



ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Διπλωματική Εργασία

Η μέθοδος της ψηφιακής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης
(digital PCR) και οι εφαρμογές της στη σύγχρονη μοριακή
διαγνωστική και έρευνα

Digital PCR and its applications in modern molecular diagnostics
and research

Κωνσταντίνος Αλμπάνης

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Κωνσταντίνα Τσουμάνη

Πάτρα, Φεβρουάριος 2025

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.



Η μέθοδος της ψηφιακής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης
(digital PCR) και οι εφαρμογές της στη σύγχρονη μοριακή
διαγνωστική και έρευνα

Digital PCR and its applications in modern molecular diagnostics
and research

Κωνσταντίνος Αλμπάνης

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Κωνσταντίνα Τσουμάνη

Μέλος ΣΕΠ, ΣΘΕΤ, Ελληνικό Ανοικτό
Πανεπιστήμιο (ΕΑΠ)

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος

Καθηγητής Βιοχημείας

Πανεπιστήμιο Πατρών

Πάτρα, Φεβρουάριος 2025

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια κα Τσουμάνη Κωνσταντίνα για την καθοδήγηση και τις χρήσιμες συμβουλές που μου παρείχε, καθώς και για την υπομονή και την κατανόησή της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη σύζυγό μου Αναστασία, τους γονείς, τα αδέρφια μου και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράστασή τους.

«Μάθαινε και τ' απλούστερα
Γι' αυτούς που ο καιρός τους ήρθε, ποτέ δεν είναι αργά.
Μάθαινε το άλφα-βήτα, δεν σου φτάνει, μα εσύ να το μαθαίνεις!
Μη σου κακοφανεί! Ξεκίνα ! Πρέπει όλα να τα ξέρεις!
Εσύ να πάρεις πρέπει την εξουσία.
Μάθαινε, άνθρωπε στο άσυλο!
Μάθαινε, άνθρωπε στη φυλακή!
Μάθαινε, γυναίκα στην κουζίνα!
Μάθαινε, εξηντάχρονε!
Ψάξε για σχολείο άστεγε!
Προμηθεύσου γνώση, παγωμένε!
Πεινασμένε, άρπαξε το βιβλίο: είναι ένα όπλο.»
Από το Εγκώμιο στη Μάθηση του Μπ. Μπρεχτ

Για τον Νίκο

Περίληψη

Η dPCR αποτελεί μια μέθοδο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης DNA υψηλής πιστότητας και ευαισθησίας, η οποία βασίζεται στην κλασματοποίηση του μείγματος PCR σε χιλιάδες μικροδιαμερίσματα. Η ενίσχυση PCR λαμβάνει χώρα σε κάθε μεμονωμένο μικροδιαμέρισμα, το οποίο δρα ως μεμονωμένος μικροαντιδραστήρας. Η κλασματοποίηση μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας έναν αριθμό διαφορετικών τεχνολογιών. Η κατανομή των αλληλουχιών στόχων στα μεμονωμένα μικροδιαμερίσματα ανιχνεύεται με φθορισμό μετά το πέρας της αντίδρασης. Η ποσοτικοποίηση των γονιδίων – στόχων εκτιμάται με στατιστική ανάλυση βάση της κατανομής Poisson, υπολογίζοντας τον λόγο των θετικών μικροδιαμερισμάτων ως προς τον συνολικό αριθμό των μικροδιαμερισμάτων. Την τελευταία δεκαετία έχουν εμφανιστεί αυτοματοποιημένα συστήματα και διάφορες τεχνολογίες και οι μέθοδοι για την ψηφιοποίηση της dPCR διευρύνονται. Οι διαθέσιμες σήμερα ψηφιακές πλατφόρμες διαφέρουν ως προς τον αριθμό μικροδιαμερισμάτων, τη μέθοδο δημιουργίας τους ή τον απαιτούμενο εξειδικευμένο εξοπλισμό. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται οι βασικές αρχές και ο πειραματικός σχεδιασμός της dPCR σε συνδυασμό με τις παραμέτρους που σχετίζονται με την ποσοτικοποίηση, καθώς και με τα τεχνικά κριτήρια που διασφαλίζουν ότι η μέθοδος λειτουργεί σωστά. Επιπλέον παρουσιάζονται οι πολυάριθμες εφαρμογές που βρίσκει η dPCR στη σύγχρονη διαγνωστική και έρευνα. Διερευνώνται τα πλεονεκτήματα της μεθόδου καθώς και οι περιορισμοί στους οποίους υπόκειται η εφαρμογή της, ενώ παράλληλα συγκρίνεται με την qPCR, την κύρια μέχρι στιγμής τεχνολογία ποσοτικοποίησης αλληλουχιών στόχων. Τέλος, εξετάζονται οι μελλοντικές προοπτικές της dPCR τόσο σε επίπεδο βελτιστοποίησης της απόδοσης της μεθόδου όσο και σε επίπεδο διεύρυνσης των εφαρμογών της.

Λέξεις – Κλειδιά

dPCR, μικρορευστονική, κλασματοποίηση, μικροδιαμερίσματα, διαγνωστική, απόλυτη ποσοτικοποίηση, ανίχνευση μεταλλάξεων, αριθμός πολλαπλών αντιγράφων, γονιδιακή έκφραση, ανίχνευση ιικού φορτίου

Abstract

Digital PCR is a highly precise and sensitive method for DNA detection and quantification based on the compartmentalization of the PCR mixture into thousands of partitions. PCR amplification takes place in each individual partition, which acts as a single microreactor. Compartmentalization can be achieved using several different technologies. The distribution of the target sequences in the individual partitions is detected by fluorescence after the reaction. The quantification of the target sequences is estimated by statistical analysis based on the Poisson distribution, calculating the ratio of positive partitions to the total number of partitions. In the last decade, automated systems and various technologies have emerged and the methods for dPCR digitization have expanded. The currently available digital platforms differ in terms of the partitions number, the method of their generation or the specialized equipment required. In this thesis, the basic principles and experimental design of dPCR are presented along with the parameters associated with the quantification, as well as the technical criteria required to ensure that the method works properly. In addition, the numerous applications of dPCR in modern diagnostics and research are presented. The advantages of the method are explored as well as the limitations to which its application is subjected. Moreover dPCR is compared with qPCR, the main quantification technology for a target sequence to date. Finally, future prospects of dPCR are discussed, both in terms of optimising the performance of the method and broadening its applications.

Keywords

dPCR, microfluidics, compartmentalization, partitions, diagnostics, absolute quantification, mutation detection, copy number variation (CNV), gene expression, viral load detection

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	v
Abstract	vi
Περιεχόμενα	vii
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	ix
Κατάλογος Πινάκων	x
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xi
1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Από την ανακάλυψη του DNA έως το σήμερα.....	1
1.2. Βασικές αρχές της PCR και των παραλλαγών της.....	2
1.2.1. Συμβατική PCR.....	2
1.2.2. PCR Αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription - PCR, RT-PCR).....	3
1.2.3. Πολυπλεχτική PCR (multiplex PCR).....	4
1.2.4. Εσωτερική PCR (Nested PCR)	5
1.2.5. PCR πραγματικού χρόνου (Real-timePCR).....	5
2. Ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (digital PCR)	7
2.1. Πειραματικός σχεδιασμός της Digital PCR	11
2.1.1. Χρωστικές και ανιχνευτές.....	11
<i>SYBR GREEN</i>	12
<i>Ιχνηθέτες TaqMan</i>	13
2.1.2. Master Mix	14
2.1.3. Συγκεντρώσεις εκκινητών και ανιχνευτών	15
2.1.4. Πρόγραμμα κύκλων θερμοκρασίας.....	16
2.1.5. Θερμοκρασία υβριδισμού	16
2.1.6. Πλαστικά σκεύη	16
2.1.7. Δείγματα ελέγχου	17
2.1.8. Παράλληλη ενίσχυση αλληλουχιών.....	17
2.2. Παράμετροι ποσοτικοποίησης για τη μεταφορά πρωτοκόλλων qPCR σε dPCR	18
2.2.1. Ειδικότητα	19
2.2.2. Ορθότητα.....	19
2.2.3. Εγκυρότητα (Robustness)	19
2.2.4. Όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικοποίησης (LOQ).....	20
2.2.5. Δυναμικό εύρος ανίχνευσης.....	21
2.3. Πρόσθετες απαιτήσεις απόδοσης	22
2.3.1. Προϊόν ενίσχυσης μοναδικού στόχου	22
2.3.2. Εύρος της «βροχής»	23
2.3.3. Διαχωριστική ικανότητα (Resolution)	24
2.3.4. Συγκέντρωση στόχου	25
2.3.5. Ποσότητα κλασματοποιημένου δείγματος.....	26
2.4. Προσεγγίσεις για πολυπλεξία στην dPCR	26
2.5. Εξέλιξη τεχνολογίας κατανομής δείγματος στην dPCR	27
2.5.1. Συσκευές που χρησιμοποιούν μικροδιαμερίσματα	29
<i>Πλατφόρμες ενεργού διαχωρισμού</i>	29
<i>Πλατφόρμες παθητικού διαχωρισμού</i>	31
<i>Πλατφόρμες αυτοψηφιοποίησης</i>	33
2.5.2. Πλατφόρμες που βασίζονται σε σταγονίδια.....	36
3. Εφαρμογές dPCR στη διαγνωστική	39

3.1. Εφαρμογές στην παρασιτολογία	39
3.1.1. Πρωτόζωα	40
3.1.2. Έλμινθες.....	42
3.1.3. Αρθρόποδα	43
3.2. Εφαρμογές στην κλινική Μικροβιολογία	43
3.3. Εφαρμογές στη Γυναικολογία.....	47
3.3.1. Μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος	47
3.3.2. Ανίχνευση χρωμοσωμικής ανευπλοειδίας	48
3.3.3. Ανίχνευση αυτοσωμικών υπολειπόμενων διαταραχών	49
3.3.4. Ανίχνευση γυναικολογικών όγκων	49
3.4. Διάγνωση και διαχείριση λοιμώξεων στην Εντατικολογία.....	53
3.4.1. Ταυτοποίηση βακτηρίων και μυκήτων στο αίμα ή σε άλλα κλινικά δείγματα.....	54
3.4.2. Ποσοτικοποίηση του μικροβιακού φορτίου για την αξιολόγηση της σοβαρότητας, της πρόγνωσης και της θεραπείας.....	56
3.4.3. Στόχευση της απόκρισης του ασθενούς.....	57
3.5. Εφαρμογές της dPCR στην εποχή του SARS-CoV-2/COVID 19	58
3.5.1. Επιλογή κατάλληλων εκκινήτων και ανιχνευτών για τον έλεγχο του SARS-CoV-2.....	59
3.5.2. Ανάπτυξη πρότυπων δειγμάτων αναφοράς για τον έλεγχο του SARS-CoV-2.....	61
3.5.3. Περιβαλλοντική επιτήρηση του SARS-CoV-2	61
3.5.4. Ανίχνευση μεταλλάξεων του SARS-CoV-2	62
3.5.5. Ποσοτικός προσδιορισμός ιικού φορτίου του SARS-CoV-2	63
3.5.6. Ανάπτυξη διαγνωστικών κιτ του SARS-CoV-2	64
3.5.7. Συνεισφορά στην αντιική έρευνα έναντι του SARS-CoV-2.....	64
4. Εφαρμογές dPCR στην Έρευνα	65
4.1. Βαθμονόμηση για αλληλούχηση υψηλής απόδοσης.....	65
4.2. Ανάπτυξη κυτταρικών σειρών	67
4.3. Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (genetically modified organisms, GMO)	70
4.4. Έλεγχος των υδάτων	73
4.4.1. Παρακολούθηση λυμάτων	75
4.4.2. Παρακολούθηση επιφανειακών υδάτων	75
4.4.3. Παρακολούθηση πόσιμου νερού.....	76
5. Συμπεράσματα	77
5.1. Συγκριτική παράθεση των μεθοδολογιών των dPCR και qPCR.....	77
5.2. Μειονεκτήματα της dPCR	80
5.3. Μελλοντικές προοπτικές της dPCR	81

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1. Αρχές της PCR.....	3
Εικόνα 2: Καμπύλη ενίσχυσης της PCR πραγματικού χρόνου σε γραμμική κλίμακα.	6
Εικόνα 3: Απόλυτη ποσοτικοποίηση μέσω qPCR πραγματικού χρόνου.	7
Εικόνα 4: Βασικές αρχές και ροή εργασιών της dPCR.....	8
Εικόνα 5: Παραδείγματα αποτελεσμάτων dPCR.....	8
Εικόνα 6: Μαθηματικός υπολογισμός του νόμου Poisson σε ένα πείραμα dPCR.	10
Εικόνα 7: Ανίχνευση σπανίων μεταλλαγμένων αλληλομόρφων σε υπόβαθρο DNA άγριου τύπου με ψηφιακή PCR.....	11
Εικόνα 8: Μηχανισμός δράσης της φθορίζουσας χρωστικής SYBRGreen 1.	12
Εικόνα 9: Τρόπος δράσης του ιχνηθέτη TaqMan.	13
Εικόνα 10: Διαβάθμιση θερμοκρασίας υβριδισμού στην ddPCR για την ενίσχυση του ειδικού για το βαμβάκι acp1.....	17
Εικόνα 11: Απεικόνιση πολλαπλών πληθυσμών φθορισμού.....	23
Εικόνα 12: Απεικόνιση διασποράς αποτελεσμάτων ddPCRενδιάμεσου φθορισμού («βροχής»).....	24
Εικόνα 13: Απεικόνιση της έννοιας της διαχωριστικής ικανότητας.....	25
Εικόνα 14: Πολυπλεχτικές δοκιμασίες ddPCR.....	27
Εικόνα 15: Πλατφόρμες ενεργού διαχωρισμού.	30
Εικόνα 16: Πλατφόρμες παθητικού διαχωρισμού.	33
Εικόνα 17: Πλατφόρμες αυτοψηφιοποίησης.	35
Εικόνα 18: Πλατφόρμες βασισμένες σε σταγονίδια.	39
Εικόνα 19: Χρονολόγιο εξέλιξης της μοριακής τεχνολογίας που εφαρμόζεται στην παρασιτολογία.....	40
Εικόνα 20: Ροή εργασιών dPCR και αρχές ddPCR και cdPCR.....	60

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Σχεδιασμός multiplex PCR.....	5
--	---

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

BSI	Bloodstream infections
cdPCR	chamber digital PCR
CRM	Certified Reference Material
CNV	Copy Number Variation
CVS	chorionic villus sampling
cffDNA	Cell-free fetal DNA
ddPCR	droplet digital PCR
dPCR	digital PCR
dsDNA	double stranded DNA
GMO	genetically modified organisms
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
MDR	Multidrug-resistance
MPR	Minimum Performance Requirements
NAATs	nucleic acid amplification tests
NIPT	non-invasive prenatal testing
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDMS	πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο
qPCR	quantitative PCR
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT-PCR	Reverse Transcription - PCR
sCAP	Severe community acquired pneumonia
SCD	Sickle cell disease
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TNBC	Triple negative breast cancer
VAP	Ventilator-associated pneumonia

1. Εισαγωγή

1.1. Από την ανακάλυψη του DNA έως το σήμερα

Σήμερα, το DNA θεωρείται πολύ περισσότερο από ένα απλό μόριο. Έχει γίνει το σύμβολο των σύγχρονων βιοεπιστημών. Η κατανόηση της δομής του και του τρόπου λειτουργίας του έχει αλλάξει ριζικά τον κόσμο μας. Το μεγαλύτερο μέρος της σύγχρονης βιολογίας βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε τεχνικές μοριακής γενετικής, είτε άμεσα, όταν πρόκειται για την αποσαφήνιση των λειτουργιών των κυτταρικών συστατικών, είτε έμμεσα, όταν για παράδειγμα απαιτείται η κατασκευή ενός μοριακού φυλογενετικού δέντρου, το οποίο χρησιμοποιείται για την εμφάνιση της εξελικτικής πορείας της ίδιας της ζωής. Επίσης άλλοι κλάδοι, όπως η εγκληματολογία, η ψυχολογία και κυρίως η ιατρική επωφελούνται όλο και περισσότερο από τις γνώσεις μας για το DNA. Ο πρώτος σημαντικός σταθμός σε αυτή τη μακροχρόνια πορεία της εξέλιξης της γενετικής ήταν το 1869 όταν το DNA απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Johann Friedrich Miescher (Dahm, 2005). Επόμενο σταθμό αποτελεί το 1953 όταν ο Watson και ο Crick περιέγραψαν τη δομή της διπλής έλικας του DNA (Dahm, 2005). Το 1975 η τεχνολογία του στυπώματος κατά Southern (Southern blotting) χρησιμοποιήθηκε για γενετικές αναλύσεις και η προσαρμογή του, οι πολυμορφισμοί μήκους τμημάτων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), αναπτύχθηκε το 1980 από τον Ray White (Tilstone, 2006). Μια όμως από τις πιο σημαντικές τεχνικές που έφερε επανάσταση στο χώρο της μοριακής βιολογίας, ήταν η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), η οποία παρουσιάστηκε από τον Mullis το 1983. Η ανακάλυψή της οδήγησε τον Mullis στην απονομή του βραβείου Νόμπελ Χημείας το 1993. Η πρώτη της εφαρμογή στον τομέα της ιατρικής έγινε για την ανίχνευση της μετάλλαξης που ήταν υπεύθυνη για την δρεπανοκυτταρική αναιμία, και φάνηκε πως η PCR αποτελούσε μια γρήγορη τεχνική η οποία ήταν δυο φορές πιο ευαίσθητη από το Southern blotting (Mullis, 1990). Από το 1993 και έπειτα, μετά την ανάπτυξη μιας μεθόδου για την παρακολούθηση της κινητικής της PCR σε πραγματικό χρόνο, οι τεχνικές PCR έγιναν πλήρως ποσοτικές (Higuchi et al., 1993). Η ενσωμάτωση της αντίστροφης μεταγραφής (RT) ως το πρώτο βήμα πριν από την εναλλαγή των κύκλων θερμοκρασιών, επέτρεψε τη χρήση των τεχνολογιών PCR (RT-PCR ή qRT-PCR) σε μελέτες RNA (Becker-André & Hahlbrock, 1989, Chelly et al.,

1988). Αυτές οι τροποποιήσεις της βασικής τεχνικής PCR έγιναν γρήγορα ο χρυσός κανόνας για την ποσοτική ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων (Bustin et al., 2009). Μέχρι και σήμερα υπάρχουν τρεις βασικές μεθοδολογίες: η PCR τελικού σημείου (end-point PCR), η ποσοτική PCR (qPCR) και η ψηφιακή PCR (digital PCR) (Quan et al., 2018). Ωστόσο, υπάρχουν πολλές άλλες παραλλαγές βασικών τεχνικών PCR.

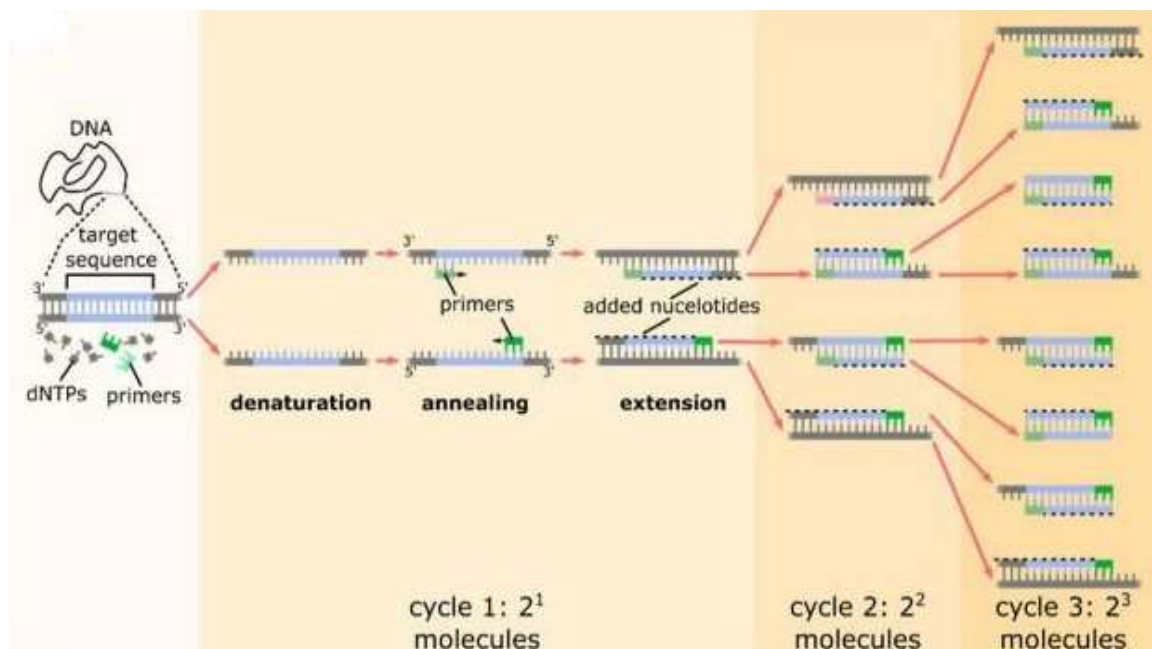
Η εξέλιξη που προέκυψε έπειτα από την ανακάλυψη της συμβατικής PCR βασίστηκε σε δυο παράγοντες. Ο πρώτος ήταν η ανακάλυψη του ενζύμου Taq πολυμεράση και ο δεύτερος η δημιουργία του θερμικού κυκλοποιητή. Αυτοί οι παράγοντες αποτέλεσαν την αφετηρία να αναπτυχθούν μια σειρά παραλλαγών της συμβατικής PCR όπως η PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), η Circularized RT-PCR (cRT-PCR), η ανάστροφη PCR (inverse PCR), η εσωτερική PCR (nested PCR), η in situ PCR, η πολυπλεχτική PCR (multiplex PCR), η multiplex-ready PCR, η ασύμμετρη PCR (asymmetric PCR), η Ligation-anchored PCR, η PCR μεγάλου μήκους (long fragment PCR), η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR, qPCR), η Immune PCR (IPCR), και η ψηφιακή PCR (dPCR) (De La Soldedad Lagunes-Castro et al., 2022).

1.2. Βασικές αρχές της PCR και των παραλλαγών της

1.2.1. Συμβατική PCR

Η PCR είναι μια *in vitro* τεχνική που ενισχύει το DNA, δημιουργώντας αρκετά εκατομμύρια αντίγραφα ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA από μια μικρή ποσότητα μορίων DNA (Arya et al., 2005). Η ειδικότητά της βασίζεται στον υβριδισμό αλληλουχιών και η ευαισθησία της εξαρτάται από την ενίσχυση που βασίζεται σε ένζυμα. Η PCR τυπικά πραγματοποιείται μετά από θερμοκρασιακές εναλλαγές (κύκλοι PCR) που επαναλαμβάνονται 20 έως 40 φορές. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει την αποδιάταξη των διπλών ελίκων του DNA, τον υβριδισμό δυο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών εκατέρωθεν της αλληλουχίας στόχου και την επιμήκυνση αυτών των εκκινητών από μια DNA πολυμεράση (**Εικόνα 1**). Κάθε κύκλος οδηγεί σε διπλασιασμό του αριθμού των μορίων DNA – στόχων (εκθετική ενίσχυση) και 2^n αντίγραφα μπορούν, θεωρητικά, να παραχθούν μετά από n κύκλους. Στην πράξη, η διαδικασία ενίσχυσης φτάνει σε ένα σημείο που υφίσταται κορεσμό, καθώς τα αντιδραστήριά της εξαντλούνται και συσσωρεύονται παραπροϊόντα, αποτρέποντας οποιαδήποτε περαιτέρω ενίσχυση. Τα προϊόντα ενίσχυσης

της συμβατικής PCR αναλύονται μέσω ηλεκτροφόρησης (μέτρηση τελικού σημείου) (Quan et al., 2018).



