



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
*«Προηγμένα Συστήματα και Μέθοδοι στη Βιοϊατρική Τεχνολογία»*

**Μοριακή Μέθοδος Ανάλυσης (PCR) –  
Ιστορική Αναδρομή – Εφαρμογές –  
Καινοτομίες - Εξελίξεις**

**ΧΡΥΣΟΒΕΡΓΗΣ ΑΝΔΡΕΑΣ**  
Αριθμός Μητρώου: 1921

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΒΑΛΛΗΣ**  
Καθηγητής

Αθήνα 10/01/2024

Η Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ο Επιβλέπων Καθηγητής

Ιωάννης Βαλαής

Νεκτάριος Καλύβας

Χρήστος Μιχαήλ

Καθηγητής

Αναπληρωτής Καθηγητής Αναπληρωτής Καθηγητής

[ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ]

[ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ]

[ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ]

**ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Ο υπογράφων Χρυσοβέργης Ανδρέας του Χρυσάνθου, με αριθμό μητρώου 1921 φοιτητής του Τμήματος Μηχανικών Βιοϊατρικής της Σχολής Μηχανικών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του διπλώματός μου».

Ημερομηνία

10/01/2024

Ο Δηλών

Χρυσοβέργης Ανδρέας



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην τρέχουσα εργασία αναφέρονται βασικές πληροφορίες σχετικά με τη Μοριακή Μέθοδο Ανάλυσης (PCR). Σκοπός είναι η συλλογή και παρουσίαση πληροφοριών που αφορούν την PCR από τη δημιουργία της και ανάπτυξή της μέχρι και σήμερα.

Για τη συλλογή των εν λόγω πληροφοριών πραγματοποιήθηκε αναζήτηση επιστημονικών άρθρων και βιβλίων στις μηχανές αναζήτησης Google Scholar, Pubmed, Elsevier κ.λπ. με τη χρήση λέξεων και φράσεων κλειδιών όπως μοριακή μέθοδος ανάλυσης PCR, εξελίξεις PCR, καινοτομίες PCR, εφαρμογές PCR, history of PCR, applications of PCR κ.α. Η αναζήτηση αφορούσε τα τελευταία 10 έτη, δηλαδή από το 2013 έως το 2023.

Τα αποτελέσματα είναι αρκετά περιορισμένα ως προς τα έτη δημοσίευσης, καθώς τα πιο σχετικά άρθρα δημοσιεύθηκαν κυρίως τα τελευταία 2 έτη. Από την άλλη, βρέθηκαν αρκετά άρθρα σχετικά με συγκεκριμένες ασθένειες για την διάγνωση οποίων χρησιμοποιείται η PCR, καθώς και κάποιες καινοτομίες οι οποίες αναπτύχθηκαν βασιζόμενες στη μέθοδο αυτή.

**Λέξεις Κλειδιά:** *μοριακή μέθοδος ανάλυσης στην διάγνωση, ιστορική αναδρομή PCR, καινοτομίες PCR, εξελίξεις PCR, μοριακή μέθοδος ανάλυσης PCR εφαρμογές στην ιατρική διάγνωση*

## ABSTRACT

Basic information about the Molecular Analysis Method (PCR) is reported in the current paper. The purpose is to collect and present information about PCR from its creation and development until today.

In order to collect this information, scientific articles and books were searched in Google Scholar, Pubmed, Elsevier, etc. search engines. using key words and phrases such as PCR molecular analysis method, PCR developments, PCR innovations, PCR applications, history of PCR, applications of PCR etc. The search covered the last 10 years, i.e. from 2013 to 2023.

The results are quite limited in terms of publication years, as the most relevant articles were mostly published in the last 2 years. On the other hand, several articles were found about specific diseases for the diagnosis of which PCR is used, as well as some innovations that were developed based on this method.

***Keywords: history of PCR in vitro diagnostics, καινοτομίες της μοριακής μεθόδου ανάλυσης PCR στην in vitro διάγνωση, εξελίξεις της μοριακής μεθόδου ανάλυσης PCR στην in vitro διαγνωστική, molecular analysis method PCR, applications in in vitro diagnosis, innovations of the molecular method of PCR analysis in in vitro diagnosis, developments of the molecular method of PCR analysis in in vitro diagnostics.***

**Ευχαριστίες:**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την σύζυγο μου Αθανασία Νίνογλου, η οποία για πολλοστή φορά με στήριξε στις προσπάθειες μου για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή Βαλαή Ιωάννη για την υπομονή και την αμέριστη υποστήριξή του.

## Πίνακας περιεχομένων

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>8</b>
<b>1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ PCR.....</b>	<b>10</b>
ΤΥΠΙΚΗ PCR (STANDARD PCR).....	11
ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ-PCR (RT-PCR) (REVERSE TRANSCRIPTION RT- PCR) .....	13
REAL TIME-PCR Η ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR (QPCR) (REAL TIME-PCR OR QUANTITATIVE PCR - QPCR) .....	13
ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ RT-PCR/QPCR (RT-PCR/QPCR COMBINED).....	14
<b>2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΈΡΕΥΝΑΣ .....</b>	<b>15</b>
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>17</b>
3.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ .....	18
3.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	21
<i>COVID-19</i> .....	21
<i>Leishmania (Λείσμανία)</i> .....	23
<i>Uveitis (Ραγοειδίτιδα)</i> .....	26
<i>Aspergillosis (Ασπεργίλλωση)</i> .....	28
<i>Συγκρίσεις PCR με Συμβατικές Μεθόδους</i> .....	31
<i>Διαγνώσεις σε Ζώα και Οργανισμούς</i> .....	38
<i>Διάφορες Εφαρμογές</i> .....	42
3.3 ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΕΣ – ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ .....	50
<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ - ΠΗΓΕΣ.....</b>	<b>70</b>

## Εικόνες

Εικόνα 1 Block diagram of real-time PCR .....	10
Εικόνα 2 Διάγραμμα ροής επιλογής μελετών ανασκόπησης.....	18
Εικόνα 3 Ορόσημα των τεχνικών μοριακής διάγνωσης. ....	20
Εικόνα 4 Αναλυτές PCR Roche c8800 από το εργαστήριο του Ε.ΚΕ.Α[61].....	69

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην τρέχουσα διπλωματική επιδιώκεται να συγκεντρωθούν βασικές πληροφορίες σχετικά με την Μοριακή Μέθοδο Ανάλυσης (PCR). Σκοπός είναι η συλλογή και η παρουσίαση πληροφοριών που αφορούν την PCR από τη δημιουργία και ανάπτυξή της έως και σήμερα. Πιο συγκεκριμένα, στόχος είναι η δημιουργία μίας ολοκληρωμένης παρουσίασης, όσο αυτό καθίσταται δυνατό, της μεθόδου PCR δίνοντας έμφαση στις διαγνωστικές εφαρμογές της ιατρικής και τις εξελίξεις της πάνω σε αυτές.

Για την υλοποίηση της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν οι διαδικτυακές μηχανές αναζήτησης επιστημονικών άρθρων και βιβλίων όπως Google Scholar, Pubmed, Elsevier κ.ά. Κατά την αναζήτηση χρησιμοποιήθηκαν λέξεις κλειδιά όπως μοριακή μέθοδος ανάλυσης στην διάγνωση, ιστορική αναδρομή PCR, καινοτομίες PCR, εξελίξεις PCR, μοριακή μέθοδος ανάλυσης PCR εφαρμογές στην ιατρική διάγνωση, history of PCR in vitro diagnostics, καινοτομίες της μοριακής μεθόδου ανάλυσης PCR στην in vitro διάγνωση, εξελίξεις της μοριακής μεθόδου ανάλυσης PCR στην in vitro διαγνωστική, molecular analysis method PCR, applications in in vitro diagnosis, innovations of the molecular method of PCR analysis in in vitro diagnosis, developments of the molecular method of PCR analysis in in vitro diagnostics. Η αναζήτηση των ανωτέρω πληροφοριών για την ιστορική αναδρομή, για τις εφαρμογές, καινοτομίες και εξελίξεις περιορίζεται στα τελευταία δέκα (10) έτη.

Βασικές δυσκολίες που παρουσιάστηκαν κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της έρευνας είναι ο μεγάλος αριθμός των αποτελεσμάτων που προέκυψαν κατά την αναζήτηση και ο ενδελεχής έλεγχος που διεξήχθη σε κάθε ένα από αυτά για να βρεθούν οι τελικές και κατάλληλες πηγές πληροφοριών που είναι απαραίτητες για τη μελέτη μας. Επιπλέον, βρέθηκαν λίγες πηγές στις οποίες αναφέρεται ενδελεχής η ιστορική εξέλιξη της μεθόδου PCR.

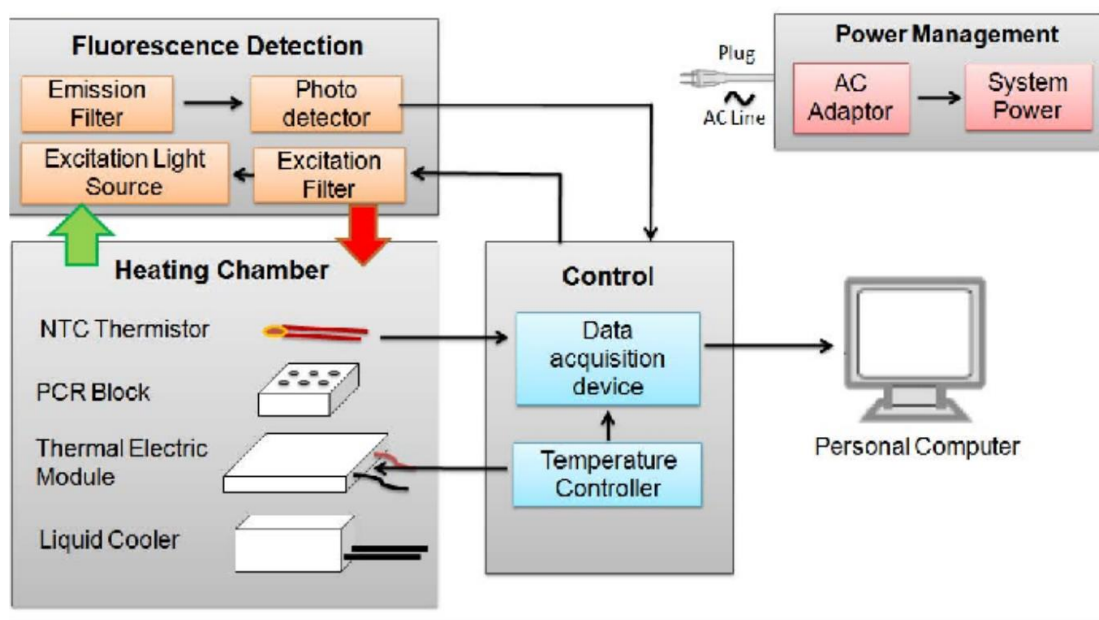
Η δομή της εργασίας μας ξεκινά με το πρώτο κεφάλαιο (Κεφάλαιο 1), στο οποίο αναφέρεται συνοπτικά το θεωρητικό υπόβαθρο της Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR). Στη συνέχεια, παρουσιάζεται η μεθοδολογία έρευνας που ακολουθήθηκε, (Κεφάλαιο 2) δηλαδή τα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την αναζήτηση πληροφοριών, οι λέξεις κλειδιά και η



διαδικασία επιλογής αναφορών. Στο Κεφάλαιο 4, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αναζήτησής μας, διατυπώνοντας μία ιστορική αναδρομή της (Κεφάλαιο 3.1), συνεχίζοντας με τις εφαρμογές της μεθόδου αυτής στους διάφορους κλάδους της ιατρικής και *in vitro* διαγνωστικής (Κεφάλαιο 3.2) και τις καινοτομίες και εξελίξεις της μοριακής μεθόδου ανάλυσης που έχουν αναπτυχθεί με την πάροδο των χρόνων (Κεφάλαιο 3.3). Στο τελευταίο κεφάλαιο της εργασίας (Κεφάλαιο 4), πραγματοποιείται σχολιασμός των αποτελεσμάτων που προαναφέρθηκαν και παρουσιάζονται τα δικά μας συμπεράσματα βάσει αυτών.

## 1. Θεωρητικό Υπόβαθρο PCR

Υπάρχουν ποικίλες μέθοδοι μοριακής ανάλυσης, οι οποίες χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές βιολογικής και χημικής έρευνας, για την ανάλυση μορίων διαφόρων υγρών. Στην τρέχουσα μελέτη, επικεντρωνόμαστε στις ιατρικές εφαρμογές κατά τις οποίες χρησιμοποιείται η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR). Οι μοριακές διαγνωστικές τεχνικές έχουν γίνει σημείο αναφοράς για εργαστήρια υγειονομικής περίθαλψης, κλινικής διάγνωσης και δοκιμών. Ο απαραίτητος εξοπλισμός (ένας θερμοκυκλοποιητής) και τα αντιδραστήρια που απαιτούνται (θερμοσταθερές πολυμεράσες, ολιγονουκλεοτίδια κ.λπ.) για την PCR είναι άμεσα διαθέσιμα και φθηνά. [1]



Εικόνα 1 Block diagram of real-time PCR

Η αρχή λειτουργίας της PCR έχει ως βάση τη χρήση της DNA πολυμεράσης. Η μέθοδος αυτή αποτελεί την *in vitro* αντιγραφή συγκεκριμένων αλληλουχιών του DNA και έχει την δυνατότητα της δημιουργίας δεκάδων δισεκατομμύριων αντίγραφων ενός θραύσματος DNA συγκεκριμένου από ένα μονο εκχύλισμα DNA. Αναλυτικότερα, οι δύο κλώνοι του μορίου DNA στόχου στις υψηλές θερμοκρασίες μετουσίωσης οι οποίες φτάνουν γύρω τους 95°C, διαχωρίζονται λόγω θραύσης των δεσμών G-C και A-T. [2]

Όλη η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε 3 στάδια. Στο αρχικό στάδιο υφίσταται ο διαχωρισμός των δύο κλώνων του DNA κάτι που ονομάζεται μετουσίωση. Αυτό συμβαίνει λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας και αρχίζει να πραγματοποιείται όταν η θερμοκρασία φτάσει τους 94°C. Τότε το DNA της μήτρας αλλάζει ουσία. Το DNA της μήτρας χρησιμοποιείται ως μήτρα κατά την διαδικασία της αντιγραφής. Αναλυτικότερα, οι δεσμοί υδρογόνου δεν μπορούν να διατηρήσουν την δομή τους σε θερμοκρασίες άνω των 80°C και για αυτό το λόγο γίνεται η μετρατροπή του δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο.

Σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται ο υβριδισμός, για την ολοκλήρωση του οποίου είναι απαραίτητο να υπάρχει θερμοκρασία μεταξύ 40°C και 70°C, και ονομάζεται θερμοκρασία υβριδισμού εκκινητών. Κατά την μείωση της θερμοκρασίας, συμπληρωματικοί κλώνοι μπορούν να υβριδιστούν και οι δεσμοί του υδρογόνου έχουν την δυνατότητα να αναμορφωθούν. Πιο συγκεκριμένα, οι μικρές και οι κοντές μονόκλωνες αλληλουχίες οι οποίες είναι συμπληρωματικές στις περιοχές και πρέπει να ενισχυθούν, πλευρίζουν το DNA και υβριδοποιούνται πιο εύκολα από το DNA μήτρας μακράς έλικος. Για αυτό το λόγο όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία του υβριδισμού, πιο εύκολο είναι ο καθορισμός της επιλεκτικότητάς του. Όταν υπάρχει έστω ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων, τότε μπορεί να επιτευχθεί η επιλεκτική ενίσχυση αλληλουχιών νουκλεοτιδίων από εκχύλισμα DNA με PCR. Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία θα χρησιμεύσουν ως εκκινητές για την επάλειψη, συντίθενται χημικά και είναι η καλύτερη δυνατή συμπληρωματικότητα και με τα δύο άκρα της αλληλουχίας ενδιαφέροντος που κάποιος επιθυμεί να ενισχύσει. Ένας από τους εκκινητές έχει σχεδιαστεί για να αναγνωρίζει συμπληρωματικά μια αλληλουχία που βρίσκεται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος κλώνου DNA του θραύσματος 5'–3'. ο άλλος να αναγνωρίζει, πάντα με συμπληρωματικότητα, μια αλληλουχία που βρίσκεται ανάντη συμπληρωματική αλυσίδα (3'–5') του ίδιου τμήματος DNA. [2, 3, 4]

Η PCR διαχωρίζεται σε επιμέρους μεθόδους ανάλογα με την εφαρμογή και χρησιμότητα. Υπάρχουν τέσσερις τύποι PCR οι οποίοι οι τυπικές παραλλαγές PCR, η αντίστροφη μεταγραφή PCR (RT-PCR), η ποσοτική PCR (qPCR) και η Real time-PCR και η συνδυασμένη RT-PCR/qPCR. [2,3]

Τυπική PCR (Standard PCR)

Η τυπική PCR αντικαθιστά τις πιο συνήθεις και παλιότερες μικροβιολογικές μεθόδους ανάλυσης. Η προσέγγιση της τυπικής PCR απαιτεί την ανάπτυξη υψηλά ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών και συνήθως πραγματοποιείται γρηγορότερα αλλά είναι και πιο ευαίσθητη σε σύγκριση με τη συμβατική μέθοδο που βασίζεται σε καλλιέργεια. [4]

Η βασική τεχνική PCR διαθέτει δέκα τροποποιήσεις. Στην πρώτη τροποποίηση εντάσσεται η αλληλόμορφη PCR η οποία επιτρέπει την άμεση ανίχνευση σημειακής μετάλλαξης στο DNA ενώ στη δεύτερη τροποποίηση είναι η λεγόμενη Assymetric PCR. Η συγκεκριμένη παραλλαγή έχει ως στόχο την ενίσχυση μόνο ενός κλώνου του μορίου του DNA-στόχου, κάνοντας χρήση άνισων συγκεντρώσεων εκκινητών. Η αντιγραφή αυτή πραγματοποιείται αριθμητικά με τη χρήση περίσσεια εκκινητή.

Εν συνεχεία στη Τρίτη τροποποίηση είναι η λεγόμενη Colony PCR. Η Colony PCR είναι ο τύπος ειδικά για βακτηριακές γονιδιωματικές μελέτες ενώ στη τέταρτη τροποποίηση είναι η λεγόμενη Degenerate PCR η οποία είναι μια παραλλαγή της PCR που χρησιμοποιεί εκφυλισμένους εκκινητές για να ενισχύσει άγνωστες αλληλουχίες DNA, που σχετίζονται με μια γνωστή αλληλουχία DNA.

Η πέμπτη τροποποίηση είναι η λεγόμενη Hotstart PCR. Η συγκεκριμένη τροποποίηση είναι μια τεχνική η οποία έχει τα βήματα της συμβατικής PCR με μόνο μια διαφορά από τη συμβατική. Η διαφορά είναι ότι η πολυμεράση Taq προστίθεται αφού τα υπόλοιπα συστατικά της PCR υποστούν θέρμανση στη θερμοκρασία τήξης του DNA. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η μη ειδική ενίσχυση σε χαμηλότερη θερμοκρασίες.

Η έκτη είναι η Inverse PCR (αντίστροφη PCR). Ενώ η συμβατική PCR απαιτεί συμπληρωματικό ζεύγος εκκινητών και για τα δύο άκρα 3' του DNA στόχου, η αντίστροφη PCR επιτρέπει την ενίσχυση του DNA με μία μόνο γνωστή αλληλουχία.

Η έβδομη είναι η λεγόμενη Miniprimer PCR και είναι ιδιαίτερος σημαντική για τη κατανόηση της μικροβιακής βιολογίας και επίσης χρήσιμη για την ταυτοποίηση διατηρημένων αλληλουχιών DNA. Για παράδειγμα όπως το 16S rRNA ή το ευκαρυωτικό 18S rRNA τα οποία δεν είναι δυνατά με τυπικούς εκκινητές.

Η όγδοη είναι η Multiplex PCR. Πρόκειται για μια τροποποίηση της PCR, η οποία χρησιμοποιείται για ταχύτερη ανίχνευση διαγραφών ή διπλασιασμού σε ένα μεγάλο γονίδιο. Η Multiplex-PCR διαθέτει πολλαπλά σετ εκκινητών σε ένα μόνο

μείγμα PCR με αποτέλεσμα να παράγει αμπλικόνια (παράγωγο τμήμα DNA) σε διαφορετικά μεγέθη που είναι κατάλληλα για τις διαφορετικές αλληλουχίες DNA.

Η ένατη είναι η Nested PCR. Είναι μια τροποποίηση της PCR που έχει σχεδιαστεί για να ελαχιστοποιεί την ενίσχυση μη ειδικών και ψευδών προϊόντων PCR, η οποία μπορεί να προκύψει λόγω σύνδεσης εκκινητών σε απροσδόκητες ή ανεπιθύμητες θέσεις παρόμοιες με το DNA-στόχο.

Τέλος, η δέκατη είναι η Touchdown PCR. Κατά την τεχνική αυτή, είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί αποκλεισμός της ενίσχυσης των μη ειδικών αλληλουχιών, με την ολοκλήρωση των πρώτων σταδίων των κύκλων PCR σε υψηλές θερμοκρασίες και των επόμενων κύκλων σε οι θερμοκρασίες απόπτωσης να μειώνονται σταδιακά. [2, 3, 4]

### ***Αντίστροφη Μεταγραφή-PCR (RT-PCR) (Reverse Transcription RT-PCR)***

Προκειμένου να εξαχθούν τα mRNA για τη δημιουργία αντιγράφων cDNA, μπορεί να χρειαστεί μια αντίδραση που καταλύεται από την αντίστροφη μεταγραφάση ρετροϊού (αντίστροφη μεταγραφάση - Reverse Transcription RT) η οποία συνθέτει μια αλυσίδα DNA από ένα πρότυπο RNA. Κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο, υπάρχει η δυνατότητα να πραγματοποιηθεί ποσοτική ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης RNA. Η επίτευξη πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας ανάστροφης μεταγραφάσης με τη δημιουργία συμπληρωματικού DNA (cDNA) από RNA.

Εκτός από τη λειτουργία στη διαδικασία της μεταγραφής, μεταγραφής ρετροϊού έχει μια περιοχή που ανήκει στην οικογένεια RNase, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την αντιγραφή της.

Η PCR αντίστροφης μεταγραφής υπερέχει της συμβατικής PCR, καθώς διαθέτει χαρακτηριστικά όπως η αναπαραγωγιμότητα, η απλότητα, η ταχύτητα, η ποσοτική ικανότητα και ο χαμηλός κίνδυνος μόλυνσης. Επιπλέον, προτείνεται ευρέως ως μια οικονομικά ακριβής και έγκαιρη διαγνωστική δοκιμασία. [2,3,4]

### ***Ποσοτική PCR (qPCR) ή Real time-PCR***

Η μέθοδος αυτή καθορίζει το επίπεδο του ειδικού DNA ή RNA στο βιολογικό δείγμα και βασίζεται στην ανίχνευση ενός φθορίζοντος σήματος του οποίου η

παραγωγή του γίνεται με βάση την ενίσχυση του προϊόντος PCR ανά κύκλο. Ένας θερμικός κυκλοποιητής είναι απαραίτητο να συνδέεται με ένα οπτικό σύστημα ανάγνωσης ώστε να πραγματοποιείται η μέτρηση της εκπομπής φθορισμού. Για την επιλεκτική υβριδοποίηση με το DNA συντίθεται ένας ανιχνευτής νουκλεοτιδίου ο οποίος έχει σημαντικό ρόλο μεταξύ των αλληλουχιών όπου υβριδοποιούνται οι εκκινητές.

Ο φθορισμός ο οποίος αλλάζει σε ένα σημείο κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης της ενίσχυσης, γίνεται μετρήσιμος και το συγκεκριμένο ονομάζεται σημείο διέλευσης ή κύκλος κατωφλίου (CT). Κατά αυτόν τον τρόπο, με τη χρήση σειριακών αραιώσεων γνωστής ποσότητας τυπικού DNA, είναι δυνατό να υπολογιστεί η ποσότητα DNA ή cDNA άγνωστου δείγματος ως τιμή CT, σχεδιάζοντας μια τυπική καμπύλη λογαριθμικής συγκέντρωσης έναντι CT. [3,4]

### ***Συνδυασμένη RT-PCR/qPCR***

Η τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) χρησιμοποιείται για την ποιοτική ανίχνευση έκφρασης RNA. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με την μετατροπή του προτύπου RNA σε cDNA, τα οποία συγχωνεύονται και αυτό έχει ως αποτέλεσμα της συγχώνευσης και του συνδιασμού των τεχνικών RT-PCR και qPCR.[3]

## 2. Ανασκόπηση Μελετών

Μια πλήρης βιβλιογραφική ανασκόπηση μελετών από το 2013 ως το 2023 θα παρατεθεί παρακάτω. Η αναζήτηση διεχξήχθη σε διαδικτυακές μηχανές αναζήτησης όπως Google Scholar, Pubmed και Elsevier και πραγματοποιήθηκε τους μήνες Μάιο, Ιούνιο και Ιούλιο του 2023. Χρησιμοποιήθηκαν λέξεις κλειδιά στην ελληνική και αγγλική γλώσσα: μοριακή μέθοδος ανάλυσης στην διάγνωση, καινοτομίες και εξελίξεις PCR, μοριακή μέθοδος ανάλυσης PCR εφαρμογές στην ιατρική διάγνωση, history of PCR in vitro diagnostics, καινοτομίες της μοριακής μεθόδου ανάλυσης PCR στην in vitro διάγνωση, εξελίξεις της μοριακής μεθόδου ανάλυσης PCR στην in vitro διαγνωστική, molecular analysis method PCR applications in in vitro diagnosis, innovations of the molecular method of PCR analysis in in vitro diagnosis, developments of the molecular method of PCR analysis in in vitro diagnostics. Δεν υπήρξε περιορισμός ως προς τη χώρα προέλευσης ή εφαρμογής της εκάστοτε έρευνας και αναφοράς.

Στη συνέχεια, ελέγχθηκαν όλα τα αποτελέσματα που βρέθηκαν και πραγματοποιήθηκε διαδικασία επιλογής μελετών ανασκόπησης. Κατά τη διαδικασία αυτή, απορρίφθηκαν μελέτες μετά από ανάγνωση τίτλου, όπου ελέγχθηκε η σχετικότητα των άρθρων με την τρέχουσα έρευνα αλλά και άρθρα που ίσως έχουν ήδη αποθηκευθεί, δηλαδή διπλότυπες μελέτες, ώστε να μην χρησιμοποιηθούν ως διαφορετικές πηγές. Μετά τον έλεγχο των τίτλων, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των περιλήψεων και σε κάποιες περιπτώσεις, όπου δεν ήταν αρκετό αυτό, αναγνώστηκε

**Μοριακή Μέθοδος Ανάλυσης (PCR) – Ιστορική Αναδρομή – Εφαρμογές – Καινοτομίες -  
Εξελίξεις**

ολόκληρο το άρθρο. Κατά τον συγκεκριμένο έλεγχο, απορρίφθηκαν οι μελέτες οι οποίες επίσης δεν ήταν άμεσα σχετιζόμενες με τη δική μας μελέτη.

Αφότου ολοκληρώθηκε η διαδικασία επιλογής μελετών ανασκόπησης, κατηγοριοποιήθηκαν αρχικά τα τελικά επιστημονικά άρθρα που κρατήθηκαν σε επιμέρους φακέλους ανάλογα με τη θεματική που καθίσταται κατάλληλη, δηλαδή τα υποκεφάλαια που προαναφέρθηκαν, 3.1 Ιστορική Αναδρομή, 3.2 Εφαρμογές και 3.3 Καινοτομίες - Εξελίξεις.

