

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ОБЪЕДИНЕННЫХ (ПУЛИРОВАННЫХ) ОБРАЗЦОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИЯХ НА НАЛИЧИЕ РНК ВИРУСА SARS-COV-2 МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Ольховский И.А. – член рабочей группы ФЛМ по лабораторной диагностике COVID-19, директор Красноярского филиала ФГБУ «НМИЦ гематологии Минздрава РФ, Президент РОО «Красноярская краевая ассоциация МедЛабДиагност»;

Гущин В.А. – член рабочей группы ФЛМ по лабораторной диагностике COVID-19, руководитель референс-центра по коронавирусной инфекции и лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов Национальный Исследовательский Центр Эпидемиологии и Микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России;

Кузнецова Н.А. – старший научный сотрудник лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов Национальный Исследовательский Центр Эпидемиологии и Микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России

Рубальский О.В. - руководитель центра поддержки технологий и инноваций, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России

Введение (постановка проблемы)

Научные данные свидетельствуют о том, что вирус SARS-CoV-2, вызвавший пандемию коронавирусной инфекции COVID19, передается прежде всего от человека к человеку при непосредственном контакте и реже опосредованно путем переноса вируса с контаминированных поверхностей на слизистые. Проявления инфекции SARS-CoV-2 варьируют от легкой степени до тяжелой. При этом легкое течение может не иметь специфических признаков по которым можно отличить инфицирование SARS-CoV-2 от других ОРВИ, а у многих людей инфицированных SARS-CoV-2 симптомы совсем не появляются не смотря на положительные ПЦР-тесты. Считается, что риск передачи от бессимптомных случаев довольно высокий, достигая 48% и 62% случаев заражений [1], что по-видимому может приводить к существенному объему не задокументированной передачи вируса [2]. Можно с уверенностью полагать, что значительная доля передачи инфекции происходит до начала клинических проявлений болезни [3]. Накопленные к сегодняшнему дню данные свидетельствуют об обнаружении РНК SARS-CoV-2 у людей как минимум за 1-3 дня до появления симптомов. При этом самая высокая вирусная нагрузка, измеренная методом ОТ-ПЦР, наблюдается с момента появления первых симптомов и до 5-го дня болезни; что объясняет более эффективное распространение SARS-CoV-2 по сравнению, например, с другими респираторными инфекциями, в том числе SARS-CoV и MERS-CoV. Это имеет важные последствия для противодействия передаче SARS-CoV-2 и подчеркивает важность раннего выявления случаев заболевания и оперативной изоляции потенциального источника инфекции [3,4]

Продолжительность выявления РНК SARS-CoV-2 обычно составляет 1-2 недели для бессимптомных лиц и до 3 и более недель для пациентов с легким или умеренно-тяжелым течением заболевания. У пациентов с тяжелой формой протекания заболевания COVID-19 выявление РНК SARS-CoV-2 может быть существенно более продолжительным. Следует также отметить, что обнаружение вирусной РНК не обязательно означает, что человек заразен и способен передавать вирус другому человеку.

Информацию о продолжительности выделения вируса SARS-CoV-2 у пациентов с различным течением можно также найти в руководящем документе ВОЗ «Критерии освобождения пациентов с COVID-19 из изоляции» [5].

Вместе с тем до сих пор отсутствуют однозначные данные о связи конкретного уровня вирусной нагрузки со степенью риска передачи инфекции. Опубликованные результаты изучения зависимости инфицирования чувствительных клеточных культур от количества вируса в пробах пациентов, демонстрируют снижение до 3% инфекционности проб при детекции продукта позже 30 цикла амплификации в тестах ПЦР-РВ [6]. Наблюдения за низким риском инфицирования окружающих от выздоравливающих пациентов подтверждают данные экспериментов *in vitro*. Вместе с тем, полученные на культурах клеток результаты не могут быть прямо перенесены на показатели контагиозности контактов между людьми. Поэтому предполагается, что человек с любым позитивным ПЦР тестом является потенциально опасным для окружающих, хотя вероятность передачи вероятно будет больше все же именно у людей, имеющих большее выделение вируса.