Εικόνα 1. Αρχές της PCR.

Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει τρία στάδια: 1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA με θέρμανση. 2. Υβριδισμός των εκκινητών στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA στόχου τους. 3. Επιμήκυνση εκκινητών με θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση. Μια τυπική αντίδραση PCR ολοκληρώνεται μετά από 20 – 40 κύκλους. Κάθε κύκλος μπορεί θεωρητικά να οδηγήσει σε διπλασιασμό του αριθμού των μορίων της αλληλουχίας στόχου (Quan et al., 2018).

1.2.2. PCR Αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription - PCR, RT-PCR)

Η RT-PCR συνδέει μια αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, για την δημιουργία cDNA από mRNA, με ενίσχυση που βασίζεται σε PCR. Μια αλληλουχία RNA δρα ως εκμαγείο για το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Το προκύπτον δίκλωνο DNA χρησιμεύει στη συνέχεια σαν εκμαγείο για την PCR. Οι εκκινητές έναντι γνωστών κωδικοποιητικών περιοχών του mRNA θα βελτιστοποιήσουν την αντίδραση για ένα συγκεκριμένο αντίγραφο ενδιαφέροντος. Σε διαφορετική περίπτωση poly-dT ολιγονουκλεοτίδια θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές για τα περισσότερα mRNA, καθώς υβριδίζονται στην poly-A ουρά. Η RT-PCR μπορεί να πραγματοποιηθεί ως δυο ξεχωριστές αντιδράσεις ή μια μεμονωμένη που απαιτεί ένα πιο ειδικό ένζυμο. Η RT-PCR διαθέτει μεγάλη ευαισθησία, με συνέπεια να απαιτεί σχετικά μικρή ποσότητα δείγματος. Χρησιμοποιείται συνήθως για τον έλεγχο γενετικών ασθενειών και για τον χαρακτηρισμό της γονιδιακής έκφρασης σε διάφορους τύπους ιστών, κυτταρικούς τύπους, καθώς και κατά τη διάρκεια

της αναπτυξιακής περιόδου. Επιπλέον είναι σύνηθες να χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση cDNA για περαιτέρω χρήση με άλλες τεχνικές μοριακής βιολογίας (Bachman, 2013).

1.2.3. Πολυπλεχτική PCR (multiplex PCR)

Από τότε που αποδείχθηκε ότι η PCR μπορούσε να ενισχύσει ταυτόχρονα πολλούς τύπους στο γονίδιο της ανθρώπινης δυστροφίνης (Chamberlain et al., 1988), η multiplex PCR έχει καθιερωθεί ως μια βασική τεχνική (Edwards & Gibbs, 1994). Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά σε διάφορα πεδία αναλύσεων του γενετικού υλικού, συμπεριλαμβανομένων των αναλύσεων διαγραφής γονιδίων (Henegariu et al., 1994), αναλύσεων μεταλλάξεων (Shuber et al., 1993) και πολυμορφισμών (Mutirangura et al., 1993), αναλύσεων ποσοτικοποίησης (Mansfield et al., 1993) και PCR αντίστροφης μεταγραφής (Crisan, 1994). Η multiplex PCR μπορεί να ενισχύσει από δυο μέχρι δεκατρείς ή και περισσότερες περιοχές του DNA. Μπορεί να είναι το τελικό σημείο της ανάλυσης ή το προκαταρκτικό για περαιτέρω αναλύσεις, όπως η αλληλούχηση ή ο υβριδισμός. Ωστόσο τα βήματα για την ανάπτυξη μιας multiplex PCR και τα οφέλη της ταυτόχρονης ενίσχυσης πολλαπλών τμημάτων είναι παρόμοια σε κάθε σύστημα. Ο σχεδιασμός ορισμένων συστημάτων multiplex PCR μπορεί να είναι τόσο απλός όσο ο συνδυασμός δυο σετ εκκινητών, για τους οποίους οι συνθήκες αντίδρασης έχουν καθοριστεί χωριστά. Ωστόσο άλλα συστήματα multiplex PCR πρέπει να αναπτυχθούν με προσεκτική εξέταση των περιοχών που πρόκειται να ενισχυθούν, των σχετικών μεγεθών των θραυσμάτων, της δυναμικής των εκκινητών και της βελτιστοποίησης της τεχνικής PCR για την προσαρμογή πολλαπλών θραυσμάτων. Τα βήματα του σχεδιασμού μιας multiplex PCR αναφέρονται στον **Πίνακα 1** (Edwards & Gibbs, 1994).

- | |
|---|
| 1. Επιλογή τύπων. Καθορισμός συστήματος PCR. Διανομή αμπλικονίων (εντοπισμένα σε σημεία μετάλλαξης, συνδεδεμένα με γονίδια, μη συνδεδεμένα χρωμοσωμικά, ομαδοποιημένα κοντινά εξόνια σε ένα ενιαίο αμπλικόνιο, κ.λ.π.). Σχεδιασμός εσωτερικού (-ων) τμήματος (-ων) ελέγχου (άλλα εξόνια, εξωτερικές αλληλουχίες, αλληλουχία ξενιστή, αλληλουχία που συντηρείται σε όλα τα πρότυπα-στόχους, κ.λ.π.) |
| 2. Σχεδιασμός εκκινητών για υβριδοποίηση σε περιοχές λεπτομερούς αλληλουχίας, σε σχέση με τα μεγέθη των αμπλικονίων |

3. Σχεδιασμός εκκινητών με παρόμοια κινητική αντίδρασης
4. Ανάπτυξη συνθηκών αντίδρασης PCR ξεχωριστά για κάθε ζεύγος εκκινητών
5. Διαδοχική προσθήκη του κάθε σετ εκκινητών , αλλάζοντας τις συνθήκες ανάλογα με τις ανάγκες. Ελάττωση της μη ειδικής ενίσχυσης (hot start, ιοντικά απορρυπαντικά, σύντομοι χρόνοι επιμήκυνσης, θερμότερο υβριδισμό, επανεπιλογή αλληλουχίας εκκινητών). Μεταβολή των σχετικών συγκεντρώσεων των ζευγών εκκινητών για ισοδύναμη ενίσχυση. Αλλαγή των ρυθμιστικών διαλυμάτων εάν είναι απαραίτητο.
6. Προσαρμογή των συστατικών της αντίδρασης και των θερμοκρασιακών κύκλων για πολυπλεχτική ενίσχυση. Οι απαιτήσεις σε Mg^{2+} , dNTP και πολυμεράση ενδέχεται να αυξηθούν. Οι ιδανικοί χρόνοι επιμήκυνσης μπορεί να είναι μεγαλύτεροι.

Πίνακας 1: Σχεδιασμός multiplex PCR

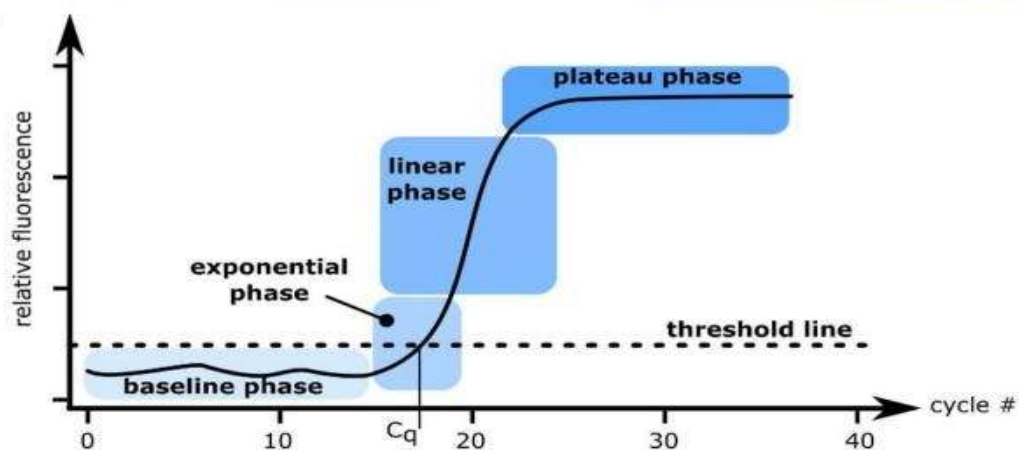
1.2.4. Εσωτερική PCR (Nested PCR)

Η εσωτερική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (nested PCR) χρησιμοποιείται σε καταστάσεις στις οποίες είναι απαραίτητο να αυξηθεί η ευαισθησία και/ή ειδικότητα της PCR, για παράδειγμα, κατά την ενίσχυση ενός συγκεκριμένου μέλους μιας οικογένειας πολυμορφικών γονιδίων ή κατά την ενίσχυση ενός αντιγράφου cDNA ενός mRNA που υπάρχει σε πολύ χαμηλή ποσότητα σε κλινικό δείγμα, το οποίο περιέχει ετερογενή πληθυσμό κυτταρικών τύπων. Η nested PCR συνήθως περιλαμβάνει δυο διαδοχικές αντιδράσεις ενίσχυσης, κάθε μία από τις οποίες χρησιμοποιεί ένα διαφορετικό ζεύγος εκκινητών. Το προϊόν της πρώτης αντίδρασης ενίσχυσης χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη δεύτερη PCR, η οποία εκκινείται από ολιγονουκλεοτίδια που υβριδοποιούνται εσωτερικά του πρώτου ζεύγους εκκινητών. Η χρήση δυο ζευγών εκκινητών επιτρέπει τη διεξαγωγή μεγαλύτερου αριθμού κύκλων, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της PCR. Η βελτιωμένη ειδικότητα της αντίδρασης προέρχεται από την υβριδοποίηση δυο διαφορετικών ζευγών εκκινητών στο ίδιο εκμαγείο στόχο. Η nested PCR είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για την ενίσχυση τμημάτων μεγάλων αλληλουχιών (Green & Sambrook, 2019).

1.2.5. PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

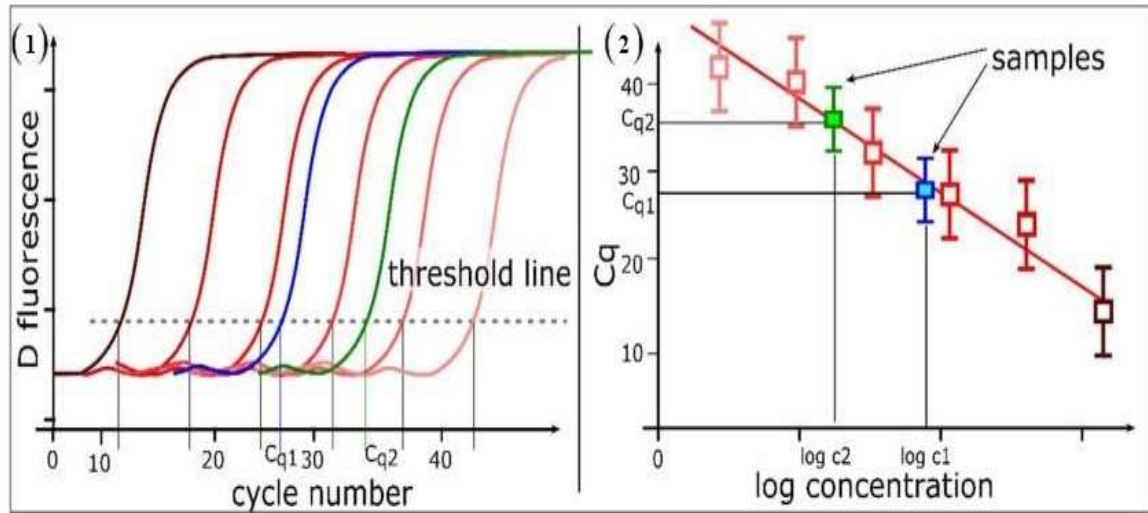
Η PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR) βασίζεται στη συμβατική PCR και καταγράφει την ποσότητα του προϊόντος PCR μετά από κάθε κύκλο ενίσχυσης χρησιμοποιώντας μια ένδειξη φθορισμού (Bustin et al, 2009). Μια τυπική γραφική

παράσταση ενίσχυσης PCR σε πραγματικό χρόνο εμφανίζει μια καμπύλη σιγμοειδούς μορφής (σε γραμμική κλίμακα) και περιλαμβάνει μια βασική φάση, ακολουθούμενη από μια εκθετική φάση που φτάνει σε μια στατική φάση (Εικόνα 2). Η εκθετική φάση αντιπροσωπεύει την πιο αποτελεσματική φάση ενίσχυσης, κατά την οποία η ποσότητα των προϊόντων PCR διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο εάν η απόδοση ενίσχυσης είναι 100%. Η μέθοδος είναι ποσοτική (quantitative PCR, qPCR) όταν χρησιμοποιείται καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευασμένη από δεδομένα της εκθετικής φάσης. Η «απόλυτη» ποσότητα της αλληλουχίας στόχου σε μια αντίδραση qPCR υπολογίζεται με τη βοήθεια μιας καμπύλης αναφοράς που δημιουργείται από ένα δείγμα γνωστής ποσότητας ή αριθμού αντιγράφων (Εικόνα 3). Η συγκεκριμένη μέθοδος συνεπάγεται ότι οι αποδόσεις ενίσχυσης του δείγματος και των προτύπων είναι ισοδύναμες. Οι διαφορές στην αποτελεσματικότητα της PCR μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την ακρίβεια της ποσοτικοποίησης (Svec et al., 2015).



Εικόνα 2: Καμπύλη ενίσχυσης της PCR πραγματικού χρόνου σε γραμμική κλίμακα.

Ένα τυπικό γράφημα εμφανίζει μια καμπύλη σιγμοειδούς μορφής με τέσσερις διακριτές φάσεις: 1. Στους πρώτους κύκλους PCR, το σήμα φθορισμού παραμένει σε επίπεδο υποβάθρου (baseline phase), λόγω χαμηλής ενίσχυσης του προϊόντος. Η γραμμή βάσης (κατώφλι, threshold) ρυθμίζεται έτσι ώστε να εξαλείφεται το σήμα του υποβάθρου. 2. Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, η ποσότητα του προϊόντος διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο σε τέλειες συνθήκες αντίδρασης (ενίσχυση απόδοσης 100%). Το κατώφλι (διακεκομμένες γραμμές, threshold) τίθεται πάνω από το υπόβαθρο και εντός της εκθετικής φάσης. Ο κύκλος ποσοτικοποίησης (C_q) είναι ο αριθμός του κύκλου στον οποίο η καμπύλη ενίσχυσης τέμνει τη γραμμή «threshold» που έχει οριστεί σημαντικά πάνω από τη βασική γραμμή. 3. Η γραμμική φάση δείχνει ότι τα αντιδραστήρια ελαττώνονται, γεγονός που οδηγεί σε μείωση της απόδοσης ενίσχυσης. Το σήμα ενίσχυσης δεν είναι πλέον εκθετικό. 4. Η στατική φάση υποδηλώνει τον κορεσμό του σήματος. Τα αντιδραστήρια εξαντλούνται και δεν δημιουργείται ούτε ανιχνεύεται επιπλέον προϊόν PCR (Quan et al., 2018).



Εικόνα 3: Απόλυτη ποσοτικοποίηση μέσω qPCR πραγματικού χρόνου.

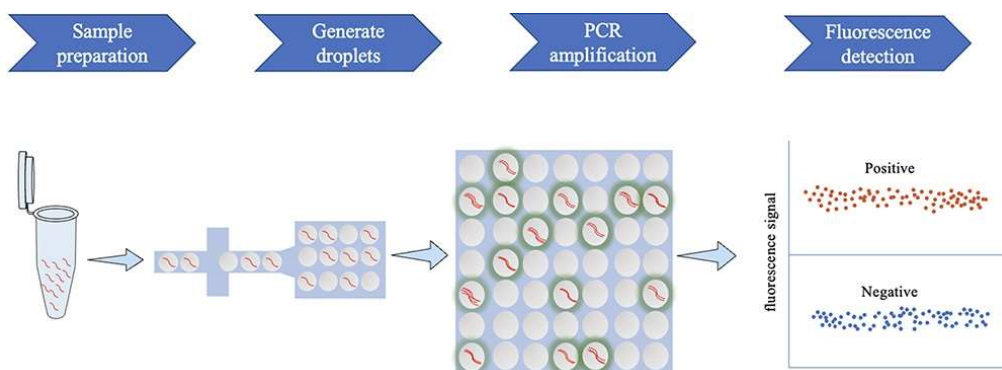
1. Καμπύλες ενίσχυσης 6 διαδοχικών αραιώσεων ενός εκμαγείου (π.χ. γονιδιωματικό DNA, προϊόν ενίσχυσης PCR, γραμμικό πλασμίδιο) με γνωστές συγκεντρώσεις (πρότυπο) για πάνω από πέντε τάξεις. Η τιμή C_q υπολογίζεται για κάθε αραιώση. 2. Η καμπύλη ποσοτικοποίησης σχεδιάζεται με βάση τις τιμές C_q των πρότυπων δειγμάτων κάθε αραιώσης σε σχέση με τον λογάριθμο της συγκέντρωσής τους και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του δείγματος προς ανάλυση. Η κλίση της καμπύλης αποδίδει την αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης της qPCR. Μια κλίση ίση με $-3,32$ (για καμπύλη ποσοτικοποίησης που δημιουργείται από διαδοχικές αραιώσεις $1/10$) υποδηλώνει 100% αποτελεσματικότητα ενίσχυσης, δηλαδή ότι η ποσότητα του προϊόντος PCR διπλασιάζεται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου (Quan et al., 2018).

2. Ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (digital PCR)

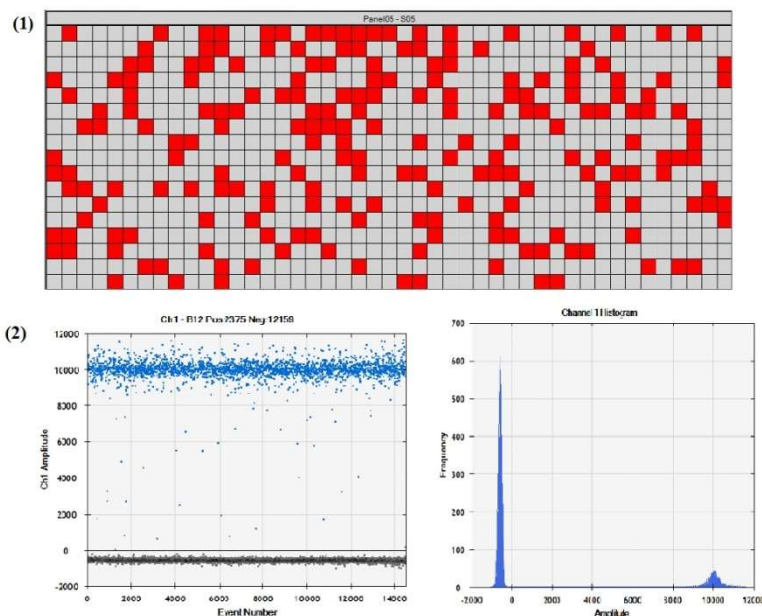
Ο όρος «ψηφιακή PCR» (digital PCR) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Kinzler και Vogelstein σε μια δημοσίευσή τους το 1999, στην οποία περιέγραφαν την ποσοτικοποίηση της μετάλλαξης του γονιδίου ras σε ένα δείγμα μέσω του διαχωρισμού του, με σκοπό να πραγματοποιηθούν μια σειρά από PCR αντιδράσεις σε μικροπλάκες 384 φρεατίων (Vogelstein & Kinzler, 1999). Ο όρος digital PCR ήταν πολύ εύστοχος καθώς αποτύπωσε τόσο τη φύση της αντίδρασης όσο και το πνεύμα της εποχής και αμέσως καθιερώθηκε. Ωστόσο, η μέθοδος που περιγράφηκε στην εργασία των Kinzler και Vogelstein δεν ήταν καινούρια, καθώς είχε χρησιμοποιηθεί την προηγούμενη δεκαετία με τους όρους «single molecule PCR» ή «Limiting Dilution PCR» (Morley, 2014).

Η digital PCR βασίζεται στην κλασματοποίηση του μείγματος PCR (όλα τα συστατικά συμπεριλαμβανομένων των στόχων DNA ή RNA) σε χιλιάδες μικροδιαμερίσματα. Η κλασματοποίηση μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας έναν αριθμό διαφορετικών τεχνολογιών, όπως μικροσταγονίδια-γαλακτώματα αιωρούμενα σε λάδι (droplet digital

PCR, ddPCR), ή μέσω μικρορευστονικής (microfluidics) (Sreejith et al., 2018). Η ενίσχυση PCR λαμβάνει χώρα σε κάθε μεμονωμένο μικροδιαμέρισμα, το οποίο δρα ως μεμονωμένος μικροαντιδραστήρας (Salipante & Jerome, 2019) (Εικόνα 4). Τα μικροδιαμερίσματα ταξινομούνται σε θετικά και αρνητικά ανάλογα με την παρουσία νουκλεϊκών οξέων στόχων. Αφού πραγματοποιηθεί η ενίσχυση του DNA σε κάθε μικροδιαμέρισμα, το θετικό παρουσιάζει διακριτά σήματα φθορισμού (Quan et al., 2018) (Εικόνα 5). Η αναλογία των θετικών μικροδιαμερισμάτων αναλύεται με ανίχνευση φθορισμού στο τελικό σημείο και η αρχική συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων στόχων υπολογίζεται με βάση την κατανομή Poisson (Lee et al., 2023).



Εικόνα 4: Βασικές αρχές και ροή εργασιών της dPCR. (Fan et al., 2022)

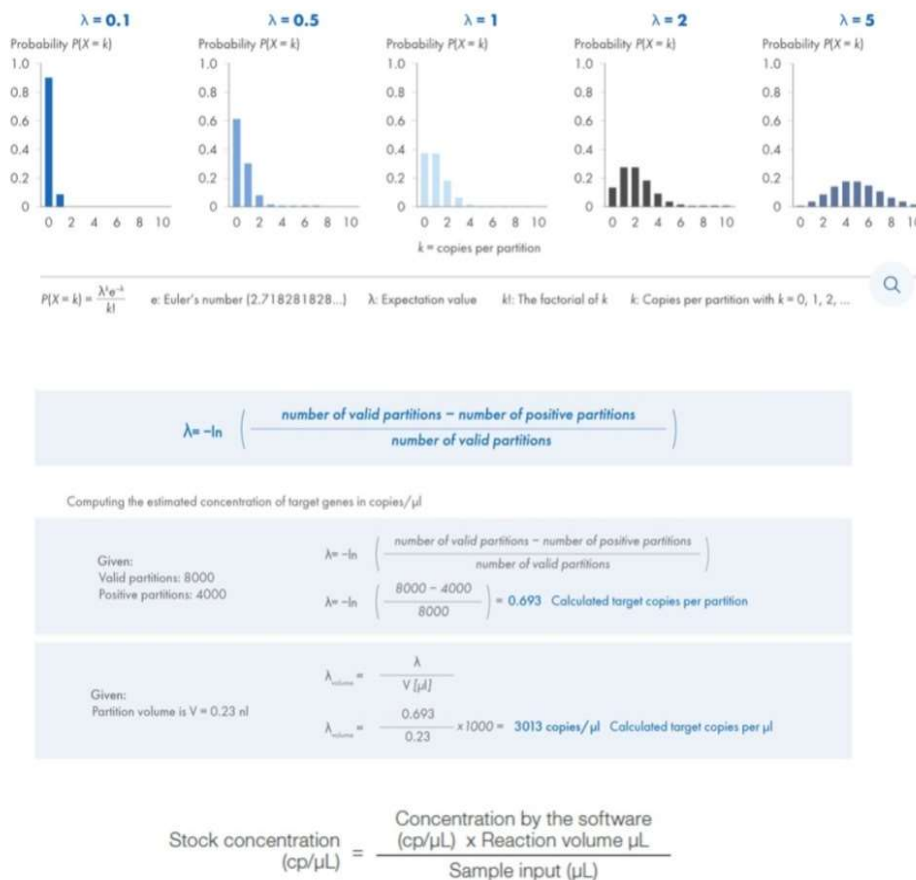


Εικόνα 5: Παραδείγματα αποτελεσμάτων dPCR.