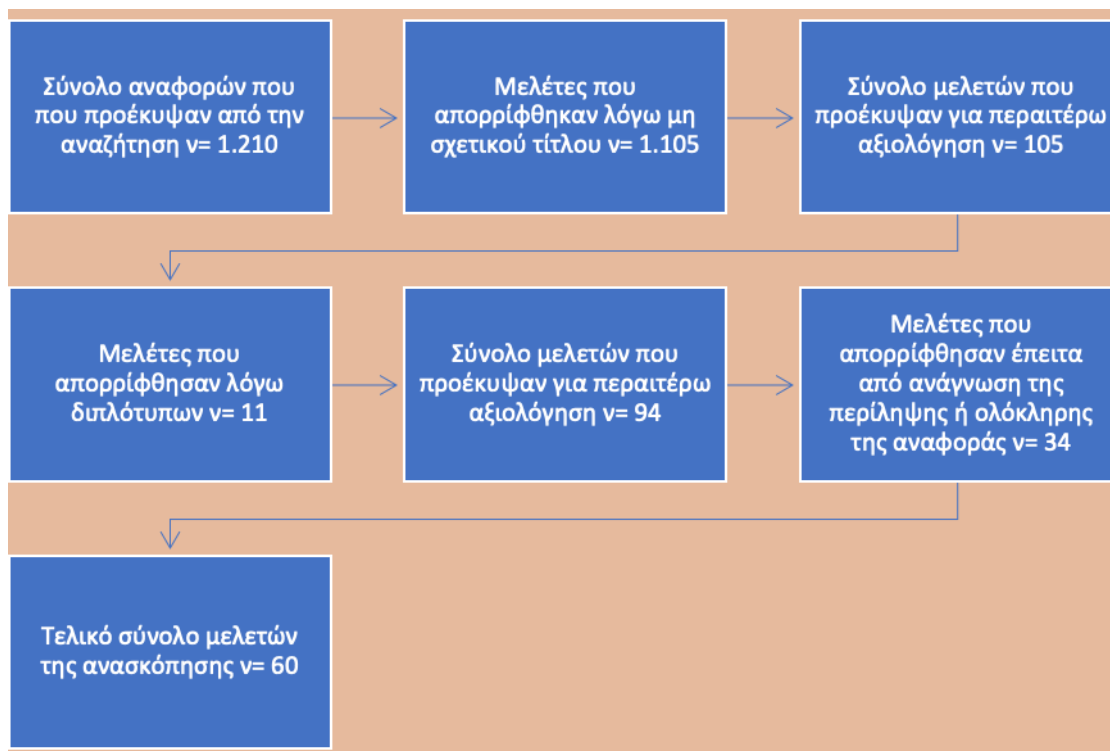


### 3. Αποτελέσματα

Κατά την αναζήτηση της σχετικής βιβλιογραφίας (Εικόνα 1) βρέθηκαν 1.210 αναφορές με τις λέξεις και φράσεις κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν, στην πρώτη φάση της αναζήτησης. Στη δεύτερη φάση της αναζήτησης, απορρίφθηκαν 1.105 πηγές μετά από την ανάγνωση του τίτλους τους. Η απόρριψή τους πραγματοποιήθηκε καθώς δεν ήταν άμεσα σχετιζόμενες με την τρέχουσα μελέτη. Έτσι, έμειναν 105 αναφορές. Από αυτές, αφαιρέθηκαν ακόμα 11 καθώς διαπιστώθηκαν διπλότυπα, δηλαδή είχαν αποθηκευθεί οι ίδιες πηγές δύο φορές με διαφορετική ονομασία αρχείου. Άρα, προέκυψαν 94 πηγές. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο ελέγχου των αναφορών, απορρίφθηκαν ακόμα 34 επιστημονικά άρθρα, κατόπιν ανάγνωσης των περιλήψεων ή και ολόκληρων των άρθρων, καθώς διαπιστώθηκε ότι δεν αφορούν την έρευνά μας. Έτσι, επιλέχθηκαν σε 60 επιστημονικές πηγές για τα κεφάλαια 3.1, 3.2 και 3.3. Από τις 60 αναφορές, μία είναι διπλωματική εργασία, 2 είναι επιστημονικά βιβλία και οι υπόλοιπες 57 είναι επιστημονικά άρθρα από έρευνες και μελέτες. Επιπλέον, μία από τις πηγές χρησιμοποιείται σε δύο κεφάλαια.

Πιο συγκεκριμένα, 6 πηγές αφορούν το Θεωρητικό Υπόβαθρο (Κεφάλαιο 1), 54 πηγές αφορούν τα επιμέρους υποκεφάλαια των αποτελεσμάτων με 4 πηγές αφορούν την Ιστορική Αναδρομή (Υποκεφάλαιο 3.1), 31 πηγές τις Εφαρμογές (Υποκεφάλαιο 3.2) και 19 τις Καινοτομίες και Εξελίξεις (Υποκεφάλαιο 3.3). Η πηγή που χρησιμοποιήθηκε σε δύο κεφάλαια είναι η Πέμπτη πηγή του θεωρητικού υποβάθρου και μία από τις 4 της ιστορικής αναδρομής.

Στο κάτωθι διάγραμμα ροής της Εικόνας 1, παρουσιάζεται σχηματικά η διαδικασία επιλογής μελετών ανασκόπησης, με την οποία παρουσιάζονται τα ανωτέρω αποτελέσματα.



Εικόνα 2 Διάγραμμα ροής επιλογής μελετών ανασκόπησης

### 3.1 Ιστορική Αναδρομή

Η αρχή της μοριακής διάγνωσης μπορεί να αναχθεί με την ανακάλυψη της δομής της διπλής έλικας του DNA από τους James D. Watson και Francis Crick (αποδέκτες του βραβείου Νόμπελ το 1962) τη δεκαετία του 1950. Η PCR δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την καινοτομία των δύο αυτών επιστημόνων, ιδίως την ανακάλυψη της δομής του DNA το 1953, αλλά και ανακάλυψη της DNA πολυμεράσης από τον Arthur Kornberg το 1956 (αποδέκτης του βραβείου Νόμπελ το 1959). Το 1983 ο Kary Mullis ο οποίος είχε επινοήσει την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης του ανατέθηκε η βελτίωση της σύνθεσης ολιγονουκλεοτιδίων. Το 1969 κατά το ταξίδι που είχε πάει για μια διάλεξη του για το βραβείο Νόμπελ οραματίστηκε την έννοια του PCR. Στη συνέχεια το 1985 κατοχυρώθηκε ως πατέντα με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας. Όλη η αρχή της PCR έχει ως κύρια βάση την πολυμεράση DNA, διότι η πολυμεράση DNA αποτελεί μια *in vitro* αντιγραφή συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA. [2,5,6,7]

Την αρχική περιγραφή της PCR και των εννοιών και επιστημονικών αρχών που την απαρτίζουν την έκανε ο Kjell Kleppe, ο οποίος εργαζόταν στο εργαστήριο του. Η αναφορά αυτή έγινε σε μια διάσκεψη στο Γκόρντον το 1969. Η πρώτη δημοσίευση με την περιγραφή της τεχνικής αυτής, πραγματοποιήθηκε το 1971 από

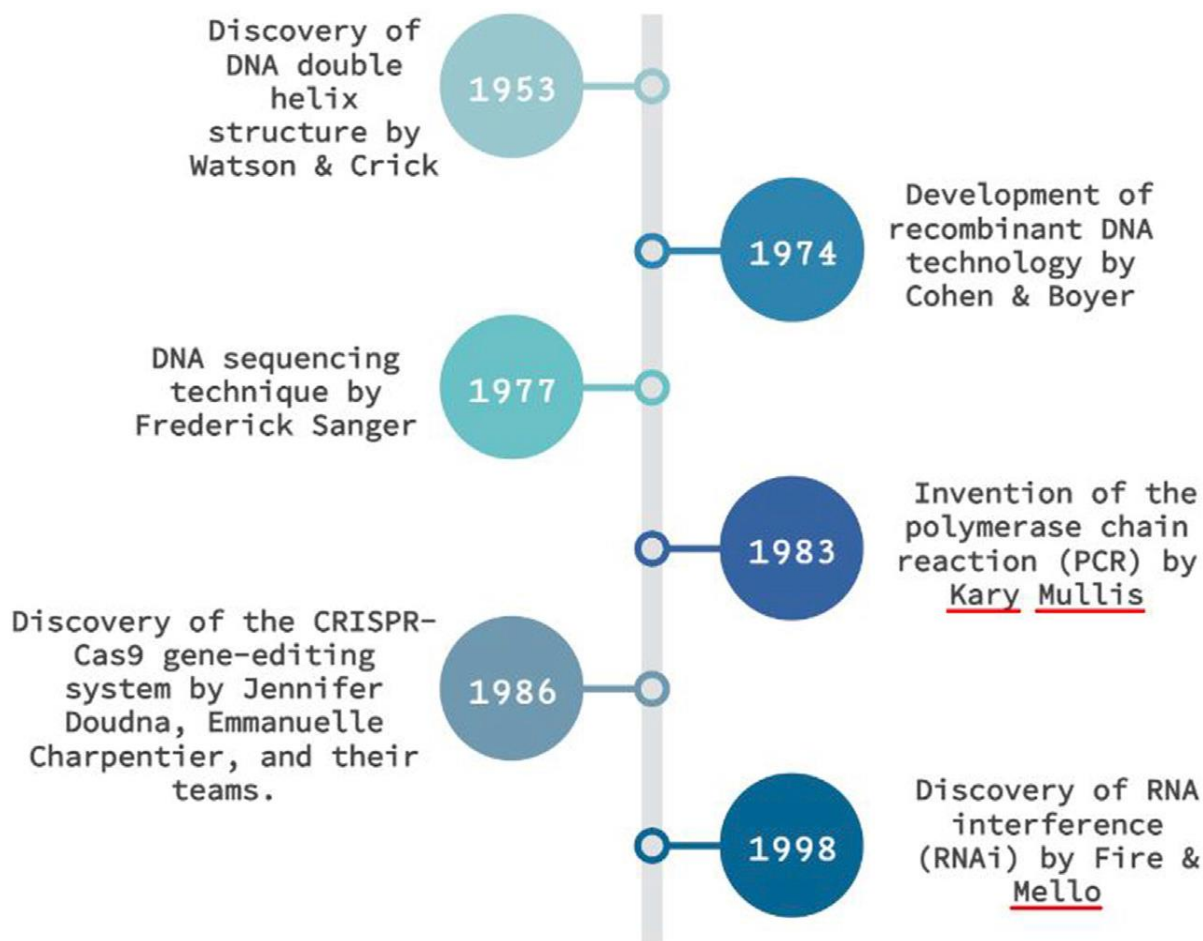
τον ίδιο τον Kleppe και τους συνεργάτες του. Η εν λόγω μέθοδος φαίνεται να μην είχε ακόμα εφαρμοστεί στην πράξη, καθώς αντιμετώπιζαν διάφορα τεχνικά προβλήματα, όπως η επίπονη σύνθεση ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών χειροκίνητα αλλά και η ανάγκη καθαρισμού μεγάλων ποσοτήτων πολυμεράσης. [5,8]

Το 1987 αποδείχθηκε για πρώτη φορά ότι η PCR είναι ένα χρήσιμο εργαλείο που μπορεί να εφαρμοστεί στη διάγνωση μολυσματικών ασθενειών και για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε περαιτέρω τα επόμενα χρόνια.

Οι επιστήμονες μπόρεσαν να κάνουν σημαντικές ανακαλύψεις με έναν τρόπο που ονόμασαν PCR. Διαπίστωσαν ότι μπορούσαν να δημιουργήσουν διαφορετικά μήκη από κάτι που ονομαζόταν amplicons (αμπλικόνια), χρησιμοποιώντας διαφορετικά εργαλεία. Αυτό βοήθησε στη διάγνωση των ασθενειών. Μετά από λίγο, έγινε αντιληπτό πώς να μετρούν τα εξεταζόμενα δείγματα με μεγαλύτερη ακρίβεια χρησιμοποιώντας μία μέθοδο που ονομάζεται qPCR. Άρχισαν, επίσης, να χρησιμοποιούν την PCR για να μελετήσουν το RNA. [5,8]

Με τις ανωτέρω τροποποιήσεις της βασικής τεχνικής PCR, όπως και όσες αναφέρθηκαν στο Θεωρητικό Υπόβαθρο (Κεφάλαιο 1) έγιναν γρήγορα βασικό πρότυπο για την ποσοτική ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων. Τη δεδομένη στιγμή τα τρία βασικά συστήματα είναι το digital PCR (dPCR), το end-point PCR και το qPCR. Παρόλα αυτά οι παραλλαγές των βασικών τεχνικών PCR είναι πάρα πολλές. Ενδεικτικά μια από αυτές είναι η Bridge PCR.

## Μοριακή Μέθοδος Ανάλυσης (PCR) – Ιστορική Αναδρομή – Εφαρμογές – Καινοτομίες - Εξελίξεις



Εικόνα 3 Ορόσημα των τεχνικών μοριακής διάγνωσης.

Στην Εικόνα 2 παρουσιάζεται ένα χρονοδιάγραμμα εξελίξεων της μοριακής ανάλυσης από την ανακάλυψη του DNA το 1953 έως και την ανακάλυψη του RNAi το 1998, από τους Fire και Mello. Το 1983, παρουσιάζεται η ανακάλυψη της PCR από τον Kary Mullis, όπως προαναφέρθηκε.

Στο τομέα της εμπορευματοποίησης, τα τελευταία χρόνια, η PCR θεωρείται χρυσό πρότυπο στη μοριακή διάγνωση. Αυτό συμβαίνει πρώτον διότι η PCR είναι ένα αυτοματοποιημένο όργανο το οποίο αντικαθιστά τις χειροκίνητες λειτουργίες και δεύτερον η χρήση των αντιδραστηρίων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ειδικότητας της PCR, της μείωσης του χρόνου και της ενίσχυση της πολυπλεξίας. Με αυτό τον τρόπο μηδενίζονται οι πιθανότητες της διασταυρούμενης μόλυνσης και της αναστολής.

Οι βιοδείκτες είναι σαν ειδικά εργαλεία για τους γιατρούς που τους βοηθούν να καταλάβουν τι συμβαίνει με το σώμα κάποιου. Δίνουν στους γιατρούς ενδείξεις για το πώς λειτουργεί το σώμα και τι μπορεί να προκαλεί πρόβλημα. Η ανάλυση PCR σε

πραγματικό χρόνο και μικροσυστοιχιών παίζουν καθοριστικό ρόλο για τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων βιοδεικτών. Αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη των συνοδευτικών διαγνωστικών τα οποία προσφέρουν σημαντικά οφέλη όχι μόνο στη πρόγνωση αλλά και στη παρακολούθηση της θεραπείας της νόσου. Συμπερασματικά, ο τομέας της μοριακής διάγνωσης έχει υποστεί μια τεράστια και ενδιαφέρουσα εξέλιξη, με την εφαρμογή πρωτοποριακών τεχνικών μετασχηματιστικών ανακαλύψεων και καινοτόμων εφαρμογών αιχμής. [5,6]

### **3.2 Εφαρμογές**

Η PCR έχει εφαρμοστεί κατά καιρούς και εξακολουθεί να εφαρμόζεται σε ποικίλες περιπτώσεις διάγνωσης ασθενειών και παρασίτων που επηρεάζουν την υγεία ανθρώπων και ζώων. Στο τρέχον υποκεφάλαιο, παρουσιάζονται κάποιες από αυτές τις περιπτώσεις στις οποίες εφαρμόστηκε η τεχνική αυτή τα τελευταία έτη, ανά θεματική.

#### **COVID-19**

Τον Ιανουάριο του 2023, οι Chi H. et. al.[9], ολοκλήρωσαν τη μελέτη τους για την εφαρμογή της PCR στη διάγνωση του COVID-19. Η ομάδα πραγματοποίησε αυτήν τη μελέτη με σκοπό να διερευνήσουν τον αριθμό των περιπτώσεων COVID-19 όπως και τις δοκιμές PCR που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση της πανδημίας, τον αριθμό των εισαγωγών και ασθενών που νοσηλεύτηκαν, των θανάτων και των επισκέψεων στο νοσοκομείο. Στη συνέχεια, επιδίωξαν να αξιολογήσουν τις συνέπειες της αλλαγής διαγνωστικής πολιτικής που εφαρμόστηκε στους ασθενείς του νοσοκομείου. Η αλλαγή της διαγνωστικής πολιτικής εφαρμόστηκε στα τέλη Μαΐου 2022.

Χρησιμοποίησαν δεδομένα σε εθνικό επίπεδο και σε νοσοκομεία για περιπτώσεις COVID-19, τεστ PCR, νοσηλεία, θνησιμότητα και επισκέψεις στο νοσοκομείο πριν και μετά την αλλαγή πολιτικής από τις 31 Ιουλίου 2022.

Με γνώμονα τις εξετάσεις PCR παρατηρήθηκε ταυτόχρονη και ραγδαία αύξηση ασθενών με COVID-19 που επισκέφτηκαν το νοσοκομείο κατά της επιδημίας της παραλλαγής Omicron. Από τον Απρίλιο του 2022 τα κρούσματα COVID-19 εκθετικά αυξήθηκαν εκθετικά με κορύφωση τον Ιούνιο. Ενδεικτικά τα ημερήσια κατά μέσο όρο κρούσματα ήταν 1.943, 55.571 και 61.511 τον Απρίλιο, τον Μάιο και τον Ιούνιο. Το Μάιο πραγματοποιήθηκε κορύφωση των δοκιμών PCR με αρκετά θετικό

ποσοστο το οποίο έφτανε το 81%. Οι καθημερινές εξετάσεις ήταν 85.788. Η πολιτική της RAT ως επιβεβαιωτικής διάγνωσης εφαρμόστηκε στις 26 Μαΐου 2022 και σημειώθηκε σημαντική μείωση των αριθμών δοκιμών PCR (85.788 και 83.113 καθημερινές εξετάσεις τον Μάιο και τον Ιούνιο). Η κορύφωση της νοσηλείας των ασθενών, 821,8 την ημέρα, έγινε τον Ιούνιο ενώ τον επόμενο μήνα τον Ιούλιο παρατηρήθηκε μείωση 549,5 ασθενείς την ημέρα. Η θνησιμότητα επίσης τον Ιούνιο έφτασε τα 147 άτομα τη ημέρα. Οι αριθμοί αυτά επικυρώθηκαν βάση των δεδομένων των νοσοκομείων. Τα επείγοντα τον Μάιο είχαν 11.397 επισκέψεις ενώ τον Ιούνιο οι επισκέψεις μειώθηκαν στις 8.126. Οι δοκιμές των PCR τον Μάιο ήταν 21.314 τον Μάιο ενώ τον Ιούνιο 6.158. Το ποσοστό των ατόμων που υποβλήθηκαν αποκλειστικά σε δοκιμές PCR μειώθηκε επίσης (10–26 έναντι 5–14%, πριν και μετά την αλλαγή πολιτικής, αντίστοιχα). Ο τρόπος με τον οποίο οι γιατροί έλεγχαν εάν κάποιος ήταν άρρωστος άλλαξε και αυτό είχε μεγάλη επίδραση στο πώς οι άνθρωποι αναζητούσαν σεσαερ ρζαΣνοσοκομείο μειώθηκε πολύ μετά την αλλαγή. Το χειρότερο μέρος της ασθένειας επίσης δεν κράτησε τόσο πολύ. [9]

Οι Sarkar, M.H. et. al. [10], δημοσίευσαν το 2023 έρευνα κατά την οποία χρησιμοποιούν ένα ειδικό τεστ που ονομάζεται qRT-PCR για να μάθουν εάν κάποιος έχει έναν ιό που ονομάζεται SARS-CoV-2. Αυτό το τεστ είναι πολύ καλό στην εύρεση του ιού, αλλά μερικές φορές μπορεί να δώσει τη λάθος απάντηση και να πει ότι το άτομο δεν έχει τον ιό, όταν πραγματικά έχει. Αυτό καθιστά πιο δύσκολο για τους γιατρούς να γνωρίζουν με βεβαιότητα εάν κάποιος είναι άρρωστος με τον ιό ή όχι, επομένως αναζητούν διαφορετικά μέρη του ιού για να τα δοκιμάσουν. Σε αυτή τη μελέτη, περιγράφηκε μια εναλλακτική προσέγγιση για την ανίχνευση του ιικού RNA του SARS-CoV-2 που στοχεύει το γονίδιο μεμβράνης (M) του ιού χρησιμοποιώντας qRT-PCR.

Χρησιμοποιήθηκαν κλινικά στοματοφαρυγγικά δείγματα σε ασθενείς οι οποίοι ήταν θετικοί στο COVID-19 ώστε να πραγματοποιηθεί η αξιολόγηση της απόδοσης αυτής της αναπτυγμένης εσωτερικής δοκιμασίας έναντι των εμπορικών κιτ qRT-PCR. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις γνωστών αντιγράφων του ψευδοϊού SARS-CoV-2 για το προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης (LOD). Το γονίδιο M στο οποίο βασίστηκε η ανάλυση μπορούσε να προβεί στην ανίχνευση τουλάχιστον 100 αντιγράφων ιού/mL. Με αυτό τον τρόπο υποδείχθηκε ότι έχει την ικανότητά του ανίχνευσης χαμηλό ικό φορτίο. Εν συνεχεία, ο προσδιορισμός

ανίχνευσε όλες τις παραλλαγές αποτελεσματικά και έδειξε συγκρίσιμη ειδικότητα, ευαισθησία και ακρίβεια σε σχέση με τα διαθέσιμα εμπορικά κιτ.

Στο τέλος ως συμπέρασμα της μελέτης προκύπτει ότι η εσωτερική ανάλυση που έχει ως βάση της το γονίδιο M είναι δυνατή να χρησιμοποιηθεί ως μια εναλλακτική αποτελεσματική λύση για τα εμπορικά κιτ qRT-PCR που είναι διαθέσιμα στην αγορά. [10]

### **Leishmania (Λεισμανία)**

Το 2023 οι ερευνητές Ghafari et al [11]. πραγματοποίησαν μια έρευνα που αφορά πρώτον τη σταθερή ταυτοποίηση της *Leishmania* πάνω στο *Phlebotomus paratasi* και δεύτερον την κατανόηση των φυσικών κύκλων μετάδοσης των παρασίτων στις μύγες της άμμου, κάτι που θεωρούνταν σημαντικό για το τοπικό έλεγχο και τη θεραπεία. Η έρευνα αυτή είχε ως κύριους στόχους να προσδιοριστούν τα είδη των *Leishmania* αλλά και ο γονότυπος των παρασιτών *Leishmania*. Ο προσδιορισμός αυτός θα γινόταν σε μύγες της άμμου στην επαρχία Ilam που βρισκόταν στο Ιράν.

Από τις περίπου 3000 μύγες που συλλέχθηκαν, εντοπίστηκαν 89 θηλυκές *Ph. paratasi* μαζί με δύο μύγες που έφεραν παράσιτα *L. major*. Το ενισχυμένο θραύσμα του γονιδίου COII, το οποίο είχε μήκος 611 ζεύγη βάσεων, έδειξε ότι 452 ζεύγη βάσεων δεν είχαν γενετικές παραλλαγές και είχαν χαμηλές πολυμορφικές θέσεις ( $P=0,001$ ). Επιπλέον, η ανάλυση αποκάλυψε υψηλό ποσοστό συνώνυμων τοποθεσιών (79,8%) σε σύγκριση με μη συνώνυμες τοποθεσίες (20,2%). Οι ερευνητές μπόρεσαν να διακρίνουν το *L. major* στο *Ph. paratasi* με βάση τη θερμοκρασία τήξης 0,84 °C ( $T_m$ ) και τη μοναδική καμπύλη που παρατηρήθηκε λόγω θερμοδυναμικών διαφορών, η οποία ήταν ένα σημαντικό κριτήριο για τη χρήση της τεχνικής HRM.

Για να επιτύχουν αυτούς τους στόχους, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν μια τροποποιημένη και βελτιωμένη τεχνική γνωστή ως τήξη υψηλής ανάλυσης (HRM). Αυτή η τεχνική περιελάμβανε τη στόχευση του γονιδίου της οξειδάσης του κυτοχρώματος II (COII) και το σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών για την ακριβή αναγνώριση της Λεισμανίας σε μύγες άμμου που συλλέχθηκαν από τα σύνορα Ιράν-Ιράκ. Τα προϊόντα PCR που ελήφθησαν στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν σε φορέα pTG19-T και η συγκέντρωση του καθαρισμένου πλασμιδίου μετρήθηκε σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Στην συνέχεια δημιουργήθηκαν διαγράμματα που έδειχναν τη καμπύλη τήξης και αναλύθηκαν οι αλληλουχίες DNA κάνοντας χρήση

διαφόρων προγραμμάτων λογισμικού. Ενδεικτικά κάποια λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το CLC Main Workbench 5.5, το Sequencher 3.1.1, το MEGA 6, MedCalc και το DnaSP5.10.01.

Η έρευνα ανέδειξε τον βióτοπο υψηλού κινδύνου για μετάδοση παρασίτων που δημιουργήθηκε από τον συνεχιζόμενο πόλεμο στο Ιράκ. Ως εκ τούτου, ήταν ζωτικής σημασίας να αναπτυχθούν ακριβείς διαγνωστικές διαδικασίες για τον αποτελεσματικό έλεγχο της λείσμανιάσης. Η μελέτη υπογράμμισε τη σημασία της κατανόησης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφορετικών ειδών παρασίτων για τη διατήρηση των μολύνσεων από *L. μείζονες* σε ξενιστές δεξαμενής και ανθρώπους. Συγκεκριμένα, ο ρόλος του *Ph. paratasi* ως επιβεβαιωμένου φορέα για τη μετάδοση της *L. major* τόσο στους ξενιστές της δεξαμενής όσο και στον άνθρωπο ήταν υψίστης σημασίας. Επιπλέον, η ανακάλυψη γρήγορων, ευαίσθητων και ακριβών διαγνωστικών διαδικασιών για τη λείσμανιάση στα σύνορα Ιράν-Ιράκ ήταν εξίσου ζωτικής σημασίας για τον έλεγχο και τη θεραπεία της νόσου. Το 2023, οι Ghafari, S.M et al [11]. διεξήγαγε έρευνα για την ταυτοποίηση της Λείσμανιάς στο *Phlebotomus paratasi*, ένα είδος μύγας της άμμου, και την εξερεύνηση των φυσικών κύκλων μετάδοσης αυτών των παρασίτων. Αυτή η έρευνα ήταν σημαντική για τη βελτίωση των μεθόδων θεραπείας και τοπικού ελέγχου. Οι κύριοι στόχοι της μελέτης ήταν ο εντοπισμός του συγκεκριμένου είδους *Leishmania* και ο γονότυπος των παρασίτων *Leishmania* που βρέθηκαν στις μύγες της άμμου στην επαρχία Pam.[11]

Ένα χρόνο πριν, το 2022, οι Gow, I. et. al.[12] ,πραγματοποίησαν και δημοσίευσαν μελέτη σχετικά με την εργαστηριακή διάγνωση για λοιμώξεις από ανθρώπινη *Leishmania*. Η συγκεκριμένη επισκόπηση παρείχε τις μεθόδους που χρησιμοποιούν τα διαγνωστικά εργαστήρια και έδινε μεγαλύτερη έμφαση στις μεθόδους ανίχνευσης και τυποποίησης που βασίζονταν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Οι τεχνικές που αναλύθηκαν ήταν από τις παραδοσιακές τεχνικές έως τις πλέον προτιμώμενες μοριακές τεχνικές.

Η ακριβής διάγνωση των διαφόρων ειδών *Leishmania* που μολύνουν τον άνθρωπο είναι ζωτικής σημασίας για την επιτυχή θεραπεία και, το πιο σημαντικό, την πρόληψη των λοιμώξεων μέσω της εφαρμογής προγραμμάτων μοντελοποίησης και παρέμβασης. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες εργαστηριακές τεχνικές για την ανίχνευση της Λείσμανιάς. Ενώ ορισμένες από αυτές τις μεθόδους έχουν τους περιορισμούς τους, αρκετές δείχνουν πολλά υποσχόμενες, ειδικά μοριακές μέθοδοι όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).



