

Review: Mengenal Metode *Sample Pooling* Untuk Pemeriksaan Spesimen SARS-CoV-2

SYAIFUL RIZAL

Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
Jl. Raya Jakarta-Bogor KM. 46 Cibinong, Indonesia. 16911
Email: drh.syaifulrizal@gmail.com

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2 has resulted in losses to death in various countries. Increased testing for COVID-19 screening is a must to prevent the spread of the viruses. The aim of this review is to explain in principle the differences between individual testing methods and sample pooling methods, as well as their advantages and benefits. There are several tests commonly used to detect SARS-CoV-2 including rapid antibody tests, rapid antigen tests, and PCR swab tests. The PCR swab test is a definitive test by the World Health Organization because its sensitivity and specificity can reach 100%. However, the test also has several drawbacks such as high cost, the need for standardized facilities, the risk of exposure, and the preparation and test procedures for the sample require trained-human resources. The sample pooling method is a modification of the individual test because in the process an individual swab specimen is mixed with different individual specimens together, then RNA is extracted and tested by RT-PCR. According to several references, the results of RT-PCR with the sample pooling method were still able to detect the presence of the SARS-CoV-2 gene even though there was an insignificant shift in C_T values under certain conditions. This method is proven to be able to increase testing of SARS-CoV-2 massively and more cost effective.

Keywords: COVID-19; diagnostic; sample pooling; SARS-CoV-2

INTISARI

Pandemi COVID-19 yang disebabkan oleh SARS-CoV-2 telah mengakibatkan kerugian hingga kematian di berbagai negara. Peningkatan metode tes untuk skrining COVID-19 merupakan suatu keharusan untuk mencegah penyebaran virus. Ulasan ini bertujuan untuk menjelaskan secara prinsip perbedaan antara metode uji individual dengan metode *sample pooling*, serta kelebihan dan manfaatnya. Terdapat beberapa uji yang umum digunakan untuk deteksi SARS-CoV-2 antara lain tes *rapid antibody*, tes *rapid antigen*, dan tes swab PCR. Tes swab PCR merupakan tes yang direkomendasikan oleh World Health Organization karena sensitivitas dan spesifisitasnya dapat mencapai 100%. Namun uji tersebut juga memiliki beberapa kekurangan yaitu biaya uji mahal, memerlukan fasilitas terstandarisasi, tingginya resiko paparan, serta preparasi dan prosedur pengujian sampel memerlukan sumber daya manusia terlatih. Metode *sample pooling* merupakan modifikasi dari uji individual karena pada prosesnya spesimen swab suatu individu dicampur dengan spesimen individu yang berbeda secara bersama-sama, kemudian dilakukan ekstraksi RNA dan diuji dengan RT-PCR. Menurut beberapa sumber referensi, hasil RT-PCR dengan metode *sample pooling* tetap mampu mendeteksi adanya gen SARS-CoV-2 meskipun terjadi pergeseran C_T value yang tidak signifikan dengan kondisi tertentu. Metode ini terbukti mampu meningkatkan pengujian SARS-CoV-2 secara masif dan lebih efektif dari segi ekonomi.

Kata kunci: COVID-19; diagnosa; *sample pooling*; SARS-CoV-2

PENDAHULUAN

Coronavirus Disease-19 (COVID-19) merupakan penyakit infeksius yang disebabkan oleh coronavirus *positive sense single-stranded RNA* atau dengan nama lain SARS-CoV-2 (Zhu *et al.*, 2020). Menurut *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), SARS-CoV-2 diklasifikasikan di bawah genus *Betacoronavirus* (subgenus *Sarbecovirus*) dari famili *Coronaviridae* (de Groot *et al.*, 2020).

Kasus SARS-CoV-2 pertama kali ditemukan di Wuhan, China pada bulan Desember 2019 (Huang *et al.*, 2020). Gejala yang diakibatkan oleh infeksi SARS-CoV-2 bersifat tidak spesifik, namun pada umumnya ditandai dengan demam, kelelahan, dan batuk kering (Huang *et al.*, 2020; She *et al.*, 2020). Sebagian besar pasien COVID-19 yang dengan gejala ringan atau sedang dapat sembuh tanpa memerlukan perawatan khusus. Namun,

penyakit ini dapat menyebabkan manifestasi klinis yang parah hingga kematian pada pasien atau individu dengan kondisi medis tertentu (seperti penyakit paru-paru kronis, diabetes, atau kondisi jantung yang serius) dapat menjadi lebih parah bila disertai dengan infeksi COVID-19 (Huang *et al.*, 2020).