Не вызывает сомнения, что своевременное выявление инфицированных людей, которые могут распространять SARS-CoV-2, чрезвычайно важно, поэтому общепризнанным подходом для замедления эпидемического процесса является применение массового тестирования с последующим обязательным применением противоэпидемических мероприятий. Отсутствие эффективного послетестового консультирования пациентов и своевременного наложение карантинных ограничений нивелирует профилактическую эффективность тестирования. В то время как адекватно выстроенная система скрининга и профилактических мероприятий позволит избирательно ослаблять меры по физическому дистанцированию людей в условиях пандемии, а значит снижать нагрузку на здравоохранение с одной стороны, а с другой гибко регулировать экономическую активность людей.

Проведение массовых скринингов с целью выявления SARS-CoV-2 у людей с бессимптомным течением заболевания считается наиболее эффективной стратегией сдерживания эпидемии, но при этом достаточно трудоемким и затратным мероприятием. При этом опыт ряда организаций, развернувших регулярное скринговое ПЦР-тестирование сотрудников (1 - 2 раза в неделю) демонстрирует успешность такого подхода для эффективного контроля заболеваемости персонала и обеспечения эффективной производственной деятельности в условиях пандемии.

Вместе с тем возможности быстрого наращивания объемов тестирования ограничены материальной базой лабораторий, недостатком квалифицированных кадров, недоступностью и долгими сроками поставки расходных материалов, что приводит к увеличению сроков получения результатов и снижению эффективности противоэпидемических мероприятий.

Одним из подходов к повышению эффективности и наращиванию объемов тестирования в условиях ограниченных ресурсов лабораторий во многих странах даже с высоким уровнем финансирования здравоохранения рассматривается объединение отдельных образцов биоматериала от нескольких пациентов (пулирование) при ПЦР-исследованиях с целью обнаружения РНК SARS-CoV-2.

Целью настоящего документа является анализ накопленного опыта применения пулирования образцов при ПЦР-исследовании для выявления РНК вируса SARS-CoV-2, а

также оценка возможных преимуществ и рисков в условиях деятельности российских лабораторий.

Зарубежный опыт

Возможность использования технологий пулирования образцов при диагностике COVID-19 допускается руководящими документами ВОЗ [7] при тестировании контингентов с низкой распространенностью инфекции и выполнении предварительной валидации конкретных технологических решений.

Так, использование алгоритмов пулирования позволило провести массовое тестирование 10 миллионов человек за 2 недели в Ухани (Китай) в мае 2020 г. При проведении тестирования образцы от 2,3 млн человек пулировались по 5 образцов от разных людей, таким образом были выявлены 56 инфицированных SARS-CoV-2. Этот метод наиболее эффективен при низкой распространенности инфекции – около 1%.

Данные показывают, что объединение до 30 образцов в пул может увеличить возможности тестирования без приобретения дополнительного оборудования и тест-наборов обнаруживая положительные образцы с достаточной диагностической точностью. При этом показано что погранично положительные единичные образцы могут не обнаруживаться в больших пулах, что обычно наблюдалось у выздоравливающих пациентов на 14–21 день симптоматической инфекции. Поскольку выделение вируса после 14 дня нетяжелой инфекции COVID-19 гораздо менее опасно для окружающих по сравнению с первыми днями заболевания, считается что потеря таких образцов при скрининге не критична по влиянию на эпидемиологический процесс. Размер пула может соответствовать различным сценариям заражения и может быть оптимизирован в соответствии с ограничениями инфраструктуры [8].

Размещенный на сайте U.S. Food and Drug Administration (FDA) текст признает, что «объединение образцов в пулы - важный инструмент общественного здравоохранения, поскольку он позволяет быстро пройти тестирование большему количеству людей, используя меньше ресурсов. Поскольку образцы объединены в пулы, ожидается, что в целом будет выполняться меньше тестов, а это означает, что будет использоваться меньше расходных материалов, однако это также позволяет вовлекать в обследование более многочисленные контингенты и позволяет пациентам быстрее получать свои результаты. Хотя существует опасение, что объединение образцов может затруднить обнаружение положительных результатов, поскольку объединение в лаборатории разбавляет любой вирусный материал, присутствующий в образцах, данные валидации наборов демонстрируют, что тесты правильно идентифицировали все объединенные образцы, содержащие положительный образец.» [9].

