



מרכז המידע והידע הלאומי למערכת בקורונה
מסמך מספר 159

אסטרטגיה של איגום דגימות (Pooling) תאפשר הגדלה משמעותית של מספר הנבדקים בישראל, תוך חיסכון במשאבי זמן, כח אדם וציוד

תקציר מנהלים :

1. נוכח ההתפשטות בתחלואת COVID-19 בישראל, קיים צורך במציאת דרך יעילה להגדלה משמעותית של מספר הנבדקים.
2. איגום דגימות (מכונה גם Pooling או Group Testing), הינה שיטה להגדלת מספר הנבדקים בכל מחזור בדיקה, באמצעות איגום של מספר דגימות יחד ליחידה אחת, בניגוד לבדיקה נפרדת עבור כל נבדק כפי שמתרחש כיום. השיטה מאפשרת בדיקת מספר רב של דגימות בו זמנית, תוך חיסכון במשאבי זמן וחומר, וכן ניצול יעיל יותר של המכשור האנליטי.
3. השיטה מאפשרת לקצר משמעותית את הזמן מרגע בקשת הבדיקה ועד לקבלת התוצאה (חיסכון שיכול להתבטא במספר ימים במצבי עומס בדיקות כפי שקיימים כיום), ובכך מגבירה את יעילות קטיעת שרשראות ההדבקה.
4. העיקרון העומד בבסיס השיטה הנו שבמאגד דגימות (pool) הנמצא שלילי, המסקנה היא שכל הנבדקים המרכיבים את המאגד שליליים - ולכן אין צורך בבדיקות פרטניות עבור כל נבדק. לצורך כך, השיטה מחייבת הערכה מקדימה ריאלית של אחוז הנבדקים החיוביים במדגם הנבדק על בסיס סיבת הבדיקה.
5. השיטה מהווה מכפיל כוח משמעותי, והינה יעילה ביותר לשימוש כאשר אחוז החיוביים במאגד לא עולה על 7% (ייעול במאות אחוזים). באחוז חיוביים גדול מ-7%, השיטה עדיין מייעלת את מערך הדיגום, אך בעשרות אחוזים בודדים בלבד.

6. בשיטה זו ניתן לעשות שימוש במספר מתווים, למשל: בדיקות תסמיניים, בדיקת נטולי תסמינים, מעקב לאיתור מוקדי התפרצות וסקירה במרכזי בדיקה ייעודיים.

7. **שיטה זו הינה דרך יעילה ומוכחת להגדלת מספר הנבדקים תוך חיסכון מרבי במשאבים.** השיטה יושמה בעבר במגוון מחלות (דוגמת שפעת ואידס), **וכיום היא נמצאת בשימוש לאיתור נדבקים בנגיף הקורונה בקרב מספר מדינות (בהן ארה"ב וגרמניה).**

8. בישראל קיימת תשתית מבוססת המאפשרת בדיקות באמצעות איגום דגימות על בסיס ציוד וחומרים קיימים. מחקרים פורצי דרך מהעולם שפורסמו מאז פרוץ המגפה האחרונה, כמו גם **בדיקות פיילוט מוצלחות** (שנערכו במספר בי"ח בארץ וכן במעבדה המרכזית לנגיפים) **מעידים על ההיתכנות לשימוש נרחב בשיטה בישראל, וכן על זמינותה ויתרונותיה.**

עיקרים

1. איגום דגימות הינה אסטרטגיית בדיקה באמצעותה ניתן **לייעל ולהעצים את ביצוע הבדיקות המולקולריות** כפי שהן מבוצעות כיום. יתרונה טמון בחיסכון בכמות החומרים, כוח האדם וזמן העבודה הנדרשים לביצוע הבדיקות (מלבד כמות המטושים הנדרשת, הנותרת כמטוש אחד לנדגם לכל הפחות), **בהפחתת העומס על מערך הבדיקות**, ובעלות כוללת נמוכה יותר.
2. למרות יתרונותיה הרבים של אסטרטגיה זו בביצוע נרחב של בדיקות, היא **כרוכה בהתאמות לוגיסטיות וטכנולוגיות** בתשתית הקיימת כיום. כמו כן, עקב היותה מכוונת לביצוע בדיקות בקנה מידה נרחב ישנם שיקולים רבים של עלות מול תועלת, בהם יש להתחשב כאשר רוצים ליישמה.
3. במסמך זה נציג את העקרונות המרכזיים העומדים בבסיס שיטה זו, כמו כן נפרט כללי מפתח לביצועה ועקרונות יישומה כפי שעלו ממחקרים ובחינת יישומים ברחבי העולם.

העיקרון בבסיס שיטת איגום הדגימות

4. איגום דגימות (מכונה גם Pooling או Group Testing), הינה שיטה לבדיקות בקנה מידה נרחב באמצעות איגום ובדיקה של מספר דוגמאות יחד - בניגוד לבדיקה נפרדת עבור כל נבדק כפי שמתרחש כיום. השיטה מאפשרת בדיקת קבוצות גדולות תוך חיסכון במשאבי זמן וחומר, לצד ניצול מיטבי של המכשור האנליטי הקיים (איורים 2, 3).
5. שימוש בשיטה זו נעשה בעבר בניטור מחלות נגיפיות כדוגמת שפעת ואיידס (עקב עלות גבוהה מאוד של בדיקות מולקולריות בעבר), ואף הוכח כיעיל בניטור מגפות באמצעות שימוש בבדיקות מבוססות ריאקציות RTqPCR (-1) (3). כמו כן, שיטה זו נבדקה ויושמה גם על נגיף SARS-CoV-2 במספר מדינות בעולם (ראו נספח א').

6. העיקרון המנחה של השיטה מתבסס על התייחסות למאגד דגימות כיחידה אחת. הדגימות מחולקות למאגדים (Pool) - תערובת שווה של מספר דגימות, כאשר כל מאגד נבדק כדגימה יחידנית.
7. במידה שהמאגד נמצא חיובי, משמעות התוצאה היא שלכל הפחות אחד מן הנבדקים המרכיבים את המאגד חיובי, ולכן עבורם מתבצעת בדיקה חוזרת שבה הדגימות נבדקות בשנית על מנת לאתר את הנשא/ים החיובים (רצף הפעולות לבדיקה החוזרת יפורט בהמשך).
8. **במידה שמאגד הדגימות נמצא שלילי המסקנה היא שכל הנבדקים המרכיבים את המאגד שליליים ולכן אין צורך בבדיקות פרטניות עבור כל נבדק.**
9. בשל העובדה שאיתור הנדגמים השליליים וניפוי שלהם הינו השלב בעל התרומה המשמעותית ביותר לחיסכון בתהליך האיגום, **הרי שבחירת גודל המאגד צריכה להתבסס על הערכת אחוז נשאי הנגיף במדגם.** איגום של מספר דגימות גבוה יחד, עלול להביא למספר גבוה של מאגדים חיוביים ובכך לבטל את יתרון החיסכון בשיטה. ככל שהאחוז המוערך של חיוביים במדגם נמוך יותר, מתאפשר איגום במאגדים גדולים יותר, עד לגבולות הטכניים שנידונים בסעיף הנוגע לרגישות הבדיקה בפורמט שימוש זה.
10. **איגום דגימות יעיל בעיקר כאשר ישנו צורך בניטור מספר רב של אנשים, מכיוון שהוא מאפשר ניפוי מהיר של המאגדים השליליים, איתור מוקדי התפרצות, וכן בחינת יעילותם של צעדי מדיניות שונים.**

יישום השיטה

1. ניתן לבצע איגום דגימות במספר אופנים. נציג להלן את הנפוצים מבניהם עבור בדיקות מולקולריות מסוג RTqPCR, שהנה שיטת הבדיקה הרווחת כיום בארץ.
2. ככלל, יישום השיטה עבור בדיקות מולקולריות מסוג RTqPCR מתבטא בשני שלבים:
 - א. איגום הדגימות ליחידה אחת (מאגד)
 - ב. ביצוע רצף פעולות בדיקה חזרת במידה ומאגד נמצא חיובי

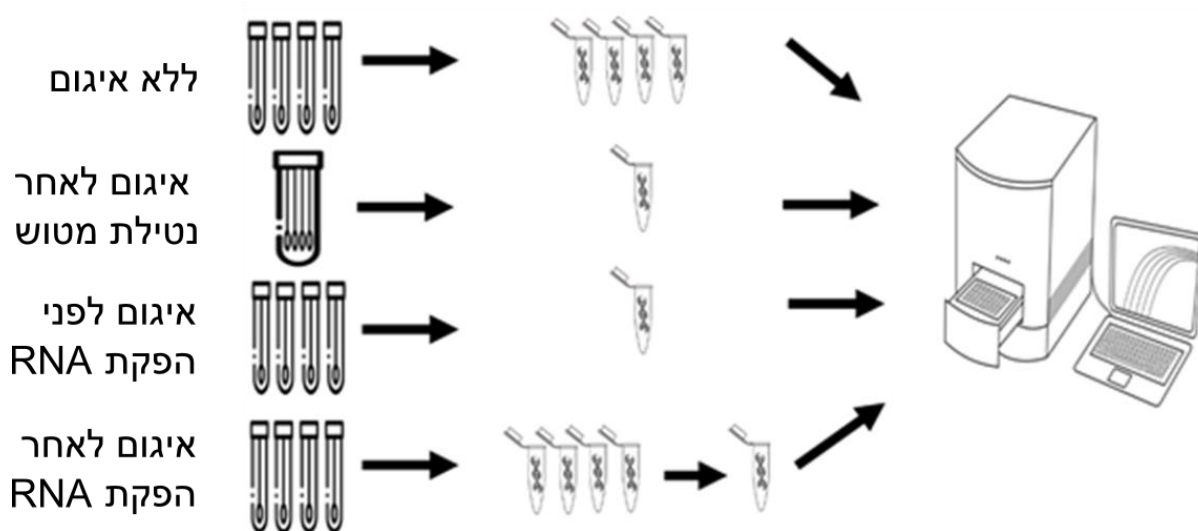
שלב א: בחירת שלב איגום הדגימות

3. בדומה לשלבי הדיגום והבידוק המבוצעים בבדיקות יחידניות, גם בשיטה של איגום הדגימות מבוצעים אותם השלבים. אולם, בחלק מן השלבים ניתן לאגד מספר דגימות יחד למאגד אחד. מרגע יצירת המאגד, יתר השלבים מבוצעים עבורו בדומה לדגימה יחידנית.
4. איגום הדגימות יכול להתבצע במספר נקודות לאורך שרשרת שלבי הבדיקה (לאחר נטילת המטוש¹, לפני הפקת ה-RNA או אחריה), כאשר לבחירה לאגד בכל שלב ישנם יתרונות וחסרונות שונים.