Menurut World Health Organization (2021), sejak Desember 2019 hingga 30 Juli 2021 telah tercatat 196.553.009 kasus terkonfirmasi positif dan 4.200.412 orang diantaranya meninggal dunia di berbagai negara. Banyaknya kasus terkonfirmasi positif ini, salah satunya disebabkan oleh mutasi SARS-CoV-2 yang turut menyebabkan tingginya tingkat penularan. Hingga saat ini telah dilaporkan beberapa varian SARS-CoV-2 secara global (Burki, 2021) yaitu Alpha, Beta, Delta, Gamma, Epsilon, Zeta, Eta, Theta, Iota, dan Kappa (World Health Organization, 2021b).

Peningkatan metode tes untuk deteksi COVID-19 merupakan suatu keharusan untuk mencegah penyebaran virus (Millioni & Mortarino, 2021). Dari beberapa varian yang telah ditemukan tersebut, varian Alpha, Beta, dan Gamma menjadi perhatian khusus karena menyebabkan tingkat penularan yang tinggi, meningkatkan keparahan penyakit, dan secara signifikan mengurangi netralisasi antibodi yang dihasilkan selama infeksi atau setelah dilakukan vaksinasi (Janik *et al.*, 2021). Oleh karena itu dibutuhkan suatu metode yang cepat dan spesifik untuk peneguhan diagnosa pasien dengan gejala COVID-19, diharapkan pasien terinfeksi dapat segera ditangani.

Terdapat beberapa metode untuk mendeteksi SARS-CoV-2 antara lain: swab rapid antigen dan tes swab PCR. Uji swab rapid antigen memiliki prinsip mendeteksi protein (antigen) spesifik virus pada sampel saluran pernafasan (Schohy *et al.*, 2020) sedangkan tes swab PCR memiliki prinsip kerja yaitu melakukan amplifikasi asam nukleat melalui *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Weissleder *et al.*, 2020). Uji rapid antigen memiliki kelebihan waktu pengujian relatif singkat namun kurang sensitif (Schohy *et al.*, 2020) bila dibandingkan dengan tes swab PCR.

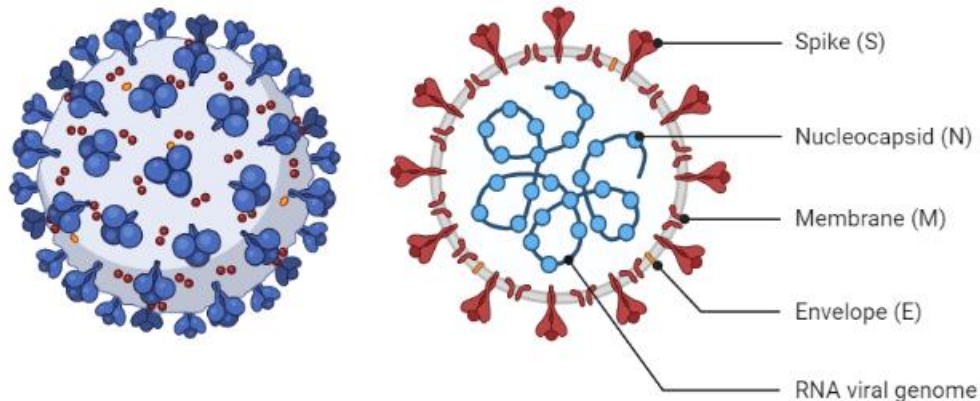
World Health Organization (WHO) merekomendasikan uji molekuler *reverse transcription* PCR (RT-qPCR) dengan sampel swab saluran pernafasan sebagai metode untuk mengidentifikasi dan peneguhan diagnosa infeksi SARS-CoV-2 (Corman *et al.*, 2020). Hal ini disebabkan sensitifitas PCR yang mencapai 90-100% dan spesifisitas 100%, sehingga memungkinkan untuk mendeteksi virus dalam spesimen dengan *viral load* yang rendah (Corman *et al.*, 2020; Vogels *et al.*, 2020). Selain itu metode RT-PCR memiliki keunggulan lain yaitu mampu memeriksa sampel dalam jumlah banyak dalam satu *batch* (Bai *et al.*, 2020). Namun uji RT-PCR juga memiliki beberapa kekurangan antara lain biaya uji mahal, memerlukan fasilitas terstandarisasi, tingginya resiko paparan, serta preparasi dan prosedur pengujian sampel memerlukan sumber daya manusia terlatih (Agustina & Fajrunni'mah, 2020). Hal ini menjadi tantangan tersendiri, terutama bagi negara berkembang dikarenakan kurangnya fasilitas laboratorium (L.S. Lau *et al.*, 2020). Oleh karena itu, diperlukan metode lain yang dapat meningkatkan kapasitas uji spesimen COVID-19 untuk meminimalkan kekurangan yang dimiliki RT-PCR yaitu dengan metode *sample pooling*. Metode *sample pooling* memiliki prinsip penggabungan atau pencampuran beberapa sampel spesimen swab ke dalam satu tempat seperti tabung (*pool*) untuk kemudian dilakukan pengujian sebagai sampel tunggal (Theagarajan, 2020). Metode ini dapat dijadikan alternatif solusi pengujian sampel COVID-19 secara masif dengan waktu pengujian yang relatif singkat, penghematan biaya yang lebih besar, serta penggunaan reagen yang lebih minimal (Abdalhamid *et al.*, 2020; Garg *et al.*, 2020).