В ходе исследования, проведенного Еврейским университетом Хадасса, было проанализировано 133 816 образцов объединенных в 17 945 пулов, размерами по 5 или по 8 образцов. В целом удалось сэкономить 76% реакций ПЦР по сравнению с индивидуальным тестированием с приемлемым снижением чувствительности [10].

Австралийские исследователи оценили чувствительность теста Cepheid Xpert® Xpress SARS-CoV-2 RT-PCR (Cepheid, США) для выявления РНК SARS-CoV-2 в пулах из 4 и 6 образцов. Для создания пулов были использованы клинические образцы, содержащие SARS-CoV-2 и отрицательные образцы. Результаты работы показали, что объединение по 4 или 6 образцов практически не влияет на чувствительность теста [11]

В другом исследовании оценивается эффективность протокола пулирования, в котором образцы объединяются после экстракции РНК с использованием набора 2019-nCoV CDC EUA (IDT, США). Тестирование 114 образцов, объединенными в 38 пулов (по 3 образца) не выявило существенных различий по чувствительности анализа между пулом и индивидуальными образцами [12].

Хотя предполагается, что пулирование образцов эффективно только для групп населения с уровнем инфицирования ниже 5%, теоретически даже при уровне заражения 10% объединение образцов можно использовать для уменьшения количества необходимых тестов примерно на 40% (по сравнению с индивидуальным тестированием). Хотя большие пулы являются наиболее предпочтительными для тестирования популяций с очень низким уровнем заражения, предполагается, что размер пула менее 10 является почти оптимальными в широком диапазоне уровней инфицирования. [13].

Вопросы внедрения пулирования образцов в широкомасштабный скрининг в США обсуждались на недавнем вебинаре, запись которого представлена по ссылке <https://www.darkdaily.com/webinar/pooled-testing-what-your-lab-needs-to-know-about-managing-a-fall-winter-surge-in-the-covid-19-pandemic/>.

Следует обратить внимание на предлагаемое программное обеспечение логистики и автоматизации разделении выборок пациентов, образцы которых могут вовлекаться в технологию пулирования. Предложенное решение позволяет уже на этапе регистрации направления автоматически формировать маршрутизацию образца и в случае положительного результата в пуле - выделяет его исходные образцы для повторного тестирования в индивидуальном порядке. Использование программы практически полностью гарантирует проблемы перепутывания проб и «распулирования».

Более того, использование программного обеспечения позволяет фиксировать место и время взятия образца и отслеживать временных интервалов на всех этапах транспортировки и выполнения анализа до передачи результата в электронную карту пациента.

Наиболее полное изложение вопросов использования пулирования проб в практике деятельности клинических лабораторий представлено в недавней публикации [14]. Авторы выделяют пять основных критериев пригодности аналитов для технологии пулирования проб и пять основных шагов практического внедрения данных технологий.

Отечественный опыт.

В Российской Федерации в настоящее время отсутствуют диагностические тест системы допущенные в официальном порядке для выполнения тестов в пулированных образцах.

Предварительные данные, полученные в отдельных лабораториях и озвученные при обсуждении вопроса членами рабочей группы ФЛМ продемонстрировали, что пулирование небольшого количества проб (от 2 до 10) позволило своевременно выполнять исследования и обеспечить необходимые объемы тестирования в условиях чрезвычайно напряженной ситуации с материальным обеспечением деятельности лабораторий на начальном этапе развития эпидемии. Применение пулирования в группах пациентов, при обследовании которых доля положительных результатов не превышает

5%, и при объединении не более 3 образцов от разных пациентов, не привела к значительному снижению эффективности лабораторной диагностики, позволило снизить нагрузку на лабораторию и затраты на обследование таких групп.