¹ לגבי איחוד לאחר נטילת המטוש - מדובר בהצעה תיאורטית שטרם נוסתה בעולם



איור 1: שלבי שרשרת הדיגום והבדיקה המולקולרית



איור 2: אפשרויות איגום בשלבים שונים. באיור מתבצעת הדגמה של העבודה משמאל לימין (נטילת דגימה, הפקת RNA ולבסוף RTqPCR) עם אפשרויות האיגום השונות

5. לצורך הבנת היתרונות היחסיים של ביצוע איגום דו-שלבי (כמפורט בסעיף 7א') בשלבים שונים של הבדיקה, להלן טבלה המדגימה בדיקת אוכלוסייה של 1,000 פרטים (המחולקים למגדים של 10 נבדקים), מתוכם 0.1% חיוביים, וביצוע בדיקה חזרת במידה ומאגד נמצא חיובי ('סבב ב').

איגום לאחר הפקת RNA	איגום לפני הפקת RNA	איגום לאחר נטילת מטוש ¹	ללא איגום	
1,000	1,000	² 2,000	1,000	מספר המטושים הכולל הנדרש (סבבים א' ו-ב')
1,000	1,000	110	1,000	מספר המבחנות הכולל שיש לפתוח באופן ידני (סבבים א' ו- ב')
1,000	110	110	1,000	מספר כולל של ערכות הפקת RNA (סבבים א' ו-ב')
סבב א : 100 סבב ב : 10	סבב א : 100 סבב ב : 10	סבב א : 100 סבב ב : 10	סבב א : 1000	מספר ריאקציות RTqPCR ³
1:10	1:10	⁵ 1:1~	1:1	המיהול המתקבל עבור דגימה חיובית במאגד ⁴⁴

² נלקח מטוש יחיד עבור המאגד, ומטוש נוסף ניטל ונשמר למקרה שהמאגד חיובי, לצורך בדיקת הפרטים הבודדים במאגד. במידה וחוזרים אל פרטי המאגדים החיוביים לנטילה נוספת במקום נטילה כפולה מלכתחילה, המספר יורד ל 1,010

³ סבב א' - בדיקת מאגדים, סבב ב' - בדיקת פרטניות עבור מאגדים שנמצאו חיוביים בסבב א'

⁴ פי כמה הדגימה עברה דילול. הדילול הוא תוצאה של הקטנת ריכוז הדגימה במבחנה, ומשמעותו פגיעה ברגישות הבדיקה. ככל שרגישות הבדיקה נמוכה יותר הסיכון לטעות מסוג FN עולה.

⁵ מבחינה טכנית מעל מספר מטושים מסוים יש צורך בהגדלת כמות הנוזל במבחנת האיסוף מה שמביא למהילה מסוימת של הדגימה החיובית.

שלב ב: אופן יצירת המאגדים ואיתור הדגימות החיוביות במאגדים שעלו כחיוביים

6. קיימות מספר אפשרויות ליצירת המאגדים ובהמשך לאיתור הדגימות החיוביות במאגדים שיצאו חיוביים (איור 3):

א. איגום דו-שלבי

1) שיטה זו היא הנפוצה והפשוטה ביותר. במידה שהמאגד נמצא חיובי - מבצעים בדיקה חזרת של כל הדגימות שנכללו במאגד על מנת לאתר את הנשא/ים החיובי/ים.

2) יתרונותיו העיקריים של אופן דיגום זה טמונים בפשטות ביצועו, וביכולת לבצעו בתנאי שכיחות נשאים משתנים באוכלוסייה. כמו כן, ביצוע הבדיקות במתכונת זו מאפשר חיסכון משמעותי במשאבים (גרף 1א' וגרף 1ב').

3) מנגד, חסרוננו העיקרי של אופן איגום ואיתור זה הוא הנחיצות בבדיקה חזרת לכל הדגימות שמקורן במאגדים חיוביים - מה שמאריך את זמן הבדיקה במעבדה⁶ ומקשה על צוותי המעבדה.

ב. איגום רב-שלבי (Repeated pooling)

1) מדובר למעשה בהרחבה של האיגום הדו-שלבי (תיאורטית ניתן לבצע זאת מספר פעמים). גם באיגום מסוג זה מתבצעת חלוקה למאגדים, אך במקרה זה כאשר נמצא מאגד חיובי, הוא מחולק שוב לתתי מאגדים שנבדקים שנית, וכן הלאה עד למציאת הדוגמאות החיוביות הבודדות. היתרון העיקרי באופן איגום זה הוא השימוש במספר בדיקות כולל נמוך ביחס לזה המבוצע באיגום דו שלבי. מנגד, חסרוננו בכך שהזמן הכולל לביצוע כל

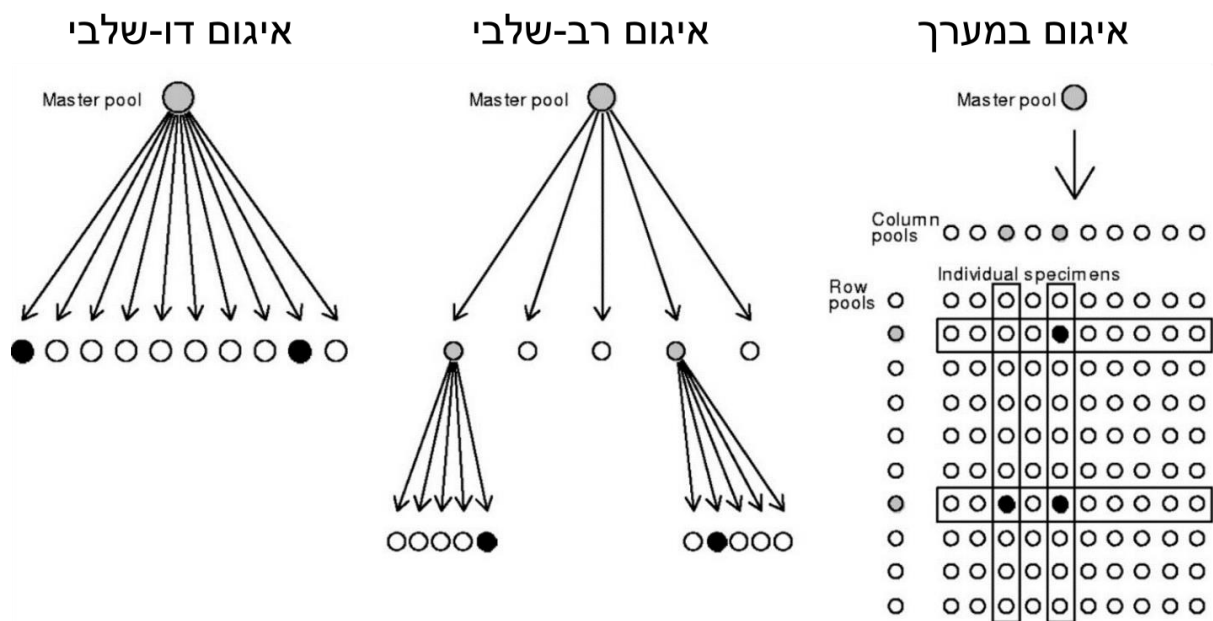
⁶ תהליך הפקת RNA ובדיקת RTqPCR יכולים לקחת 4-6 שעות נוספות

הבדיקות מתארך באופן משמעותי. חסרון משמעותי נוסף הוא הירידה ברגישות של רבי-המאגדים לעומת המאגדים באיגום הדו-שלבי, זאת כפועל יוצא מהדילול הרב של החומר התורשתי מהדוגמאות המקוריות.

ג. איגום במערך

1) באיגום באופן זה הדגימות מחולקות למאגדים, כך שכל דגימה מכל נבדק מופיעה במספר מאגדים. ניתוח דפוס התוצאות החיוביות של המאגדים מצביע על זהות הדגימה החיובית המקורית. איגום במערכים מתבצע ע"י הצבת תוצאות מאגדי הדגימות במערך דמוי טבלה וע"י הצלבת השורות והטורים מתאפשרת הסקה של זהות הדגימה או הדגימות החיוביות.

2) היתרון העיקרי באופן דיגום זה הינו קיצור שלבי הבדיקות החוזרות עבור דגימות במאגדים שנמצאו חיוביים. החסרונות העיקריים באופן זה ביחס לאיגום הדו-שלבי, הינם מיהול דגימות גבוה יחסית שעלול לפגוע ברגישות הבדיקה, וכן בהכנת מאגדים מורכבת שעלולה להעלות את הסיכון לשגיאה מסוג FN. באוניברסיטת בן-גוריון פותחה בחודשים האחרונים שיטת בדיקה קומבינטורית של מאגדים, משמע שיטה בה הדגימות השונות מאוגדות בקומבינציה של מספר מאגדים שונים (ראו נספח ב').