Οι λοιμώξεις από *Leishmania* περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα κλινικών συνδρόμων και επηρεάζουν κυρίως άτομα που κατοικούν στις πιο φτωχές περιοχές του κόσμου. Αυτές οι λοιμώξεις μεταδίδονται μέσω του δαγκώματος θηλυκών μυγών και έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνονται λόγω παραγόντων όπως τα διεθνή ταξίδια και οι πόλεμοι, που συμβάλλουν στην ανθρώπινη μετακίνηση, καθώς και μετατοπίσεις των ενδιαιτημάτων που προκαλούνται από την κλιματική αλλαγή. Παραδοσιακά, η ανίχνευση της Λεισμανίας πραγματοποιείται μέσω μικροσκοπίας, ιστολογίας, καλλιέργειας, ορολογίας και άλλων παρόμοιων μεθόδων, οι οποίες χρησιμοποιούνται συνήθως από εργαστήρια παγκοσμίως, ιδιαίτερα σε περιοχές με περιορισμένους πόρους όπου η ασθένεια είναι ενδημική.

Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης μέθοδοι ανίχνευσης με βάση το DNA. Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται σε διάφορους γονιδιωματικούς στόχους εντός του οργανισμού *Leishmania*, καθένας από τους οποίους ποικίλλει σε ευαισθησία και επηρεάζεται από τον αριθμό των αντιγράφων-στόχων που υπάρχουν στο γονιδίωμα του οργανισμού. Οι μέθοδοι ανίχνευσης με βάση την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έχουν αποκτήσει δημοτικότητα για την ανίχνευση *Leishmania*. Η PCR περιλαμβάνει την ενίσχυση καθαρών νουκλεϊκών οξέων του παθογόνου και το προκύπτον προϊόν PCR μπορεί να ανιχνευθεί μέσω ηλεκτροφόρησης γέλης στο τέλος της ενίσχυσης (cPCR), να ενισχυθεί περαιτέρω πριν από την ανίχνευση (φωλιασμένη PCR) ή να παρακολουθηθεί συνεχώς σε πραγματικό χρόνο καθώς συμβαίνει η ενίσχυση (PCR σε πραγματικό χρόνο). [12]

Ακόμα μία έρευνα σχετικά με τη διάγνωση της *Leishmania*, πραγματοποιήθηκε από τους Nahidi Y. . et. al. [13] και δημοσιεύθηκε το 2022. Τίτλος του επιστημονικού τους άρθρου είναι: «Διάγνωση με βάση την PCR του είδους *Leishmania* σε χρόνια Κοκκιωματώδης δερματίτιδα στο Mashhad, Ιράν. Η δερματική λεισμανίαση θεωρείται μια χρόνια κοκκιωματώδης δερματίτιδα. Στο Mashhad του Ιράν αναλύθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την διάγνωση των δερματοπαθειών χρόνιας κοκκιωμάτωσης στις οποίες συμπεριλαμβάνεται η δερματική λεισμανίαση.

Το νοσοκομείο Imam Reza, κατά την περίοδο 2009-2013, 64 ασθενείς με χρόνια κοκκιωματώδη δερματίτιδα επισκέφτηκαν τα παθολογικά και δερματολογικά τμήματα. Πραγματοποιήθηκαν παρασιτολογικές εξετάσεις και ιστολογική μικροσκοπική αξιολόγηση φωτός σε ορισμένα δείγματα ασθενών. Στα δείγματα έγινε

χρήση του διαγνωστικού τεστ PCR και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS.

Τα αποτελέσματα των δειγμάτων έδειξαν ότι 7 από τα 64 εμφάνισαν DNA *Leishmania* ενώ τα υπόλοιπα δεν είχαν. Οι ασθενείς είχαν μέση ηλικία 46 έτη με απόκλιση  $\pm 18.77$  έτη. Η νόσος διαρκούσε κυρίως 7 μήνες με απόκλιση  $\pm 6.73$ . Οι ασθενείς εμφάνισαν βλάβες κυρίως στο πρόσωπα και πιο συγκεκριμένα στο άνω άκρο. Η *Leishmania major* εμφανίστηκε στα 5 από τα 7 δείγματα και η *L. tropica* εμφανίστηκε σε 2 από τα 7. Όλα δείγματα με *L. tropica* εμφάνισαν φυματινοειδές κοκκίωμα ενώ μόνο σε 3 δείγματα με *L. Major* εμφανίστηκε το συγκεκριμένο κοκκίωμα. Στα αποτελέσματα εμφανίστηκαν επιπλέον και άλλες μικροσκοπικές αλλαγές φωτός.

Τα ανωτέρω αποτελέσματά είχαν ως σκοπό τη διάγνωση της χρόνιας δερματικής λεισμανίασης με PCR και αυτό προκύπτει από την ανίχνευση του *L. Tropica* και του *L. Major*. [13]

### **Uveitis (Ραγοειδίτιδα)**

Το 2022, οι Putera, I. et al.[14], δημοσίευσαν επιστημονική μελέτη με τίτλο: Ο αντίκτυπος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης του υδατοειδούς υγρού και των αποτελεσμάτων ορολογικών δοκιμών για τη διάγνωση της λοιμώδους ραγοειδίτιδας. Η έρευνα εστιάζοταν στην αξιολόγηση της κλινικής αξίας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο υδατοειδούς υγρού (RT-PCR).

Η ανάλυσή των δειγμάτων υδατοειδούς υγρού χρησιμοποιώντας RT-PCR αποδείχθηκε πολύτιμο εργαλείο για την επιβεβαίωση περίπου του ενός τρίτου των περιπτώσεων λοιμώδους ραγοειδίτιδας στην Ινδονησία. Επιπλέον, σε περιπτώσεις οφθαλμικής τοξοπλάσμωσης, τα αυξημένα επίπεδα των αντισωμάτων IgG, αλλά όχι των αντισωμάτων IgM, μπορούν να χρησιμεύσουν ως παράγοντας διαφοροποίησης από άλλες αιτιολογίες.

Τα ευρήματα της μελέτης μας αποκάλυψαν ότι η υδατική RT-PCR είχε ποσοστό διαγνωστικής θετικότητας 20% (17 από τους 86 ασθενείς) στην κοόρτη μας. Επιπλέον, το ποσοστό μόλυνσης όπως προσδιορίστηκε από την τελική αιτιολογική ταξινόμηση ήταν υψηλότερο (52%) όταν πραγματοποιήθηκε η ανάλυση RT-PCR σε σύγκριση με την αρχική διάγνωση που βασίζεται αποκλειστικά στην κλινική εικόνα (44%). Σημειωτέων, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα των

αντισωμάτων IgG του τοξοπλάσματος, αλλά όχι των αντισωμάτων IgM, μεταξύ αυτών που διαγνώστηκαν με οφθαλμική τοξοπλάσμωση και εκείνων με άλλες αιτιολογίες. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των αντισωμάτων IgG του τοξοπλάσματος ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με οφθαλμική τοξοπλάσμωση (3953 IU/mL, IQR 2707–19562) σε σύγκριση με αυτούς με άλλες αιτιολογίες (428 IU/mL, IQR 82–1807). Αυτή η διαφορά βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική ( $p < 0,0001$ ).

Για να πραγματοποιηθεί η υλοποίηση της έρευνας, έγινε ανάλυση RT-PCR single-plex σε υδατικά δείγματα που ελήφθησαν από 86 νεαρούς ασθενείς που είχαν διαγνωστεί με ραγοειδίτιδα με σκοπό την ανίχνευση της παρουσίας παθογόνων όπως για παράδειγμα ιού απλού έρπητα, ιού Epstein-Barr, Mycobacterium tuberculosis, κυτταρομεγαλοϊού, Toxoplasmosis gondii, ιού ερυθράς και ιού ανεμευλογιάς-ζωστήρα. Επιπροσθέτως, μόνο για τα ύποπτα παθογόνα έγινε λήψη των ορολογικών αντισωμάτων. Στη συνέχεια συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα της ανάλυσης PCR και των ορολογικών εξετάσεων αντισωμάτων με την αρχική και την τελική διάγνωση. [14]

Ο Fekri, S. et. al. [15] (2023), δημοσίευσαν έρευνα για τη δοκιμή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για διάγνωση λοιμώδους ραγοειδίτιδας. Η συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποίησε μια αξιολόγηση της κλινικής χρησιμότητας του τεστ PCR και του αντίκτυπού του στη διαχείριση των ασθενών που διαγνώστηκαν με λοιμώδη ραγοειδίτιδα με τη χρήση του PCR.

Αξιολογήθηκαν ιατρικά αρχεία ασθενών με ραγοειδίτιδα στους οποίους πραγματοποιήθηκε ανάλυση PCR ενδοφθάλμιων υγρών μεταξύ Ιανουαρίου 2018 και Φεβρουαρίου 2021. Στην συνέχεια τα δείγματα ελέγχθηκαν για τους ιούς όπως τον ιό Epstein-Barr, τον κυτταρομεγαλοϊό, τον έρπη, τον ιό ανεμευλογιάς ζωστήρα, τους ιούς simplex τύπου 1 και 2, το Toxoplasma gondii, και τον ανθρώπινο Τ-λεμφοτρόπος ιός τύπου 1. Επιπλέον ελέγχθηκαν για την ύπαρξη μυκητιακό ριβοσωμικό DNA 18 S/28S και βακτηριακό 16 S.

Συνολικά 186 ασθενείς υποβλήθηκαν σε υδατική παρακέντηση και δειγματοληψία υαλοειδούς, με 151 ασθενείς (81,2%) να υποβάλλονται σε υδατική παρακέντηση και 35 ασθενείς (18,8%) σε δειγματοληψία υαλοειδούς. Οι περισσότεροι από τους ασθενείς είχαν πανουβίτιδα (61,3%). Οι 69 από τους 186 ασθενείς έδειξαν θετικά ευρήματα σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης PCR. Τα πιο κοινά παθογόνα που ανιχνεύθηκαν ήταν τα CMV και VZV, το καθένα με 18 περιπτώσεις, ακολουθούμενα από 17 περιπτώσεις ανίχνευσης μυκήτων

χρησιμοποιώντας 18s/28s rDNA, 9 περιπτώσεις HSV, 3 περιπτώσεις βακτηριακού 16s rDNA, 2 περιπτώσεις HTLV-1 και 2 περιπτώσεις του *Toxoplasma gondii*. Σημειωτέον, δεν εντοπίστηκαν κρούσματα EBV. Η αρχική θεραπεία άλλαξε σε 38 ασθενείς με βάση τα αποτελέσματα της PCR. Για τα υδατικά δείγματα σύμφωνα με τη δοκιμή PCR τα αποτελέσματα έδειξαν ειδικότητα 91%, ευαισθησία 82%, αρνητική προγνωστική αξία 87% και θετική προγνωστική αξία 96%. Τέλος, με τη διαδικασία δειγματοληψίας δεν εμφανίστηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες.

Συνοπτικά, η ανάλυση PCR των ενδοφθάλμιων υγρών είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την επιβεβαίωση της διάγνωσης και την προσαρμογή της θεραπείας για ασθενείς με υποβία λοιμώδους ραγοειδίτιδας. Ωστόσο, η συνήθης εξέταση PCR για ασθενείς με αδιαφοροποίητη πανουβίτιδα για τον αποκλεισμό μολυσματικών αιτιών είχε περιορισμένα οφέλη. [15]

### **Aspergillosis (Ασπεργίλλωση)**

Το 2023 οι ερευνητές Keri et al[16] μελέτησαν τη διάγνωση της διεισδυτικής ασπεργίλλωσης με PCR. Το τεστ για την ανίχνευση ασπεργίλλου με PCR είχε εξαιρετική ειδικότητα, ευαισθησία και παρουσίασε υψηλή αρνητική προγνωστική αξία. Στόχος της έρευνας ήταν να περιγραφούν τα διαθέσιμα κλινικά δεδομένα για την PCR του *aspergillus* και να περιγραφεί η πιθανή χρησιμότητα του μέσω μιας προσέγγισης που βασίζεται σε σενάρια κλινικών περιπτώσεων.

Για την κλινική χρησιμότητα της PCR τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κυρίως σε ασθενείς οι οποίοι υποβάλλονταν είτε σε χημειοθεραπεία επαγωγής ύφεσης για αιματολογικές κακοήθειες, είτε αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων, είτε σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες, είτε σε ασθενείς με παρατεταμένη ή σοβαρή ανοσοκαταστολή. Στα πλαίσια της έρευνας είναι να οριστεί ο πληθυσμός ασθενών ως «υψηλού κινδύνου». [16]

Την ίδια χρονιά (2023), ο Huygens, S. et. al.[17], ολοκλήρωσαν μελέτη με τίτλο: Κλινική Επίδραση της Ανίχνευσης Ασπεργίλλου και Αντίστασης Αζόλης με βάση την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης στην Διηθητική Ασπεργίλλωση: Μια Προοπτική Πολυκεντρική Μελέτη. Η υψηλή θνησιμότητα σχετίζεται άμεσα με την επεμβατική ασπεργίλλωση από ανθεκτικό στην τριαζόλη *Aspergillus fumigatus* και η ανίχνευση της αντίστασης σε πραγματικό χρόνο θα έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη της κατάλληλης θεραπείας έγκαιρα και αποτελεσματικά.

Με βάση τα ευρήματα αυτής της μελέτης, οι ερευνητές προτείνουν ότι η δοκιμή αντοχής με βάση την PCR σε πραγματικό χρόνο μπορεί να είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο στη διαχείριση περιπτώσεων αντοχής στην αζόλη στην ΙΑ. Αντίθετα, η κλινική σημασία μιας απομονωμένης θετικής *Aspergillus* PCR στο BALf φαίνεται να είναι περιορισμένη. Η μελέτη προτείνει επίσης ότι μπορεί να χρειαστούν περαιτέρω διευκρινίσεις για την ερμηνεία του κριτηρίου EORTC/MSGERC PCR για το BALf, όπως ο καθορισμός μιας ελάχιστης τιμής κατωφλίου κύκλου και/ή η απαίτηση θετικών αποτελεσμάτων PCR σε περισσότερα από ένα δείγματα BALf.

Από τις 89 περιπτώσεις με *A. fumigatus* DNA, η ανάλυση PCR εντόπισε οριστικά 58 περιπτώσεις (65%) με αντοχή στην αζόλη. Σε αυτή την ομάδα, ανιχνεύθηκε αντοχή στα φάρμακα αζόλης σε 8 περιπτώσεις (14%). Είναι ενδιαφέρον ότι δύο ασθενείς βρέθηκαν να έχουν μικτή λοίμωξη, με ορισμένα στελέχη του *A. fumigatus* να είναι ευαίσθητα σε φάρμακα αζόλης ενώ άλλα ήταν ανθεκτικά. Από τους υπόλοιπους 6 ασθενείς με επιβεβαιωμένη αντίσταση στην αζόλη, μόνο ένας παρουσίασε αποτυχία της θεραπείας. Η μελέτη εξέτασε επίσης τη σχέση μεταξύ της θετικότητας στη γαλακτομαννάνη, ενός δείκτη για την επεμβατική ασπεργίλλωση, και των ποσοστών θνησιμότητας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική συσχέτιση ( $P = 0,004$ ) μεταξύ της θετικότητας στη γαλακτομαννάνη και της θνησιμότητας. Ωστόσο, μια απομονωμένη θετική *Aspergillus* PCR στο BALf δεν έδειξε καμία σημαντική συσχέτιση με τη θνησιμότητα ( $P = 0,83$ ). Σε αυτή τη μελέτη, μια ομάδα επιστημόνων διεξήγαγε μια ολοκληρωμένη αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της ανάλυσης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) *AsperGenius* στη διάγνωση και τη θεραπεία αιματολογικών ασθενών με επεμβατική ασπεργίλλωση ανθεκτική στην αζόλη. Στη μελέτη συμμετείχαν 12 ιατρικά κέντρα και η ανάλυση PCR σχεδιάστηκε ειδικά για να ανιχνεύει τις πιο κοινές μεταλλάξεις *cyp51A* στο *A. fumigatus*, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την παροχή αντοχής στα φάρμακα αζόλης.

Συνολικά 323 ασθενείς εγγράφηκαν στη μελέτη και πλήρη μυκητολογικά και ακτινολογικά δεδομένα ήταν διαθέσιμα για 276 από αυτούς, που αντιστοιχούσαν στο 94% του συνόλου των συμμετεχόντων. Μεταξύ αυτών των ασθενών, 99 διαγνώστηκαν με πιθανή ΙΑ, που αντιπροσωπεύει το 36% του δείγματος. Η δοκιμή PCR διεξήχθη σε δείγματα BALf από 293 από τους 323 ασθενείς, οι οποίοι αντιστοιχούσαν στο 91% του συνόλου των συμμετεχόντων. Από αυτά τα δείγματα, το

DNA του *Aspergillus* ανιχνεύθηκε σε 116 περιπτώσεις (40%) και το DNA του *A. fumigatus* σε 89 περιπτώσεις (30%).

Για να συμπεριληφθούν στη μελέτη, οι ασθενείς έπρεπε να παρουσιάσουν πνευμονικές διηθήσεις όπως φάνηκαν σε αξονική τομογραφία και λήφθηκαν δείγματα βρογχοκυψελιδικού υγρού (BALf) για ανάλυση. Ο προσδιορισμός του ποσοστού αποτυχίας της αντιμυκητιασικής θεραπείας ήταν ο αρχικός στόχος της μελέτης. Συγκεκριμένα σε ασθενείς που είχαν διαγνωστεί με διεισδυτικής ασπεργίλλωσης ανθεκτική στην αζόλη. [17]

Η μελέτη με τίτλο: «Η αξία της ανίχνευσης αντοχής στην αζόλη με βάση την PCR στην επεμβατική ασπεργίλλωση: Μια προοπτική πολυκεντρική μελέτη» δημοσιεύτηκε σε συνέδριο σε μορφή poster. Οι στόχοι αυτής της μελέτης ήταν η έγκαιρη ανίχνευση του ανθεκτικού στις αζόλη *Aspergillus fumigatus* θα οδηγήσει στην έγκαιρη έναρξη της ενεργού θεραπείας και μπορεί να βελτιώσει την επιβίωση της διεισδυτικής ασπεργίλλωσης. Ο χρόνος για την ανίχνευση της ανθεκτικής διεισδυτικής ασπεργίλλωσης στην αζόλη θα μπορούσε να ήταν πιο σύντομος με τη χρήση της PCR που στοχεύει τα είδη *Aspergillus* και το DNA *fumigatus* αλλά και τις δύο πιο διαδεδομένες μεταλλάξεις που σχετίζονται με την αντίσταση στην αζόλη στο γένος *cyp51A*.

Η μελέτη διαπίστωσε ότι η ανίχνευση του DNA *Aspergillus* με PCR σε δείγματα BALf ασθενών με υποκείμενες αιματολογικές παθήσεις και διηθήσεις πνευμόνων δεν συσχετίστηκε με αυξημένο ποσοστό θνησιμότητας. Ως εκ τούτου, ο ακριβής ρόλος του *Aspergillus* PCR στα κριτήρια διεισδυτικής μυκητιασικής λοίμωξης του Ευρωπαϊκού Οργανισμού για την Έρευνα και τη Θεραπεία του Καρκίνου-Μυκητίασης Ομάδας Μελέτης Εκπαίδευσης και Έρευνας Κοινοπραξίας (EORTC-MSGERC) παραμένει αβέβαιος. Ανακαλύφθηκε επίσης ότι στο 15% των ασθενών που βρέθηκαν θετικοί στο DNA του *A. fumigatus*, ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις που σχετίζονται με την αντίσταση στην αζόλη με PCR. Ωστόσο, μόνο 1 στους 6 ασθενείς με πιθανή ΙΑ και ανιχνευμένες RAM παρουσίασαν αποτυχία θεραπείας.

Η αντιμυκητιασική θεραπεία στο αποτέλεσμα μιας PCR αντοχής στο *cyp51a* υπάρχουν πιθανότητες να βοηθήσει στον μετριασμό του αντίκτυπου της αντοχής στην αζόλη στα ποσοστά θνησιμότητας. Σε μια ολοκληρωμένη μελέτη που διεξήχθη σε 12 κέντρα στην Ολλανδία και το Βέλγιο, στόχος ήταν να αξιολογηθεί η κλινική αποτελεσματικότητα του multiplex *AsperGenius*®PCR σε ασθενείς με αιματολογικές

διαταραχές που είχαν διηθήσεις στους πνεύμονες και υποβλήθηκαν σε δειγματοληψία βρογχοκυψελιδικής πλύσης (BALf). Ο πρωταρχικός μας στόχος ήταν να προσδιορίσει εάν η αντιμυκητιασική θεραπεία απέτυχε εντός 6 εβδομάδων μετά την έναρξη της θεραπείας σε ασθενείς που βρέθηκαν θετικοί για ανθεκτική στην αζόλη διηθητική ασπεργίλλωση (IA). Η αποτυχία της θεραπείας ορίστηκε ως ο θάνατος ή η ανάγκη μετάβασης σε διαφορετικό αντιμυκητιασικό παράγοντα από διαφορετική κατηγορία μετά από τουλάχιστον 5 ημέρες αρχικής θεραπείας.

Για να διασφαλιστεί ότι η λοίμωξη προκλήθηκε πραγματικά από το ανθεκτικό στέλεχος, οι ασθενείς με μικτές λοιμώξεις ευαίσθητες/ανθεκτικές σε αζόλη εξαιρέθηκαν από την ανάλυσή μας. Από τους 323 ασθενείς που εγγράφηκαν στη μελέτη, λήφθηκαν επαρκή δείγματα BALf για δοκιμή PCR από 299 ασθενείς. Διαγνώστηκαν πιθανή μυκητιακή νόσο σε 95 ασθενείς (34%), καλλιεργήθηκαν *Aspergillus* σε 24 ασθενείς (8%) και ανιχνεύθηκε DNA *Aspergillus* σε 118 ασθενείς (39%). Μεταξύ αυτών με DNA *Aspergillus*, βρήκαν ότι DNA από το είδος *fumigatus* υπήρχε σε 118 ασθενείς (39%). Σε 88 ασθενείς (29%), τα αποτελέσματα PCR αντίστασης ήταν οριστικά, με 54 από αυτούς (61%) να παρουσιάζουν μεταλλάξεις που σχετίζονται με την αντίσταση (RAMs). Οκτώ από αυτούς τους ασθενείς (15%) βρέθηκαν να έχουν πιθανή IA, αλλά δύο αποκλείστηκαν λόγω μικτών λοιμώξεων. Από τους υπόλοιπους έξι ασθενείς, ο ένας παρουσίασε αποτυχία της θεραπείας. Σε σύγκριση με ασθενείς που ήταν αρνητικοί για το αντιγόνο *Aspergillus galactomannan* (GM), εκείνοι με θετικό τεστ GM είχαν 13% υψηλότερο συνολικό ποσοστό θνησιμότητας στις 6 εβδομάδες ( $P = 0,01$ ). Παραδόξως, το ποσοστό θνησιμότητας 6 εβδομάδων στους 65 ασθενείς που βρέθηκαν θετικοί για *Aspergillus* DNA με PCR αλλά αρνητικοί για GM και καλλιέργεια δεν αυξήθηκε σημαντικά σε σύγκριση με αυτούς που ήταν αρνητικοί για PCR (14% θνησιμότητα για PCR+ έναντι 16% για PCR -,  $P = 0,68$ ). [18]

### Συγκρίσεις PCR με Συμβατικές Μεθόδους

Το 2023, οι Zamanpour, M.et. al.[19], ολοκλήρωσαν μελέτη η οποία εστιάζει στην ανάλυση της διάγνωσης της ανθρώπινης δερματικής λεισμανίασης μέσω μιας συγκριτικής έρευνας που χρησιμοποιεί τρεις διαφορετικές μεθόδους: CL Detect™ Rapid Test, άμεσο επίχρισμα και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Σε περιοχές όπου επικρατεί το CL, η μέθοδος του άμεσου επιχρίσματος χρησιμοποιείται συνήθως για την ανίχνευση μαστιγωτών. Ωστόσο, λόγω της

έλλειψης πρόσβασης σε εξειδικευμένα μικροσκόπια σε πολλά εργαστήρια, μπορεί να προκύψουν ψευδείς διαγνώσεις, οδηγώντας σε επιζήμιες συνέπειες. Έτσι, ο στόχος αυτής της έρευνας είναι να αξιολογήσει την ακρίβεια και την αξιοπιστία του CL Detect™ Rapid Test στη διάγνωση της CL, σε σύγκριση με τις μεθόδους άμεσου επιχρίσματος και PCR.

Επιλέχθηκαν συνολικά 70 ασθενείς με δερματικές βλάβες για τις οποίες υπάρχει υποψία ότι είναι CL. Λόγω της απλότητας, της ταχύτητας και των ελάχιστων απαιτήσεων δεξιοτήτων, η μέθοδος CDRT συνιστάται ανεπιφύλακτα ως διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση της δερματικής λεισμανίασης που προκαλείται είτε από *L. major* ή *L. tropica*, ιδιαίτερα σε περιοχές όπου η πρόσβαση σε εξειδικευμένα μικροσκόπια είναι περιορισμένη.

Από ένα σύνολο 70 δειγμάτων, τα 51 αναγνωρίστηκαν ως θετικά μέσω του άμεσου τεστ επιχρίσματος, ενώ 35 δείγματα έδειξαν θετικά αποτελέσματα με τη μέθοδο CDRT. Η ανάλυση PCR αποκάλυψε θετικά αποτελέσματα σε 59 δείγματα. Συγκεκριμένα, 50 δείγματα ταυτοποιήθηκαν ως *Leishmania major*, ενώ 9 δείγματα προσδιορίστηκαν ως *Leishmania tropica*.

Η ευαισθησία και η ειδικότητα των διαγνωστικών εξετάσεων υπολογίστηκαν σε 68,6% (95% CI 54,11–80,89%) και 100% (95% CI 82,35–100%), αντίστοιχα. Κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεθόδου CDRT με τις μικροσκοπικές εξετάσεις, παρατηρήθηκε ποσοστό συμφωνίας 77,14%. Επιπλέον, η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου CDRT, σε σύγκριση με τη δοκιμασία PCR (που θεωρείται ως ο κανόνας χρυσού), προσδιορίστηκε ότι είναι 59,32% (95% CI 45,75–71,93%) και 100% (95% CI 71,5–100 %), αντίστοιχα. Βρέθηκε ποσοστό συμφωνίας 65,71% μεταξύ της μεθόδου CDRT και της δοκιμασίας PCR. Από τις βλάβες λήφθηκαν δείγματα δέρματος για να χρησιμοποιηθούν σε άμεση μικροσκοπική εξέταση η οποία θα γινόταν παράλληλα με τη μέθοδο PCR. Η συλλογή του δείγματος έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή για την ταχεία διαγνωστική δοκιμή η οποία βασίζεται σε CDRT. [19]

Το 2023 οι Wardhani, P. et al.[20] χρησιμοποίησαν το πρότυπο της μεθόδου ανίχνευσης απεικόνισης με μικροσκοπία ώστε να συγκρίνουν σε πραγματικό χρόνο την απόδοση μεταξύ της συμβατικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης AbTes. Ως κύριο συστατικό του διαγνωστικού τεστ ελονοσίας θεωρείται η ανίχνευση με μικροσκοπική απεικόνιση. Η ικανότητα και η εμπειρία του τεχνικού υγείας θα επηρεάσουν τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής



εξέτασης της ελονοσίας. Υψηλότερα ποσοστά θετικότητας σε σύγκριση με τη μικροσκοπική απεικόνιση και τη συμβατική PCR εμφάνισαν τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου (abTEST Malaria qPCRII). Επίσης, έδειξε σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με άλλες δοκιμές για την ανίχνευση *P falciparum*, *Plasmodium vivax* και *P malariae*.

