samples on the X-axis. The clinical validation study should demonstrate that individual positive samples with viral load close to the assay's LoD (i.e., weak positives) are accurately detected by your test in a pool with (n-1) negative samples.
- We recommend that you provide an appropriate type of regression analysis with slope and intercept along with 95% confidence interval. Using regression analysis, we recommend that you evaluate the shift in Ct values for the positive patient samples diluted with negative patient samples.

C) Example of validation and data presentation.

The information below is included as an example of how data can be presented to FDA in a pre-EUA or EUA request. It is for illustrative purposes only and is not reflective of data from any specific test nor the only way to present such information. This example is based on a 5-sample pooling strategy using an extraction method requiring a 500 uL sample.

- 1) Used the candidate assay to individually test 500 uL aliquots of 30 comparator positive samples and 150 comparator negative samples.

Example of table for presenting calculation of PPA and NPA of the candidate test results for samples tested individually vs the comparator test results:

Samples Tested Individually	Comparator Method Result	
	Positive	Negative
Candidate Test Result		
Positive		
Negative		

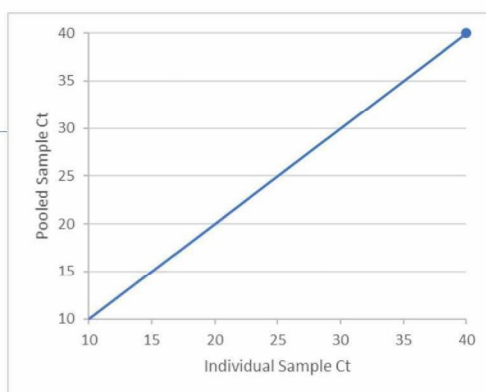
- 2) Created expected positive 5-sample pools by combining 100 uL of one (1) individual positive patient sample with 100 uL aliquots from each of four (4) unique comparator method negative patient samples. This was done for all positive patient samples thereby creating 30 5-sample pools (i.e., a total of 30 positives combined with a total of 120 negatives).

- 3) Created expected negative 5-sample pools by combining 100 uL of five (5) individual negative patient samples using a total of 150 unique negative samples. When there was sufficient volume, the same negative patient samples were used to create positive and negative pooled samples.
-
- 4) Tested all 5-sample pools by following the instructions for use of the candidate test. All previous results were unknown to the user (i.e., an individual other than the user performing the testing prepared the samples such that testing was performed “blinded”).
 - 5) Calculated the percent agreement of the pooled samples with respect to the expected results (i.e., if a positive patient sample was included in the 5-sample pools, the expected result was positive).

Example of table for presenting calculation of PPA and NPA of the candidate test results for samples tested in 5-sample pools vs expected results (where expected results are based on the individual testing):

Samples Tested in 5-sample pool	Expected Result	
	Positive	Negative
Pooled Test Result		
Positive		
Negative		

- 6) If the candidate assay is an RT-PCR test and cycle threshold scores (Ct score) are available, we recommend that you provide a data plot (example below) of the positive sample Ct scores of an individual tested positive (i.e., the Ct score of the individual positive sample used to create the positive pooled sample) and the positive pooled sample. We recommend that you include a diagonal line with a slope of 1 and a y-intercept of 0. We recommend that you provide an appropriate type of regression analysis with slope and intercept along with 95% confidence interval. Using the regression analysis, we recommend that you evaluate the shift in Ct values for the positive patient samples diluted with negative patient samples.



- 7) Agreement should also be presented in a stratified manner so that performance over the range of Ct scores can be evaluated. For example, if the cut-off for the candidate test is Ct = 40 then the following table should be provided:

Samples Tested in a 5-sample Pool	Expected Result Individual Samples with $37 < Ct \leq 40$	
	Positive	Negative
Positive		
Negative		
	Expected Result Individual Samples with $34 < Ct \leq 37$	
Positive		
Negative		
	Expected Result Individual Samples with $Ct \leq 34$	
Positive		
Negative		
	Expected Result All Individual Samples	

Positive		
Negative		