איור 3: אילוסטרציה של דרכי איגום דגימות. לקוח מתוך (56).

שיקולים מנחים לשימוש בשיטת איגום דגימות

11. בחינת השימוש באיגום דגימות, ואופן יישום השיטה מבוססים על ניתוח שני סוגי שיקולים עיקריים - שיקול כלכלי-משקי ושיקול אנליטי [4].

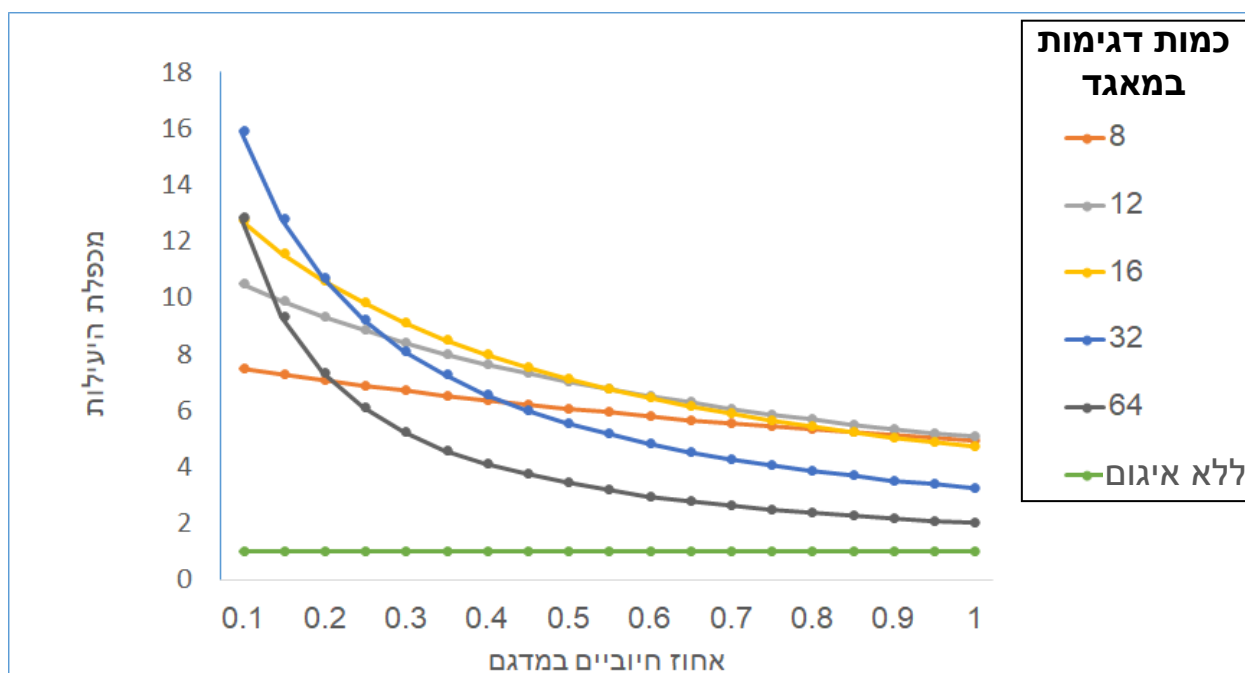
12. שיקול כלכלי-משקי:

א. השיקול המרכזי - חיסכון בכמות חומרי הבדיקה ובזמן העבודה הכולל הנדרש לביצוע בדיקה.

ב. שיטת איגום הדגימות כדאית כאשר אחוז הנשאים באוכלוסייה נמוך, היות שישנו רף עליון (המשתנה כתלות במתווה האיגום) אשר מעליו אין כדאיות לביצוע איגום [5] בשל הצורך בביצוע בדיקות חזרות. במדינות שונות בעולם מונהגים ערכי רף שונים (ראו נספח א').

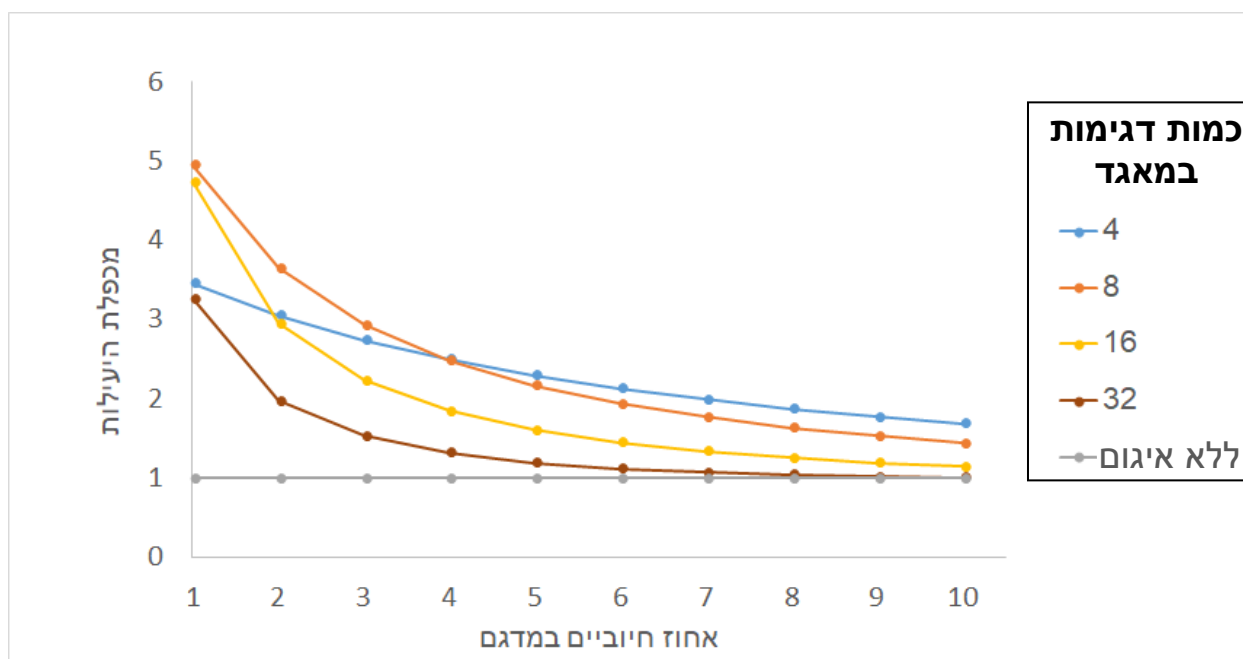
ג. בגרפים הבאים (1א', 1ב') ניתן להבחין ביעילות המתקבלת משימוש באיגום דגימות דו-שלבי בגדלים שונים של מאגדים, ובאחוזים שונים של

חיוביים במדגם⁷. כפי שניתן להבחין מגרף ג1', עם התפשטות התחלואה ועליית אחוז החיוביים במדגם הכללי, הכדאיות בשימוש באיגום דגימות לבדיקות הכלליות יורדת (גרף ג1). עם זאת, יודגש כי הכדאיות נשמרת בכל הקשור לבדיקת חסרי תסמינים במתווים השונים בהם אחוז החיוביים מהמדגם הינו נמוך מספיק.

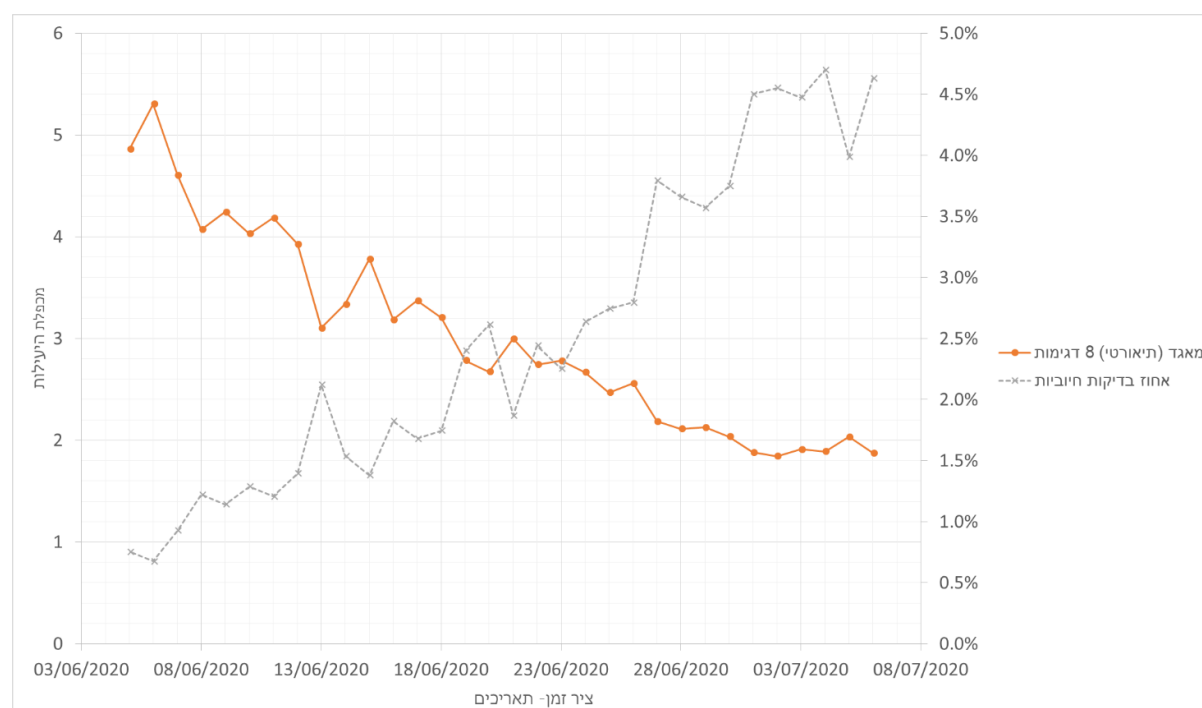


גרף ג1'- מכפלת היעילות כתלות באחוז החיוביים במדגם, בגודלי מאגדים משתנים (במדגם בו שכיחות החיוביים הינה 0.1-1%). ציר ה-X מייצג את שכיחות החיוביים במדגם, ציר ה-Y מייצג את מכפלת היעילות (המבטאת את מספר הנבדקים הממוצע עבורו ניתן להשתמש בערכת בדיקה אחת). הקווים הצבועים מייצגים את גודל המאגד.