1. Οπτική απεικόνιση αποτελέσματος dPCR που χρησιμοποιεί μικροδιαμερίσματα. Η πλάκα περιέχει 765 μικροδιαμερίσματα εκ των οποίων τα 208 εμφανίζονται ως θετικά. 2. Οπτική απεικόνιση αποτελέσματος ddPCR. Η αντίδραση περιέχει έως και 20.000 σταγονίδια εκ των οποίων τα θετικά έχουν υψηλότερο φθορισμό από τα αρνητικά (Publications Office of the European Union, 2019).

Η dPCR μοιάζει αρκετά με την qPCR ως προς τον σχεδιασμό της. Τα συστατικά μιας αντίδρασης dPCR περιλαμβάνουν ένα εκμαγείο DNA, πρόσθιους και ανάστροφους εκκινητές, ιχνηθέτες (π.χ. TaqMan, δεν περιλαμβάνονται σε περιπτώσεις ανίχνευσης που γίνεται χρήση παρεμβαλλόμενης χρωστικής), νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες για τη ρύθμιση του όγκου της αντίδρασης και το PCR μείγμα (master mix). Το τελευταίο περιλαμβάνει το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, δισθενή κατίοντα και μια DNA πολυμεράση (συν την παρεμβαλλόμενη χρωστική π.χ. SYBR[®] Green ή EvaGreen εάν έχει επιλεγεί αυτή η στρατηγική ανίχνευσης). Επιπλέον μπορεί να περιλαμβάνονται τεχνικά πρόσθετα, ανάλογα με το master mix και το είδος της dPCR (Publications Office of the European Union, 2019). Συνίσταται στο μείγμα της αντίδρασης να προστίθεται η χρωστική ελέγχου ROX, η οποία είναι ορατή σε όλα τα μικροδιαμερίσματα και χρησιμοποιείται για να επιβεβαιώσει ότι το δείγμα φορτώθηκε πλήρως και κατανεμήθηκε ομοιόμορφα στα μικροδιαμερίσματα. Μικροδιαμερίσματα χωρίς σήμα ROX απορρίπτονται για να μειωθεί ο αριθμός των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων (Dueck et al., 2019).

Η dPCR χρησιμοποιεί τους ίδιους εκκινητές και ανιχνευτές με την qPCR, αλλά επιδεικνύει αυξημένη ευαισθησία και ακρίβεια. Αυτές οι βελτιώσεις επιτυγχάνονται με την αραιώση του δείγματος σε μέρη ίσου όγκου και την κατανομή του σε μεμονωμένες αντιδράσεις, έτσι ώστε ιδανικά κάθε αντίδραση να περιέχει ένα ή κανένα αντίγραφο του DNA ενδιαφέροντος. Ο αριθμός των θετικών έναντι των αρνητικών αντιδράσεων μετράται για να υπολογιστεί άμεσα ο αριθμός των μορίων DNA στο αρχικό δείγμα με βάση την στατιστική επεξεργασία κατά Poisson (**Εικόνα 6**). Εάν το δείγμα δεν είναι αραιωμένο, πολλές από τις μεμονωμένες αντιδράσεις θα είναι θετικές και θα περιέχουν δυο, τρία ή περισσότερα μόρια στόχους. Σε αυτή την περίπτωση, η απλή καταμέτρηση των θετικών αντιδράσεων θα υποεκτιμούσε τον πραγματικό αριθμό των μορίων. Κάτι τέτοιο όμως μπορεί να αποφευχθεί χρησιμοποιώντας την εξίσωση Poisson, η οποία υπολογίζει τον μέσο αριθμό μορίων ανά αντίδραση από την παρατηρούμενη αναλογία των θετικών αντιδράσεων (Sykes et al., 1992). Χρησιμοποιώντας την κατανομή Poisson η dPCR παρέχει απόλυτη ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων, μειώνοντας την υποκειμενικότητα στην ανάλυση, καταργώντας την ανάγκη για χρήση πρότυπων δειγμάτων αναφοράς και για κατασκευή καμπυλών ποσοτικοποίησης.

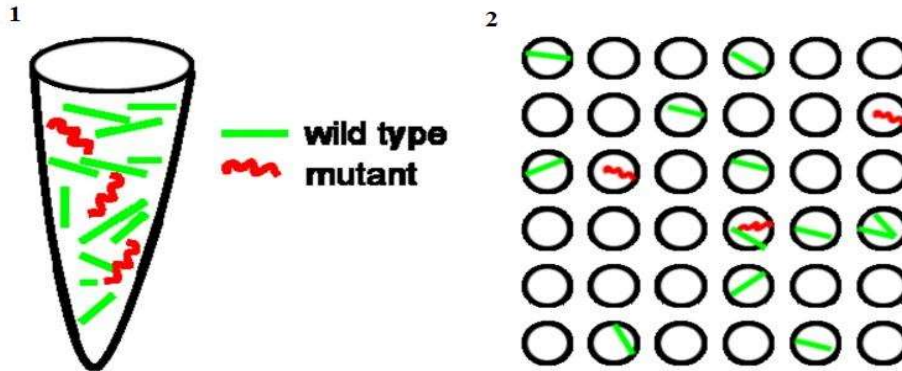


Εικόνα 6: Μαθηματικός υπολογισμός του νόμου Poisson σε ένα πείραμα dPCR.

Η dPCR, χρησιμοποιεί την κατανομή Poisson για τον προσδιορισμό της πιθανότητας ένας μικροθάλαμος να λάβει 0-10 αντίγραφα του μορίου-στόχου.

Η dPCR αυξάνει την ευαισθησία απομονώνοντας σπάνιες αλληλουχίες στόχους, ώστε να μην ανταγωνίζονται με τις υπόλοιπες αλληλουχίες του δείγματος για εκκινητές ή άλλα αντιδραστήρια σε αντίθεση με την qPCR κατά την οποία η ενίσχυση πραγματοποιείται σε μαζικές αντιδράσεις (bulk reactions) καθιστώντας δύσκολη την ποσοτικοποίηση σπάνιων αλληλουχιών σε υπόβαθρα με άφθονες αλληλουχίες (**Εικόνα 7**). Ενώ η ιδέα της dPCR είναι εξαιρετική για την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων, η εφαρμογή της αντιμετωπίζει δυσκολίες, λόγω τεχνικών εμποδίων που σχετίζονται με τον τεράστιο αριθμό των αντιδράσεων που απαιτούνται για να παραχθούν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Η εμφάνιση πολλαπλών εμπορικά διαθέσιμων πλατφορμών ικανών να εκτελούν αντιδράσεις σε κλίμακα νάνο- έως και πικολίτρων έχουν καταστήσει την dPCR ως ένα πρακτικό

εργαλείο με μεγάλες δυνατότητες σε ερευνητικά και κλινικά περιβάλλοντα (Sedlak & Jerome, 2012).



Εικόνα 7: Ανίχνευση σπανίων μεταλλαγμένων αλληλομόρφων σε υπόβαθρο DNA άγριου τύπου με ψηφιακή PCR.

1. Στη συμβατική qPCR, μεταλλαγμένα και άγριου τύπου αλληλόμορφα αναμειγνύονται μαζί σε μια μαζική αντίδραση όπου τα σπάνια μεταλλαγμένα ανταγωνίζονται για αντιδραστήρια με το πιο άφθονο άγριου τύπου DNA. 2. Η ψηφιακή PCR αυξάνει την ευαισθησία με τη διαμερισματοποίηση των αλληλουχιών άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων αλληλουχιών, δίνοντας σε μια λιγότερο άφθονη μεταλλαγμένη αλληλουχία ίση πρόσβαση στα αντιδραστήρια (Sedlak & Jerome, 2012).

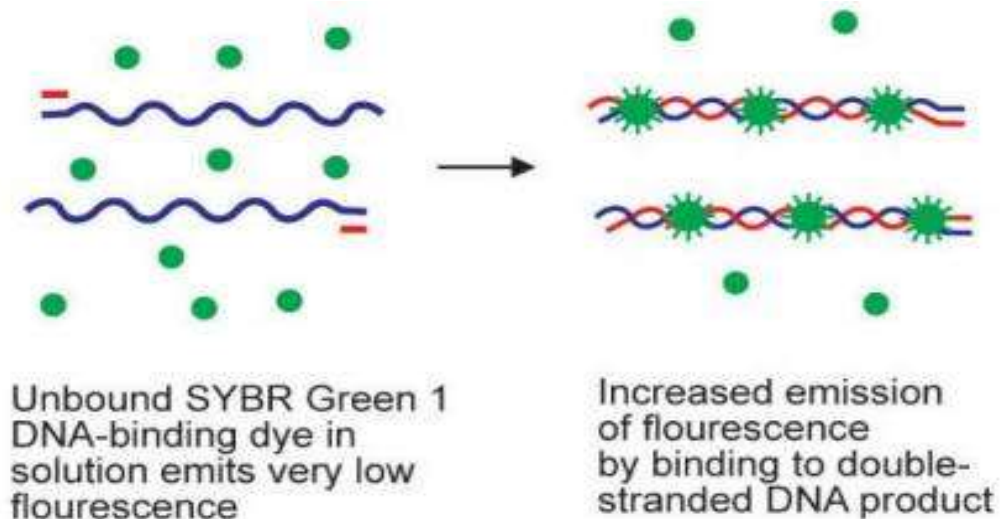
2.1. Πειραματικός σχεδιασμός της Digital PCR

2.1.1. Χρωστικές και ανιχνευτές

Ομοίως με την qPCR, η dPCR χρησιμοποιεί δυο κύριους τύπους χημικών ουσιών για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων: χρωστικές παρεμβολής DNA και ανιχνευτές με βάση την υδρόλυση (Navarro et al., 2015). Και οι δυο μέθοδοι ανίχνευσης παράγουν ένα φθορίζον σήμα που είναι ανάλογο της ποσότητας του DNA. Οι χρωστικές που δεσμεύονται στο DNA παρεμβάλλονται στο δίκλωνο DNA (double stranded DNA, dsDNA). Κατά την αλληλεπίδραση με το dsDNA, οι χρωστικές που παρεμβάλλονται στο DNA σταθεροποιούνται σε μια διεγερμένη κατάσταση που οδηγεί σε ισχυρό φθορισμό. Οι χρωστικές αυτές είναι μη ειδικές και αλληλεπιδρούν με δίκλωνα μόρια DNA ανεξάρτητα από την αλληλουχία τους. Αντίθετα, οι ανιχνευτές που βασίζονται στην υδρόλυση είναι ειδικοί ως προς την αλληλουχία. Ο σημασμένος με φθορίζουσα χρωστική ολιγονουκλεοτιδικός ανιχνευτής, αφού υβριδοποιηθεί, διασπάται ως αποτέλεσμα της 5'-3' εξωνουκλεοτιδικής δράσης της DNA πολυμεράσης. Η φθορίζουσα χρωστική αναφοράς που βρίσκεται στο 5' άκρο του ολιγονουκλεοτιδικού ανιχνευτή απελευθερώνεται και παράγει φθορίζον σήμα (Quan et al., 2018).

SYBR GREEN

Η SYBRGreen 1 είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος παράγοντας παρεμβολής δίκλωνου DNA. Είναι μια χρωστική που παρεμβάλλεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA, ανεξάρτητα από την αλληλουχία του. Φθορίζει μόνο όταν εισάγεται σε δίκλωνο DNA (**Εικόνα 8**). Επομένως η ισχύς του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη με την ποσότητα του δίκλωνου DNA που παράγεται κατά την αντίδραση. Τα πλεονεκτήματα της SYBRGreen 1 είναι το χαμηλό κόστος, η ευκολία στη χρήση και η ευαισθησία της. Κύριο μειονέκτημα αυτής της φθορίζουσας είναι ότι δεν διαθέτει ειδικότητα, καθώς αλληλεπιδρά με όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA που συντίθενται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας PCR, συμπεριλαμβανομένων των μη ειδικών προϊόντων ή και των διμερών των εκκινητών (Arya, 2005, Navarro et al., 2015). Το γεγονός αυτό καθιστά απαραίτητη τη διεξαγωγή μιας ανάλυσης καμπύλης τήξης για να προσδιοριστεί η ειδικότητα των ενισχυμένων αλληλουχιών DNA (Navarro et al., 2015). Αξίζει να σημειωθεί ότι βελτιστοποιώντας τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούν SYBRGreen, η απόδοση και η ποιότητά της μπορεί να είναι εξίσου καλή με αυτή της χρήσης TaqMan (Tajadini et al., 2014). Άλλες παρεμβαλλόμενες στο DNA χρωστικές που διατίθενται στο εμπόριο είναι το βρωμιούχο αιθίδιο, YO-PRO-1, SYBR[®] Gold, SYTO, BEBO, BOXTO, και EvaGreen (Navarro et al., 2015).

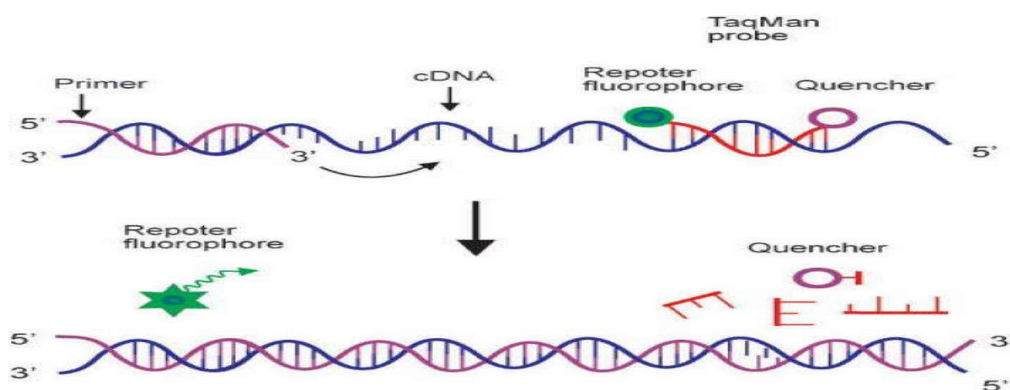


Εικόνα 8: Μηχανισμός δράσης της φθορίζουσας χρωστικής SYBRGreen 1.

Η SYBRGreen 1 είναι ένας δίκλωνος παράγοντας παρεμβολής DNA που εμφανίζει πολύ μικρό φθορισμό ενώ είναι ελεύθερος σε διάλυμα. Κατά τη διάρκεια επιμήκυνσης και του πολυμερισμού του εκκινητή, τα μόρια της χρωστικής εισάγονται στο δίκλωνο DNA προκαλώντας αύξηση στον ανιχνεύσιμο φθορισμό (Arya, 2005).

Ιχνηθέτες TaqMan

Ο ιχνηθέτης TaqMan αποτελεί έναν πολύ δημοφιλή ανιχνευτή, ο οποίος έχει σχεδιαστεί για να υβριδοποιείται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA στόχου. Ο μηχανισμός της δράσης του εξαρτάται από τη δραστικότητα 5'-3' εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης, η οποία υδρολύει τον υβριδοποιημένο ανιχνευτή κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης της αλληλουχίας στόχου. Ο ιχνηθέτης TaqMan διαθέτει μια φθορίζουσα χρωστική αναφοράς συνδεδεμένη με το 5' άκρο του και ένα μόριο αποσιώπησης στο 3' άκρο του. Όταν ο ιχνηθέτης είναι άθικτος, η χρωστική αναφοράς και το μόριο αποσιώπησης παραμένουν σε άμεση γειτνίαση και η ενέργεια διέγερσης αποσβένεται, απαγορεύοντας την εκπομπή οποιουδήποτε φθορισμού. Παρουσία της αλληλουχίας στόχου, ο ιχνηθέτης TaqMan υβριδοποιείται εσωτερικά της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί. Κατά τη διάρκεια της PCR, όταν η πολυμεράση αντιγράφει μια αλληλουχία DNA στην οποία έχει υβριδοποιηθεί ένας ιχνηθέτης TaqMan, η 5'-3' εξωνουκλεοτιδική δράση της Taq DNA πολυμεράσης υδρολύει τον ιχνηθέτη. Αυτό έχει ως συνέπεια να απομακρύνεται η χρωστική αναφοράς από το μόριο αποσιώπησης με αποτέλεσμα η ενέργεια διέγερσης να μετατρέπεται σε φθορίζον σήμα (Εικόνα 9). Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται σε κάθε κύκλο αναλογικά με τον ρυθμό υδρόλυσης του ιχνηθέτη (Arya, 2005, Navarro et al., 2015).



Εικόνα 9: Τρόπος δράσης του ιχνηθέτη TaqMan.

Ο ιχνηθέτης TaqMan είναι ένας ανιχνευτής με μια φθορίζουσα χρωστική αναφοράς συνδεδεμένη στο 5' άκρο και ένα μόριο αποσιώπησης στο 3' άκρο. Ενώ ο ιχνηθέτης είναι άθικτος, λαμβάνει χώρα το φαινόμενο FRET, κατά το οποίο η εκπομπή φθορισμού της χρωστικής αναφοράς απορροφάται από το μόριο αποσιώπησης. Παρουσία της αλληλουχίας στόχου ο ιχνηθέτης υβριδοποιείται καθοδικά μιας εκ των θέσεων των εκκινητών. Η 5'-3' εξωνουκλεοτιδική δράση της πολυμεράσης υδρολύει τον ιχνηθέτη κατά το στάδιο της επιμήκυνσης των εκκινητών. Η υδρόλυση αυτή έχει ως αποτέλεσμα να απομακρύνονται οι χρωστικές αναφοράς με τα μόρια αποσιώπησης, εκπέμποντας έτσι ένα σήμα φθορισμού (Arya, 2005).

2.1.2. Master Mix

Στην chamber digital PCR (cdPCR), ένα αντιδραστήριο φόρτωσης προστίθεται στο μείγμα της αντίδρασης για να διευκολύνει τον καταμερισμό. Σε συστήματα που βασίζονται σε σταγονίδια, συγκεκριμένα τασιενεργά περιλαμβάνονται συχνά στο master mix προκειμένου να προσδώσουν σταθερότητα στα σταγονίδια και να ελαχιστοποιήσουν την συνένωση μόλις αυτά σχηματιστούν. Κατά συνέπεια, συγκεκριμένα master mix που σχετίζονται με τις ανάλογες πλατφόρμες χρησιμοποιούνται για dPCR και η χρήση μη ειδικών master mix δεν συνίσταται από τους κατασκευαστές των οργάνων. Ωστόσο, μερικές πλατφόρμες οργάνων (π.χ. Constellation, Naica και Raindance) δεν δεσμεύονται από τη χρήση αποκλειστικών master mix. Τα πρωτόκολλα που έχουν ήδη επικυρωθεί για qPCR μπορεί να χρειαστεί να τροποποιηθούν όταν χρησιμοποιούνται με διαφορετικό master mix. Τα εμπορικά master mix μπορεί να περιλαμβάνουν μη δηλωμένα συστατικά, τα οποία μπορούν να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, η παρουσία αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) μπορεί να δώσει θετικά αποτελέσματα για μια dPCR που στοχεύει στην ανίχνευση βοοειδών. Πρέπει επομένως να δίνεται πάντα ιδιαίτερη προσοχή σε μη αναμενόμενα αποτελέσματα για αρνητικούς μάρτυρες κατά την τροποποίηση ενός πρωτοκόλλου qPCR για εφαρμογή dPCR (Publications Office of the European Union, 2019).

Ενώ η ακριβής σύσταση των master mix γενικά δεν είναι γνωστή, συνήθως δηλώνονται οι συγκεντρώσεις των βασικών συστατικών ($MgCl_2$, dNTPs, πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα). Εάν οι συγκεντρώσεις τους είναι συγκρίσιμες (εντός διακύμανσης 10%) με αυτές των επικυρωμένων συνθηκών (master mix), τότε δεν απαιτείται επαναξιολόγηση της ειδικότητας. Σε διαφορετική περίπτωση, συνίσταται πειραματικός έλεγχος σε επιλεγμένες αλληλουχίες στόχους, οι οποίες διαθέτουν τις περισσότερες ομοιότητες σε αλληλουχίες (αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτών) σε σύγκριση με τη μέθοδο που θα εφαρμοστεί. Κάτι τέτοιο είναι εφικτό με αναλύσεις βιοπληροφορικής χρησιμοποιώντας, για παράδειγμα, τη μοριακή βάση δεδομένων CCSIS (Central Core DNA Sequence Information System) του European Union Reference Laboratory for GM Food&Feed (EURL GMFF) ή μια από τις βάσεις δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Publications Office of the European Union, 2019).

2.1.3. Συγκεντρώσεις εκκινητών και ανιχνευτών

Για το σχεδιασμό και την επιλογή των εκκινητών και των ανιχνευτών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι ίδιοι κανόνες όπως και για τις δοκιμασίες qPCR (όσον αφορά την αντιστοίχιση με τον στόχο, τη σύνθεση των βάσεων, το μήκος, τη θερμοκρασία τήξης, την απουσία δευτεροταγών δομών και την αυτό- και αλληλο - συμπληρωματικότητα και την ειδικότητα (Degen et al., 2006). Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις εκκινητών και ανιχνευτών στην dPCR είναι συνήθως υψηλότερες από ότι στην qPCR. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις εκκινητών και ανιχνευτών αυξάνουν την ένταση του σήματος φθορισμού του τελικού σημείου και επιτρέπουν έτσι τον καλύτερο διαχωρισμό του θορύβου του υποβάθρου από τα ειδικά σήματα, βοηθώντας με αυτόν τον τρόπο τον ακριβέστερο ποσοτικό προσδιορισμό της αλληλουχίας στόχου. Δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε δώδεκα πειραματικές διαδικασίες ddPCR (BioRadQX200), οι οποίες επικυρώθηκαν από το EURL GMFF (European Union Reference Laboratory for GM Food & Feed) σε qPCR, έδειξαν ότι τα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν όταν η τελική συγκέντρωση των εκκινητών ρυθμίστηκε περίπου 500 nM ανά αντίδραση, διατηρώντας ίδια την αναλογία εκκινητών/ανιχνευτών με τις επικυρωμένες συνθήκες qPCR (Lievens et al., 2016).

Οι κατασκευαστές μπορεί κάποιες φορές να συνιστούν ορισμένους συνδυασμούς φθορίζουσας χρωστικής και μορίου αποσιώπησης (quencher). Συνήθως συνίσταται η χρήση μη φθορίζοντος μορίου αποσιώπησης, κάτι που μπορεί να θεωρηθεί ως γενική σύσταση, όχι μόνο για την dPCR, καθώς μόρια όπως το TAMRA συμβάλλει στη συνολική αύξηση του φθορισμού του υποβάθρου. Η αλλαγή της φθορίζουσας χρωστικής ή του μορίου απόσβεσης κατά τη μεταφορά από την qPCR στην dPCR κανονικά δεν θα πρέπει να έχει καμία επίδραση στην απόδοση της αντίδρασης εκτός αν η αλλαγή επηρεάζει τη θερμοκρασία υβριδοποίησης του ανιχνευτή (π.χ. ανιχνευτές MGB). Στην περίπτωση αυτή απαιτείται πρόσθετη βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου. Για την μεταφορά υφιστάμενων πρωτοκόλλων qPCR σε πρωτόκολλα dPCR, συνίσταται αρχικά η χρήση των συγκεντρώσεων από την επικυρωμένη μέθοδο qPCR και να εκτελείται διαβαθμισμένη αλλαγή των συγκεντρώσεων του εκκινητή/ανιχνευτή εάν αυτό κρίνεται απαραίτητο για τη βελτίωση των τιμών φθορισμού του τελικού σημείου των θετικών θαλάμων. Εάν οι συγκεντρώσεις των εκκινητών/ανιχνευτών αλλάξουν σημαντικά, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί πειραματική εκτίμηση πρόσθετων παραμέτρων απόδοσης (π.χ. ειδικότητα και ορθότητα) (Hougs et al., 2017). Τέλος, σε περίπτωση

αλλαγής της αλληλουχίας εκκινητή / ανιχνευτή απαιτείται πλήρης επικύρωση μιας τέτοιας νέας μεθόδου (Publications Office of the European Union, 2019).