Ulaskan ini bertujuan untuk menjelaskan secara prinsip perbedaan antara metode uji individual dengan metode *sample pooling*, serta kelebihan dan manfaatnya, sehingga dapat jadi rujukan sebagai metode yang dapat digunakan untuk peneguhan diagnosa COVID-19 di masa pandemi ini.

KARAKTERISTIK VIRUS SARS-CoV-2

Virus SARS-CoV-2 merupakan penyebab dari *Corona Virus Disease-2019* atau yang lebih dikenal dengan COVID-19. Secara taksonomi virus ini termasuk ke dalam ordo *Nidovirales*, famili *Coronaviridae*, subfamili *Orthocoronavirinae*, genus *Betacoronavirus* (Gorbalenya *et al.*, 2020). Coronavirus merupakan virus RNA beruntai tunggal positif (+) ssRNA) dengan ukuran diameter 80-220 nm (Park, 2020) dan panjang genom dari virus SARS-CoV-2 mencapai >30 kb, terdiri dari 14 *open reading frames* (ORFs) yang mengkode 27 protein (Wu *et al.*, 2020). Terdapat lima gen

esensial, empat diantaranya merupakan protein struktural (N, E, M dan S) dan gen untuk replikasi/transkripsi virus (*RNA dependent RNA polymerase*, RdRp). Struktur genomnya 5'-RdRp-S-E-M-N-3' dan jarang berubah-ubah (Park, 2020). Glikoprotein M atau yang disebut dengan matriks protein merupakan protein struktural yang paling berlimpah dan berperan untuk penempelan virion virus. Protein N berperan penting dalam fase morfogenesis siklus hidup virus (Siu *et al.*, 2008). Sedangkan protein S memainkan peran kritis dalam penempelan pada sel dan fusi pada membran sel inang (Alsobaie, 2021).



Gambar 1. Struktur *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2* (biorender.com)

Menurut Burki (2021), telah banyak ditemukan secara global beberapa varian SARS-CoV-2 selama pandemi ini. Varian SARS-CoV-2 dikelompokkan menjadi tiga kelompok yaitu: *Variant of concern*, *variant of interest*, dan *variant of high consequence* (Centers for Disease Control and Prevention, 2021), akan tetapi nomenklatur yang konsisten belum ditetapkan untuk varian SARS-CoV-2 (World Health Organization, 2021a). Namun per Juni 2021, *World Health Organization* (WHO) telah menetapkan penamaan 10 varian SARS-CoV-2 yang telah terdeteksi di sejumlah negara untuk memudahkan pelafalan dan untuk menghindari stigma negatif terhadap suatu negara. Varian-varian tersebut antara lain: Alpha (B.1.17), Beta (B.1.351), Delta (B.1.617.2), Gamma (P.1), Epsilon

(B.1.427/B.1.429), Zeta (P.2), Eta (B.1.525), Theta (P.3), Iota (B.1.526), dan Kappa (B.1.617.1) (World Health Organization, 2021b).

Berbagai negara telah melakukan upaya untuk mencegah tingginya angka penularan dan kematian akibat SARS-CoV-2, salah satunya adalah dengan melakukan *testing* dan *tracing*. Menurut Kim & Koo (2021), metode *testing* dan *tracing* dapat menurunkan laju infeksi serta dapat menghindarkan rumah sakit dari membeludaknya pasien yang terinfeksi SARS-CoV-2. Secara tersirat juga bahwa kemampuan *testing* dan *tracing* yang memadai dapat memungkinkan kita untuk menjadi lebih siap menghadapi resiko penyakit menular yang akan datang (Y. J. Kim & Koo, 2021).

METODE DIAGNOSA SARS-CoV-2

Uji diagnosa SARS-CoV-2 dapat dikelompokkan menjadi beberapa jenis yaitu: uji serologi, uji antigen dan uji amplifikasi asam nukleat (Weissleder *et al.*, 2020). Uji serologi atau *rapid test antibody* menggunakan prinsip *lateral flow assay*, mampu mendeteksi adanya antibodi SARS-CoV-2 melalui immunoglobulin G (IgG) dan immunoglobulin M (IgM) dalam darah pasien secara cepat (5-30 menit), proses pemeriksaannya tidak membutuhkan peralatan dan kemampuan khusus (Koczula & Gallotta, 2016; Bai *et al.*, 2020). Namun menurut Li *et al.* (2020), *rapid test antibody* dapat menghasilkan negatif palsu dikarenakan beberapa faktor antara lain kadar antibodi yang masih rendah, respon produksi antibodi yang berbeda-beda dari tiap individu, dan waktu paruh yang panjang pasca infeksi. Selain itu *rapid test antibody* juga dapat memberikan hasil positif palsu karena terjadi reaksi silang dengan virus patogen lainnya seperti SARS-CoV dan MERS-CoV atau kondisi-kondisi tertentu seperti kehamilan dan penyakit autoimun (Okba *et al.*, 2020).