⁷ תחשיב על פי (5). היות והתחשיב בוצע על פי הנחה של פיזור שווה של הדגימות החיוביות בין המאגדים, החיסכון המוצג הוא המינימלי וסביר כי במציאות החיסכון יהיה רב יותר



גרף 1ב'- מכפלת היעילות כתלות באחוז החיוביים במדגם, בגודלי מאגדים משתנים (במדגם בו שכיחות החיוביים הינה 10%-1)



גרף 1ג'- מכפלת היעילות במדינת ישראל (תיאורטית) לאורך זמן (נגזר מאחוז החיוביים החדשים), במאגד דו שלבי של 8 דגימות אל מול אחוז החיוביים במדגם (בין התאריכים 5.6.20-5.7.20). ציר ה-X מייצג את התאריכים עבורם ניתוח זה נעשה. ציר ה-Y השמאלי מייצג את מכפלת היעילות שהייתה עשויה להתקבל באיגום, אילו הבדיקות במדינת ישראל היו נערכות

באמצעות איגום דגימות. ציר ה-Y הימני מייצג את אחוז החיוביים החדשים מכלל הבדיקות החדשות שהתקבלו בימים המצוינים. הקווים הצבועים מייצגים את גודל המאגד.

ד. היבטים לוגיסטיים:

1) מעבר לבדיקות באמצעות איגום מצריך שינויים באופי העבודה. מכיוון שאיגום דגימות מבוצע ע"י פעולות רובוטיות מרובות ביחס לבדיקות בודדות, הסיכויים לטעות שעלולה להתרחש כתוצאה מהעלייה בפעולות הפיפטציה המבוצעות על ידי הרובוטים עולים גם כן. במידה שרוצים לצמצם סוג טעות זה למינימום ניתן לבצע איגום מטושים בו אין התערבות רובוטית מכיוון שהאיגום נעשה ע"י צוות הדוגמים. כמו כן, מאגדים שימצאו חיוביים יצטרכו להיבדק פרטנית ע"י עובדי מעבדה, מה שיוביל לגילוי שגיאות שהתרחשו בבדיקה הראשונה (שכן מדובר באנשי מקצוע מיומנים ומומחים בתחומם, שביכולתם לזהות תוצאות החשודות כשגויות). בנוסף, האופי השונה של הדגימות מצריך בחינה מעמיקה של התוצאות ע"י צוות המעבדה.

2) חשוב לציין כי מעבר לאיגום דגימות יכול להכפיל במספר מונים את מספר הדגימות הנבדקות על ידי המעבדות. הגברת התפוקה שהנה תוצאה חיובית, יכולה להוביל עמה לאתגרים לוגיסטיים חדשים כגון ניהול מעקב אחר מספר רב של דגימות, שמירה שלהן לביקורת לאחר בדיקה ועוד. בנוסף, הבדיקה באיגום מחייבת נהלי עבודה שונים הנובעים מהצורך לשמור את הדגימות נגישות למשך עוד מספר שעות עד לסיום בדיקתן, השילוב של בדיקות הפרטים ממאגדים חיוביים וכן שימוש בתוכנות ייעודיות או שינוי התוכנות הקיימות כיום במעבדות.

13. שיקול אנליטי:

א. דיוק בדיקות מתאפיין בשני מדדים, סגוליות (Specificity - הסיכוי שדגימה מאדם בריא תימצא שלילית) ורגישות (Sensitivity - אחוז הנשאים שנמצאו חיוביים מכלל הנשאים). התייחסות למדדים אלה הינה הכרחית על מנת להעריך את אופן תכנון הבדיקה כמו גם את ניתוח התוצאות (57).

ב. סגוליות הבדיקה מושפעת מכמה גורמים:

(1) תגובתיות צולבת (cross reactivity), שהיא גורם המתייחס ליכולת הבדיקה להבדיל ולזהות את נגיף הקורונה ביחס לנגיפים אחרים הדומים לו. בכל הנוגע לתגובתיות צולבת, הוכח כי בבדיקות מולקולריות לגילוי נגיף ה-SARS-CoV-2 הסיכוי לזיהויו של נגיף אחר שואף לאפס (6,7,59).

(2) זיהום (cross contamination) שהוא גורם המתייחס למצב שבו דגימה שלילית מזהמת ע"י מעבר חומר נגיפי מדגימה חיובית. באיגום דגימות הסיכויים לזיהום גבוהים יותר בבדיקה הראשונה של המאגד עקב פעולות הפיפטציה (פעולות המבוצעות ע"י פיפטות מכניות) הרבות של הרובוט⁸. עם זאת חשוב לזכור, שעבור מאגדים שנמצאו חיוביים מתבצעות בדיקות חזרות פרטניות, בהן הסיכוי לזיהום הינו נמוך מאוד ולכן הסיכון הכללי לזיהום באיגום דגימות נותר בסופו של דבר נמוך מאוד.

(3) הפרעה של רעשי רקע טכניים – גורם בשכיחות נמוכה מאוד.

(4) פרשנות מוטעית של התוצאות - גורם בשכיחות נמוכה מאוד.

⁸ בכל פעולת מעבדה אנושית או רובוטית ישנו סיכוי לטעות, לכן ככל שמספר הפעולות הרובוטיות עולה כך גם הסיכון לטעויות שמקורן בפעולות אלה

ג. רגישות הבדיקה:

1) רגישות הבדיקה נגזרת מריכוז החומר הגנטי של הנגיף בדגימה. לכן, באיגום דגימות בו ישנו מיהול מסוים של מספר דגימות וכתוצאה מכך גם מיהול של החומר הנגיפי, הרגישות שתתקבל תהיה נמוכה יותר ביחס לבדיקות בודדות. עם זאת, בפועל, מספר מחקרים הראו כי למרות הדילול של דגימות קליניות חיוביות באיגום, לא התקבלו תוצאות שליליות (8-10). חשוב לציין כי תמיד ישנה האפשרות שדילול דגימה שבה העומס הנגיפי הנמוך יוריד אותה מתחת לסף הגילוי של הבדיקה.

2) בהתאם למידע המצטבר כי ישנו קשר ישיר בין ערכי בדיקת RTqPCR לבין יכולת ההדבקה (ראו נספח ד' להרחבה), יש להתחשב בכך שרגישות הבדיקה עבור נשאים בעלי פוטנציאל הדבקה גבוה (ללא קשר למצב התסמיני שלהם) הינה גבוהה בהרבה מאשר לנשאים באופן כללי (למשל כאלו שזה עתה נדבקו או כאלו שנמצאים מספר שבועות לאחר שיא המחלה).

3) חשוב לציין כי נכון להיום, לא קיימת טכנולוגיה בה הרגישות גבוהה יותר מאשר בשיטת RTqPCR (11). ישנן עדויות לכך ששיטת ddPCR עשויה להעלות מעט את הרגישות (12). בנוסף דווח, כי באמצעות שימוש בשיטת ddPCR הצליחו לאתר דגימות חיוביות שהתקבלה עבורן תשובה שלילית בבדיקת RTqPCR (13). למרות זאת, יצוין כי שיטה זו אינה מותאמת לבדיקות בקנה מידה נרחב. שיטות מסוג NGS אשר הועלו כאפשרות לבדיקת איגום דגימות יכולות לספק פלטפורמה עבור בדיקות בקנה מידה נרחב, אך ברגישות נמוכה יחסית ביחס ל RTqPCR (14). בנספח ג' יפורטו המלצות בנוגע לצעדים וניסויים אפשריים להעלאת רגישות הבדיקות.

יישום שיטת איגום הדגימות כמענה לצרכים שונים

14. ניתן לבצע איגום דגימות במתווים שונים על מנת לענות על צרכים שונים (בדיקות חולים, סקירת אוכלוסיות או קטיעת שרשראות הדבקה). איגום דגימות אינו מתאים לבדיקות של חולים מאומתים לצורך הערכת התקדמות המחלה/החלמה⁹. נסקור להלן מספר מתווים עיקריים לביצוע איגום דגימות אשר עשויים לענות על מטרות שונות:

א. סקירת תסמיניים

(1) קיים צורך בהערכה מראש של אחוז הנשאים באוכלוסייה זו על מנת לשקול את הכדאיות והתועלת באיגום דגימות עבור נבדקים תסמיניים. במידה שאחוז הנשאים המוערך באוכלוסייה זו הינו גבוה - אין כדאיות לעבור לאיגום דגימות כיוון שהסיכויים לקבלת מספר גדול של מאגדים חיוביים עולה, וכתוצאה מכך יש צורך במספר רב של בדיקות חזרות לביצוע. מנגד, אם אחוז הנשאים באוכלוסייה זו אינו גבוה (עד 10% נשאים ע"פ מתווים שונים ברחבי העולם - ראו נספח א'), אזי הכדאיות לאיגום דגימות עולה.