Принципы методик и алгоритмы пулирования образцов биоматериала

На сегодняшний день подробно описаны несколько алгоритмов пулирования проб, применение которых позволяет проводить масштабные скрининговые исследования. Пулировать можно как исходные образцы (назальные и ротоглоточные мазки) так и выделенную из образцов РНК. Все описанные ниже алгоритмы могут быть использованы для приготовления объединённых проб как исходных образцов, так и РНК.

Две схемы одинарного пулирования образцов предложены Дорфманом в 1943 году.

При использовании **первого метода** смешивается равное количество образцов и тестируется один раз, затем каждый образец из положительного пула тестируется индивидуально. В отрицательных пулах все образцы считают отрицательными. Схема пулирования на рисунке 1А.

Второй метод пулирования более сложный и включает добавление дополнительного раунда пулирования. Смешивается равное количество образцов и тестируется (1 раунд пулирования), затем положительный пул разбивается на дополнительные пулы и тестируется (2 раунд пулирования), после чего каждый образец из положительного пула (после 2 раунда) тестируется индивидуально. В отрицательных пулах все образцы считают отрицательными. Схема пулирования на рисунке 1Б [15].

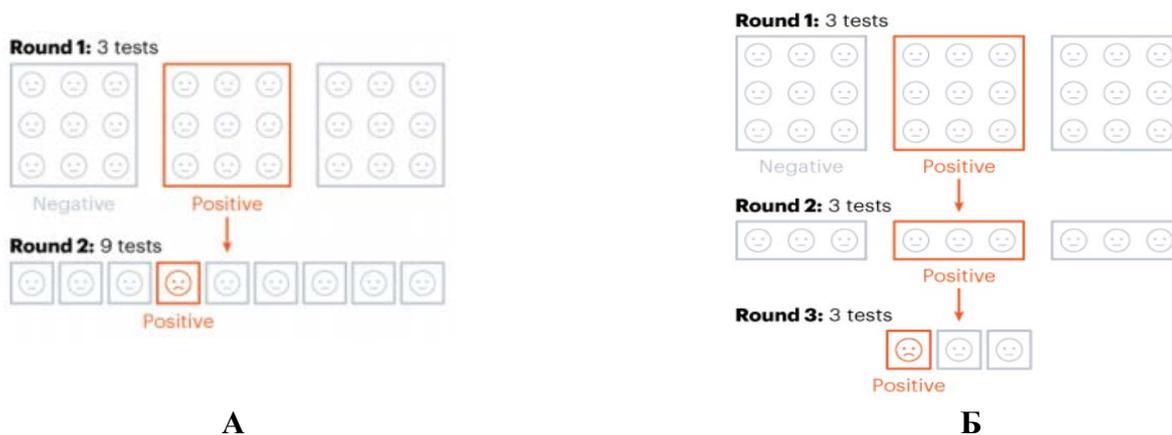


Рисунок 1. Схема пулирования образцов по Дорфману [15].

Алгоритмы двойного пулирования:

Многомерный алгоритм (Multi-dimensions) объединения образцов является вариантом алгоритма Дорфмана. Первый раунд пулирования такой же, как описано выше, но для положительных пулов во втором раунде пулирование проводят с использованием “квадратной матрицы”. Матрица представляет собой квадрат с 9 ячейками на каждой стороне, при этом каждая ячейка представляет индивидуальный образец. Образцы в каждой строке и каждом столбце тестируются как отдельный пул, в общей сложности проводится шесть тестов (для матрицы с 9 ячейками-образцами), где каждый образец попадает в 2 пула. Если образец содержит вирусную РНК SARS-CoV-2, оба пула (и строка и столбец) будут положительными, что позволит идентифицировать человека. Такая квадратная матрица может различных размеров, так использование 96-луночного планшета (8 рядов и 12 столбцов) позволяет объединить 96 образцов в 20 пулов [16]. Увеличение матрицы от квадрата до куба, также дает возможность увеличить количество протестированных образцов [17]. Схема представлена на рисунке 2.