2.1.4. Πρόγραμμα κύκλων θερμοκρασίας

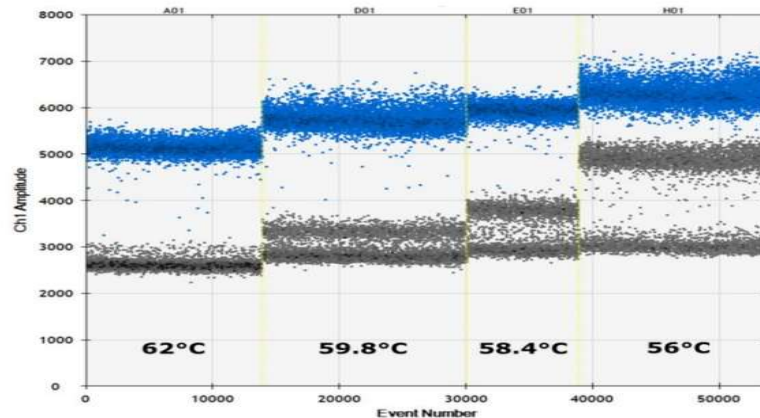
Γενικά, το πρόγραμμα θερμοκρασιακών κύκλων που χρησιμοποιείται στην qPCR μπορεί να εφαρμοστεί άμεσα στην dPCR. Ωστόσο, στην περίπτωση που για κάποιο πρωτόκολλο υπάρχουν συγκεκριμένες απαιτήσεις, θα πρέπει να ελέγχονται πάντα οι συστάσεις του κατασκευαστή. Ενδέχεται επίσης να υπάρχουν συστάσεις με τον ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας για τη διασφάλιση της ομοιόμορφης θέρμανσης των μικροδιαμερισμάτων (σταγονιδίων ή θαλάμων). Επιπλέον συνίσταται να εκτελούνται τουλάχιστον 45 κύκλοι ενίσχυσης, προκειμένου να υπάρχει επαρκής διαχωρισμός μεταξύ των θετικών σημάτων και του θορύβου του υποβάθρου (Publications Office of the European Union, 2019).

2.1.5. Θερμοκρασία υβριδισμού

Η θερμοκρασία υβριδισμού συμβάλλει στην ειδικότητα των αντιδράσεων PCR και θα πρέπει ιδανικά να είναι σύμφωνη με εκείνη των επικυρωμένων μεθόδων. Ωστόσο, στην περίπτωση της παράλληλης ενίσχυσης ενός δευτερεύοντος στόχου (πολλαπλά νέφη θετικών σταγονιδίων/μικροδιαμερισμάτων) η θερμοκρασία υβριδισμού μπορεί να αυξηθεί προκειμένου να υπάρξει επαρκής διαχωρισμός μεταξύ των θετικών σημάτων και του θορύβου του υποβάθρου (**Εικόνα 10**). Εάν η απόκλιση της θερμοκρασίας εμπίπτει εντός του εύρους της ανθεκτικότητας της μεθόδου, η οποία έχει υπολογιστεί από μια επικυρωμένη μέθοδο, δεν υπάρχει γενικά ανάγκη για δοκιμή ειδικότητας. Παρόλα αυτά η ειδικότητα θα πρέπει να δοκιμαστεί με μια μέθοδο της οποίας η θερμοκρασία υβριδισμού είναι μειωμένη. Εάν η θερμοκρασία υβριδισμού μιας μεθόδου αυξάνεται, δεν είναι απαραίτητο να ελεγχθεί η ειδικότητα επειδή οι νέες συνθήκες είναι πιο αυστηρές για την υβριδοποίηση των εκκινητών (Publications Office of the European Union, 2019).

2.1.6. Πλαστικά σκεύη

Φαίνεται ότι η μάρκα των πλαστικών σκευών και ιδιαίτερα αυτή των ρυγχών μπορεί να έχει σημασία για την επίτευξη καλών αποτελεσμάτων. Λόγω της φύσης των οργάνων, στις αντιδράσεις πρέπει να χρησιμοποιούνται πλαστικά σκεύη κατάλληλα για όργανα dPCR σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή (Publications Office of the European Union, 2019).



Εικόνα 10: Διαβάθμιση θερμοκρασίας υβριδισμού στην ddPCR για την ενίσχυση του ειδικού για το βαμβάκι *acp1*.

Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία υβριδισμού, αυξάνεται και η ειδικότητα της αντίδρασης ενώ παράλληλα η απόδοση της παράλληλης ενίσχυσης μειώνεται έως ότου ο ανεπιθύμητος πληθυσμός σταγονιδίων συγχωνευθεί με τον αρνητικό πληθυσμό (Publications Office of the European Union, 2019).

2.1.7. Δείγματα ελέγχου

Παρόλο που ο ποσοτικός προσδιορισμός με dPCR δεν εξαρτάται από τη δημιουργία καμπύλης ποσοτικοποίησης για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, εξακολουθεί να απαιτεί τη χρήση των κατάλληλων θετικών δειγμάτων ελέγχου (positive controls) για την επιβεβαίωση της ορθής πειραματικής λειτουργίας. Επιπλέον, σε ένα πείραμα dPCR θα πρέπει πάντα να χρησιμοποιούνται αρνητικά δείγματα ελέγχου (negative controls) για τον έλεγχο τυχόν ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Η χρήση δειγμάτων ελέγχου είναι απαραίτητη στην dPCR για τον έλεγχο της εμφάνισης των προαναφερθέντων φαινομένων. Για παράδειγμα, στην περίπτωση των πειραμάτων ρουτίνας ποσοτικού προσδιορισμού γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (ΓΤΟ), όπως και για την qPCR, τα controls που περιγράφονται στο ISO 24276 θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και στην dPCR. Όταν μια δοκιμασία μεταφέρεται από την qPCR στην dPCR, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσθετα δείγματα ελέγχου (π.χ. πιστοποιημένο υλικό αναφοράς ή δείγματα με γνωστή συγκέντρωση), επιτρέποντας την άμεση αξιολόγηση της απόδοσης της dPCR (Publications Office of the European Union, 2019).

2.1.8. Παράλληλη ενίσχυση αλληλουχιών

Η πλειονότητα των συστημάτων dPCR που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά μπορούν να ανιχνεύσουν φθορισμό σε δυο κανάλια, τα FAM και HEX (VIC[®]), ενώ ορισμένα συστήματα έχουν τη δυνατότητα ανίχνευσης και ενός τρίτου φθοριοφόρου. Ζεύγη αντιδράσεων (duplex reactions) μπορούν εύκολα να υλοποιηθούν. Το σήμα που σχετίζεται

με συγκεκριμένο φθοριοφόρο λαμβάνεται μέσω οποιουδήποτε από τα δυο κανάλια, υπολογίζεται από τον αλγόριθμο του λογισμικού και αναπαρίσταται γραφικά σε ένα διάγραμμα δυο αξόνων για τα κανάλια FAM και HEX (Publications Office of the European Union, 2019).

Παρόλο που η διαθεσιμότητα μόνο δυο καναλιών (FAM και HEX) περιορίζει την επιλογή των χρωστικών αναφοράς για τους ανιχνευτές TaqMan, μπορούν να επιτευχθούν πιο σύνθετα επίπεδα πολυπλεξίας στην dPCR με τη σήμανση δυο ή περισσότερων ανιχνευτών, που στοχεύουν σε διαφορετικά μόρια στόχους, με την ίδια φθορίζουσα χρωστική αναφοράς και με τη μεταβολή των συγκεντρώσεών τους (Whale et al., 2016). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα των διαχωρισμό των αντίστοιχων ομάδων των ενισχυμένων στόχων με βάση το επίπεδο φθορισμού τους. Η ταυτοποίηση της κάθε ομάδας μπορεί να καθοριστεί με ξεχωριστές αντιδράσεις με τις καθορισμένες συγκεντρώσεις του κάθε ανιχνευτή. Ο συνδυασμός των αναλύσεων dPCR για δοκιμασίες πολλαπλών αναλύσεων είναι δυνατός εάν χρησιμοποιούνται διαφορετικά κανάλια (π.χ. FAM και HEX) και με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις ανιχνευτών για διαφορετικούς στόχους. Κάτι τέτοιο ωστόσο, απαιτεί προσεκτική βελτιστοποίηση των παραμέτρων του πειράματος, καθώς η πολυπλοκότητα αυξάνεται εκθετικά με τον αριθμό των στόχων. Ο διαχωρισμός των διαφορετικών στόχων σε σαφώς αναγνωρίσιμες ομάδες είναι απαραίτητος για την αξιόπιστη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση. Τέτοιου είδους πολλαπλή ανάλυση είναι θεωρητικά δυνατή με οποιαδήποτε μορφή dPCR (Publications Office of the European Union, 2019).

2.2. Παράμετροι ποσοτικοποίησης για τη μεταφορά πρωτοκόλλων qPCR σε dPCR

Για τις επικυρωμένες μεθόδους qPCR που πρόκειται να μεταφερθούν σε μορφή dPCR θα πρέπει να ελέγχονται διάφορες παράμετροι που σχετίζονται με την ποσοτικοποίηση. Ανάλογα με την qPCR οι παράμετροι αυτές είναι: η ειδικότητα, η ορθότητα (όταν είναι δυνατόν), η επαναληψιμότητα, η ανθεκτικότητα, το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation, LOQ) (Hougs et al., 2017). Η μεταβλητότητα που σχετίζεται με την επαναληψιμότητα, την ενδιάμεση πιστότητα και την μεροληψία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της αβεβαιότητας της μέτρησης ενός αποτελέσματος dPCR. Οι γενικές αρχές για την εκτίμηση της αναλυτικής

μεταβλητότητας των αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης που λαμβάνονται με PCR πραγματικού χρόνου, μπορούν επίσης να εφαρμοστούν και για τις μεθόδους dPCR (Publications Office of the European Union, 2020). Παρακάτω εξετάζονται οι συγκεκριμένες παράμετροι.

2.2.1. Ειδικότητα

Η μέθοδος της dPCR δεν διαφέρει ως προς την έννοιά της από την qPCR. Η αρχή της ενίσχυσης των μορίων-στόχων DNA είναι ίδια με την qPCR. Η ειδικότητα μιας ανάλυσης PCR εξασφαλίζεται από τη χρήση πολυμεράσης υψηλής πιστότητας και από τον κατάλληλο σχεδιασμό εκκινητών/ανιχνευτών (αλληλουχίες DNA). Εάν η ειδικότητα μιας μεθόδου έχει αποδειχθεί στην qPCR, η αλληλουχία των εκκινητών/ανιχνευτών καθώς και οι συνθήκες αντίδρασης θα πρέπει να διατηρηθούν και στην dPCR. Ενδέχεται να χρειαστεί να γίνουν αλλαγές για τη βελτιστοποίηση της dPCR, παραδείγματος χάριν μεταβολή της συγκέντρωσης του $MgCl_2$ του ρυθμιστικού διαλύματος ή μεταβολή της θερμοκρασίας υβριδισμού. Ανάλογα με τις αλλαγές που έγιναν στη μέθοδο (π.χ. master mix, πρόγραμμα θερμοκρασιών) ενδέχεται να είναι απαραίτητη η επαναξιολόγηση της ειδικότητας της μεθόδου (Publications Office of the European Union, 2019).

2.2.2. Ορθότητα

Η ορθότητα ενός αποτελέσματος που λαμβάνεται με dPCR μπορεί να αξιολογηθεί συγκρίνοντας τη μέση μετρούμενη τιμή ενός πιστοποιημένου υλικού αναφοράς (Certified Reference Material, CRM) με την πιστοποιημένη τιμή του. Το CRM θα πρέπει να είναι ένα υλικό πιστοποιημένο για την απόλυτη συγκέντρωση του αριθμού αντιγράφων ή για τον λόγο συγκέντρωσης αριθμού αντιγράφων. Εάν παρατηρηθεί σημαντική μεροληψία στα αποτελέσματα, είτε θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω η προέλευση της μεροληψίας (π.χ. μέσω της βελτίωσης της μεθόδου dPCR), είτε τα αποτελέσματα θα πρέπει να διορθωθούν για την εν λόγω μεροληψία. Η μεροληψία θα είναι σημαντική εάν είναι μεγαλύτερη από τη διευρυμένη αβεβαιότητα της διαφοράς μεταξύ αποτελέσματος και πιστοποιημένης τιμής (Publications Office of the European Union, 2019).

2.2.3. Εγκυρότητα (Robustness)

Η μέθοδος θα πρέπει να παρέχει τα αναμενόμενα αποτελέσματα όταν υπάρχουν μικρές αποκλίσεις από τις πειραματικές συνθήκες που περιγράφονται στη διαδικασία. Στην περίπτωση της ποσοτικοποίησης, με βάση το κριτήριο αποδοχής του $\leq 25\%$ για τη

σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSDr) και την ορθότητα, η RSDr και η ορθότητα που υπολογίζονται για ένα συνδυασμό αλλαγών δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το 30% (European Network of GMO Laboratories (ENGL) et al., 2015). Παραδείγματα παραγόντων που θα πρέπει να αντιμετωπιστούν σε μια δοκιμή αξιοπιστίας είναι τα πειράματα που εκτελούνται από άλλον χειριστή, διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών και ανιχνευτών, διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού, διαφορετικοί θερμικοί κυκλοποιητές, διαφορετικοί όγκοι αντίδρασης και διαφορετικοί προμηθευτές master mix (Publications Office of the European Union, 2019).

2.2.4. Όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το LOD (και το LOQ) μιας μεθόδου dPCR εξαρτώνται από τον αριθμό των αναλυόμενων τμημάτων και από τον συνολικό τους όγκο. Συνεπώς, είναι δυνατόν να υπολογιστεί το θεωρητικό ελάχιστο LOD για μια δεδομένη διάταξη dPCR με βάση την κατανομή Poisson. Ο υπολογισμός βασίζεται στον συνδυασμό δυο πιθανοτήτων. Πρώτον της πιθανότητας να διοχετευθούν μέσω πιπέτας τα αντίγραφα DNA στο μείγμα (δειγματοληψία) και δεύτερον της πιθανότητας τα αντίγραφα αυτά να καταλήξουν στα μικροδιαμερίσματα. Στην περίπτωση μιας ddPCR με π.χ. 17.000 αναλυμένα (αποδεκτά) σταγονίδια με υποτιθέμενο όγκο σταγονιδίων 0,85 nl, το ελάχιστο θεωρητικό LOD θα είναι 0,29 cp/ml στο μείγμα PCR. Σε αυτό το επίπεδο συγκέντρωσης το 5% των μετρήσεων δεν θα έχει ούτε ένα αντίγραφο της αλληλουχίας-στόχου στα αναλυθέντα σταγονίδια.

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) είναι η χαμηλότερη ποσότητα ή συγκέντρωση αναλύτη σε ένα δείγμα που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί αξιόπιστα με αποδεκτό επίπεδο ορθότητας και πιστότητας. Κάτι τέτοιο σημαίνει ότι το LOQ μιας μεθόδου dPCR εξαρτάται από το επίπεδο αβεβαιότητας που θεωρείται αποδεκτό, δεδομένης της προβλεπόμενης χρήσης της μεθόδου. Πρακτικά το LOQ μιας μεθόδου dPCR μπορεί να καθοριστεί με τη μέτρηση της σχετικής αβεβαιότητας ενός αποτελέσματος μέτρησης σε χαμηλή συγκέντρωση ή αναλογία αριθμού αντιγράφων. Για ορισμένες πλατφόρμες ο κατασκευαστής μπορεί να παρέχει ενδείξεις σχετικά με το κατώτατο όριο του αριθμού των κλασματοποιήσεων που απαιτούνται για ακριβή ποσοτικοποίηση (Publications Office of the European Union, 2019).

2.2.5. Δυναμικό εύρος ανίχνευσης

Το δυναμικό εύρος ανίχνευσης ορίζεται από τη διαφορά μεταξύ της υψηλότερης και της χαμηλότερης ανιχνεύσιμης συγκέντρωσης ενός μορίου. Η υψηλότερη συγκέντρωση εξαρτάται άμεσα από τον όγκο του μικροδιαμερίσματος, δηλαδή τα μικροδιαμερίσματα με μικρότερους όγκους αντιστοιχούν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μορίων για δεδομένο λ (Pinheiro et al., 2012). Το λ αντιπροσωπεύει τον λόγο των μορίων m ανά θάλαμο n ($\lambda=m/n$) (Quan et al., 2018). Σε αυτό το σημείο είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι ο υψηλότερος αριθμός αλληλουχιών στόχων που ανιχνεύονται είναι πολύ μεγαλύτερος από τον αριθμό των μικροδιαμερισμάτων. Η τιμή αυτή υπολογίζεται με την επίλυση του λ για δεδομένη πιστότητα και αριθμό διαμερισμάτων στην περίπτωση υψηλής πληρότητας των διαμερισμάτων. Για παράδειγμα, για πιστότητα ίση με 12,6%, ο υψηλότερος αριθμός αλληλουχιών στόχων που ανιχνεύονται μπορεί να είναι 5 φορές μεγαλύτερος από 20.000 σταγονίδια που δημιουργούνται (Pinheiro et al., 2012) ή 11 φορές μεγαλύτερος από 106 διαμερίσματα που δημιουργούνται (Heyries et al., 2011). Με βάση αυτές τις εκτιμήσεις, ένα μεγάλο δυναμικό εύρος ανίχνευσης δημιουργεί αντιφατικούς περιορισμούς όσον αφορά τον όγκο των διαμερισμάτων, με τους μεγαλύτερους όγκους διαμερισμάτων να βελτιώνουν το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης και τους μικρότερους να βελτιώνουν το υψηλότερο όριο ανίχνευσης. Αυτή η αντίφαση μπορεί να αντιμετωπιστεί με τον σχεδιασμό dPCR με κλασματοποιήσεις πολλαπλού όγκου, όπου μια σειρά κατατμήσεων μεγάλου όγκου εξασφαλίζει υψηλή ευαισθησία, ενώ μια σειρά κλασματοποιήσεων μικρού όγκου που επιτρέπει υψηλό όριο ανίχνευσης και τέλος, λίγες σειρές κατατμήσεων με ενδιάμεσο όγκο που παρέχουν υψηλή πιστότητα (Kreutz et al., 2011, Shen et al., 2011). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η προσέγγιση αυτή είναι εφάμιλλη με τη διενέργεια μιας σειράς διαφορετικών αραιώσεων ακολουθούμενη από ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο του πιο πιθανού αριθμού (Most Probable Number, MPN). Επιπλέον, η dPCR πολλαπλών όγκων επιτρέπει την αποσύνδεση του δυναμικού εύρους και της πιστότητας της μέτρησης (Kreutz et al., 2011). Από πρακτικής σκοπιάς, η προσέγγιση αυτή μειώνει τον συνολικό αριθμό των κλασματοποιήσεων που απαιτούνται για την επίτευξη ενός συγκεκριμένου δυναμικού εύρους (Quan et al., 2018).

2.3. Πρόσθετες απαιτήσεις απόδοσης

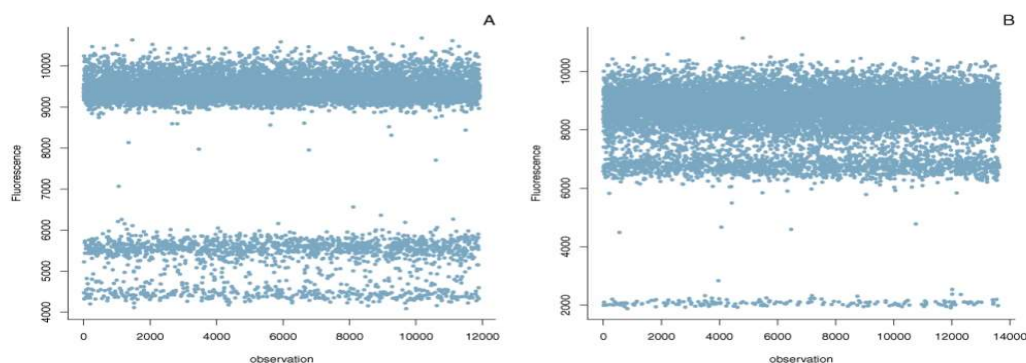
Η dPCR εξακολουθεί να είναι απλώς μια PCR με διαφορετική μορφή, συνεπώς όλες οι προκαθορισμένες ελάχιστες απαιτήσεις επιδόσεων (Minimum Performance Requirements, MPR) (European Network of GMO Laboratories (ENGL) et al., 2015) ισχύουν και στην περίπτωση της dPCR, με εξαίρεση την απόδοση της ενίσχυσης η οποία δεν είναι τόσο σημαντική επειδή η dPCR είναι μια αντίδραση τελικού σημείου. Επομένως, οι δοκιμασίες dPCR πρέπει να συμμορφώνονται - κατά περίπτωση - με αυτές τις MPR, καθώς αποτελούν τεχνικά κριτήρια προκειμένου να διασφαλιστεί ότι η μέθοδος λειτουργεί σωστά πριν προχωρήσει στον προσδιορισμό παραμέτρων όπως το όριο ανίχνευσης (LOD).

Ωστόσο, η dPCR απαιτεί τον καθορισμό ορισμένων πρόσθετων απαιτήσεων απόδοσης, οι οποίες πρέπει να πληρούνται. Εάν η δοκιμασία PCR είναι ειδική και υψηλής απόδοσης, η κύρια πηγή σφαλμάτων στην ψηφιακή ποσοτικοποίηση προκαλείται από την εσφαλμένη ταξινόμηση των μικροδιαμερισμάτων. Για να καταστεί δυνατή η ακριβής ταξινόμηση των μικροδιαμερισμάτων και αντίστοιχα να είναι αξιόπιστη η ποσοτικοποίηση, η μέθοδος θα πρέπει να ικανοποιεί διάφορα κριτήρια που σχετίζονται με τα ακόλουθα αποτελέσματα της απλής dPCR: i. Ενιαίο προϊόν ενίσχυσης (θα πρέπει να υπάρχουν μόνο δυο πληθυσμοί φθορισμού), ii. Διαχωριστική ικανότητα (ως μέτρο διαχωρισμού μεταξύ θετικών και αρνητικών) και iii. η ποσότητα των ακαθόριστων θαλάμων ή της «βροχής» (δηλαδή των σταγονιδίων/θαλάμων που έχουν ενδιάμεσο φθορισμό και δεν φαίνεται να ανήκουν ούτε στον θετικό ούτε στον αρνητικό πληθυσμό). Δυο επιπλέον κριτήρια, τα οποία ισχύουν για κάθε αντίδραση και αξιολογούνται μετά το τέλος της αντίδρασης είναι: iv. η συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου και v. η ποσότητα του δείγματος που κλασματοποιήθηκε. Τα περισσότερα από τα παραπάνω κριτήρια βασίζονται στις MPR της qPCR, στην οποία το σχετικό σφάλμα πρέπει να είναι μικρότερο ή ίσο με 25% (Publications Office of the European Union, 2019).

