

Positionspapier „Pooling“ (Gruppentestung)
zum PCR-Direktnachweis des Coronavirus SARS-CoV-2

vom 15. Mai 2020

Einführung

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfiehlt die **Individualtestung** von symptomatischen, potentiell Covid-19-Erkrankten oder Kontaktpersonen von Covid-19-Erkrankten mit einer möglichen (aber noch asymptomatischen) Infektion mit dem Coronavirus SARS-CoV-2.

Entnahme- und Versandmaterial: Für die Probenentnahme wird bei der betreffenden Einzelperson in der medizinischen Routine üblicherweise ein oro- und/oder nasopharyngealer Abstrich der Rachenhinterwand genommen. Das verwendete Tupfermaterial kann dabei je nach Hersteller variieren. Die Entnahme sollte unbedingt von medizinisch qualifiziertem Personal durchgeführt werden, da die Entnahmetechnik und der Entnahmeort sehr wesentlich die Menge des gewonnenen Testmaterials für die Analyse beeinflussen. Grundsätzlich wird in Bezug auf den Versand der Tupfer entweder in einem Röhrchen trocken oder in einer definierten Flüssigkeit ins Labor zur RNA-Isolation und anschließender RT-PCR-Analytik überführt. Die Flüssigkeit sollte keine sogenannten PCR-Inhibitoren enthalten, welche die korrekte Analytik verhindern. Die korrekte Zuordnung des Probenmaterials zum zu testenden Individuum erfolgt in der labormedizinischen Routine in der Patientenversorgung über eine identische Barcodierung, welche über eine eindeutige Nummerierung sicher die persönlichen Patientendaten (auf dem Anforderungsschein oder im digitalen Anforderungs- (*Order Entry*-) System) der individuellen Probe zuordnet. Diese Barcodierung der Primärprobe gewährleistet somit letztlich die Zuordnung des Laborergebnisses zum Individuum.

Ausgehend von der **Zielsetzung**, die Testung effektiver zu gestalten, gibt es wissenschaftliche Ansätze anstelle der Individualtestung eine Gruppentestung im sogenannten „Pooling“ einzusetzen. Die **Effektivität** eines Laborbefundes kann messbar werden, z.B. aus medizinisch-ärztlicher sowie Patienten-Sicht anhand allgemeiner Verfügbarkeit der Untersuchung bei entsprechender Indikation und aus wirtschaftlicher Sicht anhand der Kosten. Auch Schnelligkeit und qualitative Sicherheit der Ergebnisse spielen eine wichtige Rolle in der Versorgung. Ein Zeitverlust führt vor allen Dingen bei Risikopatienten zur Gefährdung der individuellen Sicherheit.

Für eine **Gruppentestung** kann in der **Probenvorbereitung** zur Analytik ein „**Poolen/Pooling**“ von Proben eingesetzt werden. Dies bedeutet, dass Einzelproben in einem Reaktionsgefäß vermischt als „Proben-Pool“ zur Analyse zusammengeführt werden. Hierzu ist es zwingend erforderlich, einen Teil der primären Patientenprobe vor der Zusammenführung als einzelne „**Rückstellprobe**“ weiterhin einzeln verfügbar zu halten. Denn im Fall eines positiven Ergebnisses der gemischten Poolprobe auf den untersuchten Erreger, hier Coronavirus SARS-CoV-2, müssen in einer nachfolgenden zweiten Analyse alle Rückstellproben des positiv getesteten Proben-Pools nochmals in einer Individualtestung erneut untersucht werden. Nur so ist es möglich die einzelne oder mehrere positive Einzelprobe/n im Pool von der/den negativen Einzelprobe/n trennen zu können. Ohne diese „**Aufschlüsselung**“/**Auflösung** des Pools ist ein patientenbezogenes Einzelergebnis als Befund für eine Diagnosefindung nicht möglich und das positive Poolergebnis muss ansonsten auf alle im gemischten Pool vorhandenen einzelnen Individuen unabhängig von ihrem tatsächlichen Infektionsstatus bezogen werden.

Gruppentestungen von Proben werden bisher im **wissenschaftlichen und veterinärmedizinischen Umfeld** aus Kostengründen eingesetzt. Auch in der seriellen Testung von Blutspendern in der humanen **Transfusionsmedizin** in Bezug auf die Erkennung ausgewählter viraler Infektionserkrankungen mit hoher