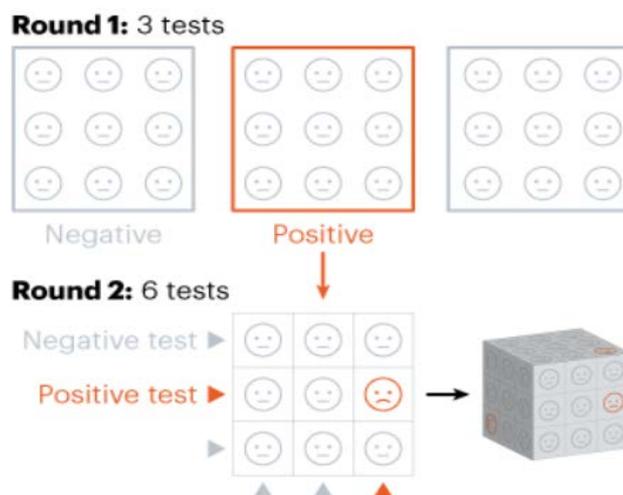


Рисунок 2. Схема многомерного (Multi-dimensions) алгоритма пулирования образцов [15].

Тестирование за **один раунд пулирования (One-step solution)**. Алгоритм пулирования со многими перекрывающимися группами позволяет сделать все тесты за один раунд. Этот подход основан на модели распределения, которая известна как триплеты Киркмана (Kirkman triples). Используется плоская матрица, в которой каждая строка представляет один тест (пулы по 3 образца), а каждый столбец — одного человека. Каждый тест должен включать в себя одинаковое количество образцов, и образец каждого человека должен быть протестирован одинаковое количество раз. Могут быть удобны при работе с роботизированными станциями [18]. Схема представлена на рисунке 3.

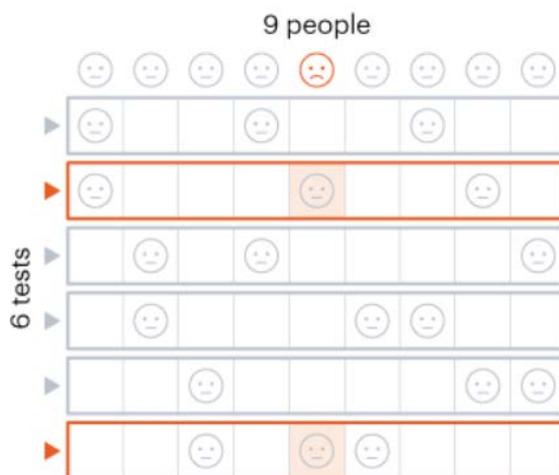


Рисунок 3. Схема алгоритма пулирования образцов для тестирования в один раунд [15].

Алгоритм	раундов тестирования	Ручное или роботизированное	эффективен при распространенности и инфекции	преимущества
Метод 1 предложен Дорфманом	2	Ручное	около 1%	Сокращение количества тестов
Метод 2 предложен	3	Ручное	около 1%	Сокращение количества тестов

Дорфманом				
Многомерный алгоритм (Multi-dimensions)	2	Ручное/ Роботизированное	около 2%	Сокращение количества тестов и минимизация ошибок дозирования
Один раунд пулирования (One-step solution)	1	Роботизированное	Более 10%	Сокращение количества тестов и сокращение времени тестирования

Экономические преимущества

Итоговая экономическая эффективность с учетом баланса стоимости предотвращённых случаев заражения за счет увеличенного объема скрининга с одной стороны и возможных потерь в связи с пропуском слабо положительных образцов с другой, в отношении пулирования при скрининге на COVID-19 на момент подготовки настоящего документа не было исследована. Конкретные примеры экономии материальных ресурсов при тестировании пулированных образцов, приводимые в зарубежных источниках не могут на прямую быть перенесены в условия деятельности лабораторий в Российской Федерации в связи с существенными различиями в оплате труда сотрудников, используемого оборудования, аналитических технологий и реальной стоимости расходных материалов. Соответствующие публикации российского опыта в доступных источниках отсутствуют.