(2) מכיוון שההגעה לשיא העומס הנגיפי (מדד המייצג את כמות הנגיף בגוף אשר ניתן להעריכו לפי ריכוז החומר הנגיפי בדגימה) סמוכה להתפתחות התסמינים, הסיכון לירידה ברגישות הבדיקה במתווה זה הינו נמוך ביותר (15-20).

(3) מהירות ביצוע הבדיקה הינה פרמטר קריטי בבדיקת אוכלוסייה תסמינית עקב ההשלכות שיש לבדיקה זו על בידוד מהיר של חולים וקטיעת שרשראות הדבקה יעילה יותר. שימוש באיגום דגימות עבור אוכלוסייה זו עלול להאריך את זמן הבדיקות הכולל במעבדה ב-4-6 שעות (בגלל הצורך בהפקת רנ"א ובדיקת RT-

⁹ היתרון באיגום דגימות נובע מחיסכון בבדיקה של מאגדים שליליים. היות שהסיכוי לבדיקה חיובית חוזרת הוא גבוה אצל חולים מאומתים, אחוז המאגדים השליליים הצפוי הוא נמוך מתחת לרף הכדאיות.

qPCR (חזרות). עם זאת, חשוב לזכור כי תוספת זמן זו מתבטלת אל מול קיצור זמני ההמתנה לבדיקה הנוצרים במצבי עומס.

ב. סקירת נטולי תסמינים

(1) ממידע שהצטבר בחודשים האחרונים בספרות האקדמית עולה כי ניתן לזהות נשאים חיוביים באוכלוסיית נטולי התסמינים (בין אם הינם טרום תסמיניים או חסרי תסמינים לחלוטין) באמצעות בדיקות מולקולריות וכי נבדקים אלה הינם מדביקים (23-17,21), (נספח ד'). מחקרים שונים מעלים ממצאים שונים בנוגע לרמות העומס הנגיפי בקבוצה זו. חלק מהמחקרים מעידים כי אין הבדל משמעותי בין רמות העומס הנגיפי באוכלוסייה זו לעומת אוכלוסיית התסמיניים (24) ואילו מחקרים אחרים מעידים כי העומס הנגיפי הממוצע באוכלוסייה זו נמוך יותר מאשר באוכלוסיית התסמיניים (25).

(2) בשל העובדה שעבור אוכלוסיית נטולי תסמינים לא קיימת נקודת ייחוס מיטבית בזמן לקיום הבדיקה (הופעת התסמינים), ניתן להניח כי באופן ממוצע העומס הנגיפי באוכלוסייה זו יהיה נמוך יותר מאשר באוכלוסיית התסמיניים. על כן, הסיכון לירידה ברגישות בבדיקת אוכלוסייה זו עולה. כדי להתגבר על הירידה ברגישות ניתן לשקול אמצעים דוגמת איגום מטושים כמו גם שיפורים טכניים נוספים (ראו נספח ג'). מנגד, מוערך כי העומס הנגיפי בפרטים מדבקים בהם גבוה דיו לאבחון, ולכן, אם המטרה הנה למצוא פרטים מדבקים, הסכנה לירידה ברגישות הבדיקה פוחתת (ראו נספח ד').

להלן הסבר על בדיקות לשתי אוכלוסיות נטולות תסמינים לדוגמה, הדורשות היערכות שונה באיגום הדגימות:

15. סקירת נטולי תסמינים בסביבת נבדק חיובי

א. כיום, לפי תוצאות החקירה האפידימיולוגית נכנסים מעגלים שונים בקרבת נבדק חיובי לבידוד. בסמוך לזמן הכניסה לבידוד, עד 48 שעות, מתבצעת בדיקה לגילוי הנגיף בקרב אותם הנכנסים בבידוד (26) - בין אם התפתחו אצלם תסמינים ובין אם לא. **היתרון הגדול בשיטה זו הינו באיתור מי מהנבדקים, היו בעלי פוטנציאל הדבקה עוד טרם כניסתם לבידוד** (ראו נספח ד'), וכך לאפשר להכניס לבידוד גם את הסביבה המקיפה אותם (מעגל שני). עם זאת, המחיר לשיטה זו עשוי להיות גבוה, שכן ככל שהמעגלים סביב נבדק חיובי גדלים, מספר הנבדקים החיוביים ממשיכה לעלות באופן היוצר עומס משמעותי על המעבדות הדיאגנוסטיות. **איגום דגימות עשוי להוות פתרון מפתח למטרה זו, ולסייע בהרחבת מעגלי הבדיקה.**

ב. לצורך מקסום הפוטנציאל של איגום הדגימות, ניתן לקבוע את גודל המאגד על פי ביצוע הערכה משתנה של הסיכוי להידבקות במעגלים סביב הנבדק החיובי (משפחה קרובה, עבודה/מסגרת חינוכית, מפגשים נקודתיים יחידים). לצורך כך יש כמובן לבצע רישום ומעקב על רמות ההדבקה בקרב המעגלים השונים סביב הנבדקים החיוביים.

16. מעקב לאיתור מוקדי התפרצות

א. מתווה זה עוסק **בחיפוש נבדקים חיוביים בקרב אוכלוסיות, ללא ידיעה מוקדמת לגבי סבירותן להכיל פרטים חיוביים.** כך לדוגמא דיוור מוגן לקשישים, צוותים רפואיים, ואף סקירה של מוקדי אוכלוסייה שונים בפריסה גיאוגרפית. בשונה מבדיקות אחרות המבוצעות באיגום דגימות, אשר היתרון בהן הוא צמצום בדיקת פרטים במאגדים שליליים, במתווה זה היתרון הוא בהיתכנות למציאת מאגדים חיוביים. היות

שדגימות מפרטים בעלי פוטנציאל הדבקה ניתנות לזיהוי גם בדילולים גבוהים (ראו נספח ד') ניתן באיגום דגימות במתווה זה להשתמש במאגדים גדולים מבשאר המתווים.

17. סקירה במרכזי בדיקה שיוקמו באופן ייעודי למטרה זו

א. מדובר בתת-מתווה של סקירת נבדקים נטולי תסמינים. הצורך העולה בסקירה זו הוא בדיקת אוכלוסיות בנקודות ייעודיות בהן האוכלוסייה מצויה בפרק זמן נתון (בניגוד למקרים של drive through בהם מרכזים את הדגימות ולא את האוכלוסייה הנדגמת).

ב. רגישות הבדיקה דומה לזו שבנטולי תסמינים וניתן לנקוט באמצעים המוצעים בנספח ג' בכדי להגבירה. במידה שמטרתה של סקירה זו הינה מציאת הפרטים המדבקים, אז הסכנה לירידה ברגישות פוחתת. מטרתה של סקירה זו הינה סיקור או גילוי של פרטים חיוביים נטולי תסמינים במרכזים שונים, לדוגמא: שדות תעופה.

ג. במקרים אלו, במאגדים עבורם תתקבל תשובה חיובית, אפשר לשקול לבצע את הבדיקות החוזרות בטכנולוגיה מהירה במקום בבדיקה הנהוגה כיום (נתון לשיקולים לוגיסטיים). כלומר, ניתן לשלב גם בדיקות POC (Point of Care) אשר מביאות לתשובות מהירות יותר ביחס לבדיקות מעבדה.

ד. דוגמא לכך הינה בדיקת Xpert Xpress של חברת Cepheid שבה מתקבלות תוצאות בעלות רגישות גבוהה תוך 45 דקות תוך שמירה על רגישות גבוהה בדומה לבדיקות מעבדה (27-28,58). דוגמה לבדיקה נוספת המאפשר קבלת תשובה מהירה הינה בדיקת ACULLA של חברת Mesa Biotech אשר מציגה תוצאות תוך 30 דקות (29).

18. **איגום דגימות הינה אסטרטגיית בדיקות המאפשרת בידוק בקנה מידה נרחב תוך כדי הגברת התפוקה וחסכון משמעותי במשאבים.** יעילותה של שיטה זו הוכחה בעבר בהתמודדות עם מספר מחלות וכיום היא מיושמת בגרמניה וארה"ב כנגד נגיף הקורונה. שיטה זו הוכחה כיעילה ביותר עבור מצבים בהם אחוז החיוביים במאגד נמוך יחסית (עד 7%), כך שהיא מאפשרת מקסום מרבי של חיסכון במשאבים תחת תנאים אלה.
19. **ההחלטה האם לבצע איגום דגימות תלויה בשני שיקולים עיקריים: שיקול משקי הכולל בתוכו את הכדאיות של שיטה זו מבחינת חיסכון המשאבים והזמן, ושיקול אנליטי הכולל התייחסות למאפייני הדיוק של הבדיקה המשפיעים גם על אופן תכנון הבדיקה כמו גם על ניתוח התוצאות.**
20. **מסקירת כלל המידע בנושא, נראה כי השימוש באיגום דגימות עבור אוכלוסיית חסרי תסמינים הינה דרך הבדיקה היעילה ביותר באמצעותה ניתן לדגום מספר רב של פרטים תוך כדי חיסכון משמעותי במשאבים.**
21. **לצורך מקסום הפוטנציאל של איגום דגימות חשוב להעריך מראש את הסיכויים לאחוז חיוביים בקרב הקבוצה הנדגמת, ולבצע תיעוד ומעקב בקרב המעגלים השונים סביב הנבדקים החיוביים.**

נספח א'