2.3.1. Προϊόν ενίσχυσης μοναδικού στόχου

Σε μια αντίδραση qPCR, ο φθορισμός που μετράται είναι το άθροισμα όλων των διαδικασιών ενίσχυσης στο μείγμα της αντίδρασης. Επομένως είναι αδύνατο να γίνει διάκριση μεταξύ διαφορετικών προϊόντων ενίσχυσης που προκύπτουν από τους ίδιους συνδυασμούς εκκινητών-ανιχνευτών στην ίδια αντίδραση (π.χ. ενίσχυση στενά

συνδεδεμένων αλληλουχιών). Στην dPCR η κλασματοποίηση επιτρέπει μια τέτοια διάκριση. Τα προϊόντα μη ειδικής ενίσχυσης (δηλαδή μη τέλεια συμπληρωματικότητα) συνήθως ενισχύονται με χαμηλότερη απόδοση, γεγονός που οδηγεί σε ένα τελικό σημείο φθορισμού που είναι χαμηλότερο από εκείνο του πραγματικού στόχου (μετά από μια τυπική αντίδραση 45 κύκλων). Κατά συνέπεια, αυτά τα προϊόντα ενίσχυσης εμφανίζονται στην dPCR ως ένας πρόσθετος (διακριτός) πληθυσμός μικροδιαμερισμάτων/σταγονιδίων μεταξύ των αρνητικών και των πραγματικά θετικών (**Εικόνα 11**). Η παρουσία πολλαπλών πληθυσμών μπορεί να περιπλέξει την ψηφιακή ανάλυση, να επηρεάσει τον διαχωρισμό των θετικών από τα αρνητικά και τελικά να οδηγήσει σε εσφαλμένη ταξινόμηση των διαμερισμάτων / σταγονιδίων (Publications Office of the European Union, 2019).



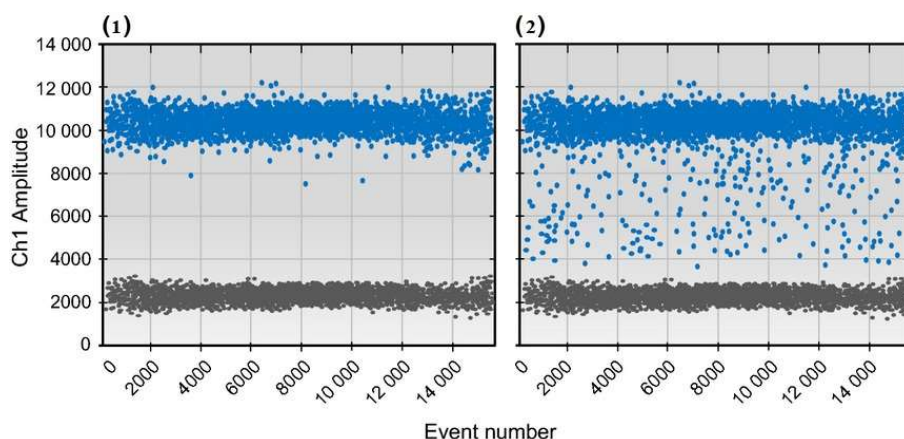
Εικόνα 11: Απεικόνιση πολλαπλών πληθυσμών φθορισμού.

Στο διάγραμμα Α που παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τον στόχο *acr1*, είναι ορατός ένας πρόσθετος πληθυσμός μετρήσεων φθορισμού με τιμές που βρίσκονται κοντά στα αρνητικά. Στο διάγραμμα Β που παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τον στόχο *cruciferin (cruA)*, ένας πρόσθετος πληθυσμός μετρήσεων φθορισμού είναι ορατός με τιμές που βρίσκονται κοντά στα θετικά. Σε αντίθεση με τη «βροχή», αυτό το είδος φθορισμού δεν κατανέμεται ομοιόμορφα μεταξύ των αρνητικών και των πραγματικά θετικών, αλλά εμφανίζεται με πιο διακριτό τρόπο (Publications Office of the European Union, 2019).

2.3.2. Εύρος της «βροχής»

Σε πολλές αντιδράσεις dPCR υπάρχουν μικροδιαμερίσματα που φαινομενικά δεν ανήκουν ούτε στον θετικό ούτε στον αρνητικό πληθυσμό. Αυτά τα μικροδιαμερίσματα έχουν ένα ενδιάμεσο επίπεδο φθορισμού και αναφέρονται στην καθομιλουμένη ως «βροχή» ή «σύρσιμο» (**Εικόνα 12**). Η «βροχή» αντιπροσωπεύει μικροδιαμερίσματα με ενδιάμεσο φθορισμό που αψηφούν την ευθεία ταξινόμηση είτε ως θετικά είτε ως αρνητικά. Σε αντίθεση με τα ανεπιθύμητα προϊόντα ενίσχυσης, η «βροχή» δεν φαίνεται να έχει έντονη κατανομή, αλλά συχνά κατανέμεται εξίσου μεταξύ θετικών και αρνητικών (Publications Office of the European Union, 2019). Η εμφάνιση της βροχής μπορεί, για παράδειγμα, να αποδοθεί σε καθυστερημένη έναρξη της PCR λόγω μερικής αναστολής σε ορισμένο

αριθμό μικροδιαμερισμάτων. (Dreo et al., 2014, Dingle et al., 2013). Επιπλέον, τα πειράματα δείχνουν ότι μετά από μια τυπική αντίδραση (40 ή 45 κύκλοι) το νέφος των αρνητικών μπορεί να φιλοξενεί ακόμη ένα πληθυσμό αποτελούμενο από τμήματα βροχής που δεν είχαν το χρόνο να συσσωρευθούν φθορισμό πάνω από το βασικό επίπεδο. Έτσι, το κύριο ερώτημα που σχετίζεται με το πόση βροχή είναι ανεκτή μετατρέπεται στο πόσα τμήματα βροχής «κρύβονται» στο αρνητικό νέφος (και επομένως πάντα ταξινομούνται λανθασμένα). Για να τεθεί ένα όριο στην ποσότητα της βροχής που μπορεί να επιτραπεί στις αντιδράσεις dPCR, εξετάζεται η εσφαλμένη ταξινόμηση των μικροδιαμερισμάτων. Πειράματα προσομοίωσης δείχνουν ότι σε επίπεδο ποσοτικοποίησης 1%, μπορεί να γίνει ανεκτή βροχή περίπου 2,5% (ποσοστό επί του συνόλου των μικροδιαμερισμάτων) πριν επιτευχθεί σφάλμα ποσοτικοποίησης 25% (Lievens et al., 2016).

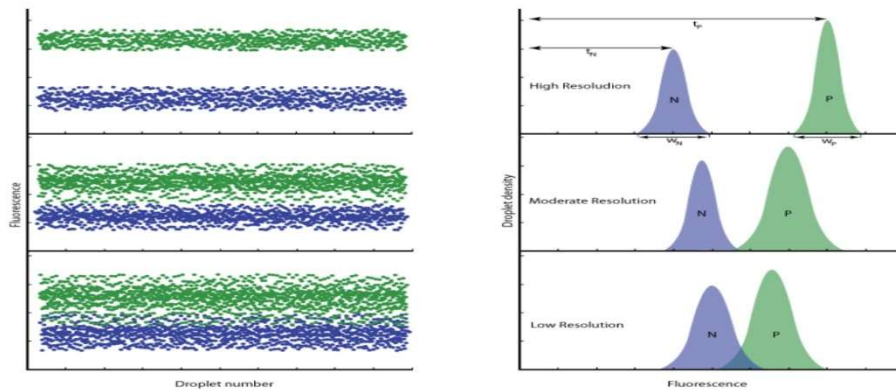


Εικόνα 12: Απεικόνιση διασποράς αποτελεσμάτων ddPCR ενδιάμεσου φθορισμού («βροχής»). Παραδείγματα δεδομένων από δοκιμασίες ddPCR για απόλυτο ποσοτικό προσδιορισμό. Διαγράμματα διασποράς του αριθμού συμβάντων (σταγονίδια) συναρτήσει του πλάτους φθορισμού για (1) μια ιδανική ανάλυση με σαφή διαχωρισμό των θετικών (μπλε) και αρνητικών (γκρι) σταγονιδίων και (2) μια ανάλυση με άφθονα ενδιάμεσα σταγονίδια («βροχή») που εμπίπτουν μεταξύ των θετικών και αρνητικών ζωνών (Koch et al., 2015).

2.3.3. Διαχωριστική ικανότητα (Resolution)

Η διαχωριστική ικανότητα είναι μια έννοια από την υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) η οποία χρησιμοποιείται στην dPCR όταν εφαρμόζεται στα διαγράμματα πυκνότητας φθορισμού των σταγονιδίων. Η διαχωριστική ικανότητα μιας ψηφιακής ανάλυσης (R_s) είναι ένα ποσοτικό μέτρο του πόσο καλά μπορούν να διαφοροποιηθούν δυο πληθυσμοί (θετικοί και αρνητικοί), στο εφεξής αναφερόμενοι ως κορυφές, σε ένα γραφικό διαχωρισμό. Ως διαχωριστική ικανότητα ορίζεται η διαφορά φθορισμού μεταξύ των δυο κορυφών, διαιρούμενη με το συνδυασμένο

πλάτος των κορυφών: $R_s = [2 \cdot (t_p - t_n)] / (w_p + w_n)$ όπου ο δείκτης p υποδηλώνει τον πληθυσμό με τον υψηλότερο φθορισμό (θετικό, σε αντίθεση με το n για τα αρνητικά). Οι μεταβλητές t και w είναι ο μέγιστος φθορισμός και το πλάτος της κορυφής αντίστοιχα (Εικόνα 13). Ουσιαστικά, η διαχωριστική ικανότητα αντιστοιχεί στο πόσο καλά διαχωρίζεται ο φθορισμός των πληθυσμών των σταγονιδίων. Μια διαχωριστική ικανότητα της τάξης του 2 αντιπροσωπεύει πλήρη διαχωρισμό (προτείνεται το $R_s=2$ ως ελάχιστο όριο για να υπάρχει περιθώριο ελάττωσης της διαχωριστικής ικανότητας σε πιο δύσκολα δείγματα). Για $R_s=2,5$ υπάρχει υψηλή διαχωριστική ικανότητα και για $R_s=0,5$ υπάρχει χαμηλή διαχωριστική ικανότητα (Publications Office of the European Union, 2019).



Εικόνα 13: Απεικόνιση της έννοιας της διαχωριστικής ικανότητας.

Τα γραφήματα αριστερά απεικονίζουν την ανάγνωση των μικροδιαμερισμάτων / σταγονιδίων και τα γραφήματα δεξιά απεικονίζουν τα αντίστοιχα διαγράμματα πυκνότητας. Τα t_n και t_p αντιπροσωπεύουν τις θέσεις φθορισμού με την υψηλότερη πυκνότητα στα αρνητικά και θετικά ζεύγη νέφη μικροδιαμερισμάτων / σταγονιδίων αντίστοιχα. Τα w_n και w_p αντιπροσωπεύουν το πλάτος των κορυφών πυκνότητας στη βάση τους (Lievens et al., 2016)

2.3.4. Συγκέντρωση στόχου

Όπως αναφέρεται σε διάφορες εργασίες (Dube et al., 2008, Jacobs et al., 2014) υπάρχει μια βέλτιστη συγκέντρωση μορίων-στόχων ανά μικροδιαμέρισμα που θα πρέπει να αποδίδει τη μικρότερη τυχαία δειγματοληπτική μεταβλητότητα και συνεπώς, τα στενότερα όρια εμπιστοσύνης. Αυτή η βέλτιστη τιμή του λ για απόλυτο ποσοτικό προσδιορισμό είναι περίπου 1,6, εάν η τυχαία δειγματοληπτική διακύμανση, όπως περιγράφεται από την κατανομή κατά Poisson, είναι η μόνη πηγή μεταβλητότητας. Για μέγεθος κατανομής 0,85 nl (ddPCR), η βέλτιστη τιμή συγκέντρωσης είναι περίπου 1.870 αντίγραφα στόχου ανά μ l ή 37.400 αντίγραφα ανά 20 μ l συνολικού μείγματος αντίδρασης.

Για μέγεθος κατανομής 6 nl (cdPCR), η τελική συγκέντρωση είναι περίπου 265 αντίγραφα στόχου ανά μl ή 2.650 αντίγραφα ανά 10 μl συνολικού μείγματος αντίδρασης για βέλτιστες συνθήκες. Ένα ανώτερο και ένα κατώτερο όριο για τη βέλτιστη ποσοτικοποίηση μπορεί να υπολογιστεί εξετάζοντας το σύνολο των αντιδράσεων που έχουν σφάλμα άνω του 25% λόγω της διακύμανσης Poisson (Lievens et al., 2016).

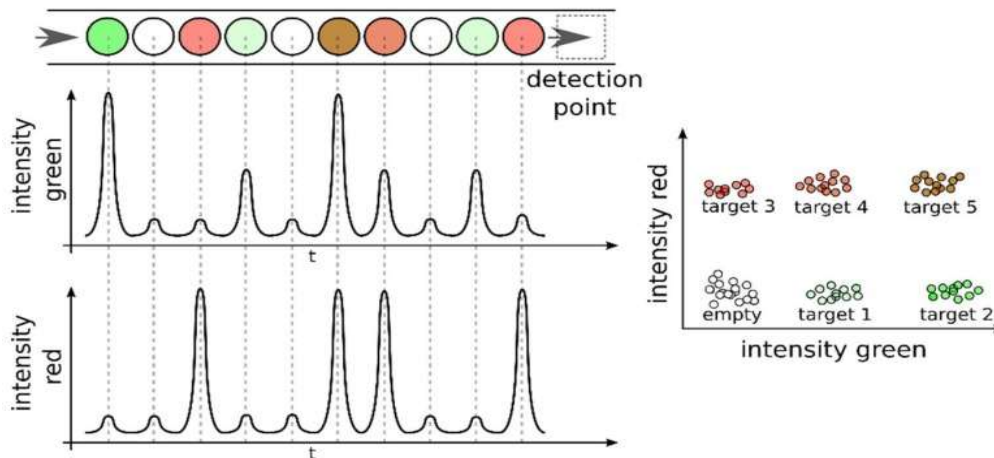
2.3.5. Ποσότητα κλασματοποιημένου δείγματος

Τόσο τα συστήματα dPCR με σταγονίδια όσο και τα συστήματα με μικροδιαμερίσματα υπόκεινται σε μεταβλητότητα ως προς τον αριθμό κλασματοποιήσεων που δημιουργούνται ή/και γίνονται αποδεκτές στην ανάλυση. Επιπλέον, οι περισσότερες τεχνικές κλασματοποίησης έχουν έναν ορισμένο «νεκρό όγκο». Κατά συνέπεια, και σε αντίθεση με την qPCR, δεν αναλύεται ολόκληρος ο όγκος του δείγματος. Κάτι τέτοιο ουσιαστικά αντιστοιχεί σε μια μορφή υποδειγματοληψίας, η οποία με τη σειρά της μπορεί να προσθέσει διακύμανση ή σφάλμα στον ποσοτικό προσδιορισμό, ιδίως για αντιδράσεις με στόχους πολύ χαμηλής συγκέντρωσης. Μπορούμε να εκφράσουμε τον αριθμό των μικροδιαμερισμάτων στην ανάλυση με σχετικό τρόπο, δηλαδή ως τον λόγο του διαμερισματοποιημένου δείγματος, το οποίο ορίζεται ως εξής: ο συνολικός όγκος των μικροδιαμερισμάτων που έγιναν δεκτά στην ανάλυση προς τον συνολικό όγκο που φορτώθηκε στη συσκευή (Publications Office of the European Union, 2019).

2.4. Προσεγγίσεις για πολυπλεξία στην dPCR

Στις πολυπλεχτικές δοκιμασίες dPCR, οι διαφορετικές αλληλουχίες στόχοι μπορούν να κωδικοποιηθούν όχι μόνο με διαφορετικά χρώματα φθορισμού, αλλά και με διαφορετικές εντάσεις φθορισμού (Taly et al., 2013, Zhong et al., 2011). Η στρατηγική αυτή καθίσταται δυνατή με την απομόνωση των αλληλουχιών στόχων σε ανεξάρτητους μικροαντιδραστήρες σε συνδυασμό με την ανίχνευση τελικού σημείου (φάση πλατό της PCR). Ο συνολικός αριθμός στόχων σε μια μόνο αντίδραση είναι ένας συνδυασμός του αριθμού χρωμάτων και του αριθμού των εντάσεων που μπορούν να διακριθούν (Madic et al., 2016) (**Εικόνα 14**). Η ένταση του φθορισμού του σήματος ελέγχεται μέσω της συγκέντρωσης των φθορίζοντων ανιχνευτών (Zhong et al., 2011, Sint et al., 2012). Εναλλακτικά, οι χρωστικές παρεμβολής DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διάκριση των προϊόντων διαφορετικού μεγέθους, επειδή ο παραγόμενος φθορισμός είναι ανάλογος του αριθμού των μορίων στα οποία έχει παρεμβληθεί χρωστική (McDermott et

al., 2013). Η πολλαπλή ανίχνευση αλληλουχιών στόχων στην dPCR μπορεί να εφαρμοστεί με διάφορα σχήματα ανάλογα με τις απαιτήσεις κάθε πειράματος (Whale et al., 2016).



Εικόνα 14: Πολυπλεχτικές δοκιμασίες ddPCR.

Η παράλληλη ανίχνευση αλληλουχιών στην dPCR καθίσταται δυνατή με την κωδικοποίηση του επιπέδου φθορισμού της φάσης πλατό, επειδή η dPCR μπορεί να εφαρμοστεί ως δοκιμασία μη ανταγωνιστικού τύπου, όπου κάθε στόχος απομονώνεται σε διαφορετικά τμήματα (Quan et al., 2018).

2.5. Εξέλιξη τεχνολογίας κατανομής δείγματος στην dPCR

Η βασική αρχή της dPCR είναι η κατανομή ενός δείγματος σε πολλαπλά κλάσματα. Αρχικά, οι κλασματοποιήσεις δημιουργήθηκαν με τη χειροκίνητη κατανομή ενός δείγματος σε ένα αριθμό βοθρίων (Vogelstein & Kinzler, 1999). Σήμερα, η χειροκίνητη κατανομή εφαρμόζεται στην περίπτωση σύνθετων πρωτοκόλλων, όπως αυτά που χρησιμοποιούν προσεγγίσεις παρόμοιες με αυτής της nested PCR που δεν μπορούν να υιοθετηθούν σε μια αυτοματοποιημένη πλατφόρμα. Παράδειγμα τέτοιου πρωτοκόλλου χειροκίνητης επαναλαμβανόμενης δειγματοληψίας αποτελεί η dPCR που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του ενσωματωμένου DNA του HIV (Agosto et al., 2007, De Spiegelaere et al., 2014). Ωστόσο, η χειροκίνητη δημιουργία πολλών κλασματοποιήσεων είναι πολύ χρονοβόρα και επίπονη. Την τελευταία δεκαετία έχουν εμφανιστεί αυτοματοποιημένα συστήματα και διάφορες τεχνολογίες και οι μέθοδοι διευρύνονται από διάφορες εταιρείες για την ψηφιοποίηση της dPCR. Οι διαθέσιμες σήμερα ψηφιακές πλατφόρμες διαφέρουν ως προς τον αριθμό μικροδιαμερισμάτων, τη μέθοδο δημιουργίας τους ή τον απαιτούμενο εξειδικευμένο εξοπλισμό (Rutsaert et al., 2018).

Παρόλο που η πρόσφατη ανάπτυξη της dPCR υποστηρίχθηκε από την πρόοδο στη σμίκρυνση των συσκευών, η ιδέα της dPCR έχει αναπτυχθεί (Sykes et al., 1992, Vogelstein & Kinzler, 1999) χρησιμοποιώντας μικροσωλήνες (Sykes et al., 1992) ή μικροπλάκες 384 βοθρίων (Vogelstein & Kinzler, 1999, Shih et al., 2001, Zhou et al., 2001, Singer et al., 2002, Chang et al., 2002a, Chang et al., 2002b). Αυτές οι μορφές μειονεκτούν λόγω του περιορισμένου αριθμού διαμερισμάτων, της περιορισμένης αυτοματοποίησης και του κόστους που συνδέεται με τη μεγάλη ποσότητα αντιδραστήριου που απαιτείται. Η μικρορευστονική, δηλαδή η τεχνολογία χειρισμού ρευστών σε μικροποσότητες (Hong & Quake, 2003), επέτρεψε τη μαζική και παράλληλη κατάτμηση των δειγμάτων και την εμφάνιση των πλατφορμών dPCR. Η μικρορευστονική στηρίζεται σε τεχνικές μικροκατασκευής προσαρμοσμένες από τη μικροηλεκτρονική και η υλοποίησή της βασίζεται είτε στη γρήγορη κατασκευή πρωτοτύπων με μαλακή λιθογραφία σε πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS) (Duffy et al., 1998), είτε σε χάραξη γυαλιού (Du et al., 2009), είτε σε χύτευση με έγχυση (Hindson et al., 2011). Πολυάριθμες ενεργές και παθητικές μικρορευστονικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τη κλασματοποίηση δειγμάτων, από φυσικά χωρίσματα έως σταγονίδια υγρών. Οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους επιτρέπουν την αυτοματοποίηση και την περιορισμένη χρήση αντιδραστήριων.

Πριν από την ανασκόπηση των διαφόρων αρχών και μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία κλασματοποιήσεων αξίζει να αναφερθούν ορισμένες προσεγγίσεις χωρίς κλασματοποιήσεις. Για παράδειγμα, σε μια πρώιμη προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε ένα τριχοειδές από λιωμένο διοξείδιο του πυριτίου, που χρησιμοποιείται συνήθως για τριχοειδή ηλεκτροφόρηση, ως δοχείο αντίδρασης για την εκτέλεση PCR σε αραιωμένα μόρια DNA. Ο αριθμός των ενισχυμένων μορίων καταμετρήθηκε έπειτα από ηλεκτρομετανάστευση χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή φθορισμού (Li et al., 2001). Αυτή η στρατηγική βασίζεται στην περιορισμένη διάχυση των προϊόντων που παράχθηκαν κατά την αντίδραση, τα οποία μεταναστεύουν συνολικά ως πώμα κατά την ηλεκτροφόρηση. Το σήμα είναι μια διαδοχή κορυφών που αντιστοιχεί στον αριθμό των αλληλουχιών στόχων στο δείγμα. Μια πιο πρόσφατη προσέγγιση βασίζεται στον μετασχηματισμό των αλληλουχιών στόχων σε νανοσφαιρίδια DNA 1μm με Rolling Circle Amplification (RCA) (Jarvis et al., 2006). Τα νανοσφαιρίδια DNA μπορούν στη συνέχεια να καταμετρηθούν σε μικροσκόπιο ή κυτταρόμετρο ροής.

Στην ενότητα που ακολουθεί, γίνεται διάκριση ανάμεσα στη φυσική κατάτμηση όπου η αντίδραση χωρίζεται σε απομονωμένα μικροδιαμερίσματα, από τα γαλακτώματα σταγονιδίων που μπορούν να συλλεχθούν εκτός συσκευής.