Η μελέτη επικεντρώθηκε στην ανίχνευση του πλασμοδίου στο ανθρώπινο αίμα η οποία πραγματοποιήθηκε σε 150 εθελοντές και στην συνέχεια έγινε σύγκριση της απόδοσης της μικροσκοπικής απεικόνισης ελονοσίας, της PCR πραγματικού χρόνου (abTESTMalaria qPCRII) και της συμβατικής PCR. Μεταξύ αυτών, 98 άτομα βρέθηκαν θετικά στην ελονοσία χρησιμοποιώντας τη μικροσκοπική μέθοδο και τα αποτελέσματά τους συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας RT-PCR και συμβατική PCR. Το *Plasmodium vivax* ήταν το κυρίαρχο είδος που ανιχνεύθηκε και στις τρεις δοκιμές. Οι δοκιμές αποκάλυψαν την παρουσία πολλαπλών λοιμώξεων, όπως διπλές και τριπλές λοιμώξεις, ιδιαίτερα κατά τη χρήση RT-PCR (28,6% των περιπτώσεων).

Η ανάλυση Mann-Whitney έδειξε σημαντική διαφορά μεταξύ της μικροσκοπικής ανίχνευσης και της AbTes PCR σε πραγματικό χρόνο στην ανίχνευση του *Pfalciparum* (Pf), του *P vivax* και της ελονοσίας *P* (Pm) ( $p < 0,05$ ). Επιπλέον, η συμβατική PCR και η AbT σε πραγματικό χρόνο έδειξαν επίσης σημαντικές διαφορές κατά την αξιολόγηση του Pm. Η αναλυτική μελέτη έγινε μεταξύ Νοεμβρίου 2018 και Ιουνίου 2019 σε 150 δείγματα αίματος τα οποία εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας συμβατική PCR, μικροσκοπική ανίχνευση απεικόνισης και RT-PCR. Το τεστ Mann-Whitney για την ανάλυση της απόδοσης κάθε δοκιμής ορίστηκε στο  $p < 0,05$ . [20]

Οι Khaleel et al. το 2023 [21] προέβησαν στη μελέτη που αφορά τον εντοπισμό βακτηρίων από δείγματα αίματος και εγκεφαλονωτιαίου υγρού και της αποτελεσματικότητας των μοριακών μεθόδων ανίχνευσης σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους. Σκοπό της μελέτης ήταν η άμεση διάγνωση των βακτηριακών παθογόνων στα κλινικά δείγματα με την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους.

Για να ταυτοποιηθούν τα βακτηριακά παθογόνα, οι αλληλουχίες που ελήφθησαν συγκρίθηκαν με αντίστοιχες αλληλουχίες που υποβλήθηκαν στο Εθνικό Κέντρο Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας (NCBI). Η μελέτη αποκάλυψε ότι χρησιμοποιώντας παραδοσιακές μεθόδους για βακτηριακή απομόνωση και ταυτοποίηση από το ENY, μόνο 5 από τα 50 δείγματα (10%) βρέθηκαν θετικά για βακτηριακές καλλιέργειες. Όλες οι υπόλοιπες καλλιέργειες ακόμα και από 7 μέρες

επώασης δεν εμφάνισαν καμία βακτηριακή ανάπτυξη. Τα 45 αρνητικά δείγματα υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε μοριακή ταυτοποίηση και διαπιστώθηκε ότι 28 από τα 45 (62,2%) ενίσχυσαν με επιτυχία ζώνες 16S rRNA, υποδεικνύοντας την παρουσία βακτηριακού γονιδιωματικού DNA. Τα πιο διαδεδομένα γένη στα δείγματα του ENY έπειτα από τη περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλουχίας ήταν τα *Bacteroides* (41,1%), και στην συνέχεια ποσοτικά ακολουθούν τα *Lactobacillus* (17,6%), τα *Janibacter* (11,7%), τα *Pseudomonas* (11,7%), τα *Achromobacter* (11,7%) και τα *Planococcus* (5,8%). Στην πόλη της Μοσούλης, διεξήχθη μια ολοκληρωμένη μελέτη σε 100 δείγματα που συλλέχθηκαν από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία σε νοσοκομεία από τον Δεκέμβριο του 2021 έως τον Απρίλιο του 2022. Αυτά τα δείγματα αποτελούνταν από αίμα (50 δείγματα) και εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) (50 δείγματα). Για την ανίχνευση παθογόνων, η μελέτη χρησιμοποίησε τόσο παραδοσιακές μεθόδους που βασίζονται σε πολιτισμικά χαρακτηριστικά όσο και απλές βιοχημικές δοκιμές, οι οποίες συνήθως χρησιμοποιούνται από νοσοκομειακά εργαστήρια. Αρχικά πρώτα έπρεπε απευθείας από τα δείγματα να γίνει η εξαγωγή του βακτηριακού γονιδιωματικού DNA, μέσω της αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με σκοπό την ενίσχυση του γονιδίου τους 16S rRNA κάνοντας χρήση τους γενικούς εκκινητές 16S. Για αλληλούχιση στάλθηκαν τα προϊόντα PCR από δείγματα τα οποία εμφάνισαν θετικά αποτελέσματα αφού πρώτα καθαρίστηκαν. Όσον αφορά τα δείγματα αίματος, οι παραδοσιακές μέθοδοι απομόνωσης και ταυτοποίησης βακτηρίων κατάφεραν να απομονώσουν 2 παθογόνα από τα 50 δείγματα που εξετάστηκαν (4%). Ωστόσο, όταν τα 48 αρνητικά δείγματα υποβλήθηκαν σε μοριακές μεθόδους, διαπιστώθηκε ότι 25 από τα 48 (52%) ενίσχυσαν με επιτυχία ζώνες 16S rRNA. Οι αλληλουχίες 16S rRNA ανήκαν σε 9 διαφορετικά γένη, με το *Pseudomonas* να είναι το πιο κυρίαρχο (16,6%) και το *Bacteroides* να είναι το λιγότερο κυρίαρχο (5,5%). Συνολικά, τα τελικά αποτελέσματα αυτής της μελέτης υπογραμμίζουν την υπεροχή της μοριακής διάγνωσης σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους που χρησιμοποιούνται συνήθως στα νοσοκομεία. Όχι μόνο η μοριακή διάγνωση παρέχει ένα πιο αποτελεσματικό μέσο για τον εντοπισμό παθογόνων παραγόντων, αλλά αποκάλυψε επίσης τον κίνδυνο λανθασμένης διάγνωσης που σχετίζεται με τις παραδοσιακές μεθόδους. Η μελέτη αποκάλυψε ακόμη και την παρουσία παθογόνων που δεν είχαν ανιχνευθεί στο παρελθόν, δείχνοντας την αξία της μοριακής προσέγγισης στην αποκάλυψη νέων πληροφοριών. [21]

Στις αρχές του 2023, δημοσιεύθηκε μελέτη με θέμα: «Διαγνωστική αποτελεσματικότητα του RealStar SARS-CoV-2 Αντίστροφης Μεταγραφής-αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (RT-PCR) σε σύγκριση με το σύστημα GeneXpert για την ανίχνευση του COVID-19», η οποία πραγματοποιήθηκε από τον Jawdat, D.M. και τους συνεργάτες του. Η ανάλυση της καμπύλης ROC αποκάλυψε ότι η ανάλυση RealStar® είχε AUC 0,597, ενώ το σύστημα GeneXpert® είχε AUC 0,637 στην ανίχνευση του SARS-CoV-2. Επιπλέον, το 35% των συνολικών αποτελεσμάτων έδειξε ουσιαστική συμφωνία 0,76 (95% CI: 0,6626-0,8732) μεταξύ των δύο συστημάτων. Η πλειοψηφία των δειγμάτων NPS, 80,66% για το RealStar® και 74,10% για το GeneXpert®, αναφέρθηκαν ως αρνητικά. Επιπλέον, τα περισσότερα δείγματα (68,85%) συλλέχθηκαν από ασυμπτωματικούς ασθενείς με βαθμολογία ARI μικρότερη από 4. Η πανδημία COVID-19, που προκαλείται από την ταχεία εξάπλωση του ιού SARS-CoV-2, έχει αναδειχθεί σε σημαντικό παγκόσμιο κρίση υγείας. Καθώς αυξάνεται η ζήτηση για αποτελεσματικές διαγνωστικές μεθόδους για τον έλεγχο της πανδημίας, είναι σημαντικό να συγκρίν την απόδοση διαφορετικών συστημάτων δοκιμών. Στόχος της ήταν η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του RealStar® SARS-CoV-2 σε σύγκριση με το σύστημα GeneXpert κάνοντας χρήση λογισμικού στατιστικής ανάλυσης. Αρχικά δημιουργήθηκε μια καμπύλη χαρακτηριστικών λειτουργίας δέκτη η λεγόμενη ROC ώστε να προβούν στη σύγκριση των δύο συστημάτων δοκιμών πάνω στην ειδικότητα (Sp), την ευαισθησία (Sn), την αρνητική προγνωστική τιμή (NPV) και τη θετική προγνωστική τιμή (PPV). Σημαντική θεωρήθηκε η δοκιμή της οποίας η τιμή της περιοχής ήταν μεγαλύτερη από 0,5 κάτω από την καμπύλη. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ROC έδειξαν ότι δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στα χαρακτηριστικά απόδοσης των συστημάτων GeneXpert και RealStar RT-PCR πάνω στην ανίχνευση του COVID-19. [22]

Ακόμα μία μελέτη σχετικά με τις μοριακές μεθόδους ανίχνευσης SARS-CoV-2, ολοκληρώθηκε το 2022, από τον Dierks, S. . et. al.[23]. Συγκεκριμένα, ασχολήθηκαν με τη Σύγκριση και εναρμόνιση Διαφορετικών Ημιαυτόματων και Αυτοματοποιημένων Αναλύσεων qRT-PCR στην αξιολόγηση του SARS-CoV-2, με σκοπό να εντοπιστούν αναλυτικές διαφορές μεταξύ των προσδιορισμών qRT-PCR συχνά παραμελούνται μεταξύ πέντε κοινώς χρησιμοποιούμενων δοκιμασιών και (ii) να επιδειχθεί μια απλή στρατηγική για την εναρμόνισή τους. Σε 85 δείγματα στοματοφαρυγγικού επιχρίσματος πραγματοποιήθηκαν οι QRT-PCR για εύρεση

SARS-CoV-2 κάνοντας χρήση τριών αυτοματοποιημένων αναλύσεων οι οποίες είναι το cobas®6800, το GeneXpert και το Alinity m και δύο ημιαυτόματους οι οποίοι είναι το RIDA GENE και το genesig.

Τα ποιοτικά αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι πλήρως αυτοματοποιημένες αναλύσεις ήταν ιδιαίτερα συγκρίσιμες, ενώ η συγκρισιμότητα δεν ήταν τόσο ισχυρή μεταξύ των μεθόδων Alinity m και ημιαυτόματων μεθόδων. Οι τιμές Ct, που υποδεικνύουν το ιικό φορτίο, διέφεραν σημαντικά σε όλες τις μεθόδους, με τις μέσες τιμές να κυμαίνονται από 22,76 για το Alinity m έως 30,89 για το RIDA®GENE και 31,50 για το genesig®, υποδηλώνοντας ότι οι ημιαυτόματες μέθοδοι είχαν τη χαμηλότερη ευαισθησία. Περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε συστηματικές προκαταλήψεις στα αποτελέσματα. Ωστόσο, όταν εφαρμόστηκαν υπολογισμοί συγκέντρωσης ιικού φορτίου για τη συγκεκριμένη ανάλυση, με βάση μεμονωμένες τυπικές καμπύλες, η συγκρισιμότητα μεταξύ των δοκιμασιών βελτιώθηκε σημαντικά και οι σημαντικές διαφορές δεν ήταν πλέον εμφανείς. Αυτή η μελέτη υπογραμμίζει τις σημαντικές αναλυτικές διαφορές μεταξύ των δοκιμασιών SARS-CoV-2 qRT-PCR, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε αποκλίνουσες αποφάσεις σχετικά με την απομόνωση των μολυσμένων ατόμων, και για την επίτευξη καλύτερης συγκρισιμότητας προτείνει μια νέα στρατηγική για την εναρμόνιση των προσδιορισμών qRT-PCR. [23]

Τους πρώτους μήνες του 2023, διεξήχθη μια ερευνητική μελέτη από τον Betaubun, A.M. et al.[24] στο Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Merauke για σύγκριση της διαγνωστικής απόδοσης διαφορετικών μεθόδων για την ανίχνευση ελονοσίας σε ύποπτους ασθενείς. Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε χρήση μεθόδων που περιελάμβαναν την PCR, την μικροσκοπία και τις ταχείες διαγνωστικές δοκιμές (RDT) με χρήση Advantage Malaria Card Pf/Pv Ag. Η μελέτη διεξήχθη ως συγχρονική μελέτη παρατήρησης και περιελάμβανε τόσο εξωτερικούς ασθενείς όσο και εσωτερικούς ασθενείς με πυρετό στο Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Merauke από τον Ιούνιο έως τον Ιούλιο 2019.

Ο πληθυσμός του δείγματος περιελάμβανε όλους τους ασθενείς με ελονοσία που βρέθηκαν θετικοί μέσω μικροσκοπίας, ενώ ο πληθυσμός ελέγχου αποτελούνταν από ασθενείς με πυρετό αλλά χωρίς ελονοσία στο RSUD Merauke. Κάθε δείγμα υποβλήθηκε σε μικροσκοπία (τόσο παχύρρευστες όσο και λεπτές τομές), RDT και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR) χρησιμοποιώντας έναν ρότορα Gene-Q με αντιδραστήριο ελονοσίας III abTESTM

5qPCR. Η Ινδονησία έχει υψηλό επιπολασμό της ελονοσίας, ειδικά στην ανατολική περιοχή, ιδιαίτερα στην Παπούα. Μάλιστα, σε μέρη όπως το Merauke, ο επιπολασμός μπορεί να φτάσει έως και το 16%. Επί του παρόντος, το χρυσό πρότυπο για τη διάγνωση της ελονοσίας είναι η μικροσκοπία. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμοί σε αυτή τη μέθοδο, γεγονός που έχει οδηγήσει σε αυξανόμενη ζήτηση για δοκιμές RDT. Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογήσει τη διαγνωστική απόδοση μιας RDT που βασίζεται στην ανοσοχρωματογραφία (ICT), συγκεκριμένα της κάρτας Advantage Malaria Card Pf/Pv Ag, σε σύγκριση με τη μικροσκοπία και την PCR.

Για τον υπολογισμό των διαγνωστικών επιδόσεων του RDT αναλύθηκε και υπολογίστηκε η Αρνητική και Θετική Προγνωστική Τιμή του, η ειδικότητά του και η ευαισθησία του. Συγκεκριμένα αναλύθηκαν 50 δείγματα ελέγχου και 55 δείγματα ελονοσίας στα οποία εφαρμόστηκε RT-PCR, RDT και μικροσκοπία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ευαισθησία RDT σε RT-PCR ήταν *P. vivax* 53,5%, *P. falciparum* 48,6% ενώ η ειδικότητα ήταν *P. vivax* 100%, *P. falciparum* 98,5%. Επιπροσθέτως, η ευαισθησία RDT στην ανάλυση με μικροσκοπία ήταν *P. vivax* 100%, *P. falciparum* 89,5% ενώ η ειδικότητα ήταν *P. vivax* 95,7%, *P. falciparum* 97,7%. Στη μικροσκοπία η τιμή  $p$  RDT και RT-PCR ήταν  $p=0,000$ : *P. Plasmodium vivax* 0,937 και *P. falciparum* RDT Κ παράγοντας μικροσκοπία *P. falciparum* 0,871 και *P. falciparum P. vivax* 0,427 και *P. falciparum* RDT k παράγοντα PCR *Plasmodium falciparum* 0,531 RDT είναι πιο ευαίσθητο στο *P. H* δοκιμή nRDT είναι πιο ειδική για την ανίχνευση του *P. vivax* από την RT-PCR. Συνιστάται περαιτέρω έρευνα για την αντίσταση στα φάρμακα κατά της ελονοσίας και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας. [24]

Τον Απρίλιο του 2023, οι Hammoudeh, Y. O. et. al [25]. παρουσίασαν στο ARVO Annual Meeting, στην Νέα Ορλεάνη, μελέτη με θέμα: «Μικροβιολογική καλλιέργεια έναντι αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης 16S/18S για τη διάγνωση λοιμώδους κερατίτιδας: Συγκριτική μελέτη».

Η λοιμώδης κερατίτιδα (IK) είναι η κύρια αιτία τραυματισμού του κερατοειδούς παγκοσμίως. Η έγκαιρη διάγνωση είναι κρίσιμη για καλά κλινικά αποτελέσματα, αλλά οι τρέχουσες μέθοδοι μικροβιακής καλλιέργειας περιορίζονται από τις χαμηλές αποδόσεις και τους αργούς χρόνους αποκατάστασης. Αυτή η μελέτη είχε ως στόχο να συγκρίνει τη διαγνωστική απόδοση της μικροβιακής καλλιέργειας και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) βασισμένη σε μοριακές δοκιμές στη διάγνωση της λοιμώδους κερατίτιδας.

Αυτή ήταν μια αναδρομική, συγκριτική διαγνωστική κλινική μελέτη. Όλοι οι ασθενείς που παρουσιάστηκαν στο Queens Medical Center, Nottingham, με υποτιθέμενο ΙΚ που υποβλήθηκαν σε μικροβιολογική καλλιέργεια (είτε άμεση καλλιέργεια, έμμεση καλλιέργεια, είτε και τα δύο) και 16S/18S PCR (με χρήση eSwab) μεταξύ Ιουνίου 2021 και Σεπτεμβρίου 2022 συμπεριλήφθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Η συμφωνία μεταξύ των δοκιμών εξετάστηκε χρησιμοποιώντας τη στατιστική Κάπα του Cohen (k).

Στη μελέτη λήφθηκε δείγμα 86 περιπτώσεις κερατοειδούς από τους 81 ασθενείς που έλαβαν μέρος συμπεριλαμβανομένων και των 5 περιπτώσεων της επαναλαμβανόμενης δειγματοληψίας. Οι ασθενείς είχαν μέση ηλικία τα 49,7 έτη με απόκλιση  $\pm 22,7$ . Επιπλέον από τους 81 ασθενείς οι 41 ήταν γυναίκες. Η άμεση καλλιέργεια, η έμμεση καλλιέργεια και η PCR είχαν θετική απόδοση 53,0%, 48,2% και 41,9% αντίστοιχα ( $p=0,127$ ). Οι πιο κοινοί οργανισμοί είναι ο *Pseudomonas aeruginosa* και οι αρνητικοί στην κοαγκουλάση σταφυλόκοκκοι. Η PCR ήταν σε θέση να αναγνωρίσει τον αιτιολογικό οργανισμό σε 3 (9,7%) από τις 31 αρνητικές περιπτώσεις καλλιέργειας. Σε επίπεδο ασθενούς (για θετικά αποτελέσματα), η PCR έδειξε ουσιαστική συμφωνία με την άμεση καλλιέργεια ( $k=0,64\pm 0,09$ ,  $p<0,001$ ) και την έμμεση καλλιέργεια ( $k=0,72\pm 0,08$ ,  $p<0,001$ ). Σε επίπεδο γένους, η PCR είχε μέτρια έως σημαντική συμφωνία με την άμεση καλλιέργεια ( $k=0,55\pm 0,10$ ,  $p<0,001$ ) και την έμμεση καλλιέργεια ( $k=0,61\pm 0,08$ ,  $p<0,001$ ), αντίστοιχα.

Αυτή η μελέτη υπογραμμίζει ότι η PCR έχει παρόμοια διαγνωστική απόδοση με τις τρέχουσες μεθόδους μικροβιακής καλλιέργειας και μπορεί να χρησιμεύσει ως μια χρήσιμη συμπληρωματική διαγνωστική μέθοδος για τη βελτίωση της διαγνωστικής απόδοσης του ΙΚ. [25]

### **Διαγνώσεις σε Ζώα και Οργανισμούς**

Ο Kuwazaki, S. et. al. (2022) [27]πραγματοποίησαν έρευνα με τίτλο: «Μοριακή διαγνωστική μέθοδος βασισμένη σε πολλαπλή PCR για την ανίχνευση της μετάλλαξης I4790K ανθεκτικής σε κυαντρανίλιπρολη στον αδαμαντόσκωρο, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)».

Στα πιο καταστροφικά παράσιτα στον κόσμο εντάσσεται ο αδαμαντοφόρος σκόρος *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Diamondback) ο οποίος έχει μεγάλη αντοχή στα εντομοκτόνα. Επιπλέον, η αντοχή του ιαπωνικού σκώρου του αδαμαντοφόρου στην κυαντρανίλιπρολή οφείλεται σε μια σημειακή μετάλλαξη

(I4790K) στο γονίδιο-στόχο του διαμιδίου γονίδιο υποδοχέα ρυανοδίνης. Αν και οι ιαπωνικοί σκώροι με αδαμαντοφόρα δεν έχουν ακόμη αναπτύξει ευρεία αντίσταση στην κυαντρανιλιπρόλη, μελλοντικές αυξήσεις στους πληθυσμούς ανθεκτικών σκώρων που φέρουν τη μετάλλαξη I4790K είναι ανησυχητικές.

Για να παρακλουθήσουν απλά και γρήγορα τη συχνότητα των μεταλλάξεων I4790K σε πληθυσμούς πεδίου, ανέπτυξαν μια μοριακή διαγνωστική μέθοδο βασισμένη στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) που μπορεί να προσδιορίσει τον γονότυπο της θέσης μετάλλαξης I4790K. Αξιολογήθηκαν η ευαισθησία και η ειδικότητα της διαγνωστικής μεθόδου συγκρίνοντας την ανίχνευση κυαντρανιλιπρόλης και ανθεκτικών σε κυαντρανιλιπρόλη αλληλόμορφα με την ανίχνευση δεδομένων αλληλουχίας Illumina MiSeq.

Τα αποτελέσματα έδειξαν αρκετά υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Επιπλέον, η συχνότητα των αλληλόμορφων ανθεκτικών σε κυαντρανιλιπρόλη που εκτιμήθηκε με μοριακές διαγνωστικές μεθόδους ήταν σχεδόν συγκρίσιμη με αυτή των δεδομένων αλληλουχίας MiSeq. Οι μοριακές διαγνωστικές μέθοδοι θα διευκολύνουν τη συνεχή παρακολούθηση των πληθυσμών αδαμαντοφόρων σκώρων στο πεδίο για τα επίπεδα αντοχής στην κυαντρανιλιπρόλη. [26]

Τον Νοέμβριο του 2022 δημοσιεύθηκε το επιστημονικό άρθρο: «Ευαισθησία του ιού νουκλεϊκού οξέος RNA ανίχνευσης του ιού της γρίπης των πτηνών, του ιού της νόσου Newcastle και του ιού της ασθένειας των αφρικανικών αλόγων σε κάρτα συνεργατών τεχνολογίας flinders χρησιμοποιώντας συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής». Η κάρτα συνεργατών τεχνολογίας FTA αποτελείται από μια μεμβράνη κυτταρίνης η οποία η βάση της είναι από βαμβάκι. Η μεμβράνη κυτταρίνης είναι βουτιγμένη με ένα χαοτροπικό παράγοντα. Ο συγκεκριμένος παράγοντας έχει την ιδιότητα να σταθεροποιεί το DNA ή το RNA μέσα στη μήτρα των ιών, να απενεργοποιεί τους μολυσματικούς μικροοργανισμούς, και να λύει το κυτταρικό υλικό. Παρόλα αυτά, όσον αφορά την ανίχνευση των ιών RNA στα ζώα δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες που να πιστοποιούν την αποτελεσματικότητα των καρτών. Η συγκεκριμένη μελέτη προχώρησε στην αξιολόγηση της ευαισθησίας ανίχνευσης του ιού RNA σε κάρτες flinders κάνοντας χρήση της συμβατικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).

Η παθογονικότητα των ιών του Newcastle και των πτηνών πολλαπλασιάστηκε με την χρήση αυγών κοτόπουλου από έμβρυα. Το αλλαντοϊκό υγρό αφού πρώτα

συλλέχθηκε τρεις ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό στη συνέχεια έγινε η αποθήκευση του στους μείον 80 βαθμούς κελσίου. Ο ιός που αποθηκεύτηκε δοκιμάστηκε για τιτλοδότηση ιού. Ο ιός της αφρικανικής ασθένειας των αλόγων ελήφθη από ένα ζωντανό εξασθενημένο εμβόλιο που διαλύθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80°C. Για την προετοιμασία του δείγματος, κάθε αποθεματικός ιός αραιώθηκε 10 φορές σειριακά και κάθε αραιώση εμβολιάστηκε σε κάρτα FTA, ακολουθούμενη από ξήρανση σε θάλαμο ασφαλείας Τάξης II. Η μολυσμένη κάρτα FTA απομονώθηκε γονιδιωματικά κάνοντας χρήση κιτ εκχύλισης με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA, κιτ καθαρισμού FTA και κιτ εκχύλισης. Το ίδιο συνέβη και στον αποθεματικό ιό. Η ανίχνευση του γονιδιώμα στόχος έγινε με συμβατική αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής ενός σταδίου για ιό γρίπης πτηνών και ιό Newcastle και δύο σταδίων συμπεριλαμβανομένης της ηλεκτροφόρησης γέλης για την ανίχνευση συγκεκριμένων νουκλεϊκών οξέων για την ασθένεια των αφρικανικών αλόγων.

Στη συνέχεια έγινε η σύγκριση με κάρτες FTA του ορίου ανίχνευσης του αποθέματος. Για την σύγκριση χρησιμοποιήθηκε και ρυθμιστικό διάλυμα TE και κιτ εξαγωγής. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης ήταν 1.47, 1.17 και 2,18 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>, ενώ για τον ιό Newcastle ήταν 4.13, 4.83 και 4.84 log<sub>10</sub> ELD<sub>50</sub>. Τέλος, το όριο ανίχνευσης του αποθέματος για τον ιό της αφρικανικής ασθένειας των αλόγων στην κάρτα FTA το οποίο εξήχθη με χρήση buffer TE με κιτ εξαγωγής ήταν 4,30 και 4,01 log<sub>10</sub> μονάδες σχηματισμού πλάκας.

Συμπερασματικά, η ευαισθησία και το όριο ανίχνευσης των ελεγμένων ιών RNA στις κάρτες flinders δεν είχε διαφορά σε σύγκριση με αυτά του αποθεματικού ιού και στις δύο μεθόδους για την απομόνωση RNA σε κάρτες FTA. Ως εκτούτου, οι κάρτες έχουν την ιδιότητα να παρέχουν δείγματα χωρίς κινδύνους, μια αξιόπιστη πηγή RNA για μοριακό χαρακτηρισμό και επαρκή ποσότητα για διαγνωστικές εφαρμογές που βασίζονται στην ανίχνευση με βάση το νουκλεϊκό οξύ. Επιπλέον, είναι χρήσιμες για τη συλλογή και τη μεταφορά δειγμάτων μολυσμένων με ιούς RNA, όπως ιό Newcastle, ιό της αφρικανικής ασθένειας των αλόγων και ιό γρίπης πτηνών.[27]

Τον Ιούλιο του 2023 δημοσιεύθηκε επιστημονικό άρθρο των Das, M., et al.[28], με τίτλο: Ευαισθησία εξέτασης υγρού επιχρίσματος αίματος, τροποποιημένη μέθοδος Knott και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τη διάγνωση της προσβολής από *Dirofilaria immitis* σε σκύλους.