דוגמאות לשימוש באיגום דגימות ברחבי העולם

התפשטות מגפת ה- COVID19 עודדה מעבדות ברחבי העולם ליישם איגום דגימות בכדי להתמודד עם הצורך בהגברה משמעותית של מספר הבדיקות, לצד המחסור בחומרים וערכות בדיקה. על מנת להתמודד עם הפער, פנו מדינות שונות בעולם לאפשרות השימוש בשיטת איגום דגימות:

1. **ארה"ב** - המעבדה לבריאות הציבור במדינת נברסקה (Nebraska Public Laboratory Health), ביצעה ניסויים מקדימים לאיגום דגימות. לאור התוצאות, ה-FDA נתן אישור מקומי למעבדה [30,31] לאגד דגימות במאגדים של 5 כל עוד אחז הבדיקות החיוביות אינו עולה על 10%. איגום הדגימות הקליני החל ב-24.3.20. לאחרונה החל במעבדה נוהל של הפרדה בין דגימות שעבורן קיימת סבירות גבוהה לנשיאת הנגיף לבין דגימות שסבירות זו נמוכה עבורן, מתוך מטרה לבצע איגום דגימות עבור הקבוצה השנייה ובדיקות רגילות עבור הקבוצה הראשונה. כך שיווצר מדגם בו אחז הבדיקות החיוביות יהיה נמוך ביותר.
2. **האיחוד האירופי** - המרכז האירופי למניעה ובקרת מחלות פרסם מתודולוגיית בדיקה לביצוע סקרי אוכלוסייה באמצעות איגום דגימות. המתודולוגיה מתבססת על איגום דגימות פשוט ומספקת כלים חישוביים למציאת גודל המדגם המתאים והמתווה הנכון (32).
3. **גרמניה** - ניסויים מקדימים מוצלחים בוצעו באוניברסיטת SAARLAND בהם איגדו מאגדים של 4 עד 30 דגימות שליליות יחד עם דגימות קליניות עבורן

היה ידוע כי ערך ה- Ct (cycle threshold) שלהם¹⁰ נמוך מ-30 כפי שנמצא עבור הגנים E ו-S. לאחר מכן בוצעה השיטה בהרצה על 1,191 דגימות קליניות, תוך שימוש ב 267 בדיקות בלבד זיהו 23 נבדקים חיוביים (1.93%). זאת, כאשר אחוז הדגימות החיוביות בתקופה ההיא בבית החולים עמד על 4.24%. כותבי המאמר ציינו כי בדיקות גבוליות בערכי Ct גבוהים יכולות לחמוק עקב הדילול, אך לטענתם **המידע מבית החולים העיד כי ערכים אלו אופייניים לחולים 14-21 יום לאחר הופעת תסמינים (33).**

א. בעקבות הצלחת הניסוי החלה בבית החולים האוניברסיטאי ב-SAARLAND בדיקה של חסרי תסמינים (בעיקר דיירי בתי אבות) באיגום דגימות. הבדיקה נעשת על מאגדים של בין 10 ל-20 דגימות המאוגדים בשלב ה VTM (viral transport media). הדגימות מאוגדות באופן ידני (מכיוון שהרובוט הקיים אצל הגרמנים לא מאפשר פיפטציה עבור איגום דגימות) ולאחר מכן המאגדים נבדקים במכשיר COBAS6800. לא נקבע סף מעליו אין כדאיות בביצוע איגום דגימות. לפי המחלקה הווירולוגית ב SAARLAND הגורם העיקרי שעודד את שימוש באיגום דגימות היה מחסור בריאגנטים (34).

ב. בנוסף, מחקר שתוצאותיו עלו כמוצלחות והוכיחו את יעילות השיטה, בנושא איגום דגימות במאגדים של 10 דגימות, הביא להרצה ראשונית במכון הווירולוגי בפרייבורג ובמספר מעבדות נוספות בגרמניה בעקבותיו (35).

4. **הודו** - המועצה ההודית למחקר רפואי (ICMR), הגוף הלאומי האחראי על מחקר ביו-רפואי בהודו, התוותה המלצות לשימוש באיגום דגימות (36) לבדיקות בשגרה על בסיס מאגדים של 5 דגימות. המלצת המועצה היא להימנע מאיגום דגימות באזורים בהם אחוז החולים הנבדק הוא מעל 5%.

¹⁰ ערך המתקבל בבדיקת RT-qPCR והוא מעיד על ריכוז הנגיף בדגימה. ישנו קשר הפוך בין ריכוז הנגיף לערך ה-Ct, ככל שריכוז הנגיף גבוה יותר כך ערך ה-Ct נמוך יותר.

על פי ההתוויות הללו החלה בדיקה באיגום דגימות במדינות רבות בהודו דוגמת אוטר פרדש (37), מערב בנגל (38), פונג'ב (39), מהרשטרה (40) ובטריטוריית איי אנדמן וניקובר (41), למהגרים/חוזרים מחו"ל/אזורים ירוקים התווה משרד הבריאות ההודי על בדיקה במאגדים של 25 (42).

5. **גאנה** - גאנה הפכה לחלוצה של יבשת אפריקה עם איגום דגימות פשוט של 10 דגימות במאגד (43). בעזרת איגום הדגימות גאנה ביצעה כבר בדיקות עבור מעל מאה אלף נבדקים.

6. **סין** - בעיר ווהאן בסין בוצע מבצע שנטען שהביא לבדיקת 6.5 מיליון תושבים ב-9 ימי בדיקה תוך איגום דגימות (44). על פי פרסומים גודל המאגד היה של כ 10 דגימת (45).

נספח ב'

שימוש באיגום דגימות בישראל

בישראל בוצעו מחקרים מובילים בנושא איגום דגימות. מחקרים אלה הצליחו לתקף כלים מוכרים מהעבר למגפת ה-COVID-19 כמו גם לפתח כלים חדשים. נסקור כעת את המחקרים המובילים מבין הנ"ל:

1. מחקר שבוצע בטכניון ובבית החולים רמב"ם בדק את השפעת דילול הדגימות על רגישות הבדיקות באיגום, עבור נשאי נגיף הקורונה (8). במחקר בוצע איגום דגימות לאחר הפקת ה-RNA, והודגם עבור דגימות בריכוזים שונים של RNA, כי עד דילול של 1×10^{-32} היה ניתן לזהות דגימות חיוביות. מחקר זה היה מהראשונים שבישרו בעולם את נושא איגום הדגימות והוא סוקר בהרחבה (6-8).

2. חוקרים מהאוניברסיטה העברית ובית החולים הדסה ביצעו בדיקה לאיגום דגימות בשיטת האיגום הדו-שלבי ובשיטה של איגום במעריך. הניסויים המקדימים צלחו והצביעו על דילול מינימאלי של הבדיקות. הפגיעה ברגישות אף צומצמה בכך שהעלו את ערך ה-Ct שמהווה רף לקביעת תגובה חיובית בבדיקת המאגד (אך לא בבדיקה הפרטנית של פרטי מאגדים חיוביים). לאחר הצלחת הניסוי החלו בבית החולים בבדיקת חסרי תסמינים (צוותים רפואיים, בתי אבות, מפעלים חיוניים) בשיטת האיגום הדו-שלבי (הקרויה לעיתים בעגה המקצועית "איגום דורפמן") במאגדים של 8 דגימות. בשיטה זו בדקו בבית החולים 26,576 דגימות ביעילות של **פי 7.3** כאשר אחוז החיוביים הוא 0.12% (49).

3. חוקרים מאוניברסיטת בן גוריון ובית החולים סורוקה בבאר שבע פיתחו שיטה מתקדמת לאיגום דגימות במעריך באופן קומבינטורי (50). השיטה של החוקרים מאגדת דגימות כך שכל דגימה נכללת במספר מאגדים, ומדפוס המאגדים החיוביים ניתן לקבוע את זהות הדגימות החיוביות. השיטה נוסתה

באופן ראשוני על 4 דגימות חיוביות בהן היה ידוע כי ריכז החומר הגנטי הינו מעל לסף הזיהוי של השיטה, שנמהלו עם דגימות שליליות. דווח, כי כל ארבעת הדגימות החיוביות זוהו, בקומבינציות שונות של איגומים. יתרונה הבולט של שיטה זו היא, שבניגוד לשיטות איגום דגימות אחרות, ניתן למצוא את זהות הדגימות החיוביות לאחר בדיקת המאגדים הראשונה ואין צורך בבדיקות פרטניות חזרות. חסרונות השיטה הינם המיהול הגדול של הדגימות באופן יחסי לאיגום דגימות פשוט, הזמן הנוסף הנדרש לצורך פעולות הפיפטציה המורכבות והסיכון משגיאות נוכח כמות מרובה של פעולות פיפטציה שעלולה להאריך את זמן הבדיקה הכולל. כמו גם, תוכנה מסחרית ייעודית.