Viruslast kann Blut gruppenweise untersucht werden. Bei der Matrix Blut sind aber immer eindeutig definierte Probenmengen, die einfach über eine venöse Blutentnahme gewonnen werden können, vorhanden. In der labormedizinischen Routineversorgung von Patient*innen ist lediglich die präventive Anwendung einer Gruppentestung von menschlichem Urin zur Früherkennung von Chlamydien in der Probenmatrix Urin beschrieben. Bei der vermeintlich einfach zu gewinnenden Matrix Urin führten allerdings bereits unterschiedliche Abnahmezeitpunkte z.B. über den Tag (morgens, mittags oder abends) sowie über den Verlauf der Miktion (Erst- oder Mittelstrahlurin) zu unterschiedlichen Ergebnissen. Dies ist ein Grund, weshalb ein Pooling sich in der Routinetestung in medizinischen Laboren nicht durchgesetzt hat. Ein kurativer Einsatz von Gruppentestungen ist bisher in der medizinischen Routine in Deutschland nicht bekannt. In Bezug auf die Verwendung von Abstrichtupfern als Matrix und den Direktnachweis des Coronavirus SARS-CoV-2 mittels PCR sind bereits zahlreiche Beispiele aus der praktischen Versorgung bekannt, die zeigen, dass unterschiedliche Abstriche an einem Individuum in Abhängigkeit von entnehmender Person sowie Ort und Zeit der Entnahme zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können.

Für die Coronavirus-SARS-CoV-2 PCR-Untersuchung wurden in den ersten und wenigen wissenschaftlichen Veröffentlichungen bereits **unterschiedliche Poolingverfahren** vorgeschlagen. Diese basieren jedoch auf kleinen Fallzahlen und sehr definierten Probenmaterialien (beispielsweise aus Ringversuchen). Inwiefern jedoch die in der praktischen Routine sehr heterogenen Materialien gepoolt werden können und ob sich unterschiedliche Materialien und Abnahmesysteme gegenseitig beeinflussen, wurde bisher nicht ausreichend betrachtet. Bei den publizierten Verfahren bestehen auch Unterschiede in der Anzahl der verwendeten Individualproben für die Herstellung des Probengemischs für die Gruppentestung (Poolgröße) oder grundlegend in der Herstellung des Probengemischs auf Grundlage des Materials (z.B. die direkte Verwendung des Abstrichtupfers oder aus Flüssigkeit/Medium, in welcher/m der Tupfer eingebracht wurde). Methoden, welche den Abstrichtupfer „verbrauchen“, werden hier nicht weiter im Detail dargelegt. Diese Methoden führen dazu, dass im Fall der Notwendigkeit einer Aufschlüsselung des Pools ein zweiter Abstrichtupfer eingesetzt werden muss, der niemals identisch zum ersten Abstrichtupfer sein kann und der – sollte die zweite Abstrichentnahme nicht direkt bei der ersten Entnahme erfolgen – immer zu einem deutlichen Zeitverlust in der Diagnosefindung führt.

In jedem Fall führt eine zweite Probenentnahme zu einer **Patientenmehrbelastung** und einem **erhöhten Bedarf an Entnahme- und Versandmaterial**. Die Vermischung von Probenflüssigkeiten führt immer zu einem **Risiko falscher Befunde**. Je mehr Proben offen nebeneinander bearbeitet und gemischt werden, desto höher ist die Gefahr einer mehrere Pools übergreifenden Kontamination mit Virusmaterial. Damit steigt auch die Gefahr falsch positiver Befunde. Ein Pooling kann auch zu einer Probenverdünnung führen. Hiermit ist ein Risiko verbunden, geringe Virusmengen nicht mehr im Gemisch nachweisen zu können. Dies bedeutet, dass falsch negative Befunde entstehen können. Die klinische Relevanz dieses Sensitivitätsverlusts ist bisher unzureichend untersucht.

Je nach Poolgröße ist der **Verlust an analytischer Sensitivität** hoch (große Pools ohne Konzentrierungsmethodik) bis gering (kleine Pools bis 5 Proben). Die diagnostische Sensitivität ist bei kleinen Poolgrößen (bis zu 5 Proben) zur Erkennung deutlich positiver Proben (Ct-Werte <30) kaum reduziert. Alle praktischen Erfahrungen und bisherigen wissenschaftlichen Publikationen weisen allerdings darauf hin, dass schwach positive Proben unter Verwendung von Poolingverfahren übersehen werden können und somit **falsch negative Laborergebnisse** erzeugt werden können.

Eine daher interessante Methode des Mini-Pooling mit fünf Individualproben in einem Pool ist das Zusammenführen der Tupfer in einem neuen Gefäß mit Medium („**Frankfurt Adjusted COVID-19 Test (FACT)**“), DRK Blutspendedienst Frankfurt/Institut für Med. Virologie Uni-Klinikum Frankfurt; Preprint und Bewertung: siehe Seite 10 in der Anlage), da nach bisher vorliegenden Erkenntnissen hierbei keine

Verdünnungseffekte auftreten. Auch in diesem Fall muss für die Nachverfolgung der Einzelprobe ein Aliquot der Originalprobe als Rückstellprobe asserviert werden, so dass bei positivem Ergebnis des Pools die entsprechende Einzelprobe nachgetestet werden kann. Heterogene Entnahme- und Probenmaterialien sind allerdings auch für dieses Verfahren eine Herausforderung und wurden bisher nur eingeschränkt wissenschaftlich untersucht.