Sedangkan uji rapid antigen memiliki prinsip mendeteksi protein (antigen) spesifik virus pada sampel yang berasal dari saluran pernafasan (Schohy *et al.*, 2020). Nukleokapsid merupakan protein spesifik yang umumnya dapat digunakan untuk mendeteksi SARS-CoV dan SARS-CoV-2 (S.K.P. Lau *et al.*, 2004). Uji ini tidak memerlukan adanya amplifikasi target gen yang dideteksi sehingga waktu yang diperlukan untuk pengujian relatif singkat namun bersifat kurang sensitif (Schohy *et al.*, 2020). Sampel swab nasofaring dengan *viral load* tinggi mampu dideteksi dengan baik, namun ketika *viral load* menurun sensitifitasnya juga turun. Selain itu, hanya dapat mendeteksi antigen saat virus aktif bereplikasi, sehingga uji ini paling tepat digunakan untuk mengidentifikasi infeksi pada fase akut atau tahap awal infeksi sehingga rentan menghasilkan negatif palsu dan positif palsu (Schohy *et al.*, 2020). Hasil positif palsu juga dapat terjadi jika antibodi pada strip uji bereaksi dengan antigen virus lain (WHO, 2020).

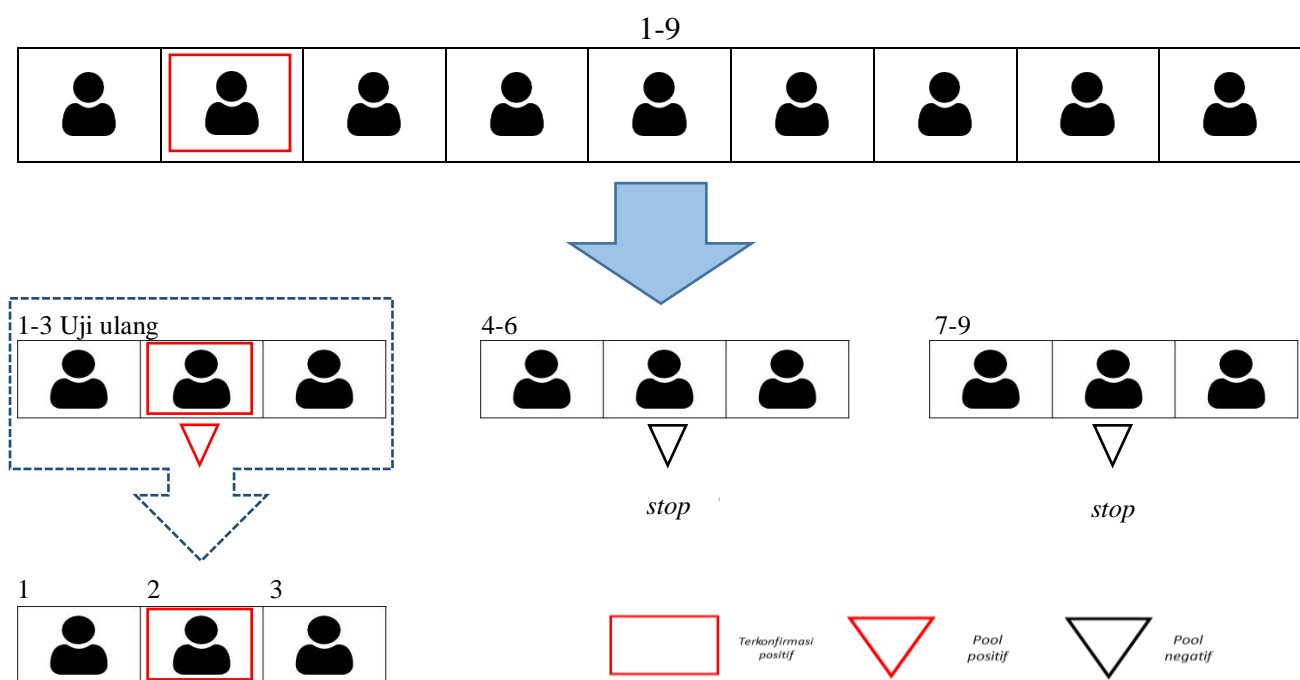
Pada uji amplifikasi asam nukleat, RNA virus dikonversi menjadi DNA yang kemudian diamplifikasi melalui *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Weissleder *et al.*, 2020). Metode umum yang digunakan adalah *real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) dan telah digunakan juga dalam diagnosis dan surveilans berbagai penyakit virus lainnya seperti SARS-CoV dan MERS-CoV (Corman *et al.*, 2020; Mackay *et al.*, 2002; Drosten *et al.*, 2013). Gen N1, N2, dan gen RdRp merupakan target gen yang biasa digunakan untuk mendeteksi SARS-CoV-2 (Weissleder *et al.*, 2020). Sampel swab dari saluran pernafasan atas (nasofaring dan orofaring) merupakan sampel yang paling sering digunakan untuk diagnosa SARS-CoV-2 dan jarang diambil dari saluran pernafasan bawah (cairan *bronchoalveolar lavage*) (See & Toh, 2020). Sampel swab yang telah dikoleksi harus segera diproses dan diuji, jika tidak maka sampel dapat disimpan hingga 72 jam pada suhu 2-8°C. Namun bila disimpan lebih dari 72 jam, maka sampel harus dibekukan pada -70 °C.