נספח ג'

אמצעים טכניים להגברת רגישות הבדיקות בעת שימוש בעידוד דגימות

1. כאמור, אחד השיקולים החשובים בבחינת איגום דגימות הינו השינוי ברגישות הבדיקה כתוצאה מדילול הדגימות החיוביות בדגימות השליליות. במידה ששיקול הרגישות הינו שיקול עליון, ניתן להתגבר על הירידה ברגישות כתוצאה מהדילול ע"י אימוץ שינויים בהליך המעבדתי בבדיקות מסוג זה.
2. נסקור להלן מספר דוגמאות אפשריות להעלאת הרגישות ע"י שינויים בהליך הבדיקה:

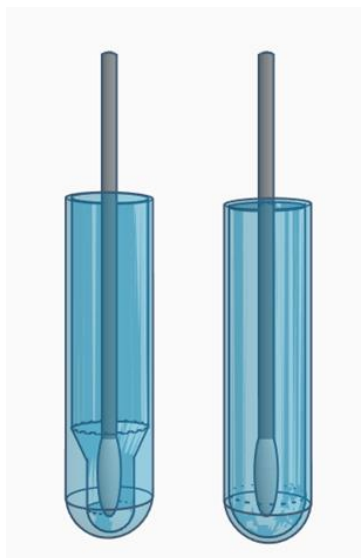
א. **נטילה לתוך תמיסת בופר ליזיס**¹¹ - התהליך הקיים כיום כולל נטילת מטוש והכנסתו למבחנה המכילה תמיסת מעבר (VTM). בהגעה אל המעבדה יש להכניס למבחנה תמיסת בופר ליזיס המנטרלת את הנגיף (כך שיהיה לא פעיל ולא מסוכן לצוות המעבדה), אך מביאה לדילולה של הדגימה. הכנסה ישירה של המטוש לתמיסת בופר ליזיס באתר דיגום החולה תמנע דילול של הדגימה ובכך יכולה להגביר את רגישות הבדיקה. בניסוי שנערך על ידי מדעני פורום 876 במפא"ת¹² (51) הוכחה טענה זו. **דיגום ישירות לבופר ליזיס גם יחסוך את שלב ההעברה לבופר ליזיס במעבדה, דבר שיביא לחסכון זמן משמעותי.**

ב. **שינוי במבנה מבחנות האיסוף** - מבחנת האיסוף כיום מכילה 2 מ"ל תמיסת VTM אליה מוכנס המטוש לאחר לקיחת הדגימה. פעולה זו מובילה לדילול ריכוז הנגיף בדגימה. הסיבה לשימוש ב 2 מ"ל VTM הינה סיבה טכנית, מאחר שמדובר בכמות שמכסה את אזור הדגימה

¹¹ תמיסה הגורמת לחירור ממברנות התאים ופוגעת בשלמותם ובכך מאפשרת את מיצוי החומר הגנטי מנגיפים ומתאים.

¹² בעבודת מחקר שרוכזה על ידי מפא"ת בוצעו בדיקות חולים במעבדה המרכזית לנגיפים בתל השומר ובבית החולים רמב"ם. המחקר השווה את הדיגום הישיר לבופר ליזיס ביחס לדיגום ל VTM (כפי שנהוג בישראל). תוצאות המחקר הראו כי דיגום ישירות לבופר ליזיס מגביר את רגישות הבדיקה.

במטוש. שימוש במבחנות בעלות מבנה שונה, בהן בתחתית המבחנה ישנה היצרות של הפלסטיק ממנו עשויה המבחנה, עשוי להביא לשימוש בכמות קטנה יותר של תמיסת ה-VTM לשם כיסוי המטוש (איור 4). כך, יתאפשר דילול נמוך יותר שיגרום לריכוזי החומר הנגיפי בדגימה להיות גבוהים יותר, וכפועל יוצא מכך תתקבל גם עלייה ברגישות הבדיקה. עקב נהלי עבודה הקשורים לבטיחות ביולוגית, במעבדות רבות אין מוציאים את המטוש מהמבחנה בעת הוצאת חלק מהדגימה במעבדה לערבוב עם בופר ליזיס (מה שיקשה על שימוש במבחנות מוצרות). לעומת זאת, במידה שיתבצע דיגום ישירות לבופר ליזיס יתאפשר השימוש במבחנות מסוג זה.



איור 4- אילוסטרציה של המבחנה הנפוצה לשימוש כיום (מימין) לעומת המבחנה המוצעת (משמאל).

ג. התאמות בפרוטוקול הפקת ה-RNA ובביצוע בדיקת RTqPCR-

תהליך הפקת ה-RNA מורכב משלבים רבים, בהם ניתן לערוך שינויים על מנת למקסם את ריכוז הדגימה הסופית המוכנסת למכשיר ה-RTqPCR. כך לדוגמה שינוי בכמות הליזאט (דגימה בתוספת בופר

ליזיס) הנלקחת (בהתאם למבחנות המתאימות) ושינוי בכמות נחל האלוזיה (הנחל המשמש לשחרור החומר הגנטי מהחרוזים המגנטיים) עשויים להביא לריכוזי חומר נגיפי גבוהים יותר בדגימה.

1) חשוב לציין כי במכשירים רבים המיועדים להפקת RNA ישנה חסימה של היצרן לשינויים מסוג זה. כמו כן שינויים אלה הינם תיאורטיים ועל כן חשוב לבדוק את השפעתם על יעילות הפקת ה-RNA.

2) בנוסף לשינויים בתהליך הפקת הרנ"א, יש לבחון אפשרות של שימוש בנפחים גדולים יותר של תמיסת הרנ"א המוכנסים לריאקציית ה-RTqPCR. (הערת שוליים- אפשרויות אלה ישימות פחות בקיטים מסחריים בהם היצרן מחייב פרוטוקול עבודה קשיח).

ב. **שימוש בפלואורופור¹³ יחיד עבור מספר מטרות - כיום רובן המוחלט של ערכות הגילוי המולקולאריות המיועדות לשימוש במכשירי RTqPCR מתבססות על זיהוי כל אתר מטרה בגנום הנגיף באמצעות פלורופור נפרד בעל אורך גל שונה. כך שזיהוי של מספר אתרים שונים בגנום הנגיף נעשה במקביל.**

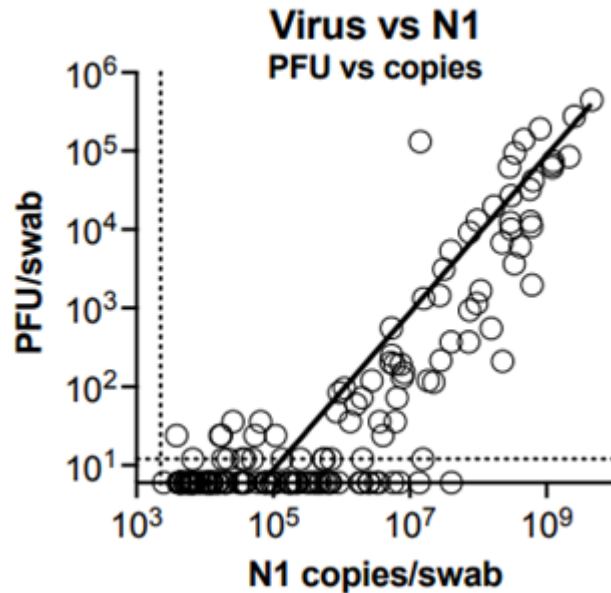
3. ניתן לשקול אפשרות נוספת שאינה נפוצה בבדיקות עבור נגיף הקורונה והיא שימוש בפלואורופור יחיד עבור מספר אתרים בגנום הנגיף, כך שתתקבל קריאה אחת במכשיר ה-RTqPCR המגלמת בתוכה את הסיגנל מכלל האתרים. קריאת הסיגנל כאות אחד מצטבר תביא לקריאה חזקה יותר שתביא לעליה ברגישות הבדיקה. אפשרות זו נוסתה כבר בהצלחה בעבר (52).

¹³ מולקולה בעלת מאפיינים פלואורסנטיים באורך גל מסוים.

נספח ד'

פירוט תופעת ההדבקה ביחס לעומס נגיפי העולה בבדיקה

1. במהלך החודשים האחרונים הולכות ומתחזקות העדויות לכך שישנה קורלציה בין ערכי תוצאות בדיקת RTqPCR, המעידות על ריכוז החומר הנגיפי בדגימה, לבין פוטנציאל ההדבקה כפי שהוא מגולם במבחני תרבית נגיפית (16,53-55).
2. בהתחשבות בשוני שבין ערכות בדיקה מולקולאריות ומבחני תרבית, בסף הרגישות הנמוך יחסית של בדיקת תרבית ביחס לבדיקה המולקולארית כמו גם בפיזור האפשרי בין דגימות, לא ניתן כיום לקבוע בוודאות רף מסוים של ערכי בדיקת RTqPCR אשר מתחתיו יהיה ניתן לקבוע בוודאות כי לנבדק חיובי אין כל יכולת הדבקה.
3. יחד עם זאת, הנתונים על הקשר בין השניים הינם מבוססים וחוזרים על עצמם. ועל כן ניתן להעריך כי פוטנציאל ההדבקה עולה ככל שערכי תוצאות בדיקת RTqPCR מעידים על ריכוז גבוה יותר של חומר נגיפי.
4. ישנה חשיבות גבוהה להגדרת מטרות הבדיקה, שכן הגדרה זו תתווה את אופן ביצוע הדגימות ואת פרשנות תוצאותיהן.
5. במידה שהמטרה העיקרית של בדיקות הינה מציאת מדביקים פוטנציאליים, בהתחשב במידע שהוצג ניתן לבצע בדיקות אלה בשיטת האיגום. שכן, הנבדקים המדביקים הינם פרטים בהם החומר הנגיפי נמצא בריכוז גבוה יחסית ולכן דגימתם סבילה בכמה מונים יותר לדילולים. על כן, בביצוע בדיקות אלה בשיטת האיגום הסיכון מטעויות שמקורן ברגישות השיטה נמוך ביותר.



גרף 3- רמת ההדבקה הוויראלית בתרבית כפונקציה של רמות ה RNA הנגיפי המחושבים מתוך ערכי ה- Ct [55].