Bewertung für die Patientenversorgung in der humanmedizinischen Routine

1. Pooling führt zum Verlust der CE-Zertifizierung und verhindert eine Produkthaftung und medizinische Gewährleistung

Medizinprodukte sind Produkte mit medizinischer Zweckbestimmung, die vom Hersteller für die Anwendung beim Menschen bestimmt sind. Zu den *In vitro*-Diagnostika zählen Reagenzien, Reagenzprodukte, Kits, Probenbehältnisse, Geräte und weitere Produkte, die zur *In vitro*-Untersuchung von Proben aus dem menschlichen Körper bestimmt sind. Eine CE-Kennzeichnung von Medizinprodukten wie medizinischen Geräten und Laborteste besagt, dass ein Produkt die Anforderungen aller gültigen EU-Richtlinien erfüllt. Ein Produkt mit CE-Kennzeichnung darf in jedem Mitgliedstaat der EU betrieben werden. Die Hersteller von im humanmedizinischen Labor eingesetzten Medizinprodukten haften nur für ihre Produkte in der Individualtestung, nicht im Einsatz in der Gruppentestung. Weder die Gefährdung von Patient*innen noch die rechtlichen Folgen für die medizinischen Labore beim Einsatz eines Pooling bei der Diagnosefindung potentiell lebensbedrohlicher akuter infektiologischer Erkrankungen, wie Covid-19, sind aktuell aus ärztlicher Sicht rechtlich absehbar.

2. Fragliche Effektivität eines „Pooling“ in der humanmedizinischen Routineversorgung: Aufwand in der Koordination und möglicher Zeitverlust bis zur Diagnosefindung

Die angenommene Optimierung der Effektivität konnte bisher im Routineeinsatz nicht nachgewiesen werden. Wissenschaftliche Aussagen sind bisher limitiert auf Studien in einzelnen medizinischen Laboren in begrenztem Umfeld (Klinik, Region) sowie in der Veterinärmedizin oder Transfusionsmedizin auf definierte und abgegrenzte Untersuchungsgruppen unter nur hierfür bestehenden fachlichen und rechtlichen Vorgaben. Diese Beschaffenheit eines begrenzten Umfelds ermöglicht jeweils leichter die Organisation einer einheitlichen Entnahme- und Versandsituation. Dieses begrenzte Umfeld ist in der breiten labormedizinischen Routineversorgung nicht gegeben. Der Koordinationsaufwand ist dadurch um ein vielfaches höher. Aufgrund von Lieferengpässen sind beispielsweise unterschiedlichste Entnahme- und Versandmaterialien im Einsatz in der Routineversorgung für die Individualtestung. Ein Pooling wäre daher auch in der Routineversorgung nur in definiertem Umfeld begrenzter Einrichtungen (Betriebe, Pflegeheime) vorstellbar. Unterschiedliche Ausgabeprozesse von Entnahme- und Versandmaterial nach unterschiedlichen Fragestellungen je nach Umfeld erhöhen allerdings die Komplexität und den Aufwand für Koordination bei der Materialausgabe und beim Materialeinsatz am Patientenbett.

Eine Steigerung der Effektivität durch das Pooling kann nur in Bezug auf Teilschritte der Analytik gelten. Im Wesentlichen ist dies eine Einsparung von Reagenzien der PCR. Andere Teilschritte der Analytik, insbesondere einerseits der Probenvorbereitung mit Herstellung von Rückstellproben und gemischten Probenpool sowie andererseits zeitlich verzögerter Aufschlüsselung aus den Rückstellproben, stellen einen deutlich erhöhten prozessualen Aufwand dar. Dies bewirkt entsprechende Kostensteigerungen. Gerade im Fall einer positiven Testung ist auch aus infektiologischer Sicht die Zeit bis zur

Befundübermittlung ein wesentlicher Punkt. Eine Zweittestung der aufgeschlüsselten Rückstellproben aus dem Probenpool stellt in jedem Fall einen Zeitverlust dar. Sollte aus den Rückstellproben keine Reproduzierbarkeit des Ergebnisses möglich sein, so wäre eine erneute Abstrichentnahme bei allen Individuen der Poolprobe notwendig. Dieser Zeitverlust kann auf jeden Fall auch Patientengefährdung bedeuten. Aufgrund der Komplexität des Prozesses ist eine abschließende Bewertung der Effektivität aktuell nicht seriös und noch nicht sicher möglich.

Ein Hinweis auf fragliche Effektivität könnte der in der Früherkennung von Chlamydieninfektionen aus Urinproben (auch gemäß EBM in der Abrechnung bei GKV-Patient*innen) zulässige Einsatz des Pooling geben. Zahlreiche medizinische Routinelabore haben dort das Pooling zugunsten der Individualtestung aus verschiedenen Gründen wieder aufgegeben bzw. in vielen medizinischen Routinelaboren wurde diese Methode auch überhaupt nicht eingeführt (siehe oben).