Uji RT-PCR merupakan *gold standart* untuk diagnosa SARS-CoV-2 karena memiliki kemampuan deteksi pada konsentrasi yang rendah (0,5 salinan/ μ L) dengan sensitivitas 90-100% dan spesivitas 100%, sehingga memungkinkan untuk mendeteksi virus dalam spesimen dengan *viral load* yang rendah (Corman *et al.*, 2020; (Vogels *et al.*, 2020). Selain itu metode RT-PCR memiliki keunggulan lain yaitu mampu memeriksa sampel dalam jumlah banyak dalam satu *batch* (Bai *et al.*, 2020). Namun uji RT-PCR juga memiliki beberapa kekurangan antara lain biaya uji mahal, memerlukan fasilitas terstandarisasi, tingginya resiko paparan, serta preparasi dan prosedur pengujian sampel memerlukan sumber daya manusia terlatih (Agustina & Fajrunni'mah, 2020). Selain itu permintaan pengujian yang meningkat selama pandemi menyebabkan kekurangan alat swab, alat pelindung diri (APD), reagen, dan peralatan seperti *thermocyclers* dan kontainmen *biosafety level-2*, hingga menyebabkan terlambatnya peneguhan diagnosa.

METODE SAMPLE POOLING

Prinsip kerja dari *sample pooling* adalah menggabungkan atau mencampur beberapa sampel spesimen swab ke dalam satu tabung (*pool*) untuk kemudian dilakukan pengujian sebagai sampel tunggal (Theagarajan, 2020). Menurut Van *et al.* (2012), sebelumnya metode *sample pooling* telah terbukti efektif dalam mendeteksi beberapa penyakit lain seperti HIV, chlamydia, malaria dan influenza. *Sample pooling* dilakukan dengan mencampur

beberapa sampel swab individu yang berbeda secara bersama-sama, kemudian dilakukan ekstraksi RNA dan diuji dengan RT-PCR (S.Y. Kim *et al.*, 2020). Jika hasilnya negatif maka setiap sampel dari *pooling* dianggap negatif sehingga tidak diperlukan pengujian individu lebih lanjut (Gambar 2.), dan sebaliknya jika suatu *pool* didapatkan hasil positif maka sampel yang ada di dalam *pool* tersebut akan diuji lagi secara individual (Abdalhamid *et al.*, 2020).



Gambar 2. Ilustrasi metode *sample pooling* (Millioni & Mortarino, 2021)

Perbedaan antara metode uji individual dengan metode *pooling* adalah pada waktu dan biaya (reagen, tenaga kerja, pelaporan) yang dibutuhkan untuk satu kali pengujian (Abdalhamid *et al.*, 2020). Pada uji individual diperlukan ekstraksi RNA satu per satu pada sampel lalu dilakukan uji RT-PCR untuk mendapatkan hasil, sedangkan metode *pooling* mencampur beberapa sampel sekaligus untuk diekstraksi kemudian dilakukan RT-PCR (Abdalhamid *et al.*, 2020). Menurut Lim *et al.* (2020), terdapat pergeseran nilai *cycle threshold* (C_T value) pada metode *sample pooling* namun tidak berbeda signifikan bila dibandingkan metode uji individual. Hasil tersebut dapat dipengaruhi beberapa faktor,

antara lain: rendahnya angka prevalensi virus pada suatu populasi, jumlah sampel yang diuji, dan jumlah sampel yang berada dalam satu *pool* (Thanh *et al.*, 2021).