2.5.1. Συσκευές που χρησιμοποιούν μικροδιαμερίσματα

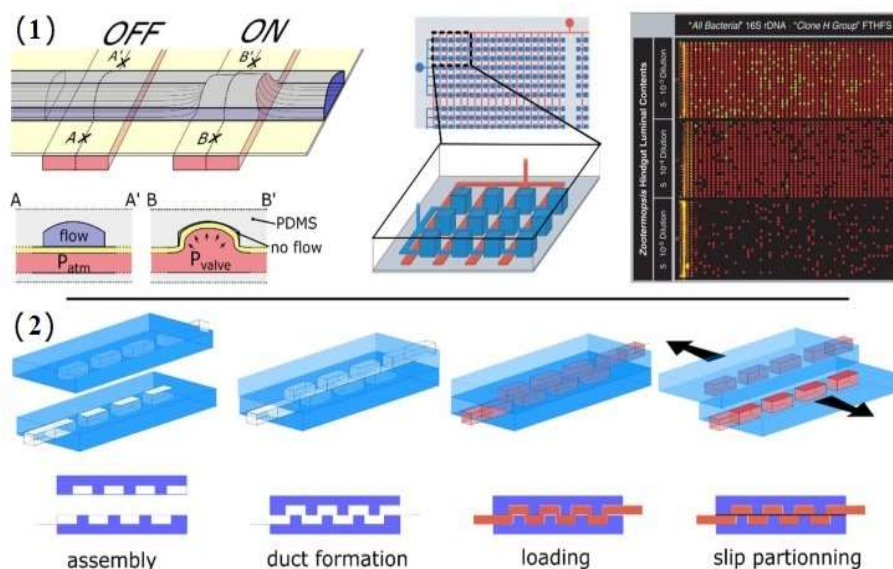
Η εκτέλεση dPCR σε μικροδιαμερίσματα περιλαμβάνει την πλήρωση της συσκευής, την κατανομή του δείγματος, την αντίδραση της PCR και την ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Οι συγκεκριμένες μέθοδοι διαχωρισμού χωρίζονται σε ενεργές, που περιλαμβάνουν είτε αναδιαμόρφωση της συσκευής, είτε μηχανική ενεργοποίηση, και σε παθητικές μεθόδους διαχωρισμού που διέπονται από ιδιότητες των ρευστών. Επιπλέον μπορεί να γίνει διάκριση και σε μεθόδους αυτοδιαχωρισμού οι οποίες περιλαμβάνουν τόσο την παθητική πλήρωση όσο και τον ενεργητικό διαχωρισμό (Quan et al., 2018).

Πλατφόρμες ενεργού διαχωρισμού

Μια από τις πρώτες μικρορευστονικές dPCR συσκευές βασίστηκε στη χρήση μικρορευστονικών βαλβίδων που δημιουργήθηκαν με την επικάλυψη ενός δικτύου για το ρευστό και ενός δικτύου ελέγχου μικρορευστονικών καναλιών κατασκευασμένων από το ελαστομερές υλικό PDMS (Unger et al., 2000). Αυτά τα δίκτυα χωρίζονται από μια λεπτή μεμβράνη που μπορεί να μετατραπεί σε ένα μικρορευστονικό κανάλι εφαρμόζοντας πίεση στο αντίθετο κανάλι ελέγχου για να δημιουργηθεί μια βαλβίδα “on – off” (**Εικόνα 15.1**). Η διαδικασία περιλαμβάνει: 1. πλήρωση όλων των μικροδιαμερισμάτων με το μείγμα της αντίδρασης 2. πίεση στο δίκτυο ελέγχου, το οποίο κλείνει τη σύνδεση μεταξύ των μικροδιαμερισμάτων, τα οποία με αυτόν τον τρόπο απομονώνονται το ένα από το άλλο. Μια τέτοια συσκευή επέτρεψε τη δημιουργία 14.112 μικροδιαμερισμάτων όγκου 6,25 nl το καθένα. Η διακύμανση του όγκου των διαμερισμάτων εξαρτάται από την ακρίβεια που υπάρχει κατά τη διαδικασία της μαλακής λιθογραφίας (Duffy et al., 1998), η οποία χρησιμοποιείται για την κατασκευή.

Η πλατφόρμα SlipChip (Du et al., 2009) χρησιμοποιεί επίσης μια προσέγγιση ενεργού διαχωρισμού (**Εικόνα 15.2**). Η διάταξη αποτελείται από δυο μισά τσιπ, στο καθένα από τα οποία έχουν χαραχθεί δυο ανεξάρτητες συστοιχίες μικροκυψελών (Shen et al., 2010). Το τσιπ συναρμολογείται με την επαφή και την ευθυγράμμιση των συστοιχιών των δυο μισών, έτσι ώστε οι θάλαμοι από τα αντίθετα μισά να σχηματίζουν προσωρινά συνεχή ελικοειδή μικρορευστονικά κανάλια. Το δείγμα και το μείγμα με τα αντιδραστήρια ρέουν

στη συνέχεια μέσω ανεξάρτητων μικρορευστονικών δικτύων και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε συστοιχίες ανεξάρτητων μικροδιαμερισμάτων με την ολίσθηση των δυο μισών. Η περαιτέρω ολίσθηση εξασφαλίζει την επικάλυψη του δείγματος και των συστοιχιών PCR δημιουργώντας μια ενιαία συστοιχία ανεξάρτητων μικροαντιδραστήρων. Το τσιπ συναρμολογείται σε ορυκτέλαιο, το οποίο λιπαίνει το σύστημα κατά την ολίσθηση και εξασφαλίζει την απομόνωση των μικροδιαμερισμάτων. Η κλασματοποίηση επιτυγχάνεται αποτελεσματικά με μηχανική διάτμηση που εφαρμόζεται κατά τη διάρκεια της ολίσθησης. Αυτή η προσέγγιση επέτρεψε τη δημιουργία 1.280 μικροδιαμερισμάτων των 2,6 nl χωρίς την ανάγκη βαλβίδων και αντλιών, με δυνατότητα δημιουργίας έως και 16.384 μικροδιαμερισμάτων όγκου πικολίτρων (Shen et al., 2010).



Εικόνα 15: Πλατφόρμες ενεργού διαχωρισμού.

1. Σχηματική αναπαράσταση μιας βαλβίδας push-up σε ένα μικρορευστονικό τσιπ από PDMS. Αριστερά: Τα κανάλια ελέγχου (κόκκινο) διαχωρίζονται από τα ρευστονικά κανάλια (μπλε) με μια λεπτή εύκαμπτη μεμβράνη (κίτρινο). Η ροή μέσω του ρευστονικού καναλιού είναι ανεμπόδιστη εάν το κανάλι ελέγχου δεν βρίσκεται υπό πίεση (βαλβίδα OFF). Όταν το κανάλι ελέγχου βρίσκεται υπό πίεση, η λεπτή μεμβράνη PDMS παραμορφώνεται και διογκώνεται μέσα στο ρευστονικό κανάλι, εμποδίζοντας τη ροή (βαλβίδα ON). Όπως απεικονίζεται στο κάτω σχήμα, επιτυγχάνεται στεγανή σφράγιση εάν η κορυφή του ρευστονικού καναλιού είναι στρογγυλεμένη. Μέση: Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει πολλούς παράλληλους θαλάμους (μπλε) συνδεδεμένους μέσω καναλιών σε μια ενιαία είσοδο. Το δίκτυο καναλιών ελέγχου (κόκκινο) δημιουργεί βαλβίδες μεταξύ κάθε θαλάμου που επιτρέπουν τον καταμερισμό του περιεχομένου τους σε ανεξάρτητους μικροαντιδραστήρες PCR. Δεξιά: Τρεις πίνακες με 1176 μικροθαλάμους ο καθένας, παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της dPCR σε δείγματα που συλλέχθηκαν από ένα μόνο τερμίτη (*Z. nevadensis*). 2. Η συσκευή SlipChip βασίζεται σε δυο μισά τσιπ που περιέχουν συστοιχίες ανοικτών θαλάμων. Δημιουργούνται προσωρινοί αγωγοί ή κανάλια όταν τα δυο μέρη ευθυγραμμίζονται και έρχονται σε επαφή ενώ είναι βυθισμένα σε ορυκτέλαιο. Το δείγμα και τα αντιδραστήρια εγχέονται πριν την αναδιαμόρφωση της συσκευής με ολίσθηση. Η ολίσθηση δημιουργεί συστοιχίες ανεξάρτητων μικροαντιδραστήρων. Η συσκευή μπορεί να ολισθαίνει περαιτέρω για να φέρει τις δυο ανεξάρτητες συστοιχίες (που περιέχουν αντιδραστήριο και δείγμα) σε επαφή για να ενεργοποιηθεί η ανάμιξη (δεν φαίνεται) (Quan et al., 2018).

Πλατφόρμες παθητικού διαχωρισμού

Ο παθητικός διαχωρισμός δεν βασίζεται σε μηχανικές μεθόδους. Χρησιμοποιεί φαινόμενα που διέπουν τα ρευστά για τη δημιουργία επιμέρους όγκων. Συστοιχίες μικροκυψελών έχουν χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία μικροδιαμερισμάτων είτε με ενεργητικές είτε με παθητικές μεθόδους. Αυτή η διάταξη μπορεί να θεωρηθεί ως άμεση σμίκρυνση μιας μικροπλάκας 384 βοθρίων, όπου ο όγκος των μεμονωμένων πηγαδιών κυμαίνεται από pL έως nL (Morrison et al., 2006, Jackman et al., 1998). Η βασική διαφορά από την αντίστοιχη μικροπλάκα 384 βοθρίων είναι ότι τα βοθρία της μικροπλάκας φορτώνονται συνήθως ταυτόχρονα για να αξιοποιηθεί πλήρως η δυνατότητα παράλληλης δραστηριότητας που προσφέρει αυτή η προσέγγιση. Κάτι τέτοιο όμως, απαιτεί μια μέθοδο που απομονώνει τα βοθρία μεταξύ τους και αποτρέπει την ταχεία εξάτμιση μικροσκοπικών όγκων. Για να υποστηριχθεί η αποτελεσματική πλήρωση και ο διαχωρισμός των βοθρίων, είναι απαραίτητο να υπάρχουν διαφορετικές επιφανειακές ιδιότητες μεταξύ του εσωτερικού του φρεατίου που πρέπει να είναι υδρόφιλο και της άνω επιφάνειας της συστοιχίας (μεταξύ των βοθρίων) που πρέπει να είναι υδρόφοβη (Jackman et al., 1998, Akagi et al., 2004, Cohen et al., 2010).

Η ανοιχτή μορφή της συστοιχίας των μικροκυψελών αποτέλεσε τη βάση τόσο για πλατφόρμες ενεργού όσο και παθητικού διαχωρισμού. Οι κλασματοποιήσεις δημιουργήθηκαν ενεργά με την έγχυση της υδατικής φάσης στις μικροκυψέλες, οι οποίες είχαν επιστρωθεί εκ των προτέρων με ένα μη αναμίξιμο έλαιο (Matsubara et al., 2004). Εναλλακτικά, ο διαχωρισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί με την επικόλληση μιας γυάλινης αντικειμενοφόρου πλάκας (Kinpara, 2004), μιας παραμορφώσιμης μεμβράνης (Wiktor et al., 2015) ή μιας ταινίας ευαίσθητης στην πίεση (Dimov et al., 2014), μετά τη φόρτωση του μίγματος της αντίδρασης.

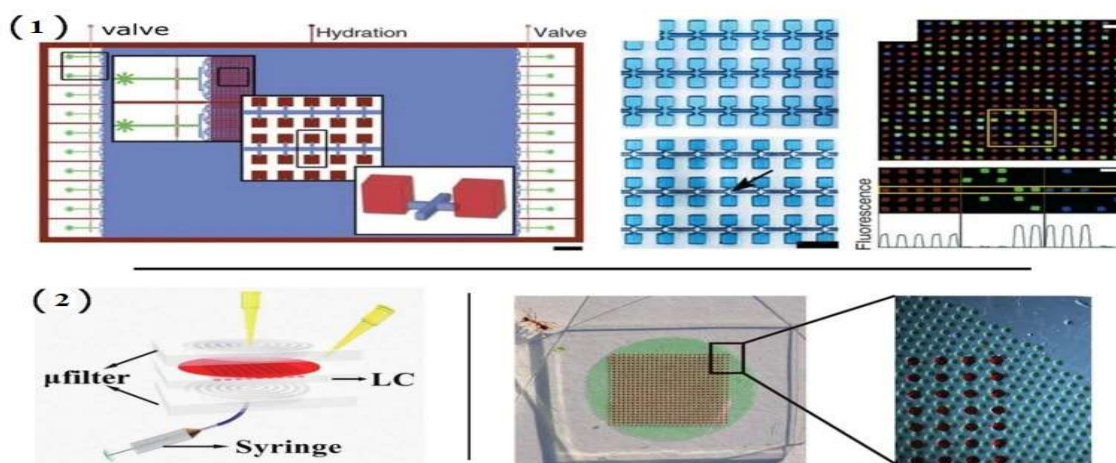
Σε αντίθεση με αυτές τις ενεργές στρατηγικές, ο διαχωρισμός με αυτή την προσέγγιση μπορεί να πραγματοποιηθεί παθητικά με τη χρήση ενός μη αναμίξιμου ελαίου, το οποίο επικαλύπτει την υδατική φάση στα μικροδιαμερίσματα μετά τη φόρτωση. Το έλαιο διαβρέχει κατά προτίμηση την κορυφή της διάταξης και δημιουργεί ένα μηνίσκο που εκτοπίζει την υδατική φάση, ωστόσο, η τριπλή γραμμή έλαιο/υδατική φάση/στερεά φάση (oil/aqueous phase/solid triple line) καθηλώνεται μεταξύ των υδρόφιλων και των υδρόφοβων περιοχών (Jackman et al., 1998, Ostuni et al., 2001). Η διεπιφάνεια υγρού - υγρού επεκτείνεται κατά μήκος της τριπλής γραμμής έως ότου φτάσει σε ένα άλλο

υδρόφοβο σημείο όπου θα δημιουργηθεί μια άλλη διαδιδόμενη τριπλή γραμμή (Reddy et al., 2005). Το έλαιο κινείται στην υδρόφοβη επιφάνεια της συστοιχίας και γύρω από τα στόμια των βοθρίων για να δημιουργήσει μια κίνηση σάρωσης που εκτοπίζει την περίσσεια της υδατικής φάσης.

Καθήλωση επίσης εμφανίζεται όταν μια τριπλή γραμμή συναντά μια απότομη αλλαγή τοπολογίας ή κατεύθυνσης καναλιού (Sposito & DeVoe, 2017, Vulto et al., 2011). Η καθήλωση μπορεί έτσι να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση αδιέξοδων μικροδιαμερισμάτων σε ένα μικρορευστονικό δίκτυο χάρη στην τοπολογία του κύριου καναλιού και των θαλάμων (Heyries et al., 2011) (**Εικόνα 16.1**). Σε αυτή τη διαμόρφωση, το φιλμ λαδιού καθηλώνεται στα στόμια των μικροδιαμερισμάτων. Αυτή η στρατηγική αυξάνει σημαντικά την πυκνότητα των μικροδιαμερισμάτων μειώνοντας το μέγεθος του κύριου καναλιού σε σύγκριση με τις μικρορευστονικές βαλβίδες που απαιτούν ένα ελάχιστο άνοιγμα ή πλάτος για να παραμορφωθούν αποτελεσματικά. Η μέθοδος αυτή είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία έως και 1 εκατομμυρίου μικροδιαμερισμάτων με όγκο της τάξης των pL, με τυπική απόκλιση όγκου ίση με ένα μικρό επί τοις εκατό ποσοστό (Heyries et al., 2011). Ο πολύ μεγάλος αριθμός μικροδιαμερισμάτων επιτρέπει απαράμιλλη ακρίβεια και θεωρητικό δυναμικό εύρος έως και 7 logs. Εκτός από την πολύ υψηλότερη πυκνότητα θαλάμων, η συγκεκριμένη στρατηγική απαιτεί μια απλούστερη διαδικασία κατασκευής σε σχέση με τις βαλβίδες πεπιεσμένου αέρα.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η πλήρωση των μικροδιαμερισμάτων σε τόσο μικρή κλίμακα δεν είναι εύκολη και περιορίζεται από τριχοειδή φαινόμενα (Reddy et al., 2005). Πρακτικά, το υγρό που εγχύεται πρέπει να επιτρέπει στον αέρα να εξέρχεται με συντονισμένο τρόπο. Η απαίτηση αυτή μετριάζεται με τη χρήση του DPMS, ενός ελαστομερούς διαπερατού στα αέρια. Τα μικροδιαμερίσματα γεμίζουν πιέζοντας το εισερχόμενο υγρό, το οποίο με τη σειρά του πιέζει τον αέρα προς τα έξω μέσω του υλικού. Εναλλακτικά, η συσκευή μπορεί να συσκευαστεί υπό κενό (Zhu et al., 2012) ή μπορεί να εφαρμοστεί κενό σε θάλαμο που βρίσκεται κάτω από μια συστοιχία μικροδιαμερισμάτων για να οδηγηθούν στην πλήρωση (Tian et al., 2015) (**Εικόνα 16.2**). Με την προσέγγιση αυτή αποφεύγεται ο κίνδυνος απώλειας του δείγματος μέσω μιας μικρής διαρροής. Το PDMS παρουσιάζει ωστόσο αρκετά μειονεκτήματα: 1. το DNA και οι πρωτεΐνες τείνουν να απορροφηθούν στην υδρόφοβη επιφάνειά του εάν δεν προεπωαστεί κατάλληλα με διάλυμα BSA (Ostuni et al., 2001, Ma et al., 2017), το οποίο με τη σειρά του μπορεί να

επηρεάσει τις επιφανειακές του ιδιότητες, 2. είναι διαπερατό στο νερό και η εξάτμιση πρέπει να μετριάζεται με την ενσωμάτωση δεξαμενών νερού (Gansen et al., 2012) και φραγμών φτιαγμένων από παρυλένιο C (Heyries et al., 2011) ή από γυαλί (Hatch et al., 2011) για την ελάττωση της απώλειας ατμών, γεγονός που περιπλέκει την κατασκευή των συγκεκριμένων συσκευών, 3. διαθέτει υψηλό κόστος παραγωγής, το οποίο εμποδίζει την χρήση του σε μεγάλη κλίμακα.



Εικόνα 16: Πλατφόρμες παθητικού διαχωρισμού.

1. Megapixel dPCR με χρήση επίπεδων συστοιχιών γαλακτώματος. Αριστερά: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής Megapixel dPCR με ένθετα που δείχνουν τη συστοιχία και τους θαλάμους σε μεγένθυση. Μέγεθος κλίμακας: 3mm. Μέση: Οι θάλαμοι είναι φορτωμένοι με μπλε χρωστική ουσία. Το βέλος υποδεικνύει τους θαλάμους που απομονώνονται με μη αναμίξιμο έλαιο. Μέγεθος κλίμακας: 50μm. Δεξιά: Παράλληλη ανίχνευση των HLCS (πράσινο) και RPPH1 (μπλε) σε 342 θαλάμους (επάνω). Σε κοντινό πλάνο φαίνονται τα σήματα των θαλάμων στα διάφορα κανάλια φθορισμού (μέση), με το αντίστοιχο προφίλ της μεσαίας σειράς (κάτω). Μέγεθος κλίμακας: 50μm. 2. Φόρτωση αντιδραστήριου με τη βοήθεια κενού σε συσταοιχία μικροθαλάμων. Αρίστερος πίνακας: Το σχηματικό διάγραμμα του μικρορευστονικού τσιπ απεικονίζει τη διαδικασία φόρτωσης του αντιδραστήριου μέσω ενός φίλτρου. Η σύριγγα χρησιμοποιείται για τη δημιουργία προσωρινού κενού μέσω του στρώματος PDMS και την προώθηση του υγρού στους μικροθαλάμους. Δεξιάς πίνακας: Συσκευή πληρωμένη με αντιδραστήριο (κόκκινο) και νερό (μπλε) (Quan et al., 2018).

Πλατφόρμες αυτοψηφιοποίησης

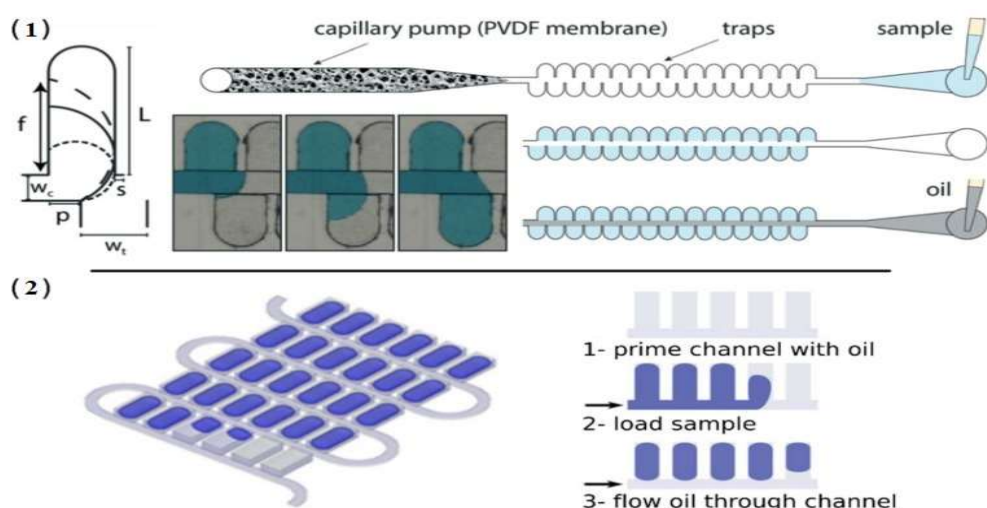
Οι πλατφόρμες αυτοψηφιοποίησης συνδυάζουν τόσο την παθητική πλήρωση όσο και την ενεργητική κλασματοποίηση. Η παθητική πλήρωση μπορεί να ενεργοποιηθεί με την αξιοποίηση του φαινομένου pinning για την αποτελεσματική εκτόπιση του αέρα με ένα υγρό κατά τη διάρκεια της πλήρωσης. Αυτό έχει επιτευχθεί με την κλιμάκωση δυο σειρών μικροδιαμερισμάτων κατά μήκος ενός κύριου καναλιού (Sposito & DeVoe, 2017) (Εικόνα 17.1). Σε αυτή την κατασκευή το υγρό σαρώνει εναλλάξ τα μικροδιαμερίσματα χωρίς να παγιδεύει αέρα, επειδή το ένα άκρο της διεπιφάνειας είναι καθηλωμένο χάρη σε ένα τοίχωμα που λειτουργεί σαν φραγμός. Η κλιμακωτή αυτή διαμόρφωση είναι κρίσιμη

για να επιτραπεί η εναλλασσόμενη καθήλωση μεταξύ των δυο πλευρών του κύριου καναλιού. Η διαβροχή της υδατικής φάσης στην πλαστική επιφάνεια αυξάνεται με την προσθήκη ενός επιφανειοδραστικού παράγοντα και γλυκερίνης, γεγονός που διευκολύνει τη φάση πλήρωσης. Αυτή η πλατφόρμα περιλαμβάνει επίσης μια τριχοειδή αντλία που τραβάει την περίσσεια του υγρού από τη συσκευή και απλοποιεί την ενεργοποίηση του συστήματος. Ο διαχωρισμός ολοκληρώνεται με την έγχυση μιας μη αναμίξιμης φάσης ελαίου. Αυτή η προσέγγιση δημιούργησε μια συστοιχία από 768 μικροδιαμερίσματα όγκου 11 nl με διακύμανση όγκου 12%. Η ενεργοποίηση μπορεί επίσης να διαδραματίζει βασικό ρόλο στην απλούστευση μιας πειραματικής διάταξης. Για παράδειγμα, η περιστροφή μπορεί να διανέμει υγρό σε μικροδιαμερίσματα που βρίσκονται κατά μήκος ενός σπειροειδούς καναλιού (Sundberg et al., 2010). Δυστυχώς, αυτή η διαμόρφωση δεν επιτρέπει την άμεση παρατήρηση των βημάτων πλήρωσης και διαχωρισμού, τα οποία θα ήταν χρήσιμα για τη βελτίωση του σχεδιασμού του καναλιού. Συνολικά αυτή η πλατφόρμα δημιούργησε μια σειρά από 1.000 μικροδιαμερίσματα όγκου 33 nl, αλλά με διακύμανση όγκου έως και 16%.