6. חשוב לציין כי למרות שבדיקת ה RTqPCR הינה בעלת יכולת בדיקה כמותית, הבדיקה במתכונתה הנוכחית מהווה סמן איכותי בלבד להימצאות הנגיף בדגימה. אחת הסיבות העיקריות לכך הוא פיזור לא אחיד של הנגיף ברקמה הנבדקת ודיגום שגוי. אך חשוב לציין שבישראל ישנה נטילה ממספר רקמות (שתי כניסות בנחיריים לנזופרינג'ל וכניסה אחת לגרון) מה שמוריד את הסיכון לנטילת דגימה שגויה. כמו כן, היות ותרגום תוצאות ה RTqPCR מביא לטווח רחב במיוחד (אשר ניתן לתרגום של עותקים בודדים עד עשרות מיליוני עותקים) גם אם לא ניתן לקבוע באופן מדויק את רמת העומס הנגיפי ניתן להעריך את רמתו הכללית.

1. Arnold, M. E., et al. "Evaluation of the pooling of swabs for real-time PCR detection of low titre shedding of low pathogenicity avian influenza in turkeys." *Epidemiology & Infection* 141.6 (2013): 1286-1297.
2. Dorfman, Robert. "The detection of defective members of large populations." *The Annals of Mathematical Statistics* 14.4 (1943): 436-440.
3. May, Susanne, et al. "Pooled nucleic acid testing to identify antiretroviral treatment failure during HIV infection." *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 53.2 (2010): 194.
4. Pouwels, Koen B., et al. "Group Testing for SARS-CoV-2: Forward to the Past?." *PharmacoEconomics Open* 4.2 (2020): 207.
5. Shani-Narkiss, Haran, et al. "Efficient and Practical Sample Pooling High-Throughput PCR Diagnosis of COVID-19." *medRxiv* (2020).
6. Pfefferle, Susanne, et al. "Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2 using a high throughput system." *Eurosurveillance* 25.9 (2020): 2000152.
7. van Kasteren, Puck B., et al. "Comparison of commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19." *Journal of Clinical Virology* (2020): 104412.
8. Yelin, Idan, et al. "Evaluation of COVID-19 RT-qPCR test in multi-sample pools." *MedRxiv* (2020).
9. Abdalhamid, Baha, et al. "Assessment of specimen pooling to conserve SARS CoV-2 testing resources." *American journal of clinical pathology* 153.6 (2020): 715-718.
10. Cabrera, Jorge J., et al. "POOLING FOR SARS-CoV-2 CONTROL IN CARE INSTITUTIONS." *medRxiv* (2020).

11. Esbin, Meagan N., et al. "Overcoming the bottleneck to widespread testing: A rapid review of nucleic acid testing approaches for COVID-19 detection." *RNA* (2020): rna-076232.
12. Martin, Alexandra, et al. "High-sensitivity COVID-19 group testing by digital PCR." *arXiv preprint arXiv:2006.02908* (2020).
13. Suo, Tao, et al. "ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens." *Emerging Microbes & Infections just-accepted* (2020): 1-30.
14. Prachayangprecha, Slinporn, et al. "Exploring the potential of next-generation sequencing in detection of respiratory viruses." *Journal of clinical microbiology* 52.10 (2014): 3722-3730.
15. Xiao, Ai Tang, et al. "Dynamic profile of RT-PCR findings from 301 COVID-19 patients in Wuhan, China: a descriptive study." *Journal of Clinical Virology* (2020): 104346.
16. Wölfel, Roman, et al. "Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019." *Nature* 581.7809 (2020): 465-469.
17. He, Xi, et al. "Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19." *Nature medicine* 26.5 (2020): 672-675.
18. Tan, Wenting, et al. "Viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19." *MedRxiv* (2020).
19. Colton, Hayley, et al. "Improved sensitivity using a dual target, E and RdRp assay for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection: Experience at a large NHS Foundation Trust in the UK." *The Journal of Infection* (2020).
20. To, Kelvin Kai-Wang, et al. "Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection

by SARS-CoV-2: an observational cohort study." *The Lancet Infectious Diseases* (2020).

21. Zou, Lirong, et al. "SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients." *New England Journal of Medicine* 382.12 (2020): 1177-1179.
22. Arons, Melissa M., et al. "Presymptomatic SARS-CoV-2 infections and transmission in a skilled nursing facility." *New England journal of medicine* (2020).
23. Sakurai, Aki, et al. "Natural History of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection." *New England Journal of Medicine* (2020).
24. Lavezzo, Enrico, et al. "Suppression of a SARS-CoV-2 outbreak in the Italian municipality of Vo'." *Nature* (2020): 1-1.
25. Kim, Seong Eun, et al. "Viral kinetics of SARS-CoV-2 in asymptomatic carriers and presymptomatic patients." *International Journal of Infectious Diseases* (2020).

26. הוראת ראש שירותי בריאות הציבור, הפרופ' סיגל סדצקי, בנושא עיתוי ביצוע בדיקות CoV-SARS-2 למגעים, 23.06.20.

27. Moran, Angelica, et al. "The detection of SARS-CoV-2 using the cepheid xpert xpress SARS-CoV-2 and Roche cobas SARS-CoV-2 assays." *Journal of Clinical Microbiology* (2020).
28. Smithgall, Marie C., et al. "Comparison of Cepheid Xpert Xpress and Abbott ID Now to Roche cobas for the Rapid Detection of SARS-CoV-2." *Journal of Clinical Virology* (2020): 104428.

29. Hogan, Catherine A., et al. "Comparison of the Accula SARS-CoV-2 test with a laboratory-developed assay for detection of SARS-CoV-2 RNA in clinical nasopharyngeal specimens." *Journal of Clinical Microbiology* (2020).

30. https://www.omaha.com/livewellnebraska/group-testing-for-covid-19-used-in-nebraska-seen-as-promising-way-to- conserve-testing/article_123ac7d8-7b85-58bc-b12d-a52f855d530d.html

31. ראיון טלפוני עם מנהל המעבדה בנברסקה.

32. European Centre for Disease Prevention and Control. " Methodology for estimating point prevalence of SARS-CoV-2 infection by pooled RT-PCR testing". (2020)

33. Lohse, Stefan, et al. "Pooling of samples for testing for SARS-CoV-2 in asymptomatic people." *The Lancet Infectious Diseases* (2020).

34. ראיון טלפוני עם דוקטור ת'ורסטן פול, מהמעבדה בבית החולים האוניברסיטאי בסארלאנד .

35. Eis-Hübinger, Anna M., et al. "Ad hoc laboratory-based surveillance of SARS-CoV-2 by real-time RT-PCR using minipools of RNA prepared from routine respiratory samples." *Journal of Clinical Virology* (2020): 104381.

36. <https://www.mohfw.gov.in/pdf/letterregguidanceonpoolingsamplesfortesting001.pdf>

37. <https://www.freepressjournal.in/india/latest-coronavirus-update-up-to-begin-pool-testing-of-covid-suspects>

38. <https://timesofindia.indiatimes.com/city/kolkata/bengal-to-start-pool-testing-of-samples-in-low-risk-zones/articleshow/75227413.cms>

39. <https://www.tribuneindia.com/news/punjab/punjab-launches-pool-testing-71594>
40. <https://www.deccanherald.com/national/west/maharashtra-to-go-for-pool-testing-to-defeat-coronavirus-824331.html>
41. <https://theprint.in/india/andaman-nicobar-has-started-conducting-pool-tests-for-covid-19-first-in-the-country/400112/>
42. Ministry of Health and Family Welfare, Government of India. "Guidelines for RT-PCR based Pooled Sampling". (2020)
43. <https://www.businessghana.com/site/news/general/212322/Ghana-pool-testing-to-increase-detection>
44. <https://edition.cnn.com/2020/05/26/asia/coronavirus-wuhan-testing-intl-hnk/index.html>
45. <https://home.nzcity.co.nz/news/article.aspx?id=312327>
46. <https://www.tabletmag.com/sections/science/articles/pooling-covid-19-israel>
47. http://www.china.org.cn/world/Off_the_Wire/2020-03/19/content_75831901.htm
48. <https://science.thewire.in/the-sciences/covid-19-a-way-to-test-more-people-with-fewer-kits/>
49. Ben-Ami, Roni, et al. "Large-scale implementation of pooled RNA extraction and RT-PCR for SARS-CoV-2 detection." *Clinical Microbiology and Infection* (2020).
50. Shental, Noam, et al. "Efficient high throughput SARS-CoV-2 testing to detect asymptomatic carriers." *medRxiv* (2020).

51. השפעת דיגום ישיר לבופר ליזיס – מפא"ת, פורופ 876.

52. Meng, Shuang, and Jinming Li. "A novel duplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of hepatitis C viral RNA with armored RNA as internal control." *Virology journal* 7.1 (2010): 1-9.
53. La Scola, Bernard, et al. "Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 39.6 (2020): 1059.
54. Bullard, Jared, et al. "Predicting infectious SARS-CoV-2 from diagnostic samples." *Clinical Infectious Diseases* (2020).
55. Quicke, Kendra, et al. "Longitudinal Surveillance for SARS-CoV-2 RNA Among Asymptomatic Staff in Five Colorado Skilled Nursing Facilities: Epidemiologic, Virologic and Sequence Analysis." *medRxiv* (2020).
56. Westreich, Daniel J., et al. "Optimizing screening for acute human immunodeficiency virus infection with pooled nucleic acid amplification tests." *Journal of Clinical Microbiology* 46.5 (2008): 1785-1792.
57. עדכונים בנושא רגישות וסגוליות של בדיקות מולקולריות ל-COVID-19. מרכז המידע והידע הלאומי למערכה בקורונה. 04.06.20.
58. סקירת בדיקות אבחון מולקולריות חדשניות עבור COVID-19. מרכז המידע והידע הלאומי למערכה בקורונה. 12.06.20.
59. Foundation for Innovative New Diagnostics. SARS-CoV-2 molecular assay evaluation: results 2020 <https://www.finddx.org/covid-19/sarscov2evalmolecular/molecular-eval-results./>