3. Keine Erfahrung für Poolingmethoden in humanen Populationen im Rahmen einer überregionalen Pandemie und deren Verlaufsmöglichkeiten

Wissenschaftliche Publikationen verweisen darauf, dass das Stadium einer Pandemie ein wesentlicher Einflussfaktor für die Auswahl der richtigen Poolingstrategie ist. Als wesentlich wird die situative Anpassung des Poolings auf die jeweilige Situation beschrieben. Praktische Erfahrungen bestehen hierzu nicht. Die Annahmen zu den jeweiligen Poolingstrategien basieren auf rechnerischen Annahmen. Für die Patientenversorgung kann daher aktuell abschließend aus ärztlicher Sicht keine Empfehlung für eine richtige Poolingstrategie für alle Phasen einer Pandemie gegeben werden. Wissenschaftlich wird eine Evaluation für jede mögliche Pandemiephase in entsprechenden Publikationen eingefordert. Eine Übersicht zu aktuellen Publikationen zum Thema mit wissenschaftlicher Beurteilung gibt **Anlage 1**.

4. Begrenzte Verfügbarkeit von Entnahme- und Versandmaterial

Der erhöhte Bedarf von Materialien in diesem Bereich durch Poolingverfahren muss in jedem Fall Berücksichtigung finden, um nicht durch Engpässe Einschränkungen in der Versorgung herbeizuführen.

5. Patientengefährdung durch Probenverwechslung

Fehler in der Präanalytik – von der Entnahme über die Identifikation und Vorbereitung bis zur Verteilung der Einzelprobe – können zu Probenverwechslungen, falsch negativen oder falsch positiven Analyseergebnissen und/oder falschen Zuordnungen von Ergebnissen zu individuellen Patient*innen führen. Ein geordneter und möglichst einfach organisierter Prozess minimiert an dieser Stelle die Häufigkeit von Fehlern.

Zwischenschritte in der Analytik mit einer Aliquotierung (Aufteilung) von Probenmaterial in Sekundärröhrchen können, selbst wenn eine identische Barcodierung Verwendung findet, ebenfalls ein Risiko für Patientenverwechslung darstellen. Ein händisches Probenpooling ist aus Sicherheitsgründen abzulehnen. Die Einführung maschineller und IT-gestützter Verfahren bedeutet finanzielle Investitionen für die medizinischen Labore.

Originalproben sind in der Regel barcodiert. In den meisten Fällen können diese Originalproben automatisiert abgearbeitet werden. Ist dies – wie bei den meisten Poolingverfahren – nicht möglich,

wird ein Sekundärröhrchen mit dem entsprechenden Barcode beklebt. Die Probenverfolgbarkeit und Patientenidentifizierbarkeit bleibt voll erhalten.

Beim Pooling verlässt man mit dem Probengemisch das System des vorgelegten, eindeutigen Barcodes einer Individualprobe und generiert eine neue Mischprobe. Eine eindeutige Probenidentifizierung ist nicht mehr möglich. Die Verfolgbarkeit kann über externe Dokumentation erfolgen. Dies ist grundsätzlich möglich, kostet aber Zeit und kann Patientengefährdung durch Probenverwechslung herbeiführen.

6. Sensitivitätsverlust und die Möglichkeit von Patientengefährdung aufgrund falsch negativer Ergebnisse

Der Einsatz großer Pools auf der Grundlage von flüssigen Gemischen geht mit einem Sensitivitätsverlust durch Probenverdünnung einher. So ist bei einem 30er Pool ein Verlust über 5 Ct-Werte zu erwarten. Dies würde dazu führen, dass ein relevanter Anteil von an sich positiven Proben nicht mehr erkannt werden würde. Es würden dadurch falsch negative Befunde entstehen, die in Einzelmessung erwartungsgemäß und richtigerweise positive Ergebnisse erzeugt hätten (bis zu etwa 30%; Grundlage Ct-Verteilung Ingelheimer bzw. Geesthachter Kollektiv). Alle bisherigen Publikationen zum Thema Pooling verweisen auf diese Möglichkeit durch Pooling schwach positive Proben zu übersehen.

Die entscheidende Frage ist: welcher Sensitivitätsverlust wäre klinisch zu akzeptieren und im Sinne des primär wirtschaftlichen Ziels der Kostenersparnis dann medizinisch-ärztlich zu rechtfertigen? Mit welcher Wahrscheinlichkeit werden durch Poolingverfahren beginnende Infektionen übersehen? Entscheidend hierbei ist die weitere Beschreibung des Verlaufs der Viruslast betroffener Patienten in Studien. Auch wenn angenommen werden kann, dass bei Covid-19 relativ schnell mit beginnenden Symptomen eine hohe Viruslast im Patienten entsteht, so kann aktuell keine abschließende Aussage zur Viruslast asymptomatischer Patient*innen in der Inkubationszeit oder Frühphase der Infektion mit SARS-CoV-2 vorgenommen werden.