Στην Ινδία η επιδημιολογική κατάσταση των μεταδιδόμενων νόσων των σκύλων είναι περιορισμένη. Η συγκεκριμένη μελέτη είχε ως στόχο τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των πρωτοκόλλων αναγνώρισης ειδών *dirofilaria* σε σκύλους. Το πρόβλημα εμφανίστηκε σε όλα τα ιδρύματα υγειονομικής περίθαλψης ζώων στο Bhubaneswar της Ινδίας.

Ο προσυμπτωματικός έλεγχος των σκυλιών είχε ως βάση τα παρατηρούμενα κλινικά σημεία και για τη διαλογή χρησιμοποιήθηκαν τρεις συμβατικές μεθόδους. Οι συμβατικές μέθοδοι ήταν η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, η τροποποιημένη μέθοδος Knott και το υγρό φίλμ. Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από 65 ύποπτα περιστατικά. Με τη συμβατική μέθοδο βρέθηκαν 38 θετικά και 4 αρνητικά. Με την μέθοδο PCR υψηλής ευαισθησίας βρέθηκαν 42 θετικά. [28]

Το 2023 οι Hemavathi, A. et al. [29] προέβησαν στη μελέτη για την απομόνωση και τον εντοπισμό του αιτιολογικού παράγοντα από ένα κοπάδι βοοειδών που είναι κλινικά ύποπτο για δερματοφίληση που σχετίζεται με δερματίτιδα κάτω άκρου στην περιοχή Puducherry (Νότια Ινδία), τους προδιαθεσικούς παράγοντες και τη θεραπεία τους. Το βακτήριο *Dermatophilus congolensis* προκαλεί τη δερματοφίληση η οποία είναι μια χρόνια εξιδρωματική. Επιπλέον, το συγκεκριμένο βακτήριο θεωρείται ως πλειομορφικός, θετικός κατά Gram ακτινομύκτης ο οποίος είναι επιβλαβής για τους ανθρώπους και τα ζώα. Παρόλα αυτά η διάγνωση της λοίμωξης γίνεται λανθασμένα διότι υπάρχει υψηλή ομοιότητα του οργανισμού με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας Actinomycetaceae.

Η εμφάνιση του *Dermatophilus congolensis* στο δέρμα των μολυσμένων ζώων δεν αποκαλύφθηκε μέσω της μικροσκοπικής εξέτασης των επιχρισμάτων αποτυπώματος δέρματος ενώ με την χρήση νηματώδων δομών η μικροσκοπική εξέταση των απομονωθέντων βακτηρίων εμφάνισε θετικά κατά Gram βακτήρια όπου η επιβεβαίωση έγινε μέσω της PCR που στοχεύει το 16S rRNA του *Dermatophilus congolensis*.

Οι Hemavathi, A. et al,[29] για την επιβεβαίωση της λοίμωξης από *D. Congolensis*, υποστήριξαν ότι κατά τη διάρκεια επιδημιολογικών ερευνών η τεχνική της PCR είναι αποδοτικότερη σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές καλλιέργειας και μικροσκοπίας. Οι προδιαθεσικοί παράγοντες για μετάδοση της λοίμωξης μέσω άμεσης επαφής με κλινικά μολυσμένα ζώα μπορεί να είναι από τις περιοχές βόσκησης με την απευθείας επαφή του δέρματος με τα κανάλια αποχέτευσης και από τη διαβροχή του δέρματος από τη βροχή.[29]

### Διάφορες Εφαρμογές

Το 2023 έγινε μια δημοσίευση μελέτης, από την Μαρέτη Ε. et. al.[30], στην οποία με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αξιολόγησαν τα ρόλο της μόλυνσης από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων στην καρκινογένεση του μαστού. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς, σε πραγματικό χρόνο δειγμάτων αναρρόφησης με λεπτή βελόνα μαστού. Επιπροσθέτως, εξέτασαν το πόσο συχνή είναι η εμφάνιση του ιού στα ανθρώπινα θηλώματα στην Ελλάδα έχοντας ως βάση μοριακή ανάλυση κλινικών κυτταρολογικών δειγμάτων.

Τα δείγματα πάρθηκαν από 114 γυναίκες και η εξέταση έγινε με βιοψία μέσω λεπτής βελόνας κάνοντας χρήση της ανοσοϊστολογικής χρώσης και της ανάλυσης RT-PCR. Από τις 114 γυναίκες, οι 57 είχαν διαγνωστεί με C5 αλλοιώσεις καρκίνου του μαστού και οι 57 με καλοήθη νοσήματα τα παλαιότερα χρόνια.

Τα συνολικά αποτελέσματα έδειξαν ότι ο ιός HPV-16, εμφανίστηκε στην ομάδα μελέτης στο 12,3% των ασθενών ενώ ο ιός HPV-39 εμφανίστηκε στην ομάδα ελέγχου, στο 1,8% των περιπτώσεων. Επιπλέον, ο ιός HPV-59 εμφανίστηκε και στην ομάδα μελέτης με 3,5% και στην ομάδα ελέγχου με 1,8%.

Αντιθέτως μεταξύ των ιστολογικών ομάδων η παρουσία του τύπου HPV διαφοροποιήθηκε στατιστικά. Πιο συγκεκριμένα ο HPV-59 εμφανίστηκε σε τρία δείγματα που περιελάμβαναν διάγνωση ινοαδένωμα, LN και IDC, ο HPV-16 εμφανίστηκε μόνο στο IDC και ο HPV-39 εμφανίστηκε αποκλειστικά σε ένα δείγμα που έγινε διάγνωση κύστης.

Συμπερασματικά είναι απαραίτητο να διερευνηθεί περαιτέρω με διεθνείς συγκριτικές μελέτες για να δοθούν σαφείς απαντήσεις στην επίδραση ότι ορισμένοι τύποι HPV παίζουν ρόλο σημαντικό στον καρκίνο του μαστού. [30]

Το 2023 οι Wu G. Et. al.[31] προέβησαν στην μελέτη που αφορούσε την εύρεση τριών κοινών μικροφυκιών στην Θάλασσα της Ανατολικής Κίνας με δοκιμή πολυμερής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης - mPCR. Τα διάφορα είδη επιβλαβών μικροφυκιών είναι η αιτία του σχηματισμού άνθησης φυκιών. Οι Wu G. et. al. μελέτησαν τρία είδη μικροφυκιών που προκαλούν σχηματισμού άνθησης φυκιών τα οποία είναι το *Karenia mikimotoi*, το *Prorocentrum donghaiense* και το *Heterosigma akashiwo*. Τα φύκια εντοπίζονται στην Κίνα και πιο συγκεκριμένα στην Ανατολική Θάλασσα. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η τεχνική πολλαπλής ανίχνευσης η οποία δεν ήταν κοινή και στα τρία φύκια.

Αρχικά, με βάση την περιοχή D1 και D2 της ριβοσωμικής αλληλουχίας DNA της μεγάλης υπομονάδας (LSU) σχεδιάστηκαν οι αντίστοιχοι ειδικοί εκκινητές. Έπειτα, καθιερώθηκε η mPCR και βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες αντίδρασης. Τέλος, προέβησαν στην αξιολόγηση της σταθερότητας, της ευαισθησία και της ειδικότητας της mPCR.

Μετά την δοκιμή τα αποτελέσματα έδειξαν ότι mPCR δεν επηρεάστηκε από τα παρεμβαλλόμενα μικροφύκη και η ευαισθησία του πειράματος ήταν  $3.3 \times 10^{-1}$  ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . Επίσης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η mPCR είχε καλή εξειδίκευση. Αυτό φάνηκε διότι η mPCR για τα μικροφύκη στόχοι δεν προκάλεσε καμία αντίδραση διασταυρούμενη με 18 μικροφύκη που δεν ήταν στόχοι.. Όσον αφορά την αξιολόγηση της πρακτικότητας έδειξε ότι το όριο ανίχνευσης των μικροφυκών στόχων ήταν 100 κύτταρα  $\text{mL}^{-1}$  κάνοντας χρήση προσομοιωμένων δειγμάτων φυσικού νερού. Αυτό θα μπορούσε να προειδοποιήσει γρήγορα των σχηματισμού άνθησης φυκιών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα οι μελετητές έφτασαν στο συμπέρασμα ότι η mPCR, για την ανίχνευση των μικροφυκών *K. Mikimotoi*, *P. Donghaiense* και *H. Akashiwo*, έχει καλή σταθερότητα, ισχυρή ειδικότητα και πολλαπλή ανάλυση. [31]

Μελέτη σχετικά με τη χρησιμότητα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για την αξιολόγηση της ομόζυγης διαγραφής CDKN2A σε μεταλλαγμένο αστροκύτωμα IDH τύπου ενηλίκου δημοσιεύθηκε το 2023 στο επιστημονικό περιοδικό *Brain Tumor Pathology*. Οι συγγραφείς, Shimizu, Y. et. al.[32], αναφέρουν μια ισχυρή και οικονομικά αποδοτική δοκιμή ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR) για την αξιολόγηση του CDKN2A HD.

Η Ταξινόμηση Όγκων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος 5η Έκδοση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO CNS5) εισήγαγε ένα πρόσφατα καθορισμένο αστροκύτωμα, IDH-μεταλλαγμένο βαθμού 4, για την ταξινόμηση του διάχυτου γλοιώματος ενηλίκων. Ένα από τα διαγνωστικά κριτήρια είναι η παρουσία ομόζυγης διαγραφής CDKN2A/B (HD).

Πραγματοποιήθηκε ένας προσδιορισμός αριθμού αντιγράφων TaqMan χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή που βρίσκεται εντός του CDKN2A. Η γραμμική συσχέτιση μεταξύ των τιμών Ct και του σχετικού αριθμού αντιγράφων CDKN2A επιβεβαιώθηκε χρησιμοποιώντας ένα σειριακό μείγμα DNA από φυσιολογικό αίμα και κύτταρα U87MG. Ο προσδιορισμός qPCR διεξήχθη σε 109 μεταλλαγμένα αστροκυτώματα IDH, συμπεριλαμβανομένων 14 όγκων με CDKN2A HD, που

επαληθεύτηκαν είτε με πολλαπλή εξαρτώμενη από την απολίωση με ενίσχυση ανιχνευτή (MLPA) είτε με πλατφόρμες μικροσυστοιχίας CytoScan HD.

Η τιμή αποκοπής, για τον προσδιορισμό του CDKN2A HD, ήταν 0,85 και απέδωσε ειδικότητα 99,0% και ευαισθησία 100% μετά από ανάλυση της χαρακτηριστικής καμπύλης λειτουργίας δέκτη.

Σε DNA που βγαίνει από μονιμοποιημένα δείγματα ιστού ή κατεψυγμένα δείγματα ιστού με φορμαλίνη ενσωματωμένα σε παραφίνη εφαρμόζεται ο προσδιορισμός CDKN2A HD. Σε ασθενείς με CDKN2A HD, η επιβίωση ήταν μικρότερη σε σχέση με αυτούς που δεν είχαν. Η αξιολόγηση έγινε με MLPA/CytoScan και με qPCR.

Συμπερασματικά για τη βαθμολόγηση και την πρόγνωση του αστροκυτώματος η μέθοδος qPCR, η οποία είναι συμβατή με το CNS5 του ΠΟΥ, είναι κλινικά εφαρμόσιμη. [32]

Ο Peng J. et. al. [33](2023) πραγματοποίησαν μελέτη με τίτλο: «Ανάλυση ενός κυττάρου του circRNA με χρήση ddPCR». Στη μελέτη αυτή, οι συγγραφείς περιγράφουν τις διαδικασίες για την ποσοτικοποίηση ενός circRNA σε μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα παγκρέατος χρησιμοποιώντας ddPCR.

Μια νέα μέθοδος ποσοτικής PCR για τη τεχνολογία σταγονιδίων γαλακτώματος νερού-ελαίου είναι η αλυσιδωτή αντίδραση ψηφιακής πολυμεράσης σταγονιδίων το λεγόμενο ddPCR. Η μέθοδος αυτή στη περίπτωση που ο αριθμός αντιγράφων τους είναι χαμηλός επιτρέπει την ακριβή ποσοτικοποίηση των μορίων νουκλεϊκού οξέος.

Τα κυκλικά RNA (circRNAs) είναι ένας τύπος μορίου RNA που έχει ένα μοναδικό χαρακτηριστικό ότι είναι μονόκλωνα αλλά ομοιοπολικά κλειστά. Αυτά τα circRNA βρίσκονται σε αφθονία τόσο σε ζώα όσο και σε φυτά, υποδεικνύοντας την ευρεία παρουσία τους σε διαφορετικούς οργανισμούς. Υπόσχονται πολλά ως πιθανοί βιοδείκτες για την ανίχνευση και την πρόβλεψη του καρκίνου, προσφέροντας πολύτιμες γνώσεις για τη διάγνωση και την πρόγνωση αυτής της νόσου. Επιπλέον, τα circRNA επιδεικνύουν επίσης δυνατότητες ως θεραπευτικοί στόχοι ή παράγοντες στη θεραπεία του καρκίνου, καθώς έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν τη δραστηριότητα ογκογόνων microRNA ή πρωτεϊνών που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου. Στην τεχνική της ψηφιακής PCR σταγονιδίων (ddPCR), μια μικρή ποσότητα του δείγματος χωρίζεται σε περίπου 20.000 μικροσκοπικά σταγονίδια. Κάθε σταγονίδιο, το οποίο είναι μόνο ένα κλάσμα ενός νανολίτρου σε μέγεθος, στη

συνέχεια υφίσταται ενίσχυση PCR για να ενισχυθεί η παρουσία του συγκεκριμένου μορίου στόχου. Μετά από αυτήν την ενίσχυση, ένας αυτοματοποιημένος αναγνώστης σταγονιδίων συλλαμβάνει τα σήματα φθορισμού που εκπέμπονται από τα σταγονίδια. [33]

Οι Kim I. Et al. [34](2023), πραγματοποίησαν μελέτη για την ποσοτική ανάλυση πολυμεράσης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για την ανίχνευση του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού και της αντοχής στην κλαριθρομυκίνη. Οι ερευνητές είχαν ως στόχο να αναγνωρίσουν τα στελέχη της σαλμονέλας χρησιμοποιώντας PCR που στοχεύει ένα συγκεκριμένο γονίδιο μαστιγίνης από δείγματα αίματος ύποπτων κλινικών ασθενών. Τα αποτελέσματα της δοκιμής Widal έδειξαν ότι όλα τα δείγματα ορού, εκτός από έναν ασθενή, βρέθηκαν θετικά για αντιγόνο O. Επιπλέον, τρεις ασθενείς βρέθηκαν θετικοί και για τα δύο αντιγόνα H και O, ενώ ένας ασθενής έδειξε συγκόλληση για το αντιγόνο H. Η προσέγγιση PCR που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη ανίχνευσε επιτυχώς κλινικά σχετική *Salmonella Typhi*, όπως αποδεικνύεται από την παρουσία θραυσμάτων 458-497 bp στο πήκτωμα αγαρόζης 0,8%, που αντιστοιχεί στο γονίδιο μαστιγίνης του *S. Typhi*. Επιπλέον, η ένθετη PCR, η οποία είναι γνωστή για την αυξημένη ευαισθησία της σε σύγκριση με τη συμβατική PCR, ανίχνευσε επίσης σχετικά μικρότερα αμπλικόνια 366-343 bp. Συνολικά αναλύθηκαν 142 δείγματα γαστρικής βιοψίας και τα αποτελέσματα της γονιδιακής αλληλουχίας έδειξαν ότι 124 από αυτά είχαν μολυνθεί με HP. Μεταξύ αυτών των λοιμώξεων, 42 είχαν τη μετάλλαξη A2143G, 2 είχαν τη μετάλλαξη A2142G και μία είχε διπλή μετάλλαξη. Δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις A2142C. Όσον αφορά την ανίχνευση HP, η DPO-PCR έδειξε ευαισθησία 96,0% και ειδικότητα 100,0%. Τα αντίστοιχα ποσοστά για το Allplex™ ήταν 99,2% και 100,0%. Για τη μετάλλαξη A2143G, η DPO-PCR είχε ευαισθησία 88,3% και ειδικότητα 82,0%, ενώ το Allplex™ είχε ευαισθησία 97,6% και ειδικότητα 96,0%. Ο συντελεστής Kappa του Cohen, ο οποίος μετρά τη συμφωνία μεταξύ των διαφορετικών δοκιμών, ήταν 0,56 για το DPO-PCR και 0,95 για το Allplex™. Προχωρώντας σε μια άλλη μελέτη, ο Abas O. Hadi και η ομάδα του διεξήγαγαν ένα επιστημονικό ερευνητικό έργο σχετικά με την τεχνική ανίχνευσης με βάση την PCR για τη *Salmonella typhi* στην Pune της Ινδίας. Η μελέτη δημοσιεύθηκε στο *Korean Journal of Physiology and Pharmacology* το 2023. Η σαλμονέλα είναι ένα τροφιμογενές παθογόνο που είναι γνωστό ότι προκαλεί τοπικά ξεσπάσματα, θέτοντας σημαντικό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία σε ορισμένες χώρες, όπως η Αφρική και η

Ινδία, ιδιαίτερα σε περιοχές με περιορισμένη πόρους υγειονομικής περίθαλψης. Ο κύριος στόχος αυτής της μελέτης ήταν η ανάπτυξη μιας μεθόδου μοριακής ανίχνευσης για τη σαλμονέλα.

Η διαγνωστική απόδοση του Allplex™ βρέθηκε ότι είναι συγκρίσιμη με την άμεση γονιδιακή αλληλουχία και δεν είναι κατώτερη από την DPO-PCR. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα του Allplex™ ως διαγνωστικού εργαλείου. Ο προσδιορισμός της αντοχής στην κλαριθρομυκίνη είναι ζωτικής σημασίας όταν πρόκειται για τη θεραπεία και την εκρίζωση των λοιμώξεων από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (HP). Προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα του Allplex™ H.pylori & ClariR Assay (Allplex™) στη διάγνωση και την ανίχνευση αντοχής στην κλαριθρομυκίνη στην HP, διεξήχθη μια μελέτη.

Οι συμμετέχοντες που υποβλήθηκαν σε οισοφαγογαστροδωδεκαδακτυλοσκόπηση στο Incheon St. Hospital Mary's μεταξύ Απριλίου 2020 και Αυγούστου 2021 εγγράφηκαν στη μελέτη. Η απόδοση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πολλαπλής πολυμεράσης (PCR) και του ολιγονουκλεοτιδίου διπλής εκκίνησης (DPO) που βασίζεται σε Allplex™ συγκρίθηκε με τη μέθοδο προσδιορισμού αλληλουχίας προτύπων χρυσού. Συνοπτικά, οι μελέτες που συζητήθηκαν παραπάνω υπογραμμίζουν τη σημασία των ακριβών και αποτελεσματικών διαγνωστικών τεχνικών για τις λοιμώξεις από *Helicobacter pylori* και *Salmonella typhi*. Η ανάλυση Allplex™ και οι μέθοδοι που βασίζονται στην PCR έδειξαν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στην ανίχνευση της αντοχής στην κλαριθρομυκίνη και της *Salmonella Typhi*, αντίστοιχα. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα και επικύρωση για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα και η αξιοπιστία αυτών των διαγνωστικών εργαλείων.

Ως αποτέλεσμα, συνιστάται ιδιαίτερα η μέθοδος PCR που χρησιμοποιείται σε αυτήν την έρευνα να χρησιμοποιηθεί ως μια γρήγορη, οικονομική και αποτελεσματική τεχνική για την ανίχνευση και την αναγνώριση της σαλμονέλας. [34, 35]

Οι Fatima Afroz et al. [36] (2023) πραγματοποίησαν έρευνα σχετικά με την PCR-dipstick DNA χρωματογραφία για ανίχνευση εντεροβακτηριδίων ανθεκτικών σε καρβαπενέμες που παράγουν καρβαπενεμάση. Τη σημερινή εποχή τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες εντεροβακτηρίδια είναι απειλή για τη δημόσια υγεία για αυτό το λόγο η ανίχνευση τους είναι απαραίτητη για τον περιορισμό αυτών των παθογόνων. Οι

Fatima Afroz et al[36]. για την ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμάσης προέβησαν στην αξιολόγηση της ευαισθησίας της χρωματογραφίας DNA αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)-dipstick (GeneFields CPE) σε σύγκριση με τη συμβατική PCR. Απομονώθηκαν στο σύνολο 145 εντεροβακτηριδία τα οποία ήταν ανθεκτικά στη καρβαπενέμη. Τα εντεροβακτηριδία ελέγχθηκαν για καρβαπενεμάση με φαινοτυπικό mCIM και γονοτυπική-συμβατική μέθοδο χρωματογραφίας DNA PCR και PCR-dipstick DNA.

Στη δοκιμασία χρωματογραφίας DNA με ράβδο στάθμης PCR, μετά από multiplex PCR εφαρμόζεται ένα σύστημα ανίχνευσης βασισμένο σε υβριδισμό DNA-DNA όπου τα ενισχυμένα προϊόντα μπορούν εύκολα να ερμηνευτούν παρατηρώντας μια μπλε γραμμή στη λωρίδα DNA οπτικά εντός 15 λεπτών χωρίς ηλεκτροφόρηση γέλης. Με συμβατική PCR έγινε ανίχνευση 142 θετικών απομονώσεων CP-CRE για NDM και για OXA-48 ενώ με δοκιμασία χρωματογραφίας DNA PCR-dipstick οι απομονώσεις ήταν όλες θετικές. Η ειδικότητα και η ευαισθησία με συμβατική PCR για ανίχνευση OXA-48 και NDM ήταν 97.2%, 98.6% ενώ με τη δοκιμασία χρωματογραφίας DNA PCR-dipstick ήταν 92.7% και 100.0%. Με βάση τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας οι ερευνητές έφτασαν στα εξής συμπεράσματα πρώτον ότι η συμβατική PCR εμφανίζει εξαιρετική συμφωνία για την ανίχνευση CP-CRE και δεύτερον ότι η χρωματογραφία DNA PCR-dipstick όσον αφορά την ευαισθησία και τη ταχύτητα αποτελεί ένα ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση του CP-CRE. [36]

Το 2023, μια μελέτη με το όνομα: «Η απόδοση της PCR σε πραγματικό χρόνο σε ύποπτη λοίμωξη του αίματος που σχετίζεται με τον καθετήρα αιμοκάθαρσης: μια μελέτη απόδειξης της ιδέας» δημοσιεύτηκε στο Clinical Kidney Journal. Οι Mathieu Acquier et. al[37]. πραγματοποίησαν μια μελέτη η οποία είχε ως σκοπό την αξιολόγηση των ύποπτων λοιμώξεων αίματος από καθετήρες μέσω τη διαγνωστική απόδοση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (rt-PCR) σε σύγκριση με καλλιέργειες αίματος. Οι λοιμώξεις του αίματος που σχετίζονται με τον καθετήρα (CRBIs) παραμένουν κύρια αιτία θνησιμότητας

Την σημερινή εποχή οι ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση με κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες (CVCs) εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό λοιμώξεων στο αίμα και σε πολλές περιπτώσεις οι λοιμώξεις είναι θανάσιμες. Αυτό υφίσταται κυρίως σε τρεις λόγους πρώτον λόγω της καθυστέρησης στη μικροβιολογική

διάγνωση, δεύτερον λόγω στη πιθανή χρήση μη αποτελεσματικών αντιβιοτικών και τρίτων λόγω της μη ειδικής συμπτωματολογίας.

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία, συλλέχθηκε ένα δείγμα αίματος ταυτόχρονα για PCR σε πραγματικό χρόνο με κάθε ζεύγος αιμοκαλλιέργειών το οποίο ήταν ύποπτο για λοίμωξη του αίματος. Η διαδικασία PCR σε πραγματικό χρόνο έγινε σε πλήρες αίμα με συγκεκριμένους εκκινητές DNA, οι οποίοι ήταν ο *mecA*, ο *Staphylococcus spp*, ο 16S και ο *Staphylococcus aureus*, και χωρίς κανένα στάδιο εμπλουτισμού. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν σε κάθε δοκιμασία PCR σε πραγματικό χρόνο συγκρίθηκαν με την αντίστοιχη καλλιέργεια αίματος ρουτίνας.

Οι γρήγορες και εξαιρετικά ακριβείς διαγνωστικές δυνατότητες των δοκιμών *rt-PCR* σε ύποπτες περιπτώσεις HD CRBI υπογραμμίζουν τις δυνατότητές τους να βελτιώσουν σημαντικά τη διαχείριση αυτής της πάθησης μειώνοντας την περιττή κατανάλωση αντιβιοτικών. Σε 40 περιπτώσεις που ήταν ύποπτες για λοιμώξεις αίματος σε 37 ασθενείς έγινε η συλλογή 84 ζεύγη δειγμάτων και έπειτα η σύγκριση. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι 13 διαγνώστηκαν όντως είχαν υποστεί λοίμωξη αίματος. Επιπλέον οι εκκινητές στη διαδικασία PCR σε πραγματικό χρόνο είχαν διαγνωστική απόδοση εξαιρετική μέσα σε 3,5 ώρες. Μόνο ο εκκινητής *mecA* δεν έδειξε εξαιρετική διαγνωστική απόδοση και αυτό γιατί δεν υπήρχαν θετικά δείγματα. Ο εκκινητής *Staphylococcus spp*. είχε ευαισθησία 100% και ειδικότητα 97%, και το τεστ *S. aureus* έδειξε ευαισθησία 100% και ειδικότητα 99%. Ο εκκινητής 16S είχε ειδικότητα 78% και ευαισθησία 100%. Με τη χρήση των αποτελεσμάτων των δοκιμών *rt-PCR*, κατέστη δυνατός ο ακριβέστερος στόχος των αντιβιοτικών, με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της παρουσίας θετικών κατά Gram αντι-κόκκων από 77% σε 29%. [37]

Ο McMonnies K. et. al.[38] (2023) πραγματοποίησαν έρευνα σχετικά με Μια δοκιμή *Streptococcus PCR*: αξιολόγηση της ταχείας εφαρμογής σε ένα Παιδιατρικό Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών του Λονδίνου. Τον Δεκέμβριο του 2022, το UKHSA τόνισε μια μη εποχική αύξηση των περιπτώσεων οστρακιάς και λοιμώξεων από στρεπτόκοκκο της ομάδας A (GAS). Τα μέσα μαζικής ενημέρωσης αναφέρθηκαν στην αύξηση των παιδιατρικών θανάτων από GAS.

Πριν και μετά από την εφαρμογή της δοκιμής PCR εξετάστηκαν συνολικά 50 περιπτώσεις. 27 περιπτώσεις μετά και 23 περιπτώσεις πριν ελέγχθηκαν για εξέταση PCR έχοντας ως βάση τη βαθμολογία FeverPAIN. Η τιμή της βαθμολογίας πρέπει να είναι ίση ή μεγαλύτερη από 3 για διηθητικό GAS ή για οστρακιά. Πριν από την



εφαρμογή της PCR, η χορήγηση αντιβιοτικών ξεκίνησε σε 20 ασθενείς (87,0%), ενώ μόλις 16 ασθενείς (59,3%) έλαβαν αντιβιοτικά μετά την εισαγωγή της PCR. Το τεστ PCR επηρέασε την απόφαση του ιατρού σε 4 από τις 27 περιπτώσεις (14,8%), με αποτέλεσμα 3 περιπτώσεις όπου η αντιβιοτική θεραπεία αποκλιμακώθηκε λόγω αρνητικών αποτελεσμάτων PCR και 1 περίπτωση όπου η διάρκεια των αντιβιοτικών επεκτάθηκε από 5 ημέρες σε 10 ημέρες, με βάση ένα θετικό αποτέλεσμα PCR. Είναι ενδιαφέρον ότι υπήρξε αύξηση στη διάρκεια παραμονής στο τμήμα επειγόντων περιστατικών για ασθενείς στην ομάδα μετά την εφαρμογή, με μέσο όρο 4,52 ώρες σε σύγκριση με 3,78 ώρες. Επιπλέον, μετά την εφαρμογή του τεστ PCR, διαπιστώθηκε ότι δεν ζητήθηκε ή εσφαλμένα ζητήθηκε εξέταση PCR για 19 από τους 27 ασθενείς (70,4%). Για τη διεξαγωγή της αξιολόγησής, πραγματοποιήθηκε μια αναδρομική ανάλυση περιπτώσεων χρησιμοποιώντας το ηλεκτρονικό σύστημα αρχείων ασθενών EPIC©. Εξετάστηκαν συγκεκριμένα περιπτώσεις παιδιών ηλικίας 3 έως 15 ετών που εισήχθησαν στην παιδιατρική πτέρυγα ενός μεγάλου οξέος νοσοκομείου στο κεντρικό Λονδίνο με πυρετό ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$  τις προηγούμενες 24 ώρες) και είτε πονόλαιμο είτε με διάγνωση αμυγδαλίτιδας, οστρακιά ή διεισδυτικό αέριο. Εξετάστηκαν περιπτώσεις από μια περίοδο δύο εβδομάδων πριν και μετά την εφαρμογή του τεστ PCR.