Ниже приводятся теоретические расчеты. Ориентировочная себестоимость расходных материалов рассчитана на тестирование 100 000 человек, среди которых распространённости инфекции 1% инфицированы 1000 человек. В этом примере экономии расходных материалов оценивали исходя из объединения 100 000 образцов в пулы по 9 как для алгоритмов одинарного, так и для двойного пулирования. При этом максимальная экономия может составить около 12 млн руб, а стоимость выявления одного случая инфицированности снизится с 32 000, до 20 000 тыс руб. Понятно, что экономия ресурсов будет от увеличиваться при снижении доли инфицированных пациентов среди обследуемого контингента и при увеличении количества образцов, собранных в одном пуле, а также от технологических решений, позволяющих экономить использование дорогостоящих импортных наконечников для дозирования.

Алгоритм	Количество тестирований	Средняя стоимость расходных материалов в рублях
Индивидуальное тестирование	100 тысяч	32 000 000
Метод 1 Дорфмана	>44,5 тысяч	23 000 000
Метод 2 Дорфмана	>35 тысяч	20 000 000
Многомерный алгоритм (Multi-dimensions)	>35 тысяч	20 000 000
Один раунд пулирования	>67 тысяч	23 000 000

(One-step solution)		
---------------------	--	--

Проблемные вопросы, связанные с использованием метода пулирования в деятельности клинических лабораторий

В литературе достаточно полно обсуждаются проблемы, связанные с применением методик пулирования и основная из них - повышенный уровень риска пропуска инфицированных пациентов. В качестве аргумента в пользу выполнения технологий пулирования приводятся результаты исследований, демонстрирующие, что наиболее инфекционно опасные бессимптомные носители вируса отличаются его высокой концентрацией и, следовательно, вероятность из пропуска тестами пониженной чувствительности по сравнению с более чувствительными тестами минимальна. Об этом свидетельствуют и теоретические расчёты, и опыт опубликованных зарубежных исследований [11, 18]. Кроме того, при использовании алгоритма пулирования первичных образцов без разведения, проблемы разведения вирусной нагрузки и снижения чувствительности теста «de facto» отсутствуют.

Как вариант снижения вероятности ложноотрицательного результата возможно предусмотреть рекомендации по обязательному повторному тестированию пациента, что вполне возможно при скрининге в организованных коллективах предприятий.

Более того, в сравнении с использованием допущенных для диагностики COVID-19 тестов на выявление вирусных антигенов, метод ПЦР отличается большей чувствительностью даже при 10-кратном разведении образца. Исходя из этого, результат теста, выполненного методом ПЦР-РВ в пуле из 10 образцов по диагностической чувствительности будет соответствовать выполнению десяти отдельных тестов на антиген для тех же 10 пациентов.

Вторым проблемным аспектом может стать повышенный риск перепутывания проб при дополнительных манипуляциях, связанных с процедурами пулирования образцов. В этом отношении следует указать, что проблемы перепутывания проб относятся к вопросам организации технологического процесса и настройками лабораторного программного обеспечения, имеющийся опыт позволяет минимизировать возможные риски. В статье [12] представлено описание лабораторной стратегии для уменьшения ошибок в процессе объединения, которые включают: (1) надзор за процессом сборки пула вторым сотрудником; (2) проверка ручных расшифровок вторым сотрудником; (3) запрет на сообщение об отрицательных объединенных образцах до завершения индивидуального тестирования положительных пулов; (4) использование стандартных рабочих листов для записи двух идентификаторов (номер образца и пациент имя) каждого образца в пулах, а также (5) требования к оператору подписи на каждом этапе процесса тестирования». Недавно во время цитируемого выше вебинара был представлен пример программного обеспечения для автоматизированных станций пулирования образцов.

Характерные для России проблемы могут быть также связаны с необходимостью пересматривать тарифы ОМС при выполнении пулирования проб в случае снижения стоимости такого тестирования. Наши аргументы позволяющие преодолеть возникающие сомнения: Взаимодействие с ФОМС в вопросе использования пулирования в случае расширения тестирования пациентов в рамках гарантированной медицинской помощи может быть решено за счет выделения отдельного временного тарифа для отдельных

обследуемых контингентов, либо для выделенных лабораторий обследующих выделенные контингенты пациентов с низкой распространенностью позитивных результатов. В качестве альтернативного прецедента подобных решений можно привести примеры тарификации сложных тестов, предполагающих проведение в отдельном проценте случаев подтверждающих постановок (диагностика вирусных гепатитов, ВИЧ инфекции и др.). Как и случае с тестами пулированных проб на COVID-19, аналогия заключается в том, что в каждой аналитической серии для подтверждающих повторных тестов используются разное количество расходных материалов в зависимости от количества действительно позитивных образцов.