Wichtig bleibt bei dieser Beurteilung, dass die mittels PCR gemessene Viruslast (anders als bei Blut- oder Urinproben) aus Abstrichtupfern nicht auf die reale Viruslast im Patienten schließen lässt. Hierzu spielt bei Abstrichen, wie bereits dargestellt, die Qualität der Abnahme eine zu bedeutende Rolle. Für Reihenuntersuchungen in Pflegeheimen gilt dabei im Fall von psychisch eingeschränkten oder dementen Patient*innen die besondere Schwierigkeit einer korrekten Probenentnahme. Somit bleibt die Frage der Übertragungswahrscheinlichkeit bei einer im Abstrich nachgewiesenen geringen Virusmenge weiterhin nicht geklärt, da es keine belastbaren Daten zwischen der im Abstrich aufgenommenen Virusmenge und der tatsächlich vorhandenen Virusmenge im Patienten gibt. Zudem ist bei der einmaligen Untersuchung nicht in jedem Fall zu klären, ob sich der Untersuchte am Anfang oder eher am Ende des individuellen Infektionsverlaufes befindet.

Weiterhin besteht auch eine gewisse Beeinflussbarkeit der Sensitivität in offenen Gerätesystemen durch subjektive Beurteilungsschritte. Dies gilt es auch bei der vergleichenden Bewertung von wissenschaftlichen Daten zu berücksichtigen. Bisher werden unterschiedliche PCR-Verfahren zur Labordiagnostik des Coronavirus SARS-CoV-2 verwendet. Dies schützt auch in gewissem Maße vor Lieferengpässen in Bezug auf Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.

Allerdings sind die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)-Analysen in Bezug auf Teilaspekte der Methodik nicht normiert. Beispielsweise können Differenzen je nach Methode und subjektiver Erfahrung des Untersuchers in der Erstellung der Ct-Werte bestehen. Der Ct-Wert, abgekürzt für engl. *threshold*

cycle ist eine theoretische Größe, die den Anfang des exponentiellen Wachstums einer Kurve beschreibt. Die Größe spielt vor allem für die Quantifizierung des Viruserbguts als Nukleinsäure während einer *real time* quantitativen PCR eine Rolle. Hier beschreibt der Ct-Wert den Teil der Kurve, in dem die Fluoreszenz der Reaktion erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Je mehr Nukleinsäure vor der PCR in der Probenlösung vorlag, desto mehr Kopien entstehen in den wiederholten Zyklen der Methode und umso schneller kommt es zu Fluoreszenzsignalen, und dementsprechend eher übersteigt die Fluoreszenz den Schwellenwert. Ein Vergleich des Ct-Wertes zweier Proben zeigt, welche vor der Amplifikation mehr Viruserbgut enthielt, vorausgesetzt beide Reaktionen erfolgten mit gleicher Effizienz. In der Beurteilung können auf Basis unterschiedlicher PCR-Methoden allerdings „schwach“ positive Proben von Patient*innen unterschiedliche Viruslast bedeuten. Dies erschwert die Bewertung von Methoden gerade in dieser kritischen Patientengruppe.

Die Sensitivität des Virus-Direktnachweises kann zudem durch Inhibitoren der PCR-Reaktion in einer Patientenprobe bis hin zur fehlenden Nachweisbarkeit negativ beeinflusst werden. Das Vorhandensein eines Inhibitors in einer Einzelprobe muss daher immer zur Auflösung / Aufschlüsselung aller Einzelproben eines Pools führen.

7. Testauflösung /-schlüsselung und die Gefahr fehlender Reproduzierbarkeit für individuelle Befundergebnisse

Bei Verwendung kleinerer Pools auf Grundlage von „Tupfer-Pools“ ist die Aufschlüsselung / Auflösung (Nachtestung der Einzelproben) eines positiven Pools nicht mehr möglich, da das Primärmaterial komplett in den Pool überführt wurde.

Somit muss für alle Pool-Patienten ein Verdacht auf eine Infektion ausgesprochen werden und alle Pool-Patienten müssen durch eine neue Probennahme einzeln getestet werden. In der Nachtestung darf kein Patient fehlen. Die Patienten/Probanden müssten für die Zeit in Quarantäne genommen werden, da potentiell infektiös, oder es müssten schon primär zwei Abstriche/Proband genommen werden und diese durch die Einsender entsprechend gekennzeichnet oder im Labor einem separaten System zugeführt werden. Dies bedeutet einen Zeitverlust und zusätzliche Kosten.