Επιπλέον, μετρήθηκαν την ικανοποίηση ασθενών και προσωπικού μέσω ενός ερωτηματολογίου που χορηγήθηκε μετά την εφαρμογή. Προκειμένου να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα στη θεραπεία και να διατηρηθούν οι πόροι αντιβιοτικών, το τμήμα επειγόντων περιστατικών παιδιατρικής μας εισήγαγε αμέσως μια δοκιμή ταχείας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης GAS (PCR). Ο στόχος ήταν να αξιολογηθεί ο αντίκτυπος της εφαρμογής αυτής της δοκιμής PCR, ειδικά στις συνταγές αντιβιοτικών, τη διάρκεια παραμονής στο τμήμα επειγόντων περιστατικών και την ικανοποίηση τόσο των ασθενών όσο και του προσωπικού. Συνολικά, η εισαγωγή της ταχείας δοκιμής GAS PCR έδειξε πολλά υποσχόμενη μείωση των περιττών συνταγών αντιβιοτικών και επηρεάζοντας τις αποφάσεις θεραπείας. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν προκλήσεις όσον αφορά τη σωστή χρήση του τεστ PCR και την αύξηση της διάρκειας παραμονής των ΕΔ. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη σημασία περαιτέρω διερεύνησης και πιθανών βελτιώσεων στη διαδικασία υλοποίησης για την πλήρη αξιοποίηση των πλεονεκτημάτων αυτής της δοκιμής.

Αυτή ήταν μια μικρής κλίμακας αξιολόγηση μετά την άμεση εφαρμογή μιας ταχείας δοκιμής PCR για το GAS. Τα δεδομένα μας υποδηλώνουν μείωση των συνταγών αντιβιοτικών μετά την εισαγωγή. Ωστόσο, η παραμονή στο τμήμα ήταν

παρατεταμένη. Ένα μεγάλο ποσοστό των επιλέξιμων παιδιών δεν έλαβε τις κατάλληλες εξετάσεις, υπογραμμίζοντας τη σημασία της εκπαίδευσης και της ευαισθητοποίησης του προσωπικού κατά τη στιγμή της εφαρμογής. Η εφαρμογή της ταχείας δοκιμής PCR φαίνεται χρήσιμη για τον εξορθολογισμό της θεραπείας, αλλά η εκπαίδευση και η ευαισθητοποίηση είναι πρωταρχικής σημασίας για τη διασφάλιση της κατάλληλης χρήσης της. [38]

Ο Dadwal R. et. al.[39] (2023) πραγματοποίησαν μελέτη για τον επιπολασμό του *Trichomonas vaginalis* με μοριακή μέθοδο με βάση την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε συμπτωματικές γυναίκες από τη Βόρεια Ινδία. Η τριχομονίαση παραμένει μια από τις πιο κοινές σεξουαλικά μεταδιδόμενες λοιμώξεις, η οποία είναι ιάσιμη. Αυτή η μελέτη δείχνει ότι η εξέταση PCR είναι πραγματικά σημαντική για την εύρεση του *Trichomonas vaginalis* σε γυναίκες που έχουν συμπτώματα.

Οι ερευνητές συνέλεξαν δείγματα από γυναίκες που έκαναν πυελικές εξετάσεις και είχαν συμπτώματα. Χρησιμοποίησαν διαφορετικά τεστ για να ψάξουν για *Trichomonas vaginalis*, όπως να κοιτάζουν τα δείγματα κάτω από ένα μικροσκόπιο και να τα μεγαλώσουν σε εργαστήριο. Χρησιμοποίησαν επίσης το τεστ PCR. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το τεστ PCR ήταν καλύτερο από τα άλλα τεστ στην εύρεση του *Trichomonas vaginalis*. Βρήκε 17 περιπτώσεις που οι υπόλοιπες εξετάσεις έχασαν. Για την επιβεβαίωση ότι το *Trichomonas vaginalis* δεν προκαλεί προβλήματα ή δεν εξαπλώνεται σε άλλους ανθρώπους, είναι πραγματικά σημαντικό να το βρεθεί νωρίς και να είναι γνωστό με βεβαιότητα εάν κάποιος το έχει. Αυτή η μελέτη είχε σκοπό να γνωστοποιήσει εάν μια ειδική εξέταση που ονομάζεται PCR είναι καλύτερη από άλλες εξετάσεις για την εύρεση του *Trichomonas vaginalis*. Επίσης, ήταν αναγκαίο να προσδιοριστεί ο αριθμός των γυναικών που διέθεταν ένα συγκεκριμένο είδος έκκρισης είχαν *Trichomonas vaginalis* με βάση το τεστ PCR. [39]

### **3.3 Καινοτομίες – Εξελιξίσεις**

Τον Ιούνιο του 2023, ο Afschin Gandjour. et. al.[40] από το Πανεπιστήμιο της Φανκφούρτης, δημοσίευσε τη μελέτη του για τη βέλτιστη κατανομή των σπάνιων δοκιμών PCR κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID-19. Σκοπός του ήταν να αναπτύξει ένα μαθηματικό μοντέλο που θα βελτιστοποιεί τη διαγνωστική ικανότητα με δοκιμές PCR βάσει εργαστηρίου.

Το μαθηματικό μοντέλο έδειξε αρχικά την αξία του τεστ PCR σε σχέση με την προ-δοκιμαστική πιθανότητα του COVID-19 και επίσης μπορούσε να προβεί

στην εξαγωγή των ανωτέρων και των κατώτερων ορίων που δείχνουν την πιθανότητα κατωφλίου προ δοκιμής της καθορισμένης ομάδας προτεραιότητας. Το Φεβρουάριο του 2022 έγινε η εφαρμογή του μαθηματικού μοντέλου στη Γερμανία κάνοντας χρήση το ποσοστό θετικότητας της δοκιμής PCR.

Η συνάρτηση τιμής της δοκιμής PCR έχει σχήμα καμπάνας σε σχέση με την πιθανότητα προ-δοκιμής, φτάνοντας στο μέγιστο σε μια πιθανότητα προ-δοκιμής 0,5. Τουλάχιστον τα 2/3 του πληθυσμού που έχει ελεγχθεί έχει πιθανότητα προ-δοκιμής χαμηλότερη και με βάση ότι ένα ποσοστό θετικότητας στη δοκιμασία PCR είναι 0.3, πριν από τη δοκιμή υψηλότερα και τα χαμηλότερα κατώφλια πιθανότητας είναι 0.7 και 0.1. Παρόλα αυτά, η πιθανότητα να βγουν τα άτομα που έχουν συμπτώματα θετικά στο τεστ είναι 25% πιθανότητα και αυτό είναι απαραίτητο να έχει υψηλότερη προτεραιότητα για την εξέταση PCR. Επίσης, σε ασυμπτωματικά άτομα τα οποία δεν έχουν έρθει σε επαφή με κρούσμα COVID-19 και εμφάνισαν θετικό γρήγορο τεστ αντιγόνου είναι απαραίτητο να το επιβεβαιώσουν κάνοντας τεστ PCR ενώ τα άτομα που έχουν συμπτώματα και έχουν και θετικό τεστ γρήγορου αντιγόνου δεν απαιτείται τεστ PCR. Οι αλλαγές στη συχνότητα εμφάνισης οδηγούν σε αλλαγές στο ποσοστό θετικότητας στη δοκιμασία PCR και, ως εκ τούτου, επηρεάζουν το όριο για τη δοκιμή PCR. [40]

Οι He J .et. al. [41](2020) δημοσίευσαν μελέτη σχετικά με τη δημιουργία μίας νέας εφεύρεσης, της μικρότερης συσκευής qPCR διπλού χρώματος. Οι επιστήμονες δημιούργησαν μια μικρή και φορητή συσκευή που μπορεί γρήγορα και εύκολα να κάνει τεστ για τον κορωνοϊό. Αυτή η συσκευή χρησιμοποιεί μια ειδική μέθοδο που ονομάζεται qPCR για την ανίχνευση διαφορετικών τμημάτων του ιού. Είναι σε θέση να ανιχνεύσει δύο διαφορετικά μέρη του ιού ταυτόχρονα. Η συσκευή έχει περίπου το μέγεθος ενός μικρού κουτιού και ζυγίζει περίπου όσο ένα σαπούνι. Διαθέτει ειδικές θήκες όπου γίνονται οι δοκιμές, καθώς και σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας και τρόπο προβολής των αποτελεσμάτων. Μπορεί επίσης να συνδεθεί με υπολογιστή ή τηλέφωνο για να στείλει τα αποτελέσματα της δοκιμής. Αυτή η συσκευή είναι πραγματικά χρήσιμη, επειδή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μέρη όπως νοσοκομεία ή κλινικές για να δοκιμάσει ανθρώπους για τον ιό γρήγορα και με ακρίβεια. [41]

Η διαγνωστική διαδικασία PCR έχει γνωρίσει μια νέα πρόοδο με την εισαγωγή μιας εφαρμογής πολυπλεξίας σε πραγματικό χρόνο RT-qPCR που βασίζεται σε TaqMan. Αυτή η καινοτόμος μέθοδος, η οποία αναπτύχθηκε από τον Yu επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση τριών ιών - του αστροϊού της χήνας (GoAstV),

του παρβοϊού της χήνας (GPV) και του κυκλοϊού της χήνας (GoCV). Αυτές οι λοιμώξεις είναι γνωστό ότι προκαλούν σοβαρά συμπτώματα, όπως σοβαρή διάρροια, και έχουν ως αποτέλεσμα σημαντικές οικονομικές απώλειες για την παγκόσμια βιομηχανία χήνας. Ως εκ τούτου, έχει καταστεί επιτακτική ανάγκη να αναπτυχθεί ένα γρήγορο και ακριβές μέσο διαφοροποίησης μεταξύ αυτών των τριών ιών. Συνολικά, η ανάπτυξη αυτής της μεθόδου πολυπλεξίας σε πραγματικό χρόνο RT-qPCR που βασίζεται σε TaqMan αντιπροσωπεύει μια σημαντική πρόοδο στον τομέα της διαγνωστικής PCR.

Η υψηλή ευαισθησία, η ειδικότητα και η αναπαραγωγιμότητά του το καθιστούν πολύτιμο εργαλείο για την ταχεία και ακριβή ανίχνευση των GoAstV, GPV και GoCV, βοηθώντας τελικά στον έλεγχο και την πρόληψη αυτών των οικονομικά καταστροφικών λοιμώξεων στη βιομηχανία χήνας. Για να αντιμετωπιστεί αυτή η ανάγκη, καθιερώθηκε προσεκτικά και βελτιστοποιήθηκε μια μέθοδος πολλαπλής αντίστροφης μεταγραφής-ποιοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-qPCR) βασισμένη σε ανιχνευτή TaqMan για την ταυτόχρονη ανίχνευση GoAstV, GPV και GoCV. Αυτό περιελάμβανε τον σχεδιασμό τριών ζευγών ειδικών εκκινητών και ανιχνευτών, λαμβάνοντας υπόψη τις διατηρημένες αλληλουχίες των ORF2, VP3 και Rep κάθε αντίστοιχου ιού. Μέσω singleplex σε πραγματικό χρόνο RT-qPCR, ήταν δυνατό να ανιχνευθούν μόλις 10 αντίγραφα των στοχευόμενων γονιδίων. Ωστόσο, η πρόσφατα αναπτυγμένη πολυπλεξία σε πραγματικό χρόνο RT-qPCR επέδειξε ακόμη υψηλότερη ευαισθησία, απαιτώντας μόνο τουλάχιστον 100 αντίγραφα για ανίχνευση. Οι συντελεστές συσχέτισης που ελήφθησαν από τον προσδιορισμό υπερέβησαν το 0,99, υποδεικνύοντας μια ισχυρή σχέση μεταξύ των γονιδίων-στόχων και των ανιχνευόμενων σημάτων.

Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα ενίσχυσης της ανάλυσης κυμαινόταν από 80 έως 100%, επικυρώνοντας περαιτέρω την ακρίβεια και την αξιοπιστία της. Για να αξιολογηθεί η απόδοση της ανάλυσης, αναλύθηκαν 85 δείγματα ιστού. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι το GoAstV και το GPV ήταν τα κυρίαρχα παθογόνα, που συχνά εμφανίζονταν σε συν-μόλυνση. Αυτό το εύρημα υπογραμμίζει τη χρησιμότητα της μεθόδου πολυπλεξίας σε πραγματικό χρόνο RT-qPCR για τον ακριβή εντοπισμό και τη διάκριση μεταξύ αυτών των ιογενών λοιμώξεων.

Αυτή η ανάλυση παρέχει ένα γρήγορο, αποτελεσματικό, ειδικό και ευαίσθητο εργαλείο για την ανίχνευση των GoAstV, GPV και GoCV. Αυτό μπορεί να διευκολύνει τη διαχείριση της νόσου και την επιδημιολογική επιτήρηση. [42]

Η Plasmonic Cross-Linking Colorimetric PCR, μια πρόοδος στη μοριακή διάγνωση, αναπτύχθηκε από τον Kunlun Jiang και την ερευνητική του ομάδα. Αυτή η καινοτόμος τεχνική προσφέρει μια απλή, οικονομικά αποδοτική και ακριβή πλατφόρμα για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων. Οι πιθανές εφαρμογές του περιλαμβάνουν την ανίχνευση παθογόνων, την επιτήρηση ασθενειών και τον έλεγχο στο σημείο φροντίδας (POC). Ενώ η αλυσιδωτή αντίδραση φωτοθερμικής πολυμεράσης Plasmon (PPT-PCR) είναι μια εξαιρετικά αποτελεσματική μέθοδος για την ενίσχυση νουκλεϊκού οξέος, δεν διαθέτει μια φιλική προς το χρήστη μέθοδο ανάλυσης κατάλληλη για χρήση POC.

Για να αντιμετωπιστεί αυτό, οι ερευνητές προτείνουν μια νέα προσέγγιση που ονομάζεται χρωματομετρική PCR πλασμονικής διασταύρωσης (PPTccPCR), η οποία συνδυάζει πλασμονικά μαγνητικά νανοσωματίδια (PMNs) με νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) για ανάλυση. Παρουσία αμπλικονίων, τα AuNP σχηματίζουν δομές με τα PMN και μπορούν να συλλεχθούν χρησιμοποιώντας ένα μαγνητικό πεδίο, με αποτέλεσμα μια αλλαγή στο χρώμα στο υπερκείμενο. Αυτή η οπτικά ανιχνεύσιμη μέθοδος μπορεί να αναγνωρίσει το DNA-στόχο σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο 5  $\mu\text{L}$  αντίγραφα μέσα σε μόλις 40 λεπτά. Το όριο ανίχνευσης που επιτυγχάνεται είναι τόσο χαμηλό όσο 1,8 αντίγραφα/ $\mu\text{L}$  με βάση τα σήματα απορρόφησης. Είναι σημαντικό ότι αυτή η στρατηγική είναι απλή, ευαίσθητη και δεν απαιτεί ακριβά όργανα. Οι δυνατότητές του για ανίχνευση POC είναι σημαντικές και ανοίγει επίσης δυνατότητες για περαιτέρω εφαρμογές στην κλινική διάγνωση. [43]

Μία μελέτη για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 με τη χρήση βιοαισθητήρα ηλεκτροχημικοφωταύγειας με βάση στρατηγική ενίσχυσης αλυσιδωτής αντίδρασης ασύμμετρης πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε από τον Chunying Jiang et. al.[44]. Η αξιόπιστη μέθοδος Anewand έχει κατασκευαστεί για την ανίχνευση του σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου του κορωνοϊού τύπου 2 (SARS-CoV-2) ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης γονίδιο 1ab (ORF1ab) μέσω τεχνολογίας βιοαισθητήρα υψηλής ευαισθησίας ηλεκτροχημικοφωταύγειας (ECL) που βασίζεται σε εξαιρετικά αποτελεσματική ασύμμετρη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (ασύμμετρη PCR) στρατηγική ενίσχυσης.

Αναλυτικά η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιεί ως ανιχνευτές μαγνητικής σύλληψης συζευγμένα μαγνητικά σωματίδια μαζί με μια συμπληρωματική αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος του γονιδίου SARS-CoV-2 ORF1ab η οποία είναι σημασμένη με βιοτίνη και ως φωταυγείς ανιχνευτές η ίδια συμπληρωματική

αλληλουχία σημασμένη με Ru(bpy)<sub>2</sub><sup>+</sup> 3. Έπειτα γίνεται ο σχηματισμός ενός μοντέλου ανίχνευσης ανιχνευτών μαγνητικής σύλληψης με προϊόντα νουκλεϊκών οξέων ασύμμετρης ενίσχυσης PCR και τις ετικέτες φωταύγειας Ru(bpy)<sub>2</sub><sup>+</sup>3. Το αποτέλεσμα της ενίσχυσης της ευαισθησίας της μεθόδου ανίχνευσης του γονιδίου SARS-CoV-2 ORF1ab οφείλεται στο συνδυασμό της στρατηγικής της ασύμμετρης ενίσχυσης PCR μαζί με τη τεχνολογία του ευαίσθητο βιοαισθητήρα ECL. Επιπροσθέτως, το γραμμικό εύρος της μεθόδου είναι 1-10<sup>6</sup> αντιγράφων/μL και η εξίσωση παλινδρόμησης είναι  $Y = 534,942X + 2919,301$  ( $R = 0,9983$ ,  $N = 7$ ) και το όριο ανίχνευσης είναι 1 αντίγραφο/μL.

Συμπερασματικά, η μέθοδος ικανοποιεί τις αναλυτικές απαιτήσεις για προσομοιωμένα δείγματα ούρων και σάλιου. Τα πλεονεκτήματα της είναι η υψηλή ευαισθησία και η λογική αναπαραγωγιμότητα κατά των παρεμβολών, κάτι το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αναφορά για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων ανίχνευσης πεδίου για τον SARS-CoV -2. [44]

Μία καινοτομία που αναπτύχθηκε βασιζόμενη στις μεθόδους PCR είναι ένα προσαρμοστικό πλαίσιο φιλτραρίσματος για την αφαίρεση μη ειδικών αντιδράσεων και αντιδράσεων χαμηλής απόδοσης σε Multiplex Digital PCR με βάση τις σιγμοειδείς τάσεις από τους Luca Miglietta et al[46]. Η ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR) σε συνδυασμό με μεθόδους μηχανικής μάθησης (ML) έχει δείξει τη δυνατότητα να ξεκλειδώσει επιστημονικές ανακαλύψεις, ιδιαίτερα στον τομέα της μοριακής διάγνωσης για μολυσματικές ασθένειες. Μια πολλά υποσχόμενη εφαρμογή αυτού του αναδυόμενου πεδίου διερευνά την πολυπλεξία PCR ενός καναλιού φθορισμού εξάγοντας ειδικές κινητικές και θερμοδυναμικές πληροφορίες για τον στόχο που περιέχονται στις καμπύλες ενίσχυσης, επίσης γνωστή ως πολυπλεξία βάσει δεδομένων. Οι Luca Miglietta et al [46] έκαναν χρήση αλγόριθμους ανίχνευσης ακραίων τιμών οι οποίοι βασίζονται σε σιγμοειδείς τάσεις καμπυλών ενίσχυσης για να εντοπίσουν και να φιλτράρουν μη ειδικές και χαμηλής απόδοσης αντιδράσεις από δεδομένα qPCR.

Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν δημοσιευμένα δεδομένα στα οποία η ανάλυση της καμπύλης ενίσχυσης, η λεγόμενη ACA, αποδεικνύει ότι εξετάζονται οι οργανισμοί που παράγουν καρβαπενεμάση σε κλινικές απομόνωσης. Η στρατηγική που ανέπτυξαν είχε το όνομα ως προσαρμοστικό φίλτρο χαρτογράφησης (AMF). Αυτή η στρατηγική είχε ως σκοπό προσαρμογής του ποσοστού των ακραίων τιμών που αφαιρέθηκαν σύμφωνα με τον αριθμό των θετικών μετρήσεων στο qPCR.

Στο πειραματικό μέρος αξιολογήθηκαν, 116.222 θετικές αντιδράσεις ενίσχυσης από τα 152.000 γεγονότα ενίσχυσης, πριν και μετά το φιλτράρισμα. Έπειτα έγινε η σύγκριση με τη κατανομή κορυφής τήξης, φτάνοντας στο συμπέρασμα ότι οι ακραίες τιμές των καμπυλών ενίσχυσης έχουν άμεση σύνδεση με τη μείωση της απόδοσης PCR ή με τη μετατόπιση της κατανομής τήξης.

Το ACA εφαρμόστηκε για την αξιολόγηση της απόδοσης ταξινόμησης πριν και μετά το AMF, παρουσιάζοντας βελτιωμένη ευαισθησία 1,2% όταν χρησιμοποιούνται εσωτερικά σε σύγκριση με μείωση 19,6% όταν χρησιμοποιούνται ακραίες τιμές ( $p$ -value < 0,0001), αφαιρώντας το 53,5% όλων των λανθασμένων καμπυλών τήξης με βάση μόνο στο σχήμα ενίσχυσης. [46]

Οι Chenyan Wang et. al. [47] ανέπτυξαν δοκιμασία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR) ανάστροφης μεταγραφής TaqMan σε πραγματικό χρόνο ώστε να ανιχνεύσουν το νέο ιό θυλακικής νόσου (nVarIBDV) ο οποίος εμφανίστηκε στη Κίνα και κυρίως σε πουλερικά κρεατοπαραγωγής. Για αυτό το λόγο όλα τα πουλερικά εμβολιάστηκαν κατά του ιού.

Ο πρωταρχικός στόχος ήταν να διερευνηθεί η αξιοπιστία ανίχνευσης και διάκρισης του γονότυπου nVarIBDV από τον μη nVarIBDV μέσω της μεθόδου ανάλυσης TaqMan σε πραγματικό χρόνο. Για την καθιέρωση μιας μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ανάστροφης μεταγραφής TaqMan ενός σταδίου σε πραγματικό χρόνο έγινε χρήση του πολυμορφισμού των νουκλεοτιδίων στην περιοχή 50-UTR και της επικαλυπτόμενης περιοχής νρ5/νρ2 των αλληλουχιών τμήματος A του IBDV.

Η διάκριση των στελεχών nVarIBDV και non-nVarIBDV κυρίως σε στελέχη ζωντανών εμβολίων έγινε με ακρίβεια με την χρήση της μεθόδου. Επίσης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρχαν διασταυρούμενες αντιδράσεις με τον IBDV αρνητικού πεδίου, τον ιό της νόσου του Newcastle, τον ιό της λοιμώδους βρογχίτιδας, τον ιό της γρίπης των πτηνών και τον ιό της λοιμώδους λαρυγγοτραχειίτιδας,. Το γραμμικό δυναμικό εύρος της μεθόδου ήταν μεταξύ 10<sup>2</sup> και 10<sup>7</sup> αντιγράφων/αντίδρασης DNA, μέσο R<sup>2</sup> 1,00 και απόδοση 94% για non-nVarIBDV και με μέσο R<sup>2</sup> 0,99 και απόδοση 93% για nVarIBDV και.

Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν τη μέθοδο και για την ανίχνευση 84 κλινικών θυλάκων κοτόπουλων τα οποία είχαν εμβολιαστεί με το ζωντανό εμβόλιο. Και σ' αυτή τη περίπτωση η μέθοδος, σε σύγκριση με μια στρατηγική που βασίζεται στην PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) για το γονίδιο νρ5 ή στην ανάλυση

αλληλουχίας των HVR στο γονίδιο np2, έδειξε μεγάλη ακρίβεια στη διάκριση των στελεχών nVarIBDV και μη nVarIBDV. Συμπερασματικά, η συγκεκριμένη μέθοδος που ανέπτυξαν οι ερευνητές σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξε γρήγορη, ειδική και ευαίσθητη προσέγγιση για την ανίχνευση λοιμώξεων που προκαλούνται από nVarIBDV. Τέλος η μέθοδος μπορεί να θεωρηθεί σε ζωντανά στελέχη εμβολίων ως ένα επιπλέον διαγνωστικό εργαλείο αναγνώρισης και διάκρισης του nVarIBDV από το μη nVarIBDV. [47]

Το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022 πραγματοποιήθηκε η διπλωματική εργασία με τίτλο: The Art of PCR Assay Development: Data-Driven Multiplexing, στο Τμήμα Ηλεκτρολόγων και Ηλεκτρονικών Μηχανικών Κέντρο Βιο-Εμπνευσμένης Τεχνολογίας & Τμήμα Λοιμωδών Νοσημάτων του Imperial College London, από την Luca Miglietta. et. al.[48]. Η νέα μεθοδολογία που ανακαλύφθηκε έχει το όνομα Data-Driven Multiplexing. Η μεθοδολογία έχει ως βάση τη τεχνητή νοημοσύνη και τα συμβατικά μοριακά όργανα με στόχο την ανάπτυξη κλινικών διαγνωστικών δοκιμών οι οποίοι θα είναι γρήγοροι και οικονομικά αποδοτικοί. Η διπλωματική εργασία προχώρησε στη διερεύνηση της βιοπληροφορικής τροποποίησης της αλληλεπίδρασης μεταξύ εκκινητών και γενετικού υλικού. Με την ενσωμάτωση της επεξεργασίας τεχνητής νοημοσύνης στην ανάλυση των σημάτων που προκύπτουν, οι διαγνωστικές δυνατότητες των συμβατικών οργάνων PCR μπορούν να βελτιωθούν. Αυτή η πρόοδος έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει την ακρίβεια και την αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων, ωφελώντας τελικά τον τομέα της διάγνωσης και διαχείρισης μολυσματικών ασθενειών. Η ανίχνευση γενετικού υλικού από ζωντανούς οργανισμούς περιλαμβάνει μια πολύπλοκη διαδικασία κατά την οποία οργανικά μόρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με χημικά συστατικά. Αυτή η αλληλεπίδραση δημιουργεί ένα σημαντικό σήμα που μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την παρουσία, την ποσότητα ή την ποιότητα των νουκλεϊκών οξέων-στόχων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στον τομέα της ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων, όπου μπορεί να αναγνωριστεί το γενετικό υλικό συγκεκριμένων οργανισμών, όπως το DNA ή το RNA. Οι τεχνικές ενίσχυσης του DNA, όπως αυτές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της μικροβιακής αντοχής ή του COVID-19, διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στη διάγνωση και τη διαχείριση διαφόρων μολυσματικών ασθενειών.