Στην περίπτωση της αυτοψηφιοποίησης (Cohen et al., 2010, Gansen et al., 2012), η διάταξη αποτελείται από ένα κύριο κανάλι με πλευρικά μικροδιαμερίσματα (Thompson et al., 2014) (**Εικόνα 17.2**). Αρχικά η συσκευή προετοιμάζεται με μη αναμίξιμο έλαιο που διαβρέχει το κανάλι και τα τοιχώματα των μικροδιαμερισμάτων. Στη συνέχεια, το υδατικό δείγμα εγχέεται και ακολουθείται από ένα επιπλέον στρώμα ελαίου για τη δημιουργία διαχωρισμών. Η πλήρωση περιλαμβάνει την εκτόπιση του μη αναμίξιμου ελαίου από το υδατικό διάλυμα και απαιτεί τα τοιχώματα να είναι υδρόφοβα, γεγονός που μπορεί να φαίνεται αντιφατικό (Cohen et al., 2010). Την υδροφοβικότητα του τοιχώματος εξασφαλίζει η παρουσία ενός λεπτού φιλμ ελαίου στην επιφάνειά του (Tice et al., 2003), το οποίο λειτουργεί ως αγωγός αποστράγγισης κατά τη διάρκεια της μετατόπισης της φάσης. Στην περίπτωση υδρόφιλων τοιχωμάτων, η υδατική φάση αλληλεπιδρά έντονα με τα τοιχώματα και δημιουργεί ένα φραγμό που εμποδίζει τη διαρροή του ελαίου από τους θαλάμους.

Η διαδικασία αυτή έρχεται σε αντίθεση με τον παθητικό διαχωρισμό επειδή περιλαμβάνει το σχηματισμό σταγονιδίων που δημιουργούνται μέσω του διαχωρισμού ενός πώματος από ένα δίκτυο μικροδιαμερισμάτων (Boukellal et al., 2008) και δεν βασίζεται στην καθήλωση και τις διαφορετικές επιφανειακές ιδιότητες μεταξύ του κύριου καναλιού και

των θαλάμων. Ο διαχωρισμός των σταγονιδίων διέπεται πράγματι από τον αριθμό των τριχοειδών που χαρακτηρίζει τη σχετική επίδραση των δυνάμεων που οφείλονται στο ιξώδες και σε τριχοειδικά φαινόμενα (Link et al., 2004, Tan et al., 2004). Ο όγκος διαχωρισμού καθορίζεται κυρίως από τον όγκο του μικροδιαμερίσματος, αλλά εξαρτάται επίσης από τη γεωμετρία του μικροδιαμερίσματος, τον ρυθμό ροής, αριθμό των τριχοειδών, τη γωνία επαφής και το ιξώδες του ελαίου. Μια εξελιγμένη έκδοση της πλατφόρμας αυτοψηφιοποίησης έδωσε συστοιχίες 535 μικροδιαμερισμάτων όγκου 6 nl με διακύμανση του όγκου των θαλάμων 10-15% (Gansen et al., 2012). Οι ίδιες αρχές εφαρμόστηκαν περαιτέρω σε ένα δίκτυο μικροκοιλοτήτων που βρίσκονται στον πυθμένα ενός κύριου καναλιού (Schneider et al., 2013). Αυτή η προσέγγιση απέδωσε μεγαλύτερη πυκνότητα μικροδιαμερισμάτων (38.400 θάλαμοι των 2 nl). Επιπλέον με την προσαρμογή του σχεδιασμού του κύριου καναλιού, επέτρεψε τη βελτιστοποίηση του σχηματισμού σταγονιδίων.



Εικόνα 17: Πλατφόρμες αυτοψηφιοποίησης.

1. Σχηματική αναπαράσταση διαμόρφωσης κλιμακωτής παγίδας όπου η πλήρωση ελέγχεται με rinning. Ο σχεδιασμός επιτρέπει την αποτελεσματική πλήρωση εξαιτίας της σαρωτικής κίνησης του διαλύματος μέσω των παγίδων, απογεύγοντας έτσι την παγίδευση αέρα εντός των θαλάμων. Η μετατόπιση του rinning είναι διαφορετική σε κάθε πλευρά του κύριου καναλιού χάρη σε ένα τοίχωμα που λειτουργεί σαν φραγμός. Η διαδικασία φόρτωσης της συσκευής παρουσιάζεται στις εικόνες. Η συσκευή ενσωματώνει μια τριχοειδή αντλία που αναρροφά παθητικά την περίσσεια του υγρού. 2. Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής αυτοψηφιοποίησης που περιέχει 1020 θαλάμους. Αρχικά στη συσκευή φορτώνεται το έλαιο. Στη συνέχεια τροφοδοτείται με το μείγμα της αντίδρασης και έπειτα εγχέεται επιπλέον έλαιο για να δημιουργηθεί μια σειρά από σταγονίδια που παγιδεύονται στους θαλάμους (Quan et al., 2018).

2.5.2. Πλατφόρμες που βασίζονται σε σταγονίδια

Ο πρώτος στόχος της γαλακτωματοποίησης είναι η δημιουργία απομονωμένων μικροαντιδραστήρων σε υδατικά σταγονίδια μέσα σε μη αναμίξιμο έλαιο. Ένα κρίσιμο συστατικό αυτής της τεχνολογίας είναι η σύνθεση του επιφανειοδραστικού και του ελαίου που εξασφαλίζει τόσο τη σταθερότητα αυτών των μικροαντιδραστήρων, όσο και τη συμβατότητα τους με μοριακές αντιδράσεις όπως η PCR ή η ισοθερμική ενίσχυση (Holtze et al., 2008). Η ενθυλάκωση δεν επιτελεί πάντα διαχωρισμό του δείγματος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί απλώς για τη δημιουργία ανεξάρτητων μικροαντιδραστήρων, όπως στο BEAMing (Beads, Emulsion, Amplification, Magnetics) (Diehl et al., 2006, Li et al., 2006, Dressman et al., 2003). Σε αυτή τη μέθοδο ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με μαγνητικά σφαιρίδια που δεσμεύουν τις αλληλουχίες στόχους με περιοριστική αραίωση, έτσι ώστε να δεσμεύεται ένα μόνο μόριο ανά σφαιρίδιο. Η ενθυλάκωση πραγματοποιείται για τη δημιουργία σταγονιδίων με ένα σφαιρίδιο που χρησιμοποιούνται ως ανεξάρτητοι μικροαντιδραστήρες για την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου και τον κορεσμό της επιφάνειας του σφαιριδίου. Τα γαλακτώματα μπορούν να ληφθούν εύκολα και γρήγορα με μηχανική διάτμηση, η οποία παράγει σταγονίδια πολυδιασποράς. Μετά την ανάκτηση των σφαιριδίων, οι συνδεδεμένες με σφαιρίδια αλληλουχίες που σημαίνονται με φθορίζον μόριο ταυτοποιούνται με κυτταρομετρία ροής υψηλής απόδοσης. Τα μαγνητικά σφαιρίδια επιτρέπουν έναν απλό και αποτελεσματικό καθαρισμό και χειρισμό του δείγματος. Η προσέγγιση αυτή εφαρμόζεται για την ποσοτικοποίηση της γενετικής ανισορροπίας συγκεκριμένων γενετικών τόπων (Li et al., 2006, Dressman et al., 2003). Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου έγκειται στη μετατροπή ενός μοριακού σήματος σε κυτταρομετρική ένδειξη με ελάχιστους περιορισμούς στη διαδικασία γαλακτωματοποίησης.

Οι μέθοδοι μικρορευστονικών σταγονιδίων διαφέρουν από το BEAMing στο γεγονός ότι χρησιμοποιούν τα σταγονίδια ως πραγματικά χωρίσματα. Οι μέθοδοι αυτές καθίστανται δυνατές με μικρορευστονικές τεχνικές γαλακτωματοποίησης, οι οποίες παράγουν μονοδιάσπαρτα σταγονίδια με πολύ περιορισμένη διακύμανση όγκου. Τα μικρορευστονικά σταγονίδια μπορούν να δημιουργηθούν με διάφορες τεχνικές, όπως η διασταύρωση-T (T-junctions) (Thorsen et al., 2001), το ακροφύσιο (**Εικόνα 18.1**) (Anna et al., 2003), ή η βαθμιαία γαλακτωματοποίηση (Sugiura et al., 2001). Ο σχηματισμός σταγονιδίων με συνδέσεις-T και μικρορευστονικά ακροφύσια βασίζεται στην ιξώδη διάτμηση που υπερνικά τα τριχοειδή φαινόμενα στη διεπιφάνεια. Η δημιουργία

σταγονιδίων μέσω της εστίασης της ροής εξαρτάται επομένως από τον αριθμό των τριχοειδών του συστήματος. Αντίθετα, η βαθμιαία γαλακτωματοποίηση προκαλείται από μια ανισορροπία της πίεσης Laplace που ελέγχεται από την γεωμετρία του καναλιού. Αυτές οι τεχνικές δημιουργίας σταγονιδίων έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ροών αποτελούμενων από σταγονίδια με όγκους που κυμαίνονται από pL έως nL και απόδοση έως και δεκάδες χιλιάδες σταγονίδια ανά δευτερόλεπτο. Σε αντίθεση με τα σταγονίδια που παράγονται σε στερεούς θαλάμους τα μικρορευστονικά σταγονίδια δεν είναι στατικά αλλά μετακινούνται μέσα σε δίκτυα καναλιών. Τα σταγονίδια μπορούν να συλλέγονται εκτός του τσιπ για την πραγματοποίηση της PCR και να επανεισάγονται σε μια μικρορευστονική συσκευή για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Με την τεχνική των σταγονιδίων, το δείγμα δεν αλληλεπιδρά με τα τοιχώματα των καναλιών αφού έχει εγκλωβιστεί στο σταγονίδιο, παρόλο που αυτό μπορεί να μην αποκλείει τη διασταυρούμενη επιμόλυνση (Pinheiro et al., 2011) ή τη διεπιφανειακή αναστολή (Courtois et al., 2009, Beverung et al., 1999).

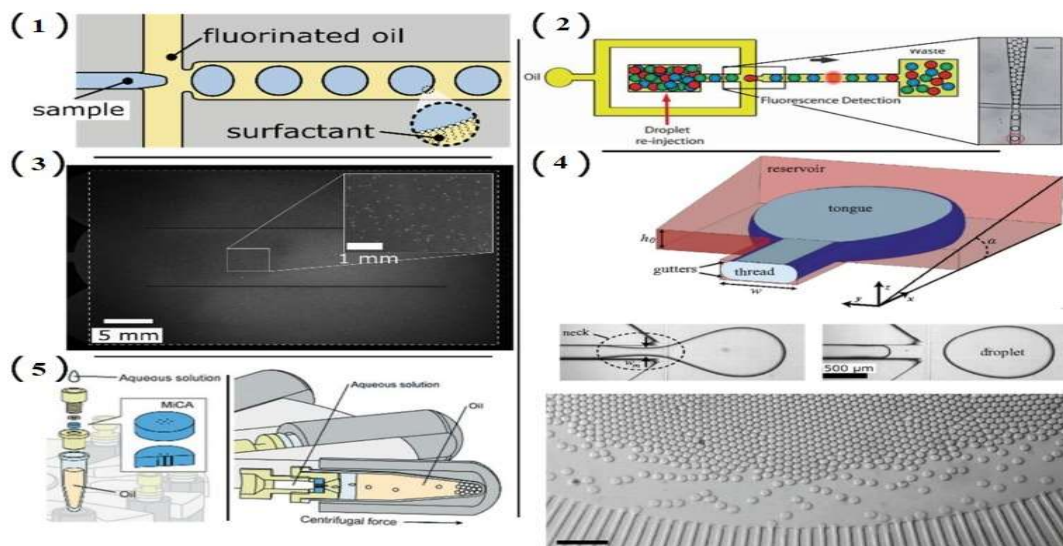
Εφαρμογές dPCR που βασίζονται σε μικρορευστονικά σταγονίδια έχουν καταστεί δυνατές από τη δυνατότητα της ενίσχυσης ενός μορίου (Kiss et al., 2008, Beer et al., 2008, Kumaresan et al., 2008, Schaeferli et al., 2008, Mazutis et al., 2009). Με τη χρήση σταγονιδίων που παράγονται με μικρορευστονικές τεχνικές, ο αριθμός των διαμερισμάτων μπορεί να προσαρμοστεί ώστε να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις μιας εφαρμογής, με συσκευές που μπορούν, για παράδειγμα, να παράγουν πάνω από ένα εκατομμύριο σταγονίδια (Hatch et al., 2011). Επιπλέον, η διακύμανση του όγκου των μικρορευστονικών σταγονιδίων κυμαίνεται σε ποσοστό μερικών μονάδων επί τις εκατό (Dong et al., 2015, Thorsen et al., 2001, Anna et al., 2003, Sugiura et al., 2001) και επίσης, δεν εξαρτάται από την ομοιογένεια της κατασκευής, επειδή όλα τα σταγονίδια παράγονται από μια μόνο πηγή. Αυτή η στενή κατανομή όγκου παρέμεινε χαμηλότερη από 3% όταν μετρήθηκε από σταγονίδια που δημιουργήθηκαν με 16 ανεξάρτητες πηγές από πέντε διαφορετικές εμπορικά διαθέσιμες κασέτες οκτώ καναλιών (Pinheiro et al., 2011). Η απόδοση της παραγωγής σταγονιδίων μπορεί να αυξηθεί με συστήματα πολλαπλών ακροφυσίων (Schaeferli et al., 2008) ή μέσω διαχωρισμού σταγονιδίων (Hatch et al., 2011), ωστόσο οι επιδράσεις αυτών των τεχνικών στη διακύμανση του όγκου των σταγονιδίων είναι άγνωστες. Τέλος, οι δοκιμασίες που περιλαμβάνουν πολλαπλούς όγκους δεν μπορούν εύκολα να υλοποιηθούν σε ένα μόνο πρωτόκολλο με τη χρήση σταγονιδίων,

επειδή το μέγεθος των σταγονιδίων εξαρτάται κυρίως από τις διαστάσεις των ακροφυσίων και ο χειρισμός των σταγονιδίων στα κανάλια είναι περίπλοκος εάν τα σταγονίδια είναι πολυδισπαρμένα.

Η απόδοση της ψηφιακής PCR με τη μέθοδο των σταγονιδίων (ddPCR) συχνά περιορίζεται από την ανάγνωση των αποτελεσμάτων που συνήθως πραγματοποιείται με τη διαδοχική εξέταση σε μια διάταξη που προέρχεται από την κυτταρομετρία ροής (**Εικόνα 18.2**). Η απόδοση της ανάγνωσης είναι χαμηλότερη από ότι στην κυτταρομετρία, επειδή τα σταγονίδια δεν μπορούν να αντέξουν σε υψηλούς ρυθμούς διάτμησης. Αυτός ο περιορισμός μπορεί να ξεπεραστεί με την μετατροπή των σταγονιδίων σε σωματίδια συμβατά με την κυτταρομετρία, όπως μαγνητικά (Diehl et al., 2006, Li et al., 2006, Dressman et al., 2003, Kumaresan et al., 2008, Zhang et al., 2012) ή σφαιρίδια αгарόζης (Zhang et al., 2012) ή με τη χρήση μιας μορφής διπλού γαλακτώματος (Zinchenko et al., 2014). Εναλλακτικά, έχει αναπτυχθεί ένας τρισδιάστατος μετρητής σωματιδίων (IC 3D) για την ταχεία καταμέτρηση των θετικών σταγονιδίων απευθείας από το φιαλίδιο συλλογής, ο οποίος απαλλάσσει από την ανάγκη περαιτέρω χειρισμού του γαλακτώματος (Kang et al., 2014). Ο IC 3D βασίζεται σε ένα οριζόντιο μικροσκόπιο του οποίου ο ομοεστιακός φακός σαρώνει ολόκληρο το γαλάκτωμα περιστρέφοντας και μετακινώντας το φιαλίδιο συλλογής. Οι πιο κλασικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν στρατηγικές ανίχνευσης ευρέος πεδίου που έχουν εφαρμοστεί για την απεικόνιση των σταγονιδίων διατεταγμένων σε δισδιάστατες συστοιχίες ή κρυστάλλους (Hatch et al., 2011, Dangla et al., 2013) (**Εικόνα 18.3**). Αυτή η προσέγγιση είναι φθηνότερη και ευκολότερη στην εφαρμογή, καθώς δεν απαιτεί καμιά οπτική ευθυγράμμιση. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει επίσης την ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο και την ανάλυση της καμπύλη τήξης, οι οποίες παρέχουν αποτελεσματικές στρατηγικές για την απόρριψη οποιασδήποτε ανεπιθύμητης ενίσχυσης που μπορεί να υπάρχει σε μεγάλο αριθμό θερμικών κύκλων.

Η ελαχιστοποίηση της ανάγκης για εξειδικευμένο εξοπλισμό που πραγματοποιεί τη διαμερισματοποίηση, αποτελεί μια σημαντική τεχνολογική τάση. Μικρορευστονικά σταγονίδια έχουν δημιουργηθεί με τη χρήση διαβαθμισμένου περιορισμού, μια μέθοδο παρόμοια με τη βαθμιδωτή γαλακτωματοποίηση που επιτρέπει την απλοποίηση της λειτουργία της ελαιώδους φάσης (Dangla et al., 2013) (**Εικόνα 18.4**). Είναι ενδιαφέρον ότι τόσο οι σταδιακοί γαλακτωματοποιητές (Schuler et al., 2015) όσο και οι πηγές σταγονιδίων (Chen et al., 2016) έχουν προσαρμοστεί για λειτουργούν με φυγόκεντρους

που βρίσκονται συνήθως στα εργαστήρια (Εικόνα 18.5). Εκτός από την απλούστευση της εγκατάστασης και τον εξορθολογισμό της ροής των εργασιών, αυτές οι προσεγγίσεις μπορούν να αυξήσουν την απόδοση των δειγμάτων επιτρέποντας την ταυτόχρονη ενσωμάτωση πολλαπλών δειγμάτων.



Εικόνα 18: Πλατφόρμες βασισμένες σε σταγονίδια.

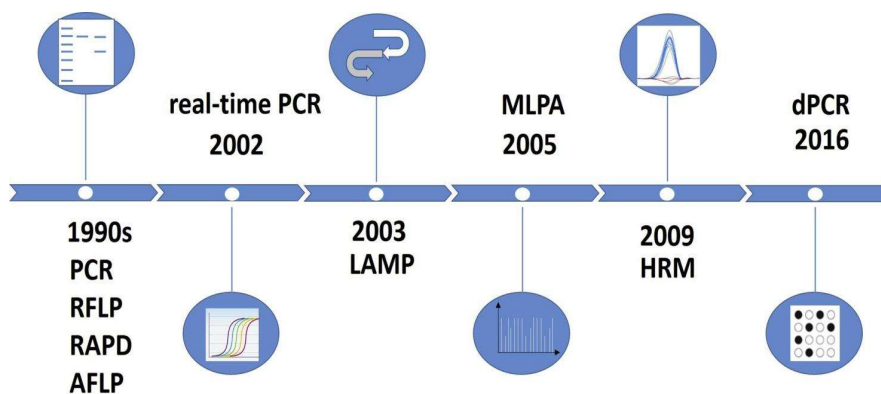
1. Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας σταγονιδίων με ακροφύσιο ή με συσκευή παραγωγής σταγονιδίων. Η υδατική φάση συμπιέζεται από δυο ρεύματα μη αναμίξιμου ελαίου που τεντώνουν τη διεπιφάνεια μέσω ιξώδων δυνάμεων έως ότου αναπτυχθεί τριοειδής αστάθεια και το σταγονίδιο αποκολληθεί. Τα σταγονίδια είναι πολύ σταθερά χάρη στις επιφανειοδραστικές ουσίες που σταθεροποιούν τη διεπιφάνειά τους. 2. Το σήμα φθορισμού από τα σταγονίδια μπορεί να ανιχνευθεί διαδοχικά (single-file configuration). Η διάταξη αυτή θυμίζει τις διαμορφώσεις που χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία ροής. 3. Το σήμα των σταγονιδίων μπορεί επίσης να εξεταστεί με τη χρήση ανίχνευσης ευρέως πεδίου (wide field detection) που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση έως και 1 εκατομμυρίου σταγονιδίων. 4. Σταγονίδια μπορούν να δημιουργηθούν με μια απλοποιημένη πειραματική διάταξη που βασίζεται σε ένα είδος βαθμιαίας γαλακτωματοποίησης. 5. Εναλλακτικά, οι διατάξεις παραγωγής σταγονιδίων έχουν προσαρμοστεί για ενεργοποίηση με φυγόκεντρο, γεγονός που την ταυτόχρονη ενθυλάκωση πολλών δειγμάτων. Μέγεθος κλίμακας: 500μm (Quan et al., 2018).

3. Εφαρμογές dPCR στη διαγνωστική

3.1. Εφαρμογές στην παρασιτολογία

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί μοριακές μέθοδοι που βασίζονται στα νουκλεϊκά οξέα για τη διάγνωση των παρασιτικών λοιμώξεων. Τα πλεονεκτήματα αυτών των μεθόδων είναι πολυάριθμα. Συνήθως περιλαμβάνουν αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα και απλούστερη τυποποίηση των διαγνωστικών διαδικασιών. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την ανίχνευση των νουκλεϊκών οξέων των παρασίτων, συμπεριλαμβανομένων της συμβατικής PCR, της Nested PCR, της PCR πραγματικού

χρόνου, του πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού PCR (PCR-RFLP), της τυχαίας ενίσχυσης πολυμορφικού DNA (random amplification of polymorphic DNA, RAPD), του πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων ενίσχυσης (amplification fragment length polymorphism, AFLP), της καμπύλης τήξης υψηλής ανάλυσης (high-resolution melt curve, HRM), της πολυπλεχτικής ενίσχυσης εξαρτώμενης από τη σύνδεση ανιχνευτή (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA), της ισοθερμικής ενίσχυσης μέσω βρόχου (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) και της αλληλούχησης DNA (αλληλούχηση κατά Sanger και αλληλούχηση νέας γενιάς) (**Εικόνα 19**) (Pomari et al., 2019).



Εικόνα 19: Χρονολόγιο εξέλιξης της μοριακής τεχνολογίας που εφαρμόζεται στην παρασιτολογία.

Η dPCR χαρακτηρίζεται ως «νέα» τεχνολογία στην παρασιτολογία, με αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις δυνατότητές της στην κλινική διάγνωση και τον έλεγχο, δεδομένου ότι απαιτούνται ιδιαίτερα ευαίσθητες και ειδικές μοριακές δοκιμασίες για την ανίχνευση χαμηλών παρασιτικών φορτίων και τη διάκριση διαφορετικών ειδών (Leiby, 2011). Εδώ θα αναφερθούν οι εφαρμογές της dPCR που αφορούν τρεις κύριες κατηγορίες παρασίτων ιατρικής σημασίας: πρωτόζωα, έλμινθες και αρθρόποδα.