Im Fall der alternativen FACT-Methode bestehen möglicherweise diese Einschränkungen nicht. Dieses Poolingverfahren wurde allerdings, auch wenn es bereits zuvor im Rahmen anderer Fragestellungen in verschiedenen Laboren zur Anwendung kam, im Zusammenhang mit der Corona-Pandemie zur Patentanmeldung gebracht. Abschließend kann daher die Verwendung dieser Methode nicht ohne weitere Prüfung von Kosten und möglicherweise im Rahmen der Nutzung entstehender Pflichten in medizinischen Laboren zum Einsatz gebracht werden.

Im Fall einer nicht eindeutigen Aufschlüsselung verbleibt bei jeder Poolingmethode die Möglichkeit, dass ein positives Testergebnis des Probengemischs in der Individualtestung nicht unmittelbar nachvollzogen werden kann. Dieses Risiko ist für Rückstellproben geringer anzunehmen als für parallel entnommene Zweitproben. Das Risiko der fehlenden Reproduzierbarkeit des Laborergebnisses ist nochmal deutlich höher bei einer zeitlich versetzten zweiten Abstrichentnahme. Der kritische Punkt wiederholter Abnahmen und ihrer Vergleichbarkeit bleibt damit die niemals identische Abstrichqualität bei der Probenentnahme.

8. Mögliche Verzögerungen in der Meldepflicht von Infektionserkrankungen

Aus dem vorherigen Punkt 7 kann sich eine Meldepflicht für eine positive Pool-Probe ergeben, die nicht aufgelöst werden kann mit entsprechenden Auswirkungen auf die Meldepflicht. Somit müsste zeitnah jeder Patient aus dem positiven Pool als Verdacht an das zuständige Gesundheitsamt gemeldet werden. Eine Gruppenmeldung ist gemäß Infektionsschutzgesetz nicht vorgesehen. Die Folgen in Bezug auf individuelle psychische Belastung und Gefährdung der Gesundheit des Einzelnen sind aktuell nicht abzuschätzen. Die Gruppenquarantäne und Gefährdung ganzer Populationen wie im veterinärmedizinischen Umfeld kommt aus ärztlicher Sicht nicht in Betracht.

Die auf das Einzelwohl ausgerichtete ärztliche Patientenversorgung in der Humanmedizin erfordert es daher, Schaden abzuwenden und unter Berücksichtigung der gesetzlich vorgeschriebenen Orientierung am Stand von Wissenschaft und medizinischem Fortschritt, qualitätsgesicherte Verfahren in der Diagnose und Behandlung von Krankheiten anzuwenden.

Zusammenfassung

Aus ärztlicher Sicht ist aktuell der Einsatz einer Gruppentestung (eines Probenpoolings) im Rahmen einer andauernden Pandemie mit noch offener Entwicklung bei noch vielen offenen technischen, rechtlichen und ethischen Fragen nicht ohne Weiteres in der medizinischen Routineversorgung von Patient*innen anwendbar. Produkt- und Arzthaftungsfragen lassen das unkritische Anwenden von Pooling-Protokollen als hoch-risikoreich erscheinen. Eine flächendeckende Anwendung in humanmedizinischen Facharztlaboren kann vor diesem Hintergrund nicht empfohlen werden.

Die Individualtestung ermöglicht bereits eine effektive Patientenversorgung auch unter besonderer Berücksichtigung gefährdeter Risikogruppen. Jede Erhöhung der Komplexität im etablierten Prozess dieser Versorgung erhöht das Risiko in noch unbestimmter Weise für aktuell nicht vorhersehbare Ereignisse.

Gruppentestungen sollten daher ausschließlich in definierten Studiensituationen auch unter Beachtung der Heterogenität der in der Routine verwendeten Entnahmesysteme weiterentwickelt und erforscht werden. Ein Einsatz in der Routineversorgung von Menschen und insbesondere die „Vermarktung“ solcher Konzepte durch rein gewerbliche und nicht fachärztlich geführte Labore ist aktuell abzulehnen.

Die über den erzielbaren verminderten Reagenzverbrauch erwirtschaftbaren Kostenvorteile werden durch die mit dem Poolen verbundenen deutlich erhöhten Organisations- und Prozesskosten mehr als verbraucht, so dass unter dem Gesichtspunkt eine Vollkostenbetrachtung hier keine signifikante Effizienzsteigerung zu erwarten ist.

Bei fehlendem Kostenvorteil bleibt der unstrittige Verlust an diagnostischer Sensitivität einer PCR-Untersuchung, der insbesondere im Umfeld der Untersuchung von Risikopopulationen nicht wünschenswert sein kann.

Anlage 1

zum Positionspapier „Pooling“ (Gruppentestung) zum PCR-Direktnachweis des Coronavirus SARS-CoV-2 vom 14. Mai 2020

Sichtung wissenschaftlicher Publikationen zum Thema SARS-CoV-2 und Pooling

Bei einer PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) Recherche am 13.05.2020 wurden zusätzlich zu dem von Lohse et al. publizierten Letter vier Publikationen gefunden.