Συμπερασματικά, η διατριβή έδειξε ότι η σύζευξη της τεχνητής νοημοσύνης με τους αγωγούς σχεδιασμού προσδιορισμού είναι ζωτικής σημασίας για την αντιμετώπιση των τρεχουσών διαγνωστικών προκλήσεων. Η ανάπτυξη μιας



βέλτιστης λύσης για τη μεγιστοποίηση της αξίας των κλινικών δοκιμών ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων, η οποία τελικά οδηγεί σε πιο ακριβή θεραπεία ασθενών και ευκολότερη διαχείριση του ελέγχου λοιμώξεων, απαιτεί τη σύγκλιση και τη συνεργασία διαφόρων κλάδων, όπως η βιοπληροφορική, η μοριακή βιολογία και η επιστήμη δεδομένων. Ενσωματώνοντας γνώσεις και μεθοδολογίες από αυτούς τους διαφορετικούς τομείς, βελτιώνεται η αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων, ανοίγοντας το δρόμο για βελτιωμένη φροντίδα των ασθενών και βελτιωμένα μέτρα ελέγχου λοιμώξεων. [48]

Ακόμα μία καινοτομία στη μέθοδο της PCR είναι η Διευκόλυνση Ποσοτικής Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου με Βαφή με Εμφυτευμένο Οξείδιο Γραφενίου με Πολυ(αιθυλενογλυκόλη), η οποία πραγματοποιήθηκε από τους Khushbu Chauhan και την ομάδα του και δημοσιεύθηκε το Μάρτιο του 2023. Η μέθοδος ανάλυσης Η μέθοδος ανάλυσης qPCR χρησιμοποιείται καθημερινά στη μοριακή διάγνωση διότι δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης νουκλεϊκού οξέος σε πραγματικό χρόνο κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης. Με αυτό τον τρόπο δεν απαιτείται η ηλεκτροφόρηση γέλης μετά την ενίσχυση για ανίχνευση αμπλικονίου. Το αρνητικό της μεθόδου είναι η εμφάνιση των περιορισμών λόγω στη μη ειδική ενίσχυση του DNA με αποτέλεσμα να υπάρξει αμφιβολιών όσον αφορά την πιστότητα και την αποτελεσματικότητα της.

Εδώ, αποδεικνύουν ότι το οξείδιο του γραφενίου σε νανομεγέθη που έχει εμβολιαστεί με πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG-nGO) μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα και την ειδικότητα του qPCR με την προσρόφηση μονόκλωνου DNA (ssDNA) χωρίς να επηρεάζει τον φθορισμό της δίκλωνης βαφής σύνδεσης DNA κατά τη διάρκεια του DNA ενίσχυση. Το PEG-nGO προσροφά πλεονάζοντα εκκινητές ssDNA στην αρχική φάση της PCR, έχοντας χαμηλότερες συγκεντρώσεις αμπλικονίων DNA και ελαχιστοποιώντας έτσι τη μη ειδική ανόπτηση του ssDNA και την ψευδή ενίσχυση λόγω διμερισμού εκκινητών και εσφαλμένης εκκίνησης.

Προσθέτοντας τη χρωστική δέσμευση DNA EvaGreen, και του PEG-nGO δημιουργείται το σύστημα PENGO-qPCR το οποίο σε σύγκριση με το συμβατικό qPCR, έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της ευαισθησίας και της ειδικότητας του DNA μέσω προτιμησιακής προσρόφησης του ssDNA χωρίς αναστολή της δραστηριότητας της πολυμεράσης του DNA.

Η ευαισθησία ανίχνευσης του ιικού RNA ήταν 67 φορές πιο υψηλή στο σύστημα PENGO-qPCR από τη συμβατικό qPCR. Τέλο, η βελτίωση της απόδοσης ενός qPCR γίνεται προσθέτοντας το PEG-nGO ως ενισχυτή PCR αλλά και το EvaGreen για χρωστική δέσμευση DNA στο μίγμα qPCR. [49]

Μια μέθοδος βασισμένη στο AS-qPCR για την ανίχνευση SNP που σχετίζονται με τη νόσο του Αλτσχάιμερ αναπτύχθηκε από τους Jing Chen et al. [50] το 2022. Πιο συγκεκριμένα στη μελέτη αναπτύχθηκε μιας μέθοδο ανίχνευσης πολυμορφισμού ενός νουκλεοτιδίου, χαμηλού κόστους και υψηλής ευαισθησίας έχοντας ως βάση την τεχνολογία ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (AS-qPCR). Η συγκεκριμένη τεχνολογία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του πολυμορφισμού ενός νουκλεοτιδίου, όπως η απολιποπρωτεΐνη E και η μετατόπιση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης 40.

Στο πειραματικό μέρος, επιλέχθηκαν 40 ασθενής από το τμήμα κλινικής μνήμης του Νοσοκομείου Dongzhimen και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού ανίχνευσης SNP. Η μέθοδος είχε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο Αρχικά, έγινε η παρασκευή των θετικών πλασμιδίων αλλά με διαφορετικούς γονότυπους (TT/CC/TC) σε απολιποπρωτεΐνη E rs429358, rs7412 και εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης 40 rs11556505. Σε δεύτερο στάδιο έγινε ο σχεδιασμός των εκκινητών 3'-T/3'-C με σκοπό την ενίσχυση των θετικών πλασμιδίων για κάθε θέση SNP. Σε τρίτο στάδιο, υπολογίστηκε για κάθε θετικό πλασμίδιο το log<sub>10</sub> της αναλογίας αριθμού αντιγράφων και το διάστημα ερμηνείας του γονότυπου καθορίστηκε. Η τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η AS-qPCR και η επαλήθευση της ακρίβειας ανίχνευσης έγινε χρησιμοποιώντας την αλληλουχία PCR-Pooling.

Η αξιολόγηση των γονότυπων SNP μέσω της τεχνολογίας AS-qPCR εμφάνισε τέλεια αντιστοίχιση με τα αποτελέσματα μέσω της συμβατική αλληλουχίας DNA. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξης μιας μεθόδου ανίχνευσης γονότυπου για AD με βάση την AS-qPCR. Η μέθοδος αυτή εμφανίσε ακρίβεια, ευκολία, είχε χαμηλό κόστος και συνέβαλε στη πρόωρη διάγνωση ασθενών με Αλτσχάιμερ. [50]

Το 2022 πραγματοποιήθηκε μελέτη με στόχο την ανίχνευση του ιού της ηπατίτιδας C στη χώρα του Πακιστάν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ανάλυσης Nested-PCR. Στο πειραματικό μέρος συλλέχθηκαν 16 δείγματα από ασθενείς που ήταν θετικοί σε αντισώματα ηπατίτιδας C. Τα δείγματα πάρθηκαν από το εργαστήριο

Μοριακής Διαγνωστικής. Τα δείγματα πρώτα επεξεργάστηκαν και υποβλήθηκαν σε εκχύλιση RNA. Η ποιοτική ανάλυση της HCV -RNA μέσω ένθετης PCR έγινε με τη χρήση του cDNA. Το cDNA συντέθηκε με ένζυμο ανάστροφης μεταγραφάσης. Τα αποτελέσματα από 16 δείγματα ασθενών έδειξαν ότι 9 δείγματα ήταν θετικά και 7 δείγματα ήταν αρνητικά για ηπατίτιδα C. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν σύγκριση της τιμής για τεστ HCV-RNA ανά δείγμα από ασθενείς με ηπατίτιδα C σε διάφορα εργαστήρια. Στις εργαστηριακές δοκιμές anti-HCV, HCV ποιοτικές, ποσοτικές και γονοτυπικές δοκιμές, σε σύγκριση με τις άλλες πέντε δοκιμές που βασίζονται στην PCR, το εργαστήριο Shoukat Khanum έκανε αναφορά για μεγαλύτερο κόστος για τις δοκιμές HCV-RNA. Αντιθέτως, η εργαστηριακή δοκιμή HCV-RNA του Dow σε σχέση με το εργαστήριο Shoukat Khanum ήταν χαμηλότερη. Επιπλέον, το εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής είχε τη χαμηλότερη και πιο οικονομική δοκιμή για αντι-HCV. Τέλος οι ερευνητές έφτασαν στο συμπέρασμα ότι οι μοριακές τους δοκιμές για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του HCV-RNA ήταν καλές για διαγνωστικές και κλινικές επιδόσεις και στα πέντε εργαστήρια δημόσιας υγείας. [51]

Μια καλή πηγή μη επεμβατικών βιοδεικτών θεωρούνται τα εξωσωματικά microRNA λόγω των λειτουργιών τους στη γενετική ανταλλαγή μεταξύ των κυττάρων. Παρόλα αυτά η ανακρίβεια τους πάνω στην επιτήρηση του καρκίνου του ήπατος θεωρείται μεγάλη πρόκληση στην ερευνητική κοινότητα. Για αυτό το λόγο αναπτύχθηκε μια στρατηγική διπλής φωτοθερμικής ψηφιακής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε συνδυασμό με μια προσέγγιση σύλληψης εξωσώματος με βάση νανοσωματίδια λιπιδίων. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τη καταγραφή της έκφρασης microRNA σε χρονικό διάστημα 3 ωρών λειτουργίας.

Οι μικροφορείς ζελατίνης με πρόσμικτο δισουλφίδιο του μολυβδαινίου/ νανοςύνθετο μολυβδαίνιο τα οποία παράγονται με μικρορευστότητα εμφανίζουν ελκυστικές ιδιότητες ως ρυθμός αύξησης 2 - 4 βαθμούς Κελσίου s-1 που προκαλείται από σχεδόν υπέρυθρο και αναστρέψιμο μετασχηματισμό sol-gel σε βήμα με την ενεργοποίηση PCR. Η αντίστοιχη ακτινοβολία που συντονίζεται με την ψύξη με ανεμιστήρα εκτελείται αυτόματα μέσω μιας αυτοσχέδιας μονάδας ελέγχου με προγράμματα για να επιτευχθεί θερμοκυκλοποίηση PCR. Με αυτό τον τρόπο λήφθηκε η ικανότητα πολυπλεξίας της επισήμανσης διπλού χρώματος, 10 φορές χαμηλότερα σε εκφράσεις microRNA-22-3p σε σχέση με το microRNA ελέγχου 26a-5p και 19 με 31 φορές υψηλότερα στο εξωσωματικό microRNA-200b-3p και

microRNA-21-5p. Η ποσοτικοποίηση έγινε σε δύο καρκινικά κύτταρα του ήπατος το HepG2 και το Huh7. Τέλος, το συμπέρασμα ήταν ότι η συγκεκριμένη μέθοδος του γονότυπου εξωσωματικού microRNA θα έχει την δυνατότητα να γίνει εφαρμογή της στη διάγνωση του καρκίνου του ήπατος. [52]

Οι Shlomo Tsuriet et. al.[53] πραγματοποίησαν μελέτη πάνω στη ψηφιακή μέθοδος PCR σε όγκους εγκεφάλου με σκοπό την ανίχνευση απώλειας CDKN2A. Η απώλεια του CDKN2A μπορεί να βρεθεί σε πολλούς όγκους και αυτό διότι το CDKN2A είναι ένα βασικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Σε περισσότερο από το 50% των όγκων, στο αστροκυτώματος βαθμού IV, το CDKN2A διαγράφεται και σε πολλές περιπτώσεις, τα γλοιώματα χαμηλού βαθμού με ομόζυγη απώλεια του CDKN2A συμπεριφέρονται σαν όγκοι υψηλού βαθμού. Οι μέθοδοι για την ανίχνευση της απώλειας CDKN2A είναι συχνά δύσκολες, δαπανηρές, αναξιόπιστες ή δεν είναι άμεσα διαθέσιμες στα περισσότερα ινστιτούτα παθολογίας.

Ως αποτέλεσμα, οι συνήθεις διαγνώσεις όγκου εγκεφάλου τυπικά δεν περιλαμβάνουν έλεγχο για διαγραφή CDKN2A. Ωστόσο, οι ερευνητές έχουν αναπτύξει μια τεχνική ψηφιακής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (dPCR) για τον εντοπισμό της απώλειας του CDKN2A. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει τη μέτρηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου CDKN2A και ενός γονιδίου αναφοράς στο ίδιο χρωμόσωμα.

Επιπλέον, η συμβατότητά του με παλαιότερα δείγματα και η ικανότητα εργασίας με χαμηλές ποσότητες DNA το καθιστούν προτιμότερο σε περιπτώσεις όπου άλλες μέθοδοι μπορεί να μην είναι αποτελεσματικές. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτή η δοκιμασία που αναπτύχθηκε πρόσφατα είναι αξιόπιστη όταν χρησιμοποιείται σε ιστούς που περιέχουν περισσότερο από 50% περιεκτικότητα σε όγκο και έχουν τουλάχιστον 0,4 ng DNA. Η κούρτη επικύρωσης έδειξε πλήρη συμφωνία και η ανάλυση ανίχνευσε επιτυχώς ομόζυγη απώλεια σε 16 γλοιώματα με άγνωστη κατάσταση CDKN2A. [53]

Το 2023 δημοσιεύθηκε μία μελέτη με τίτλο: «Μια πολυκεντρική αξιολόγηση και συστάσεις εμπειρογνομόνων για τη χρήση του πρόσφατα αναπτυγμένου πάνελ αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης λοίμωξης άρθρωσης BioFire», από τους Kordo Saeed και την ομάδα του. Για την αξιολόγηση του BJIP, πραγματοποιήθηκε μια αναδρομική ανάλυση σε πολλά κέντρα στο Ηνωμένο Βασίλειο και την Ιρλανδία. Υπολογίσθηκε τη θετική ποσοστιαία συμφωνία (PPA) και την αρνητική ποσοστιαία συμφωνία (NPA) μεταξύ του BJIP και της καλλιέργειας ρουτίνας. Επιπλέον,

διευκολύνθηκε μια διεπιστημονική ομαδική συζήτηση (MDT) για να καθορίσουν τη βέλτιστη ή πιθανή χρήση αυτής της νέας μεθόδου δοκιμών. Συνολικά 399 δείγματα αρθρικού υγρού, η πλειονότητα των οποίων ήταν από εγγενείς αρθρώσεις, υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τη χρήση BJIP εκτός από την καλλιέργεια ρουτίνας.

Σε αυτή τη μελέτη, στόχος ήταν η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του BJIP σε σύγκριση με τη δοκιμή καλλιέργειας και η διερεύνηση για την πιθανή χρήση του στη διαχείριση ασθενών. Τα γρήγορα αποτελέσματα που προέκυψαν από το BJIP βρέθηκαν να έχουν δυναμικό κλινικό αντίκτυπο στη διαχείριση των ασθενών. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το πάνελ δεν περιλαμβάνει όλους τους κλινικά σημαντικούς οργανισμούς που σχετίζονται με λοιμώξεις από προσθετικές αρθρώσεις (PJI), κάτι που μπορεί να περιορίσει τη συνολική του αξία σε τέτοιες περιπτώσεις.

Ένα από τα πλεονεκτήματα του BJIP είναι η ικανότητά του να ανιχνεύει ανθεκτικούς δείκτες και να αναγνωρίζει πρόσθετους οργανισμούς όπως η *Neisseria gonorrhoeae* και η *Kingella kingae*. Αυτές οι πληροφορίες μπορεί να είναι κρίσιμες για τον καθορισμό της κατάλληλης αντιβιοτικής θεραπείας. Το MDT συμφώνησε ότι το BJIP θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί παράλληλα με τις τυπικές μεθόδους τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιατρικούς ασθενείς, με την καθοδήγηση ειδικών με βάση τις τοπικές ανάγκες. [54]

Η μελέτη έδειξε επιτυχώς την αποτελεσματική σύλληψη του ASFV DNA από περιττώματα χοίρου, ορό και δείγματα ιστών χρησιμοποιώντας τις μεθόδους ανίχνευσης qPCR και RPA με τη βοήθεια DNA.

Συνολικά, αυτή η μελέτη παρουσιάζει μια ταχεία και ευέλικτη μέθοδο σύλληψης DNA που είναι ειδική για το ASFV, επιτρέποντας αποτελεσματικό έλεγχο και παρακολούθηση του ιού. Οι ανεπτυγμένες τεχνικές qPCR και RPA έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν σε διαγνωστικά στο σημείο της φροντίδας για ASFV. [55]

Η μελέτη που διεξήχθη από μια ομάδα από την Κορέα και δημοσιεύθηκε το 2023 επικεντρώνεται στην ανάπτυξη μιας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και μεθόδου ενίσχυσης ανασυνδυασμένης πολυμεράσης (RPA) βασισμένη σε μαγνητικά σφαιρίδια σε πραγματικό χρόνο για την ανίχνευση των αφρικανικών χοίρων ιός πυρετού (ASFV).

Το ASFV είναι μια εξαιρετικά θανατηφόρα ασθένεια στους χοίρους που έχει προκαλέσει σημαντικές οικονομικές απώλειες παγκοσμίως λόγω της παγκόσμιας

εξάπλωσής της. Η έγκαιρη ανίχνευση είναι ζωτικής σημασίας για την πρόληψη των εστιών ASF και την εφαρμογή μέτρων ελέγχου. Ενώ είναι διαθέσιμες μέθοδοι ταχείας ενίσχυσης, η εκχύλιση νουκλεϊκού οξέος από τα δείγματα εξακολουθεί να απαιτεί εργαστηριακές διαδικασίες. Για να το αντιμετωπίσουν αυτό, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την ισχυρή συγγένεια δέσμευσης μεταξύ βιοτίνης και στρεπταβιδίνης για να συλλάβουν το DNA του γονότυπου Π του ASFV απευθείας από ακατέργαστα κλινικά δείγματα ενεργοποιώντας μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη με ανιχνευτές σύλληψης βιοτινυλιωμένου ολιγονουκλεοτιδίου. Το DNA που έχει συλληφθεί μπορεί στη συνέχεια να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (qPCR) και RPA.

Ένας άλλος τομέας καινοτομίας περιλαμβάνει τη διερεύνηση μιας μακράς εμβέλειας ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (LR-RT-qPCR) για την ταχεία ανίχνευση ενεργών ιών. Αυτή η έρευνα διεξήχθη από τον Masato Yasuura και την ομάδα του και δημοσιεύτηκε στο BMC Microbiology το 2022. Ενώ οι συμβατικές μέθοδοι αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιούνται συνήθως για τη διάγνωση, ο προσδιορισμός του τίτλου των παθογόνων ιών με βάση την PCR μπορεί να είναι δύσκολος. Σε μια προηγούμενη μελέτη, αναπτύχθηκε μια δοκιμασία LR-RT-qPCR για την ταχεία αξιολόγηση του τίτλου του ιού της γρίπης Α που ακτινοβολείται με υπεριώδη ακτινοβολία (IAV). Σε αυτήν την τρέχουσα έρευνα, η εστίαση ήταν στον προσδιορισμό του εάν η ανάλυση LR-RT-qPCR θα μπορούσε επίσης να αξιολογήσει τον τίτλο του IAV που είχε απενεργοποιηθεί με άλλες μεθόδους. Για να εξεταστεί αυτό, το IAV απενεργοποιήθηκε χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές. Αυτό περιλάμβανε θέρμανση στους 100 °C για ποικίλες χρονικές περιόδους που κυμαίνονται από 1 έως 15 λεπτά, επεξεργασία με 0,12% υποχλωριώδες νάτριο για χρονικές περιόδους που κυμαίνονται από 3 έως 30 λεπτά και επεξεργασία με 70% αιθανόλη για χρονικές περιόδους που κυμαίνονται από 10 έως 30 λεπτά. Η αποτελεσματικότητα αυτών των μεθόδων αδρανοποίησης επιβεβαιώθηκε χρησιμοποιώντας μια δοκιμασία μολυσματικής δόσης καλλιέργειας ιστού πενήντα τοις εκατό (TCID<sub>50</sub>).

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε LR-RT-qPCR για τη διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ μολυσματικότητας και αριθμού αντιγράφων. Επιπλέον, εκτός από την επιτυχή εφαρμογή της στην υπεριώδη ακτινοβολία, η μέθοδος LR-RT-qPCR αποδείχθηκε κατάλληλη για την αξιολόγηση της επίδρασης της απενεργοποίησης θερμότητας στη μολυσματικότητα του IAV. Ωστόσο, υπάρχει πιθανότητα για μικρές

τροποποιήσεις στο μέλλον για τη μείωση του χρόνου που απαιτείται για το TCID<sub>50</sub>. Αν και αυτή η μέθοδος δεν είναι εφαρμόσιμη για την απενεργοποίηση της αιθανόλης, η μέθοδος LR-RT-qPCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταχεία αξιολόγηση των επιδράσεων της χλωρίωσης στο IAV συγκρίνοντας τους αριθμούς αντιγράφων πριν και μετά τη θεραπεία. [56]

Μία βασική τεχνολογική εξέλιξη αφορά την αξιοποίηση των ψηφιακών μέσων. Βασισμένη σε αυτήν οι συγγραφείς του επόμενου άρθρου πραγματοποίησαν μελέτη σχετικά με την ενίσχυση της πολυπλεξίας σε PCR σε πραγματικό χρόνο, η οποία αποτελεί μοριακή διάγνωση επόμενης γενιάς. Συνολικά, η συνεργασία μεταξύ ακαδημαϊκών ερευνητών και επιστημόνων του κλάδου αναμένεται να οδηγήσει στην πρόοδο αυτών των τεχνολογιών. Με περαιτέρω ανάπτυξη, αυτές οι προσεγγίσεις έχουν τη δυνατότητα να βελτιώσουν σημαντικά την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων σε ένα ευρύ φάσμα πεδίων. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική στους τομείς των βιοεπιστημών, της βιομηχανικής και της ιατρικής. Επιτρέπει την ακριβή ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων, καθιστώντας το απαραίτητο εργαλείο στη μοριακή διάγνωση. Μια σημαντική πτυχή της qPCR είναι η ικανότητα ανίχνευσης πολλαπλών στόχων DNA ή RNA ταυτόχρονα, γνωστή ως multiplex PCR (mPCR). Αυτή η προσέγγιση είναι ζωτικής σημασίας για την επίτευξη βέλτιστης απόδοσης, οικονομικής απόδοσης και αποτελεσματικότητας στη διάγνωση μολυσματικών ασθενειών. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την αύξηση των δυνατοτήτων πολυπλεξίας του qPCR. Αυτές περιλαμβάνουν τεχνικές που χρησιμοποιούν ειδικούς για το στόχο φθορίζοντες ανιχνευτές και χωρική πολυπλεξία, όπου τα δείγματα διαχωρίζονται για να επιτρέπεται η παράλληλη ενίσχυση πολλαπλών στόχων. Ωστόσο, αυτές οι λύσεις συχνά περιορίζονται σε μικρό αριθμό στόχων ή απαιτούν ακριβά μέσα. Υπάρχει ανάγκη για καινοτόμες προσεγγίσεις που μπορούν να προωθήσουν το πεδίο της πολυπλεξίας στην qPCR και να επιτρέψουν την ανάλυση υψηλής απόδοσης με πιο προσιτό τρόπο. Μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση είναι η χρήση αλγορίθμων μηχανικής μάθησης, γνωστών και ως λύσεις που βασίζονται σε δεδομένα. Αυτοί οι αλγόριθμοι μπορούν να αναλύσουν τις καμπύλες ενίσχυσης και τήξης (AC και MC) που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της qPCR για να προσδιορίσουν και να ποσοτικοποιήσουν με ακρίβεια πολλαπλούς στόχους νουκλεϊκών οξέων σε μία μόνο αντίδραση. Αυτή η ανασκόπηση στοχεύει να καταδείξει την επιτυχή ενσωμάτωση λύσεων που βασίζονται σε δεδομένα με

προηγμένες πλατφόρμες qPCR, μαζί με διάφορες χημικές βελτιώσεις, για τη βελτίωση των δυνατοτήτων πολυπλεξίας. Επιπλέον, οι εξελίξεις στις θερμοδυναμικές βάσεις δεδομένων έχουν καταστήσει δυνατή την πρόβλεψη AC και MC από δεδομένα ακολουθίας. Αυτό ανοίγει την ευκαιρία να χρησιμοποιηθούν προσομοιώσεις υπολογιστή για τον εξορθολογισμό και τη βελτιστοποίηση του σχεδιασμού των προσδιορισμών mPCR, όπου η ανίχνευση στόχου υποστηρίζεται από τεχνολογίες που βασίζονται σε δεδομένα. Η ανασκόπηση διερευνά επίσης πρόσφατες προσπάθειες για την ανάπτυξη ενός πλαισίου από άκρο σε άκρο που ενσωματώνει λύσεις λογισμικού που βασίζονται στη γνώση και τα δεδομένα για τη βελτίωση του σχεδιασμού της ανάλυσης και την αύξηση της ακρίβειας του εντοπισμού και της ποσοτικοποίησης στόχων σε πολυπλεξικές ρυθμίσεις. [57]

Οι Yizheng Huang et al.[58], πραγματοποίησαν έρευνα σχετικά με την πολύπλοκη PCR σταγονιδίων μονοκυττάρου με μηχανική εκμάθηση για ανίχνευση ιών ανθρωπίνων θηλωμάτων υψηλού κινδύνου. Ο προσυμπτωματικός έλεγχος HPV υψηλού κινδύνου, ο οποίος διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη μείωση της εμφάνισης και του ποσοστού θανάτου από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά μέσω της χρήσης της τεχνολογίας μικρορευστών. Αυτή η τεχνολογία αιχμής προσφέρει μια εξαιρετικά αποτελεσματική προσέγγιση για τον ακριβή εντοπισμό του HPV υψηλού κινδύνου χρησιμοποιώντας πολλαπλά σταγονίδια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ενός κυττάρου (PCR). Δυστυχώς, οι υπάρχουσες μέθοδοι εμποδίζονται από τα μειονεκτήματα της ύπαρξης μικρορευστοποιημένων τσιπ χαμηλής ενσωμάτωσης, πολύπλοκων συστημάτων αντιδραστηρίων, δαπανηρού εξοπλισμού ανίχνευσης και χρονοβόρων διαδικασιών αναγνώρισης σταγονιδίων. Ωστόσο, η ομάδα μας έχει αναπτύξει με επιτυχία μια καινοτόμο και πρωτοποριακή τεχνική multiplex droplet PCR που επιτρέπει την άμεση ανίχνευση αλληλουχιών HPV υψηλού κινδύνου μέσα σε μεμονωμένα κύτταρα.