В случаях, когда обследуются бессимптомные пациенты по личной инициативе за счет собственных средств или средств работодателя, вопрос оплаты из средств ФОМС не рассматривается в принципе. Важно отметить, что внедрение технологии пулирования повлечет снижение стоимости что повысит доступность тестирования и возможности выполнения повторных исследований, а в итоге к повышению эффективности противоэпидемических мероприятий и снижению риска инфицирования населения.

ВЫВОДЫ:

1. Пулирование образцов при выполнении молекулярно-генетических анализов может быть применительно к когортам населения с распространенностью инфекции не более 10% в условиях пиковых нагрузок на лабораторные мощности при обязательном выполнении внутрилабораторного контроля конкретного уровня чувствительности выполняемого теста. Оптимальные методики и алгоритмы работы с пулированными образцами требуют специальной валидации в условиях работы российских лабораторий
2. Основным ограничением использования пулирования образцов для выявления вируса SARS-CoV-2 в настоящее время является отсутствие в инструкциях к диагностическим тест-системам соответствующей опции. Считаем целесообразным внесение возможности применения пулирования образцов в рамках оговоренных ограничений при подготовке фирмами производителями комплекта документов для получения Регистрационного удостоверения Росздравнадзора.
3. Считаем актуальным вопрос организации производства и использования в внутрилабораторном и межлабораторном контроле контрольных материалов с установленным уровнем вирусной нагрузки.
4. Проведение молекулярно-генетического тестирования вируса SARS-CoV-2 в пулированных образцах до внесения необходимых дополнений в инструкции фирм-производителей диагностических тест-систем допустимо выполнять в медицинских организациях на основании локальных документов, соответствующих действующему законодательству как действие в чрезвычайных обстоятельствах.
5. Считаем целесообразным организацию клиничко-лабораторного исследования, направленного на изучение диагностической и экономической эффективности использования разных алгоритмов пулирования образцов при обследовании отдельных контингентов населения.

P.S.

На момент подачи данного документа для размещения на сайте ФЛМ в Российской Федерации развернута массовая вакцинация населения против инфекции COVID-19 и приняты законодательные акты ограничивающие объёмы обязательного тестирования граждан на COVID-19. Вместе с тем, несмотря на результативность принятых решений по обеспечению лабораторий новым оборудованием и расходными материалами, накопление опыта работы специалистов представленные вопросы использования пулированных проб остаются актуальными. Прежде всего в связи с предоставляемой возможностью снижения затратности и сроков тестирования и как результатом - экономии бюджета здравоохранения и повышения доступности выполнения тестов для большего числа людей, в том числе и на платной основе. Кроме того, до сих пор остается до конца не ясным частота потенциально эпидемически опасных случаев выделения вирусных частиц у вакцинированных людей при бессимптомном или малосимптомном проявлении заболевания. Наконец, собранная в настоящем документе информация и рекомендации могут быть полезны при возможном появлении новых мутаций коронавируса устойчивых к поствакцинальному иммунитету, а также для оперативных мероприятий в случае новых глобальных эпидемий.