Hogan et al fanden in 2 positive Proben von 2888 Abstrichproben und BALs, die in insgesamt 292 Pools untersucht wurden. Es wurde keinerlei Vergleiche mit den Einzelproben mitgeteilt. Daher lässt die Arbeit keine Rückschlüsse auf einen etwaigen Sensitivitätsverlust durch die Poolingstrategie zu. Die Publikation belegt lediglich, dass man in Poolingproben positive Proben erhalten kann, aber liefert keine Anhaltspunkte ob dieser Ansatz bezüglich der Sensitivität medizinisch und diagnostisch vertretbar ist.

Abdalhamid et al. fanden durch Modelling ein optimale Poolgröße von 5 Proben. Es wurden 25 experimentelle Pools aus einer positiven (durchschnittliche Ct-Werte der Einzelproben 26 mit SD 5.5. Cutoff Ct 40) und 4 negativen Abstrichproben untersucht. Bei allen war der Ct-Wert der Pools höher (bis zu 5 Ct-Werte) als in den Einzelproben; dies entspricht durchweg dem durch Verdünnung erwartbaren Sensitivitätsverlust. Zusätzlich wurden 60 Abstrichproben in 12 Pools untersucht. 2 dieser Pools waren positiv; die Auflösung der Pools ergab zwei positive Proben ohne Ct-Wert-Angaben.

In dieser Studie hatten die Proben insgesamt vergleichsweise unkritische Ct-Werte bezüglich der Sensitivität. Bei Proben mit höheren Ct-Werten können keine Aussagen gemacht werden. Es gibt keine Information über Ct-Wertverteilung in den klinischen Proben im Casemix der Untersucher. Deshalb ist eine Abschätzung bezüglich des Sensitivitätsverlusts und damit eines möglichen Einsatzes in der Routinediagnostik nicht möglich.

Yelin et al. untersuchten RNA-extrakte von individuellen, positiven Proben mit negativen RNA-Extrakten in Pools von 2, 4, 8, 16, 32, 64. Positive Proben im Casemix hatten einen Ct-Wert von 25.5 +/- 6.1. Die für die Untersuchung ausgewählten 5 Proben hatten durchschnittliche Ct-Werte von 24.5 +/- 3.1, waren in der Gesamtpopulation also eher stärker positiv. In den Pools kam es zu einer erwartbaren Erhöhung der Ct-Werte in Abhängigkeit von der Verdünnung. Bis zum 16er Pool waren alle Pools positiv, bei den 32er Pools waren 4/5 positiv.

Für drei positive Proben (höchster Ct-Wert 31.8) wurden die Originalproben mit jeweils 7 negativen Proben gepoolt und erst dann die RNA extrahiert (8er Pools). Alle Pools wurden positiv. Es wurde ein Sensitivitätsverlust von 2.4+/-0.11 bis 3.6 +/- 2.1 Ct-Werten je nach amplifiziertem Gen beobachtet.

Die in dieser Studie verwendeten Proben hatten insgesamt vergleichsweise unkritische Ct-Werte bezüglich der Sensitivität. Bei Proben mit höheren Ct-Werten können keine Aussagen gemacht werden. Es gibt keine Information über Ct-Wertverteilung in den klinischen Proben. Pools wurden in der Studie im Wesentlichen aus den RNA-Extrakten gebildet. Dies ist im Routinelabor mit dem häufig verwendeten Roche Cobas System (etwa 30% der Anwender im INSTAND Ringversuch) vollständig unpraktikabel.

Torres et al. verwendeten Abstrichproben, die in 3 ml Transportmedium ausgewaschen und dann bei – 80 °C gelagert wurden. 10 positive Proben (Ct-Werte range 23.4 bis 38.8 (E-gene) und 21.8 bis 35.8 (RdRP-gene) wurden mit negativen Proben in simulierten 5er und 10er Pools gemischt. Die positiven Proben stammten von ambulanten Patienten mit frischer (<6 Tage) milder Symptomatik. Die Ct-Werte wurden entsprechend der Verdünnung höher. Die Pools wurden positiv, solange die Ct-Werte der positiven Einzelproben < 32 (E

gene) bzw. < 35.2 (RdRP gene) waren. Insgesamt wurden aber in diesem Ansatz 30% bzw. 40% der Pools nicht als positiv detektiert.

Diese Studie reflektiert die klinische Realität eines Screening-Approaches mit einem erheblichen Anteil von Proben mit geringer Viruslast. **Bei solchen Proben kommt es durch den Pooling-Ansatz zu einem klinisch relevanten Sensitivitätsverlust mit insgesamt 30-40% falsch negativen Proben.**

Lohse et al. stellten aus E-Swabproben 30er Pools her, wobei die Grundgesamtheit in 5er Pools zusammengeführt wurden, die dann in 30er Pools kombiniert wurden. Die Ct-Verteilung der Proben ist 22-29 (E-Gen) und 21-29 (S-Gen). In keinem der positiven Pools mit nur einer positiven Probe wurde eine Ct-Wert Absenkung im Pool detektiert (Abb. 1 A und B). Das ist in komplettem Gegensatz zu der Beobachtung von gespickten Pools mit positiven Proben mit Ct-Wert grösser 30 (n=3), bei denen die Pools alle eine erhebliche Ct-Wertabsenkung detektiert wird. Die Autoren machen hierfür einen Carriereffekt verantwortlich.