Ο σχεδιασμός ενός μικρορευστικού τσιπ με τέσσερις δομές εστίασης στη ροή αναπτύχθηκε για να επιτρέψει την αποτελεσματική και ταυτόχρονη προετοιμασία των σταγονιδίων σε ένα μόνο βήμα. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η ταυτόχρονη ανίχνευση των αλληλουχιών πολλαπλών στόχων με βάση ένα μονοχρωματικό σήμα φθορισμού κάνοντας χρήση PCR σταγονιδίων ενός κυττάρου. Έπειτα, έγινε η αυτόματη αναγνώριση σε μεγάλους πληθυσμούς μεμονωμένων σταγονιδίων κυττάρων με την εφαρμογή της μηχανικής εκμάθησης και με ακρίβεια 97%. Τέλος, ανιχνεύθηκαν με ευαισθησία και χωρίς μόλυνση σε μικτά κύτταρα HeLa και CaSki, οι αλληλουχίες του



ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων 45, 18 και 16. Συμπερασματικά η συγκεκριμένη προσέγγιση παρέχει τη δυνατότητα της αξιόπιστης και γρήγορης ανίχνευσης αλληλουχιών πολλαπλών στόχων σε μεμονωμένα κύτταρα. Ταυτόχρονα όσον αφορά τη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου η προσέγγιση καθίσταται ισχυρή για τη διερεύνηση της κυτταρικής ετερογένειας. [58]

Ο Youlan Qu et. al.[59] του διεξήγαγαν έρευνα σε ψηφιακά τσιπ PCR που μπορούν να ανιχνεύσουν καρκινικούς δείκτες σε εξωκυτταρικά κυστίδια του σάλιου. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας αναγνωρίζει τη σημασία της έγκαιρης διάγνωσης και θεραπείας του καρκίνου για τη διάσωση ζωών. Ωστόσο, οι τρέχουσες μέθοδοι για την αξιολόγηση των όγκων βασίζονται κυρίως σε απεικονιστικές εξετάσεις και βιοψίες ιστών, οι οποίες μπορεί να είναι ακριβές, έχουν υψηλά ποσοστά ψευδώς θετικών και επεμβατικές. Σε αυτή τη μελέτη, εισάγεται ένα τσιπ ψηφιακής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (dPCR) για την ανίχνευση βιοδεικτών σε κυστίδια του σάλιου. Αυτό το τσιπ χρησιμοποιεί τεχνολογία μικρορευστοποίησης για την ακριβή αναγνώριση διαφόρων καρκινικών δεικτών και επιδεικνύει εξαιρετική ευαισθησία. Όταν δοκιμάζεται σε κλινικά δείγματα, το τσιπ διακρίνει αποτελεσματικά τις περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα από τους κανονικούς μάρτυρες και ξεπερνά την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR) στην ανίχνευση δειγμάτων εξαιρετικά χαμηλής συγκέντρωσης. Αυτά τα ευρήματα προσφέρουν ελπιδοφόρες προοπτικές για μη επεμβατικό πρώιμο έλεγχο καρκινικών δεικτών με την ανίχνευση δεικτών εξωκυτταρικών κυστιδίων στο σάλιο. [59]

Το 2023 δημοσιεύθηκε μία μελέτη στην οποία παρουσιάστηκε η ανάπτυξη και μελέτη της απόδοσης ενός κιτ αντιδραστηρίων για την ταυτοποίηση των *Vibrio cholerae* και *Vibrio parahaemolyticus* με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδική για πολλαπλούς τύπους σε κλινικές δοκιμές. Η χολέρα ανήκει στην ομάδα των λοιμώξεων και η καταπολέμησή της ρυθμίζεται από τον Διεθνή Κανονισμό Υγείας του ΠΟΥ (2005). Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί αρκετά συστήματα δοκιμών για την ανίχνευση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) των στελεχών *Vibrio cholerae*. Ωστόσο, δεν έχουν καταχωρηθεί συστήματα δοκιμών PCR για την ανίχνευση DNA του *V. parahaemolyticus* σε κλινικό υλικό στη Ρωσία.

Ο στόχος αυτής της μελέτης είναι η διεξαγωγή κλινικών δοκιμών και η αξιολόγηση της απόδοσης του «Κιτ αντιδραστηρίων για την ταυτοποίηση των *V. cholerae* και *V. parahaemolyticus* με PCR ειδική για αλληλόμορφα πολλαπλών

θέσεων» (κιτ αντιδραστηρίων «Vibrio-screen FL») για την κατάσταση εγγραφή του καθορισμένου ιατροτεχνολογικού προϊόντος.

Κατά τη διάρκεια των κλινικών δοκιμών, το κιτ αντιδραστηρίων "Vibrio-screen FL" δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας κλινικά στελέχη μικροοργανισμών από το γένος *Vibrio* και άλλα είδη ως αναλύτες στόχους. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν περιελάμβαναν βακτηριολογική ανάλυση και PCR πολλαπλών τόπων με ανίχνευση υβριδισμού-φθορισμού. Η μελέτη παρουσιάζει τα ευρήματα κλινικών δοκιμών που διεξήχθησαν στο κιτ αντιδραστηρίων "Vibrio-screen FL", το οποίο αναπτύχθηκε για τη βελτίωση των μέσων και των μεθόδων για τον εντοπισμό και τη διάκριση επικίνδυνων παθογόνων λοιμώξεων με βάση δεδομένα ποικιλομορφίας γονιδιώματος. Αυτές οι κλινικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν στο Κεντρικό Κέντρο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του FMBA της Ρωσίας, με άδεια του Υπουργείου Υγείας και του FMBA της Ρωσίας. Οι δοκιμές ακολούθησαν συγκεκριμένο πρόγραμμα κλινικών δοκιμών και έλαβαν τα απαραίτητα πιστοποιητικά. Συνολικά, το κιτ αντιδραστηρίων "Vibrio-screen FL" θεωρείται μια υψηλής ποιότητας, αποτελεσματική και ασφαλής διαγνωστική ιατρική συσκευή για *in vitro* διαγνωστικά. Επιδεικνύει επαρκή διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση συγκεκριμένων θραυσμάτων νουκλεϊκών οξέων *Vibrio* spp., *V. cholerae* και *V. parahaemolyticus*. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κλινικά εργαστηριακά διαγνωστικά για επιδημιολογική ανάλυση και παρακολούθηση ασθενειών που προκαλούνται από αυτές τις παθογόνους δονήσεις. Το κιτ αντιδραστηρίων "Vibrio-screen FL" είναι μια ιατρική συσκευή σχεδιασμένη για επαγγελματική χρήση στην κλινική εργαστηριακή διάγνωση. Έχει βρεθεί ότι έχει αναλυτική ευαισθησία τουλάχιστον 10<sup>6</sup> αντιγράφων του γονιδίου *SecY* για την αναγνώριση του γένους *Vibrio*, τουλάχιστον 10<sup>6</sup> αντιγράφων του γονιδίου *hlyA* για το *V. cholerae* και τουλάχιστον 10<sup>6</sup> αντιγράφων του γονιδίου *vrrC* για το *V. parahaemolyticus*. Κατά τη δοκιμή για αναλυτική εξειδίκευση, δεν παρατηρήθηκαν μη ειδικές αντιδράσεις με δείγματα DNA από άλλα είδη μικροοργανισμών. Το κιτ αντιδραστηρίων "Vibrio-screen FL" έχει πιστοποιηθεί ως ιατρική συσκευή για *in vitro* διαγνωστικά, ειδικά για την ταυτοποίηση στελεχών *V. cholerae* και *V. parahaemolyticus* με χρήση πολλαπλής αλληλόμορφης PCR με ανίχνευση υβριδισμού-φθορισμού. Έχει λάβει πιστοποιητικό εγγραφής και έχει εγκριθεί για διανομή στη Ρωσική Ομοσπονδία. [60]

## 4. Συζήτηση & Συμπεράσματα

Στην τρέχουσα εργασία πραγματοποιήθηκε αναζήτηση σε μελέτες συγγραφέων σχετικά με την μοριακή μέθοδο ανάλυσης PCR ως προς την ιστορική της αναδρομή, τις εφαρμογές της καθώς και τις πρόσφατες καινοτομίες και εξελίξεις βασισμένες στη μέθοδο αυτή. Το επίκεντρο της εργασίας ήταν κυρίως οι εφαρμογές που αφορούν τη διάγνωση νόσων σε ασθενείς ανθρώπους ή ζώα.

Μέσα από τη διαδικασία βιβλιογραφικής ανασκόπησης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, επιλέχθηκαν σε 60 πηγές, από τις οποίες οι 6 αναφέρονται στο θεωρητικό υπόβαθρο, οι 4 αφορούν την ιστορική αναδρομή, 31 έχουν να κάνουν με τις εφαρμογές και 21 με τις καινοτομίες και εξελίξεις της τεχνολογίας αυτής (Εικόνα 1). Ενώ ορίστηκε ως χρονικό περιθώριο αναζήτησης η τελευταία δεκαετία, δηλαδή από το 2013 έως και το 2023, σχεδόν όλες οι πηγές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στην τρέχουσα εργασία δημοσιεύθηκαν το 2022 και το 2023. Γεγονός που μας προβληματίζει και μας βάζει σε σκέψεις πως πριν το 2022 οι έρευνες στο συγκεκριμένο τομέα της *in vitro* διαγνωστικής δεν ήταν ιδιαίτερα ανεπτυγμένες.

Κατά τη διαδικασία διεξαγωγής μιας βιβλιογραφικής ανασκόπησης, η οποία περιγράφεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, έγινε δυνατή η συγκέντρωση συνολικά 60 πηγών. Αυτές οι πηγές χωρίστηκαν σε διαφορετικές κατηγορίες με βάση το περιεχόμενό τους. Συγκεκριμένα, 6 από τις πηγές εστίασαν στο θεωρητικό υπόβαθρο του θέματος, 4 παρείχαν μια ιστορική ανασκόπηση, 31 συζήτησαν εφαρμογές της τεχνολογίας και 21 διερεύνησαν καινοτομίες και εξελίξεις που σχετίζονται με αυτόν τον τομέα.

Όσον αφορά το κεφάλαιο της ιστορικής αναδρομής, παρουσιάστηκε μια πρόκληση λόγω του περιορισμένου αριθμού διαθέσιμων αναφορών. Βρέθηκαν μόνο 4 πηγές που θα μπορούσαν να παρέχουν μια ολοκληρωμένη επισκόπηση της ανάπτυξης της PCR από την έναρξή της μέχρι σήμερα. Επιπλέον, αυτές οι πηγές περιείχαν σε μεγάλο βαθμό παρόμοιες πληροφορίες με μικρές μόνο παραλλαγές και πρόσθετες λεπτομέρειες.

Προχωρώντας στο κεφάλαιο των εφαρμογών, οργανώθηκαν οι διάφορες χρήσεις της μεθόδου PCR με βάση τα κύρια θέματα τους. Αυτό περιελάμβανε εφαρμογές στη διάγνωση του COVID-19, της Λεισμανίας, της ραγοειδίτιδας και της

ασπεργίλλωσης. Βρέθηκαν επίσης μελέτες που συνέκριναν την PCR με άλλες μεθόδους μοριακής ανάλυσης. Επιπλέον, αποφασίσθηκε να ενσωματωθούν έρευνες που αφορούν ζώα και οργανισμούς όπως άλογα, σκύλοι και αδαμαντοφόροι σκώροι, καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο στη ζωή των ανθρώπων είτε ως σύντροφοι, ως ζώα εργασίας είτε ως πιθανά βάρη για την υγεία. Βρέθηκαν 10 μελέτες που διερεύνησαν άλλες εφαρμογές και ασθένειες, αλλά αυτές δεν κατηγοριοποιήθηκαν καθώς δεν αναφέρθηκαν σε πολλές πηγές.

Οι καινοτομίες που έχουν εμφανιστεί τα τελευταία δύο χρόνια στον τομέα της PCR περιλαμβάνουν μια σειρά από διαφορετικές πτυχές. Δύο αξιοσημείωτες εφαρμογές περιλαμβάνουν την ανάπτυξη κιτ αντιδραστηρίων ειδικά σχεδιασμένων για τον εντοπισμό ορισμένων ασθενειών. Μια άλλη συναρπαστική εξέλιξη είναι η χρήση βιοαισθητήρων ηλεκτροχημωφωταύγειας για την ανίχνευση του SARS-CoV-2, που αντιπροσωπεύει μια νέα εφαρμογή της τεχνολογίας. Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει την ψηφιακή PCR με καινοτόμους τρόπους για την ανίχνευση ασθενειών.

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση που προέκυψε από την ανασκόπησή μας ήταν ότι η πλειονότητα των πηγών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία δημοσιεύτηκαν το 2022 και το 2023, παρά την περίοδο αναζήτησής μας που εκτείνεται από το 2013 έως το 2023. Αυτό το εύρημα δημιούργησε ανησυχίες και οδήγησε να γίνει η υπόθεση ότι η έρευνα στον συγκεκριμένο τομέα της *in vitro* διάγνωσης μπορεί να μην είχε αναπτυχθεί εκτενώς πριν από το 2022. Συμπερασματικά, η διαδικασία βιβλιογραφικής ανασκόπησης μας έδωσε πολύτιμες πληροφορίες για τη διαθέσιμη βιβλιογραφία για την PCR. Παρουσιάστηκαν προκλήσεις όσον αφορά τις περιορισμένες ιστορικές αναφορές και τη συγκέντρωση πρόσφατων δημοσιεύσεων. Ωστόσο, έγινε εφικτή η κατηγοριοποίηση των πηγών σε διαφορετικούς τομείς εστίασης και ο εντοπισμός των βασικών εφαρμογών και καινοτομιών στο πεδίο.



**Εικόνα 4 Αναλυτές PCR Roche c8800 από το εργαστήριο του Ε.ΚΕ.Α[61]**

Αναφορές - Πηγές

- [1] Yadav, Pratibha & Lodhi, Sharad & Chauhan, A.K.S. (2023). Genomics: A complete genome sequence.
- [2] Buckner, C.A., Lafrenie, R.M., Dénonnée, J.A., et al., 2016. We are IntechOpen , the world's leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 % . Intech 11, 13.
- [3] Mohammed Dawood, I., Sulafa El-Samarrai, B.K., 2018. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences Saliva and Oral Health. Int. J. Adv. Res. Biol. Sci 5, 130–154.
- [4] Zhang, Y., Wang, Z., Wang, W., et al, 2022. Applications of polymerase chain reaction-based methods for the diagnosis of plague (Review). Exp. Ther. Med. 24, 1–10. <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11438>
- [5] Shechter, Ari. Schwartz, G., 2018. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. Physiol. Behav. 176, 139–148. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3747-0>.
- [6] Wang, J., 2022. Editorial: Methods and Applications in Molecular Phylogenetics. Front. Genet. 13, 1–3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.923409>
- [7] Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, et al, 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of dhort synthetic DNA' s as catalyzed by DNA polymerases. J Mol Biol. \_ 1971;5\_6: 3\_4\_1\_3\_6\_1. [\_P\_u\_b\_M\_e\_d:4\_9\_2\_7\_9\_5\_0\_]\_
- [8] Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková et al, 2020. PCR past, present and future. Biotechniques 69, 317–325. <https://doi.org/10.2144/BTN-2020-0057>
- [9] Chi H, Chiu NC, Chen CC, et al, 2023. To PCR or not? The impact of shifting policy from PCR to rapid antigen tests to diagnose COVID-19 during the omicron epidemic: a nationwide surveillance study. Front Public Health. 2023 Jul 20;11:1148637. doi: 10.3389/fpubh.2023.1148637. PMID: 37546311; PMCID: PMC10399748.
- [10] Sarkar, M.H., 2023. M gene targeted qRT-PCR approach for SARS-CoV-2 virus detection 1–15.
- [11] Ghafari, S.M., Fotouhi- Ardakani, R., Parvizi, P., 2023. Accurate Identification of Leishmania Parasites in Sand flies by Polymorphism Analysis of Cytochrome Oxidase Subunit 2 Gene Using Polymerase Chain Reaction and Quantitative PCR-High Resolution Melting Techniques in Iranian Border with Iraq. J. Arthropod. Borne. Dis. 16, 301–314. <https://doi.org/10.18502/jad.v16i4.12085>
- [12] Gow, I., Smith, N.C., Stark, D., Ellis, J., 2022. Laboratory diagnostics for human Leishmania infections: a polymerase chain reaction-focussed review of detection and identification methods. Parasites and Vectors 15, 1–24. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05524-z>
- [13] Nahidi, Y., Meibodi, N.T., Ghazvini, K., et al, 2022. PCR-Based Diagnosis of Leishmania Species in Chronic Granulomatous Dermatitis in Mashhad, Iran. Iran. J. Parasitol. 17, 573–582. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v17i4.11285>
- [14] Putera, I., La Distia Nora, R., Utami, N., et al, 2022. The impact of aqueous humor polymerase chain reaction and serological test results for establishing infectious uveitis diagnosis: An Indonesian experience. Heliyon 8, e10988. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10988>
- [15] Fekri, S., Barzanouni, E., Samiee, S., Soheilani, M., 2023. Polymerase chain reaction test for diagnosis of infectious uveitis. Int. J. Retin. Vit. 9, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40942-023-00465-w>
- [16] Keri, V.C., Chandrasekar, P.H., 2023. Polymerase chain reaction in the diagnosis of invasive aspergillosis: approaches for appropriate use. Leuk. Lymphoma 0, 1–5. <https://doi.org/10.1080/10428194.2023.2209683>
- [17] Huygens, S., Dunbar, A., Buil, J.B., et al, 2023. Clinical Impact of Polymerase Chain Reaction-based Aspergillus and Azole Resistance Detection in Invasive Aspergillosis: A Prospective Multicenter Study. Clin. Infect. Dis. 77, 38–45. <https://doi.org/10.1093/cid/ciad141>
- [18] Huygens S., Dunbar A., Buijl J et al. P474 The value of PCR-based azole resistance detection in invasive aspergillosis: A prospective multicenter study. Med Mycol [Internet]. 2022 Sep 1;60(Supplement\_1): myac072P474. Available from: <https://doi.org/10.1093/mmy/myac072.P474>
- [19] Zamanpour, M., Mohebalí, M., Khamesipour, A., et al, 2023. Diagnosis of Human Cutaneous Leishmaniasis: A Comparative Study Using CL Detect™ Dipstick, Direct Smear and

- Polymerase Chain Reaction Methods. *Acta Parasitol.* 68, 328–333. <https://doi.org/10.1007/s11686-023-00662-5>
- [20] Wardhani, P., Aryati, Chamidah, N., 2023. Performance comparison between Conventional Polymerase Chain Reaction and AbTes Real-time polymerase chain reaction with the gold standard of microscopy imaging detection method. *Bali Med. J.* 12, 139–143. <https://doi.org/10.15562/bmj.v12i1.4035>
- [21] Khaleel, A.M., Faisal, R.M., Altaii, H.A., 2023. The efficiency of molecular methods compared to traditional methods in identifying bacteria from blood and cerebrospinal fluid samples. *Malays. J. Microbiol.* 19, 115–122. <https://doi.org/10.21161/mjm.220105>
- [22] Jawdat, D.M., Aljarallah, G.S., Albakr, M.A., et al, 2023. Diagnostic Efficacy of RealStar SARS-CoV-2 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) in Comparison to GeneXpert System for the Detection of COVID-19. *Cureus* 2019, 1–8. <https://doi.org/10.7759/cureus.35158>
- [23] Dierks, S., Thiele, K., Bohne, W., et al, 2022. Comparison and Harmonization of Different Semi-Automated and Automated qRT-PCR Assays in the Assessment of SARS-CoV-2. *Viruses* 14. <https://doi.org/10.3390/v14102239>
- [24] Betaubun, A.M., Adiatmaja, C.O., Butarbutar, T. V., et al, 2023. Comparison between the Diagnostic Performances of Rapid Diagnostic Test (RDT) using Advantage Malaria Card Pf/Pv Ag, Microscopy, and Polymerase Chain Reaction (PCR) in Malaria Suspected patients at the Merauke Regional General Hospital. *Res. J. Pharm. Technol.* 16, 514–518. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2023.00087>
- [25] Hammoudeh, Y. O., Suresh, L., Lister, M., et al, 2023. Microbiology culture versus 16S/18S polymerase chain reaction for diagnosing infectious keratitis: A comparative study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 64(8), 2333-2333.
- [26] Rattanamas, K., Taesuji, M., Kulthonggate, U., et al, 2022. Sensitivity of RNA viral nucleic acid-based detection of avian influenza virus, Newcastle disease virus, and African horse sickness virus on flinders technology associates card using conventional reverse-transcription polymerase chain reaction. *Vet. World* 15, 2754–2759. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2754-2759>
- [27] Kuwazaki, S., Jouraku, A., Kitabayashi, S., 2023. Multiplex PCR-based molecular diagnostic method to detect cyantraniliprole-resistant I4790K mutation in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Appl. Entomol. Zool.* 58, 121–126. <https://doi.org/10.1007/s13355-022-00809-2>
- [28] Das, M., Patra, R.C., Senapati, S.K., Sahoo, R., et al, 2023. Sensitivity of Wet Blood Smear Examination, Modified Knott ' s Method and Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of *Dirofilaria immitis* Infestation in Dogs 3–5.
- [29] Hemavathi, A., Sai Nehru, B., Vivek Srinivas, V.M., et al, 2023. Isolation, PCR based Diagnosis and Therapeutic Management of Bovine Dermatophilosis. *J. Anim. Res.* 13, 30954. <https://doi.org/10.30954/2277-940x.01.2023.12>
- [30] Maretis, E., Vavoulidis, E., Papanastasiou, A., Maretis, T., et al, 2023. Evaluating the potential role of human papilloma virus infection in breast carcinogenesis via real-time polymerase chain reaction analyzes of breast fine needle aspiration samples from Greek patients. *Diagn. Cytopathol.* 51, 414–422. <https://doi.org/10.1002/dc.25130>
- [31] Wu, G., Liu, F., Chen, G., et al, 2023. Establishment of a multiplex polymerase chain reaction detection assay for three common harmful microalgae in the East China Sea. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 30, 60500–60513. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26821-9>
- [32] Shimizu, Y., Suzuki, M., Akiyama, O., et al, 2023. Utility of real-time polymerase chain reaction for the assessment of CDKN2A homozygous deletion in adult-type IDH-mutant astrocytoma. *Brain Tumor Pathol.* 40, 93–100. <https://doi.org/10.1007/s10014-023-00450-z>
- [33] Peng, J., Li, F., Xu, X., Hu, S., 2023. Single-Cell Analysis of circRNA Using ddPCR. *Methods Mol. Biol.* [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3323-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3323-6_13)
- [34] Kim, I., Maeng, L.S., Kim, J.S., et al, 2023. Quantitative multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* and clarithromycin resistance. *BMC Microbiol.* 23, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02868-z>
- [35] Hadi, A.O., Alburkat, H., Abdulelah, T., 2023. PCR-based Detection technique for Typhoidal Salmonella in Pune, India 27, 140–146. <https://doi.org/10.25463/kjpp.27.1.2023.1>
- [36] Fatima A., Anwarul H., Qumrul H., Shaheda et al, 2023. PCR-dipstick DNA Chromatography for detection of Carbapenemase Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *World J. Adv. Res. Rev.* 18, 112–118. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2023.18.1.0514>

- [37] Acquier, M., Zabala, A., V., Delmas, et al, 2023. Performance of real-time PCR in suspected haemodialysis catheter-related bloodstream infection: a proof-of-concept study. *Clin. Kidney J.* 16, 494–500. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfac242>
- [38] McMonnies K., Patel T., Ravindran S., Clapham et al, 2023. A Streptococcus PCR testing\_ evaluation of rapid implementation in our Paediatric Emergency Department \_ *Archives of Disease in Childhood*, n.d.
- [39] Dadwal R, Sharma N, Kanaujia R, et al, 2023. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* by polymerase chain reaction-based molecular method among symptomatic women from Northern India. *Indian J Sex Transm Dis [serial online]* [cited 2023 Jul 22];44:40-4. Available from: <https://ijstd.org/text.asp?2023/44/1/40/378137>
- [40] Gandjour, A., 2023. Optimal allocation of scarce PCR tests during the COVID-19 pandemic. *PLoS One* 18, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285083>
- [41] He J, Wan Y, Zhou W. *Journal of Hazard Mater [Internet]*. 2020;124199. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124199>
- [42] Yu J, Zou J, Liu X, Pan Y, Mu Y, Li S, et al. TaqMan-probe-based multiplex real-time RT-qPCR for simultaneous detection of GoAstV, GPV, and GoCV. *Poult Sci.* 2023;102(2).
- [43] Jiang K, Wu J, Kim JE, An S, Nam JM, Peng YK, et al. Plasmonic Cross-Linking Colorimetric PCR for Simple and Sensitive Nucleic Acid Detection. *Nano Lett.* 2023;23(9):3897–903.
- [44] Jiang C, Mu X, Liu S, Liu Z, Liu B, Du B, et al. A Study of the Detection of SARS-CoV-2 by the Use of Electrochemiluminescent Biosensor Based on Asymmetric Polymerase Chain Reaction Amplification Strategy. *IEEE Sens J.* 2023;23(8):8094–100.
- [45] Gandjour A. Optimal allocation of scarce PCR tests during the COVID-19 pandemic. *PLoS One [Internet]*. 2023;18(6 June):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0285083>
- [46] Miglietta L, Xu K, Chhaya P, Kreitmann L, Hill-Cawthorne K, Bolt F, et al. Adaptive Filtering Framework to Remove Nonspecific and Low-Efficiency Reactions in Multiplex Digital PCR Based on Sigmoidal Trends. *Anal Chem.* 2022;94(41):14159–68.
- [47] Wang C, Hou B, Shao G, Wan C. Development of a One-Step Real-Time TaqMan Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Assay for the Detection of the Novel Variant Infectious Bursal Disease Virus (nVarIBDV) Circulating in China. *Viruses.* 2023;15(7):1453.
- [48] Miglietta L., 2022 Department of Electrical and Electronic Engineering Centre for Bio-Inspired Technology Department of Infectious Diseases Centre for Antimicrobial Resistance Optimisation The Art of PCR Assay Development: Data-Driven Multiplexing. 2022;(February).
- [49] Chauhan K, Kim DM, Cho E, Kim DE. Facilitation of Dye-Based Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction with Poly(ethylene glycol)-Engrafted Graphene Oxide. *Nanomaterials.* 2023;13(8).
- [50] Chen J, Shi B, Li Y, Feng Y, Ni J, Shi J, et al. An AS-qPCR-based method for the detection of Alzheimer’s disease-related SNPs. *J Cell Biochem.* 2023;124(1):118–26.
- [51] Javeed R, Tariq N, Daud S, Yousafzai A, Manzoor S, Ahmad A. Nested-PCR based Detection of Hepatitis C Virus: Low-cost Strategy in Pakistan. *Proc Pakistan Acad Sci Part B.* 2022;59(3):81–7.
- [52] Parvin R, Zhang L, Zu Y, Ye F. Photothermal Responsive Digital Polymerase Chain Reaction Resolving Exosomal microRNAs Expression in Liver Cancer. *Small.* 2023;2023027672:1–12.
- [53] Tsurriel S, Hannes V, Hasona A, Raz M, Hershkovitz D. Digital PCR-Based Method for Detecting CDKN2A Loss in Brain Tumours. *Mol Diagnosis Ther [Internet]*. 2022;26(6):689–98. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40291-022-00610-5>
- [54] Saeed K, Ahmad-Saeed N, Annett R, et al. A multicentre evaluation and expert recommendations of use of the newly developed BioFire Joint Infection polymerase chain reaction panel. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]*. 2023;42(2):169–76. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10096-022-04538-w>
- [55] Dhandapani G, Nguyen VG, Kim MC, Noh JY, Jang SS, Yoon SW, et al. Magnetic-bead-based DNA-capture-assisted real-time polymerase chain reaction and recombinase polymerase amplification for the detection of African swine fever virus. *Arch Virol [Internet]*. 2023;168(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05681-7>
- [56] Yasuura M, Nakaya Y, Ashiba H, Fukuda T. Investigation on the applicability of a long-range reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction assay for the rapid detection of



**Μοριακή Μέθοδος Ανάλυσης (PCR) – Ιστορική Αναδρομή – Εφαρμογές – Καινοτομίες -  
Εξελίξεις**

- active viruses. *BMC Microbiol* [Internet]. 2022;22(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02723-7>
- [57] Kreitmann L, Miglietta L, Xu K, Malpartida-Cardenas K, D'Souza G, Kaforou M, et al. Next-generation molecular diagnostics: Leveraging digital technologies to enhance multiplexing in real-time PCR. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2023;160.
- [58] Huang Y, Sun L, Liu W, Yang L, Song Z, Ning X, et al. Multiplex single-cell droplet PCR with machine learning for detection of high-risk human papillomaviruses. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2023;1252(February):341050. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341050>
- [59] Qu Y, Bai Y, Wu Z, Yang D, Liu H, Mao H. Non-invasive detection of tumor markers in salivary extracellular vesicles based on digital PCR chips. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2023;548(July):117488. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117488>
- [60] Chemisova O.S., Poleeva M.V., Vodopyanov S.O., Vodopyanov A.S., Trukhachev A.L., Pisanov R.V., Kruglikov V.D., Noskov A.K. Development and study of the performance of a reagent kit for the identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus allele-specific polymerase chain reaction in clinical trials // *Epidemiology and Infectious Diseases.* - 2022. - Vol. 27. - N. 3. - P. 175-183. doi: 10.17816/EID111975
- [61] <https://rdkm.roche.com/explore/products/212573/overview>