Berbagai studi untuk menentukan banyaknya jumlah sampel dalam satu *pool* telah dilakukan, namun ukuran yang optimal adalah sekitar 20-30 sampel dengan angka prevalensi virus 1%. Sedangkan jika angka prevalensinya sekitar 15% maka dalam satu *pool* berisi sekitar 15 sampel. Dengan kata lain, semakin tinggi prevalensi virus pada suatu populasi maka jumlah sampel yang digunakan dalam suatu *pool* akan berkurang (Ghosh *et al.*, 2020; Shani-Narkiss *et al.*, 2020; Millioni & Mortarino, 2021; Mutesa *et al.*, 2021). Metode *pooling*

juga memiliki kekurangan yaitu jika *pooling* dilakukan dengan jumlah sampel yang terlalu banyak dalam satu *batch*, maka dapat mengurangi sensitivitas dan memunculkan hasil negatif palsu terutama pada sampel dengan *viral load* rendah dikarenakan terjadi pengenceran (S. Y. Kim *et al.*, 2020; Sahajpal *et al.*, 2020). Dengan metode *sample pooling* diharapkan dapat meningkatkan kapasitas skrining terhadap SARS-CoV-2 pada suatu populasi yang besar secara cepat pada kondisi yang terbatas, sehingga dapat mempercepat peneguhan diagnosa (Deka & Kalita, 2020).

KESIMPULAN

Metode *sample pooling* bukan merupakan metode baru untuk mendeteksi suatu penyakit, sehingga dapat digunakan sebagai metode skrining SARS-CoV-2. Metode ini dianggap lebih efisien dan lebih cepat bila dibandingkan dengan metode pengujian individual karena dapat menguji lebih banyak sampel sekaligus dalam satu waktu, menghemat penggunaan reagen, dan menurunkan beban kerja. Metode ini memiliki potensi sebagai metode alternatif skrining penyakit menular di masa depan sehingga nantinya dapat mempercepat proses skrining dan peneguhan diagnosa penyakit pada suatu populasi besar.

DAFTAR PUSTAKA

Abdallahamid, B., Bilder, C. R., Garrett, J. L., & Iwen, P. C. 2020. Cost effectiveness of sample pooling to test for SARS-CoV-2. *Journal of Infection in Developing Countries*. vol. 14(10): 1136–1137. <https://doi.org/10.3855/jidc.13935>.

Agustina, A. S., & Fajrunni, R. 2020. Perbandingan metode RT-PCR dan tes rapid antibody untuk deteksi COVID-19. *Jurnal Kesehatan Manarang*. vol. 6(Khusus): 47–54. <https://doi.org/10.33490/jkm.v6ikhusus.317>.

Alsobaie, S. 2021. Understanding the molecular biology of SARS-CoV-2 and the COVID-19 pandemic: A Review. *Infection and Drug Resistance*. vol. 14: 2259–2268. <https://doi.org/10.2147/idr.s306441>.

Bai, H., Cai, X., & Zhang, X. 2020. Landscape Coronavirus Disease 2019 test (COVID-19 test) in vitro -- A comparison of PCR vs Immunoassay vs Crispr-Based test. *OSF Preprints*. <https://doi.org/https://doi.org/10.31219/osf.io/6eagn>.

Burki, T. 2021. Understanding variants of SARS-CoV-2. *Lancet (London, England)*. vol. 397(10273): 462. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00298-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00298-1).

Centers for Disease Control and Prevention. 2021. *SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions*. Cdc. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variantinfo.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fcases-updates%2Fvariant-surveillance%2Fvariant-info.html.

Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K. W., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G. J. C., Haagmans, B. L., Van Der Veer, B., Van Den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J. L., Ellis, J., Zambon, M., ... Drosten, C. 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. vol. 25(3): 23–30. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.

de Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R., Enjuanes, L., Gorbalenya, A. E., Holmes, K. V., Perlman, S., Poon, L., Rottier, P. J. M., Talbot, P. J., & Woo, P. C. Y. 2020. *Coronaviridae-Positive Sense RNA Viruses-Positive Sense RNA Viruses (2011)-ICTV*. Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae.

Deka, S., & Kalita, D. 2020. Effectiveness of sample pooling strategies for SARS-CoV-2 mass screening by RT-PCR: A scoping review. *Journal of Laboratory Physicians*. vol. 12(03): 212–218. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1721159>.

Drosten, C., Seilmaier, M., Corman, V. M., Hartmann, W., Scheible, G., Sack, S., Guggemos, W., Kallies, R., Muth, D., Junglen, S., Müller, M. A., Haas, W., Guberina, H., Röhnisch, T., Schmid-Wendtner, M., Aldabbagh, S., Dittmer, U., Gold, H., Graf, P., ... Wendtner, C. M. 2013. Clinical features and virological analysis of a case of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *The Lancet Infectious Diseases*. vol. 13(9): 745–751. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70154-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70154-3).

Garg, J., Singh, V., Pandey, P., Verma, A., Sen, M., Das, A., & Agarwal, J. 2020. Evaluation of sample pooling for diagnosis of COVID-19 by real time-PCR: A resource-saving combat strategy. *Journal of Medical Virology*: 1–6. <https://doi.org/10.1002/jmv.26475>.