Bei den klinischen Proben wird auch in dieser Studie eine der Verdünnung proportionale Absenkung der Ct-Werte (bis zu 5 Ct-Werte) berichtet. Die Autoren postulieren bei Proben mit geringer Viruslast einen positiven Effekt des Poolings durch Carriereffekte, die einen positiven Nachweis trotz Verdünnung ermöglichen würden. Dies erfordert mindestens experimentelle Bestätigung an einer relevanten grösseren Stichprobe. In keiner der anderen Studien, so wie auch bei den klinischen Proben in dieser Studie wurde ein solcher Effekt beobachtet und ist deshalb höchst zweifelhaft.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Ct-Wertverteilung in den verschiedenen Studien eher zu höheren Viruslasten verteilt war. Alle Studien zeigen eine der Verdünnung entsprechende Erhöhung der Ct-Werte um bis zu 5 Stufen. In der klinischen Situation der Testung von gering symptomatischen bis asymptomatischen ambulanten Patienten am ehesten entsprechenden Untersuchung von Torres et al. kam es zu bis zu 40% falsch negativen Befunden. Aus diesen Fakten lässt sich ableiten, dass Pooling beim Screening von Patienten und Probanden auf SARS-CoV-2 nicht ausreichend wissenschaftlich belegt ist, um aus medizinischer und diagnostischer Sicht die Anwendung eines solchen Prinzips in der Routinediagnostik zu empfehlen. Im Gegenteil muss man annehmen, dass es durch Pooling in einem Casemix von Probanden und Patienten mit geringer Viruslast in Oropharynxabstrichen zu einer unverträglich grossen Zahl falsch negativer Befunde kommen könnte.

Literatur

Assessment of Specimen Pooling to Conserve SARS CoV-2 Testing Resources.

Abdalahamid B, Bilder CR, McCutchen EL, Hinrichs SH, Koepsell SA, Iwen PC.
Am J Clin Pathol. 2020 May 5;153(6):715-718. doi: 10.1093/ajcp/aqaa064.

Sample Pooling as a Strategy to Detect Community Transmission of SARS-CoV-2.

Hogan CA, Sahoo MK, Pinsky BA.

JAMA. 2020 Apr 6. doi: 10.1001/jama.2020.5445. [Epub ahead of print] No abstract available.

Pooling of samples for testing for SARS-CoV-2 in asymptomatic people

Lohse S†, Pfuhl T†, Berkó-Göttel B, Rissland J, Geißler T, Gärtner B, Becker BL, Schneitler S, *Smola S.
Lancet Infect Dis 2020 Apr 28 [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30362-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30362-5)

Pooling of Nasopharyngeal Swab Specimens for SARS-CoV-2 detection by RT-PCR.

Torres I, Albert E, Navarro D.

J Med Virol. 2020 May 5. doi: 10.1002/jmv.25971. [Epub ahead of print]

Evaluation of COVID-19 RT-qPCR test in multi-sample pools.

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.
Clin Infect Dis. 2020 May 2. pii: ciaa531. doi: 10.1093/cid/ciaa531. [Epub ahead of print]

Preprints

Aufgrund der aktuellen Pandemie können weltweit wissenschaftliche Arbeiten zum Thema Covid-19 oder SARS-CoV-2 auch als sogenannte **“Preprints”** (<https://www.medrxiv.org/>) öffentlich vorgestellt werden. Zur Einordnung der Verwendung der Inhalte wird auf der Webseite ein Hinweis gegeben. Die rote Hervorhebung entspricht der Originaldarstellung.

Caution: Preprints are preliminary reports of work that have not been certified by peer review. They should not be relied on to guide clinical practice or health-related behavior and should not be reported in news media as established information.

Efficient prevalence estimation and infected sample identification with group testing for SARS-CoV-2.

Brian Cleary^{1,*†}, James A. Hay^{2,*}, Brendan Blumenstiel¹, Stacey Gabriel¹, Aviv Regev^{3,4,5,†}, Michael J. Mina^{1,2,6,7,†}

medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.20086801>.this version posted May 6, 2020.

FACT- Frankfurt adjusted COVID-19 testing- a novel method enables high-throughput SARS-CoV-2 screening without loss of sensitivity.

Michael Schmidt, MD¹, Sebastian Hoehl, MD², Annemarie Berger, PhD², Heinz Zeichhardt, MD³, Kai Hourfar, MD¹, Sandra Ciesek, MD^{2,4*}, Erhard Seifried, MD^{1*}

medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.28.20074187>.this version posted May 1, 2020.