Используемая литература

1. Naiyer Imam, Sarah Zaidi, Arijit Robin Chakraborty. Transmission, Prevention, and Risk Factors of COVID-19 - in BREAKING DOWN COVID-19. A Living Textbook. Publication of First Medicine and Global Clinical Carey Kriz, Naiyer Imam, Sarah Zaidi (Eds.) Partners (2020) p.25-36
2. Li, R.; Pei, S.; Chen, B.; Song, Y.; Zhang, T.; Yang, W.; Shaman, J. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV2). Science 2020, 493, 489–493
3. He X, Lau EH, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. Nat Med. 2020;26(5):672-5
4. Muge Cevik, Matthew Tate, Ollie Lloyd, Alberto Enrico Maraolo, Jenna Schafers, Antonia Ho SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta- analysis - Lancet Microbe 2021; 2: e13–22 (<https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S2666-5247%2820%2930172-5>)
5. Научная справка ВОЗ «Критерии освобождения пациентов с COVID-19 из изоляции» (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332451/WHO-2019-nCoV-Sci_Brief-Discharge_From_Isolation-2020.1-rus.pdf)
6. Jefferson T ; Spencer EA ; Brassey J ; Heneghan C Viral cultures for COVID-19 infectivity assessment – a systematic review (Update 4) (<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.08.04.20167932v4>)
7. Andreas Deckert a, Till Bärnighausen a & Nicholas NA Kyei Simulation of pooled-sample analysis strategies for COVID-19 mass testing Bulletin of the World Health Organization (<https://www.who.int/bulletin/volumes/98/9/20-257188/en/>)

8. Stefan Lohse, Thorsten Pfuh, Barbara Berkó-Götte, Jürgen Rissland, Tobias Geißler, Barbara Gärtner Pooling of samples for testing for SARS-CoV-2 in asymptomatic people *The Lancet Infectious Diseases* CORRESPONDENCE| VOLUME 20, ISSUE 11, P1231-1232, NOVEMBER 01, 2020 [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(20\)30362-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(20)30362-5/fulltext))
9. - Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Issues First Emergency Authorization for Sample Pooling in Diagnostic Testing (<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-issues-first-emergency-authorization-sample-pooling-diagnostic>)
10. Netta Barak, Roni Ben-Ami, Tal Sido, e.a. Lessons from applied large-scale pooling of 133,816 SARS-CoV-2 RT-PCR tests <https://doi.org/10.1101/2020.10.16.20213405>
11. Graham, M.; Williams, E.; Isles, N.; Buadromo, E.; Toatu, T.; Druce, J.; Catton, M.; Lin, C.; Howden, B.P.; Williamson, D.A. Sample pooling on the Cepheid Xpert® Xpress SARS-CoV-2 assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2021, 99, 115-238. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889320306155?via%3Dihub>
12. Freire-Paspuel, B.; Vega-Mariño, P.; Velez, A.; Cruz, M.; Garcia-Bereguiain, M.A. “Sample pooling of RNA extracts to speed up SARS-CoV-2 diagnosis using CDC FDA EUA RT-qPCR kit.” *Virus Res.* 2020, 290, 17–19. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170220310807?via%3Dihub>
13. Ben-Amotz, D. Optimally pooled viral testing. *Epidemics* 2020, 100413 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1755436520300360?via%3Dihub>)
14. Jun G Tan, Aznan Omar, Wendy BY Lee, Moh S Wong Considerations for Group Testing: A Practical Approach for the Clinical Laboratory *Clin Biochem Rev.* 2020 Dec; 41(3): 79–92. doi: 10.33176/AACB-20-00007
15. Smriti Mallapaty The mathematical strategy that could transform coronavirus testing. Four charts show how pooling samples from many people can save time or resources *Nature* Vol 583 2020 P. 504-505 (<https://www.nature.com/articles/d41586-020-02053-6>)
16. Nasa Sinnott-Armstrong, Daniel L. Klein, Brendan Hickey Evaluation of Group Testing for SARS-CoV-2 RNA (<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.27.20043968v1.full-text>).
17. Mutesa, L.; Ndishimye, P.; Butera, Y.; Souopgui, J.; Uwineza, A.; Rutayisire, R.; Ndoricimpaye, E.L.; Musoni, E.; Rujeni, N.; Nyatanyi, T.; et al. A pooled testing strategy for identifying SARS-CoV-2 at low prevalence. *Nature* 2020. (<https://arxiv.org/abs/2004.14934>)
18. Sabyasachi Ghosh, Ajit Rajwade, Srikar Krishna, e.a. Tapestry: A Single-Round Smart Pooling Technique for COVID-19 Testing (<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.23.20077727v2>)