Ghosh, S., Rajwade, A., Krishna, S., Gopalkrishnan, N., Schaus, T., Chakravarthy, A., Varahan, S., Appu, V., Ramakrishnan, R., Ch, S., Jindal, M., Bhupathi, V., Gupta, A., Jain, A., Agarwal, R., Pathak, S., Rehan, M. A., Consul, S., Gupta, Y.,

- ... Gopalkrishnan, M. 2020. Tapestry: A Single-Round smart pooling technique for COVID-19 testing. *MedRxiv*, 2020.04.23.20077727. <https://doi.org/10.1101/2020.04.23.20077727>.
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L. L. M., Samborskiy, D. V., Sidorov, I. A., Sola, I., & Ziebuhr, J. 2020. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*. vol. 5(4): 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. vol. 395: 497–506.
- Janik, E., Niemcewicz, M., Podogrocki, M., Majsterek, I., & Bijak, M. 2021. The emerging concern and interest SARS-CoV-2 variants. *Pathogens*. vol. 10(6): 1–13. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060633>.
- Kim, S. Y., Lee, J., Sung, H., Lee, H., Han, M. G., Yoo, C. K., Lee, S. W., & Hong, K. H. (2020). Pooling upper respiratory specimens for rapid mass screening of COVID-19 by real-time RT-PCR. *Emerging Infectious Diseases*. vol. 26(10): 2469–2472. <https://doi.org/10.3201/eid2610.201955>.
- Kim, Y. J., & Koo, P. H. 2021. Effectiveness of testing and contact-tracing to counter COVID-19 pandemic: Designed experiments of agent-based simulation. *Healthcare (Switzerland)*. vol. 9(6): 1-16. <https://doi.org/10.3390/healthcare9060625>.
- Koczula, K. M., & Gallotta, A. 2016. Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry*. vol. 60(1): 111–120. <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>.
- Lau, L. S., Samari, G., Moresky, R. T., Casey, S. E., Kachur, S. P., Roberts, L. F., & Zard, M. 2020. COVID-19 in humanitarian settings and lessons learned from past epidemics. *Nature Medicine*. vol. 26(5): 647–648. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0851-2>.
- Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Wong, B. H. L., Tsoi, H. W., Woo, G. K. S., Poon, R. W. S., Chan, K. H., Wei, W. I., Malik Peiris, J. S., & Yuen, K. Y. 2004. Detection of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in SARS patients by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*. vol. 42(7): 2884–2889. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.2884-2889.2004>.
- Li, Z., Yi, Y., Luo, X., Xiong, N., Liu, Y., Li, S., Sun, R., Wang, Y., Hu, B., Chen, W., Zhang, Y., Wang, J., Huang, B., Lin, Y., Yang, J., Cai, W., Wang, X., Cheng, J., Chen, Z., ... Ye, F. 2020. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *Journal of Medical Virology*. vol. 92(9): 1518–1524. <https://doi.org/10.1002/jmv.25727>.
- Lim, K. L., Johari, N. A., Wong, S. T., Khaw, L. T., Tan, B. K., Chan, K. K., Wong, S. F., Elaine Chan, W. L., Ramzi, N. H., Chooi Lim, P. K., Hakim, S. L., & Voon, K. 2020. A novel strategy for community screening of SARS-CoV-2 (COVID-19): Sample pooling method. *PLoS ONE*. vol. 15(8): 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238417>.
- Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*. vol. 30(6): 1292–1305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>.
- Millioni, R., & Mortarino, C. 2021. Test groups, not individuals: a review of the pooling approaches for SARS-CoV-2 diagnosis. *Diagnostics*. vol. 11(68): 1–13. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11010068>.
- Mutesa, L., Ndishimye, P., Butera, Y., Souopgui, J., Uwineza, A., Rutayisire, R., Ndoricimpaye, E. L., Musoni, E., Rujeni, N., Nyatanyi, T., Ntagwabira, E., Semakula, M., Musanabaganwa, C., Nyamwasa, D., Ndashimye, M., Ujeneza, E., Mwikarago, I. E., Muvunyi, C. M., Mazarati, J. B., ... Ndifon, W. 2021. A pooled testing strategy for identifying SARS-CoV-2 at low prevalence. *Nature*. vol. 589(7841): 276–280. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2885-5>.
- Okba, N. M. A., Marcel A. Müller, Wentao Li, Chunyan Wang, Corine H. GeurtsvanKessel, Victor M. Corman, Mart M. Lamers, Reina S. Sikkema, Erwin de Bruin, Felicity D. Chandler, Yazdan Yazdanpanah, Quentin Le Hingrat, Diane Descamps, Nadhira Houhou-Fidouh, Chantal B.E.M. Reusken, Berend-Jan Bosch, Christian Drosten, Marion P.G. Koopmans, & Bart L. Haagmans. 2020. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerging Infectious Diseases*. vol. 26(7): 1478–1488. <https://doi.org/10.1101/2020.03.11.987958>.
- Park, S. E. 2020. Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2; coronavirus disease-19). *Clinical and Experimental Pediatrics*. vol. 63(4): 119–124. <https://doi.org/10.14776/piv.2020.27.e9>.
- Sahajpal, N. S., Mondal, A. K., Njau, A., Ananth, S., Jones, K., Ahluwalia, P. K., Ahluwalia, M., Jilani, Y., Chaubey, A., Hegde, M., Kota, V., Rojiani, A., & Kolhe, R. 2020. Proposal of RT-PCR-Based Mass Population Screening for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

- (Coronavirus Disease 2019). *Journal of Molecular Diagnostics*. vol. 22(10): 1294–1299. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.07.001>.
- Scohy, A., Anantharajah, A., Bodéus, M., Kabamba-Mukadi, B., Verroken, A., & Rodriguez-Villalobos, H. 2020. Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. *Journal of Clinical Virology*. vol. 129(May): 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104455>.
- See, A., & Toh, S. T. 2020. Respiratory sampling for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: An Overview. *Head and Neck*. vol. 42(7): 1652–1656. <https://doi.org/10.1002/hed.26232>.
- Shani-Narkiss, H., Gilday, O. D., Yayon, N., & Landau, I. D. 2020. Efficient and practical sample pooling for high-throughput PCR diagnosis of COVID-19. *MedRxiv*: 1-16. <https://doi.org/10.1101/2020.04.06.20052159>.
- She, J., Jiang, J., Ye, L., Hu, L., Bai, C., & Song, Y. 2020. 2019 novel coronavirus of pneumonia in Wuhan, China: emerging attack and management strategies. *Clinical and Translational Medicine*. vol. 9(19): 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40169-020-00271-z>.
- Siu, Y. L., Teoh, K. T., Lo, J., Chan, C. M., Kien, F., Escriou, N., Tsao, S. W., Nicholls, J. M., Altmeyer, R., Peiris, J. S. M., Bruzzone, R., & Nal, B. 2008. The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles. *Journal of Virology*. vol. 82(22): 11318–11330. <https://doi.org/10.1128/jvi.01052-08>.
- Thanh, T. T., Nhan, N. T. T., Mai, H. K., Trieu, N. B., Huy, L. X., Thuy, H. T. T., Chung, L. T., Anh, N. N., Hong, N. T. T., Thang, B. T., Thu, N. T. H., Chi, L. T. K., Hanh, N. T., Hoang, N. H., Chau, N. V. V., Thwaites, G., Hung, D. T., Tan, L. Van, & Yen, N. T. K. 2021. The Application of Sample Pooling for Mass Screening of SARS-CoV-2 in an Outbreak of COVID-19 in Vietnam. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. vol. 104(4): 1531–1534. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1583>.
- Theagarajan, L. N. 2020. *Group Testing for COVID-19: How to Stop Worrying and Test More*. <http://arxiv.org/abs/2004.06306>.
- Van, T. T., Miller, J., Warshauer, D. M., Reisdorf, E., Jernigan, D., Humes, R., & Shulta, P. A. 2012. Pooling nasopharyngeal/throat swab specimens to increase testing capacity for influenza viruses by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. vol. 50(3): 891–896. <https://doi.org/10.1128/JCM.05631-11>.
- Vogels, C. B. F., Brito, A. F., Wyllie, A. L., Fauver, J. R., Ott, I. M., Kalinich, C. C., Petrone, M. E., Casanovas-Massana, A., Catherine Muenker, M., Moore, A. J., Klein, J., Lu, P., Lu-Culligan, A., Jiang, X., Kim, D. J., Kudo, E., Mao, T., Moriyama, M., Oh, J. E., ... Grubaugh, N. D. 2020. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nature Microbiology*. vol. 5(10): 1299–1305. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0761-6>.
- Weissleder, R., Lee, H., Ko, J., & Pittet, M. J. 2020. COVID-19 diagnostics in context. *Science Translational Medicine*. vol. 12(546): 1–6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc1931>.
- WHO. 2020. Saran penggunaan tes imunodiagnostik di fasyankes (point of care) untuk COVID-19. 8 April, *Pernyataan Keilmuan*, 1–4. <https://www.who.int/docs/default-source/>.
- World Health Organization. (2021a). SARS-CoV-2 genomic sequencing for public health goals. In *WHO - Interim guidance* (Issue January). https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-genomic_sequencing-2021.1.
- World Health Organization. (2021b). *Update 60 – SARS-CoV-2 nomenclature variants*. <https://www.who.int/publications/m/item/update-60-sars-cov-2-nomenclature-variants>.
- Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J., Sheng, J., Quan, L., Xia, Z., Tan, W., Cheng, G., & Jiang, T. 2020. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host and Microbe*. vol. 27(3): 325–328. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. 2020. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. vol. 382(8): 727–733. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>.