3.1.1. Πρωτόζωα

Ελονοσία

Η άμεση ανίχνευση των παρασίτων και η έγκαιρη θεραπεία είναι ζωτικής σημασίας για την πρόληψη των σοβαρών επιπλοκών της ελονοσίας (Landier et al., 2016). Ο σκοπός αυτός, γενικά, εξυπηρετείται με τη χρήση παραδοσιακών μεθόδων (микροσκοπιο και τα τελευταία χρόνια ανίχνευση αντιγόνων με ταχείες διαγνωστικές δοκιμασίες), παρά την υπολειπόμενη ευαισθησία τους (Bisoffi et al., 2012, Bisoffi et al., 2010, Tangpukdee et al., 2009). Αυτό συμβαίνει επειδή οι οξείες προσβολές ελονοσίας προκαλούνται τις

περισσότερες φορές από συγκριτικά υψηλά παρασιτικά φορτία στο αίμα, τα οποία ανιχνεύονται εύκολα με τις μεθόδους αυτές. Ωστόσο, απαιτούνται πιο ευαίσθητα εργαλεία σε διαφορετικές καταστάσεις, όπως η «χρόνια ελονοσία» και η υπεραντιδραστική σπληνομεγαλία της ελονοσίας (Bisoffi et al., 2016), οι ασυμπτωματικές λοιμώξεις που πρέπει να ανιχνεύονται στο πλαίσιο προγραμμάτων εξάλειψης της ελονοσίας (Li et al., 2019), καθώς και η ανάγκη βελτίωσης του ελέγχου των αιμοδοτών, τόσο σε ενδημικές όσο και σε μη ενδημικές χώρες (Verra et al., 2018, Mangano et al., 2019). Στο πλαίσιο αυτό, η εξαιρετικά ευαίσθητη δοκιμασία της dPCR μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση της πολύ χαμηλής παρασιταιμίας των ανθρώπινων ειδών *Plasmodium*. Πρόσφατες μελέτες ανέφεραν την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ειδών *Plasmodium* που διερευνήθηκαν με δοκιμασίες dPCR. Η ανάλυση dPCR έδωσε εξαιρετικά αναπαραγώγιμες μετρήσεις σε ένα μεγάλο εύρος πυκνοτήτων παρασίτων ($1-10^5$ γονιδιώματα/μl) με μεγαλύτερη ευαισθησία από την qPCR για το *P. falciparum* και ίση ευαισθησία για το *P. vivax* (Koepfli et al., 2016). Τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η dPCR μπορεί επίσης να παρέχει ακριβέστερη ποσοτικοποίηση των παρασίτων από τη μικροσκοπία όταν απαιτούνται απόλυτες πυκνότητες (Srisutham et al., 2017). Η ακρίβεια της τεχνολογίας dPCR έχει δοκιμαστεί επίσης για τη βελτίωση της ευαισθησίας, της ειδικότητας και της απόδοσης των μεθόδων κατά την αξιολόγηση υποψηφίων παρεμβάσεων για την παρεμπόδιση της μετάδοσης. Η εμφάνιση και η μετάδοση της ανθεκτικότητας στις αντιελονοσιακές θεραπείες εξακολουθούν να εμποδίζουν τις προσπάθειες εξάλειψης της ελονοσίας. Μια δοκιμασία dPCR μπορεί επίσης να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για τη διεύρυνση της κατανόησης του μηχανισμού δράσης των φαρμάκων κατά της ελονοσίας και για την ανάδειξη νέων μηχανισμών ανθεκτικότητας στα φάρμακα (Wang et al., 2018). Επιπλέον, η dPCR έχει χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση μεταλλάξεων που ευθύνονται για την ανθεκτικότητα στα αντιελονοσιακά φάρμακα ως μια καλή εναλλακτική λύση στη συμβατική PCR καθώς και στην αλληλούχηση DNA (LaMonte et al., 2016).

Μπαμπεσίωση

Η μικροσκόπηση του αίματος αποτελεί τον κύριο τρόπο εξέτασης και ανίχνευσης της μόλυνσης από *Babesia*. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή είναι πολύ δύσκολη σε ασθενείς με πολύ χαμηλή παρασιταιμία κατά τα πρώιμα ή χρόνια στάδια της λοίμωξης και απαιτεί καλά εκπαιδευμένο προσωπικό λόγω των μορφολογικών ομοιοτήτων με τα παράσιτα της

ελονοσίας (Leiby, 2011). Αναπτύχθηκε μια δοκιμασία dPCR ως ευαίσθητη μοριακή μέθοδος που παρέχει ταυτόχρονη και ειδική ως προς το είδος ανίχνευση των *B. microti* και *B. duncani* σε χάμστερ. Η δοκιμασία έδειξε 100% ειδικότητα σε σύγκριση με άλλα παθογόνα που μεταδίδονται με το αίμα και ήταν ικανή να ανιχνεύσει την πρώιμη λοίμωξη σε σύγκριση με την qPCR (Wilson et al., 2015).

Κρυπτοσπορίδιο

Η dPCR εφαρμόστηκε επίσης για τον απόλυτο ποσοτικό προσδιορισμό του εντερικού παρασίτου *Cryptosporidium* στα κόπρανα (Zahedi et al., 2015, Yang et al., 2014). Σε σύγκριση με την qPCR, η ακρίβεια, όπως υποδεικνύεται από τις χαμηλότερες τιμές εκατοστιαίας σχετικής απόκλισης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων της dPCR ήταν σταθερά καλύτερη και η ποσοτική ανίχνευση επηρεάστηκε λιγότερο από την παρουσία αναστολέων.

3.1.2. Έλμινθες

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας PCR, ιδίως της PCR πραγματικού χρόνου, αποτελεί έγκυρη εναλλακτική λύση στις διαγνωστικές μεθόδους που βασίζονται στη μικροσκοπηση για τους έλμινθες, με βελτίωση επίσης της όλης διαδικασίας δειγματοληψίας (Kaisar et al., 2017, Pomari et al., 2018). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να απαιτούνται πιο ευαίσθητα διαγνωστικά εργαλεία, για παράδειγμα, για την ανίχνευση μολύνσεων με πολύ χαμηλό παρασιτικό φορτίο που προέρχονται από έλμινθες που στοχεύονται για εξάλειψη ή από έλμινθες που προέρχονται εκτός των ενδημικών χωρών (Pomari et al., 2019).

Σχιστοσωμίαση

Πρόκειται αναμφισβήτητα για την πιο σημαντική και ταυτόχρονα πιο παραμελημένη λοίμωξη από έλμινθες (Colley et al., 2014). Η δοκιμασία dPCR για το *Schistosoma japonicum* παρουσίασε υψηλή ευαισθησία για την ανίχνευση χαμηλών επιπέδων παρασιτικού DNA σε κόπρανα, ορό, ούρα και σάλιο (Weerakoon et al., 2016, Weerakoon et al., 2017). Με βάση μελέτη που πραγματοποιήθηκε, προσδιορίστηκε ο επιπολασμός από το *S. japonicum* σε δείγματα κοπράνων αιγών (46,4% στην dPCR έναντι 6,9% της qPCR) αποδεικνύοντας ότι η dPCR είναι ένα πολύτιμο νέο εργαλείο για τη διάγνωση και την παρακολούθηση της σχιστοσωμίας, κυρίως σε περιοχές χαμηλού επιπολασμού και έντασης (Van Dorssen et al., 2017). Επιπλέον, η dPCR χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό δυνητικών κλινικών βιοδεικτών του *S. japonicum*, όπως το κυκλοφορούν

ελεύθερο DNA (cfDNA) που απομονώθηκε από τον ορό, τα ούρα, τους σιελογόνους αδένες και τα κόπρανα (Weerakoon et al., 2017).

Οπισθορχίαση

Μελέτες σχετικά με τη λειτουργική οργάνωση του μεταβολικού συστήματος του *Opisthorchis felinus* διεξήχθησαν με dPCR για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων του κυτοχρώματος P₄₅₀ (Pakharukova et al., 2015) και για την επικύρωση των μεταγραφωμικών δεδομένων RNA αλληλούχησης γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες-μεταφορείς ABC και των γονιδίων που εκφράζουν τις P-γλυκοπρωτεΐνες (Mordvinov et al., 2017).

3.1.3. Αρθρόποδα

Ψώρα

Η εμφανιζόμενη ανθεκτικότητα των ακάρεων *Sarcoptes scabiei* έναντι του κύριου αντιπαρασιτικού φαρμάκου αποτελεί επί του παρόντος σημαντική πηγή ανησυχίας (Gopinath et al., 2018, Mounsey & McCarthy, 2013, Adriko et al., 2018, Khalil et al., 2017). Η dPCR εφαρμόστηκε για τη μελέτη της έκφρασης μιας κατηγορίας ενζύμων που αποτελούν πολλά υποσχόμενους νέους στόχους αντιπαρασιτικών φαρμάκων για τον έλεγχο της λοίμωξης από το *S. scabiei*. Ο Fernando και οι συνεργάτες του υπέθεσαν ότι η οικογένεια γονιδίων SMIPP-Cs (Scabies Mite Inactivated Cysteine Proteases) έχει εξελιχθεί ως προσαρμογή στον τρόπο ζωής του *S. scabiei* και μπορεί να εμπλέκεται στον έλεγχο της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή. Οι συγγραφείς ανέπτυξαν μια δοκιμασία dPCR για την ενίσχυση των διαφόρων μεταγράφων της οικογένειας SMIPP-Cs. Η ανάλυση dPCR παρείχε πληροφορίες σχετικά με το επίπεδο μεταγραφής των γονιδίων SMIPP-C και τον υπολογισμό του αριθμού αντιγράφων των γονιδιακών μεταγράφων ανά μεμονωμένο στάδιο ζωής (Fernando et al., 2018).

3.2. Εφαρμογές στην κλινική Μικροβιολογία

Η δυνατότητα που παρέχει η dPCR για απόλυτο ποσοτικό προσδιορισμό, που δεν βασίζεται σε ένα καλά ποσοτικοποιημένο πρότυπο ή σε μια εξαιρετικά αποτελεσματική ενίσχυση, είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό του φορτίου παθογόνων, για τον ποσοτικό προσδιορισμό στόχων με ποικιλομορφία αλληλουχίας και δειγμάτων με αναστολείς, ακόμα και για τον χαρακτηρισμό προτύπων αναφοράς που θα χρησιμοποιηθούν σε διαδικασίες qPCR. Η ψηφιακή PCR και η αντίστροφη μεταγραφή RT-dPCR έχουν

χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό αντιγράφων DNA και RNA ιών, βακτηρίων και παρασίτων σε διάφορα κλινικά δείγματα, μεταξύ άλλων και όταν δεν είναι διαθέσιμο ένα καλά βαθμονομημένο πρότυπο για την ενίσχυση qPCR (Kuypers & Jerome, 2017). Η dPCR έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό πολλών ιών, συμπεριλαμβανομένων του HIV-DNA και των δυο μακρών τελικών κυκλικών επαναλήψεων (2-LTR) του HIV (Strain et al., 2013, Henrich et al., 2012), του CMV (cytomegalovirus) (Sedlak et al., 2014, Hayden et al., 2013), του ιού της ηπατίτιδας B (Huang et al., 2015), του πολυομαϊού JC (Giovannelli et al., 2016), του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (Jeannot et al., 2016), του HIV-RNA (Sedlak, & Jerome, 2014, Huggett et al., 2015, Sedlak et al., 2014), του ανθρώπινου Τα-λεμφοτροπικού ιού (Sedlak & Jerome, 2014, Huggett et al., 2015), των ανθρώπινων ρινοϊών (Sedlak et al., 2014), του ιού της ηπατίτιδας C (Sedlak et al., 2014), του ιού της ηπατίτιδας E (Nicot et al., 2016) και του ανθρώπινου παρεχοϊού τύπου 3 (Aizawa et al., 2016). Επίσης η χρήση της dPCR έχει περιγραφεί για την ποσοτικοποίηση βακτηριακών στόχων όπως του *Mycobacterium tuberculosis* (Ushio et al., 2016) και του *Helicobacter pylori* (Talarico et al., 2016).

Η dPCR και η RT-dPCR είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για τον ποσοτικό προσδιορισμό ιών DNA και RNA που διαθέτουν μεγάλη ποικιλομορφία αλληλουχιών, όπως ο ιός BK (Hoffman et al., 2008). Ο ποσοτικός προσδιορισμός αυτών των ιών με qPCR και RT-qPCR πραγματοποιείται συχνά με τη χρήση συναινετικού σετ εκκινητών (consensus primer) και ανιχνευτών που προορίζονται για την ανίχνευση όλων των γονοτύπων του ιού. Ωστόσο, η αναποτελεσματική ενίσχυση ορισμένων γονοτύπων λόγω χαμηλής συμπληρωματικότητας μεταξύ των αλληλουχιών συναινετικών εκκινητών και ανιχνευτών και του νουκλεϊκού οξέος στόχου μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβή ποσοτικοποίηση (Sedlak et al., 2017, Hoffman et al., 2008). Σε σύγκριση με την RT-qPCR, ο άνθρωπος ρινοϊός, ο οποίος έχει εξαιρετικά ποικιλόμορφο γονιδίωμα, ποσοτικοποιήθηκε με μεγαλύτερη ακρίβεια με την RT-dPCR, η οποία επηρεάζεται λιγότερο από την αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης (Sedlak et al., 2017). Η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης μπορεί επίσης να επηρεαστεί από προσμίξεις σε ένα δείγμα νουκλεϊκού οξέος που αναστέλλουν την PCR. Σε σύγκριση με την qPCR, η dPCR παρείχε ακριβέστερη ποσοτικοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών παρουσία αναστολέων στα δείγματα, συμπεριλαμβανομένης της ανίχνευσης του κυτταρομεγαλοϊού σε δείγματα κοπράνων

(Sedlak et al., 2014) και του εντερόκοκκου σε δείγματα νερού για την παρακολούθηση της ποιότητας του περιβάλλοντος (Wang et al., 2016).

Μια άλλη χρήσιμη εφαρμογή της dPCR για το κλινικό εργαστήριο είναι ο χαρακτηρισμός των προτύπων αναφοράς. Τα πρότυπα αναφοράς που χρησιμοποιούνται σε δοκιμασίες ρουτίνας qPCR μπορούν αρχικά να ποσοτικοποιηθούν με τη χρήση της dPCR, η οποία δεν βασίζεται σε χρήση προτύπων δειγμάτων για τον ποσοτικό προσδιορισμό (Huggett et al., 2015, Zhang & Li, 2016, Tang et al., 2016). Η dPCR έχει χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό αντιγράφων πρότυπων δειγμάτων αναφοράς που χρησιμοποιούνται σε πειράματα qPCR για τον CMV (Sedlak & Jerome, 2013, Pavšič et al., 2016, Hayden et al., 2015). Το Εθνικό Ινστιτούτο Πρότυπων και Τεχνολογίας (National Institute of Standards and Technology) καθιέρωσε πρόσφατα ένα νέο πρότυπο για τον CMV με χρήση dPCR (Haynes et al., 2013). Η ποσοτικοποίηση προτύπων πλασμιδίων *Escherichia coli* με dPCR υπερτερεί συγκριτικά με την ποσοτικοποίηση που βασίζεται σε απορρόφηση UV και φασματομετρία μάζας (Liang et al., 2016). Η ψηφιακή PCR έχει επίσης αποδειχθεί πολύτιμη για τον προσδιορισμό της ετερογένειας του αριθμού αντιγράφων για τα διεθνή πρότυπα. Για παράδειγμα, οι δοκιμασίες dPCR που στόχευαν σε διαφορετικές περιοχές των διεθνών προτύπων του Π.Ο.Υ. για τους ιούς BK και JC διέφεραν ποσοτικά έως και οκτώ φορές, ανάλογα με την περιοχή την οποία στόχευαν. Αυτή η απόκλιση δεν προέκυψε από την ανακρίβεια της dPCR, αλλά από την παρουσία πολλαπλών ικών υποπληθυσμών εντός των προτύπων του Π.Ο.Υ., εύρημα που επιβεβαιώθηκε με τη χρήση της αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS) (Bateman et al., 2017, Greninger et al., 2017).

Η σχετικά καλή ευαισθησία και η εξαιρετική πιστότητα της dPCR την καθιστούν χρήσιμη για την ακριβέστερη ανίχνευση χαμηλών φορτίων παθογόνων, για την ανίχνευση μείζονων μεταλλάξεων και σπάνιων αλληλόμορφων και για τον προσδιορισμό της αναλογίας συγκεκριμένων στόχων στο ίδιο δείγμα. Η καλύτερη πιστότητα της dPCR αποκαλύπτει κλινικά σημαντικές αλλαγές στο ικό φορτίο. Ο ιδιαίτερα ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός του πολύ χαμηλού αριθμού ικών αντιγράφων παρείχε ακριβέστερη παρακολούθηση των δεξαμενών HIV DNA (residual latent HIV DNA reservoirs) που βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση (Strain et al., 2013) και των ικών φορτίων CMV στον ορό για την παρακολούθηση της αντιικής θεραπείας (Sedlak & Jerome, 2013), αν και το κλινικό όφελος της βελτιωμένης πιστότητας δεν έχει ακόμα αποδειχθεί. Η dPCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση πολύ χαμηλού αριθμού νουκλεϊκών οξέων

που κυκλοφορούν στο αίμα, συμπεριλαμβανόμενου του DNA μολυσματικών παραγόντων (Hudecova, 2015). Υπάρχουν μελέτες στις οποίες έχει αναφερθεί ανίχνευση DNA του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) στον ορό ασθενών με καρκίνωμα σχετιζόμενο με τον HPV (Jeannot et al., 2016) και DNA του *M. tuberculosis* στο πλάσμα ασθενών με πνευμονική φυματίωση (Ushio et al., 2016).

Η πολύ υψηλή πιστότητα της dPCR ενισχύει την εφαρμογή της για την ανίχνευση σπάνιων σημειακών μεταλλάξεων σε ένα υπόβαθρο αλληλουχιών αγρίου τύπου (Sedlak & Jerome, 2013). Ενώ η qPCR και η πυροαλληλούχιση δεν μπορούν να ανιχνεύσουν λιγότερο από 1 έως 10% ενός μεταλλαγμένου αλληλόμορφου σε ένα υπόβαθρο μη μεταλλαγμένων DNA, η dPCR ήταν σε θέση να ανιχνεύσει μια μετάλλαξη σε ένα υπόβαθρο 200.000 γονιδίων KRAS αγρίου τύπου (Pekin et al., 2011). Οι αναφερθείσες εφαρμογές στην κλινική μικροβιολογία περιλαμβάνουν την ανίχνευση με δοκιμασίες dPCR μεταλλάξεων αντοχής σε φάρμακα ενάντια στον ιό της ηπατίτιδας C, στον *Staphylococcus aureus* και στον ιό της γρίπης (Vynck et al., 2016, Huggett et al., 2015, Whale et al., 2016). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Whale και τους συνεργάτες του η dPCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της αντοχής στην οσελταμιβίρη από τον ιό της γρίπης A και διαπιστώθηκε χαμηλή ευαισθησία για τον μεταλλαγμένο ιό, μόλις 0,1% (Whale et al., 2016). Αυτή η πολύ ευαίσθητη ανίχνευση των σπάνιων παραλλαγών της ανθεκτικής αλληλουχίας στα φάρμακα μπορεί να βελτιώσει τη διαχείριση των ασθενών, διευκολύνοντας την αλλαγή της φαρμακευτικής αγωγής.

Μια άλλη σημαντική εφαρμογή της dPCR περιλαμβάνει την ανίχνευση μεταλλάξεων που προκαλούνται από γονιδιακή επεξεργασία. Τέλος, η καλύτερη πιστότητα που επιδεικνύει η dPCR επιτρέπει λεπτομερείς μετρήσεις μεταξύ σχετικών στόχων (finer fold change measurements). Κάτι τέτοιο μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικό για δοκιμασίες που επιδιώκουν τον προσδιορισμό του ιικού φορτίου ανά κύτταρο. Ένα καλό παράδειγμα αυτού του είδους των περιπτώσεων αποτελεί η δοκιμασία για την ανίχνευση του κληρονομούμενου χρωμοσωμικά ενσωματωμένου ανθρώπινου ερπητοϊού 6 (ciHHV-6), μια δοκιμασία πολλαπλής dPCR που ποσοτικοποιεί τόσο το ανθρώπινο όσο και το HHV-6 DNA (Sedlak et al., 2014). Τα άτομα με κληρονομούμενο ciHHV-6 έχουν αναλογία HHV-6/ανθρώπινα κύτταρα 1:1. Η ταυτοποίηση τέτοιων ατόμων στο πλαίσιο της μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων μπορεί να βοηθήσει στην ερμηνεία των θετικών αποτελεσμάτων της τυπικής εξέτασης HHV-6 και ενδεχομένως να οδηγήσει στην

αποτροπή περιττής θεραπείας με αντικαρκινικά φάρμακα. Σε μεταγενέστερη μελέτη περιγράφεται μια νέα δοκιμασία dPCR που αναγνωρίζει τον κληρονομούμενο ciHHV-6 και προσδιορίζει επίσης ποια από τα είδη HHV-6A ή HHV-6B, είναι υπεύθυνο για την ενσωμάτωση σε μια αντίδραση (Sedlak et al., 2016).

3.3. Εφαρμογές στη Γυναικολογία

3.3.1. Μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος

Ο προγεννητικός έλεγχος διαδραματίζει βασικό ρόλο στη δευτερογενή πρόληψη των γενετικών ανωμαλιών. Καλύπτει συνήθως τα ανευπλοειδή χρωμοσώματα, τις ασθένειες που οφείλονται στην κληρονομικότητα ενός γονιδίου και την αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή (Mao et al., 2019). Η παραδοσιακή προγεννητική διάγνωση πραγματοποιείται μέσω αμνιοπαρακέντησης και δειγματοληψίας χοριακών λαχνών (chorionic villus sampling, CVS), οι οποίες είναι επεμβατικές και ενίοτε προκαλούν αποβολές. Το 1997 ανακαλύφθηκε στο μητρικό πλάσμα το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA (Cell-free fetal DNA, cffDNA), σηματοδοτώντας μια νέα εποχή μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου (non-invasive prenatal testing, NIPT) (Hudecova, 2015). Ωστόσο, τα επίπεδα του cffDNA στο πλάσμα της μητέρας είναι εξαιρετικά χαμηλά, αποτελώντας μόνο το 10-20% όλων των πρωτεϊνών του πλάσματος (Papageorgiou & Patsalis, 2012). Επομένως, μόνο ένα εξαιρετικά ευαίσθητο μοριακό διαγνωστικό εργαλείο μπορεί να ανιχνεύσει το cffDNA που κυκλοφορεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο μητρικό πλάσμα. Η dPCR το καθιστά εφικτό ποσοτικοποιώντας το cffDNA με ακρίβεια, με συνέπεια να υπάρχει η δυνατότητα να προβλεφθούν προγεννητικά ασθένειες σε γενετικό επίπεδο.

Σε μελέτη που διενήργησαν ο El Khattabi και οι συνεργάτες του, συνδύασαν dPCR μαζί με ανιχνευτές υδρόλυσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό του κυκλικού DNA του πλάσματος σε 213 έγκυες γυναίκες, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η dPCR μπορεί να διαγνώσει το σύνδρομο της τρισωμίας 21 μη επεμβατικά (El Khattabi et al., 2016). Αντίστοιχα, σε διαφορετική μελέτη αξιολογήθηκε η δυνατότητα της dPCR να ανιχνεύει τη δρεπανοκυτταρική νόσο (Sickle cell disease, SCD), διαπιστώνοντας ότι το 82% των αρσενικών εμβρύων και το 75% των θηλυκών εμβρύων διαγνώστηκαν με SCD μέσω της dPCR χρησιμοποιώντας το DYS14, τον ειδικό δείκτη του χρωμοσώματος Y (Barrett et al., 2012). Οι SMN1 και SMN2 στο 5q13 είναι παθογενετικοί παράγοντες για τη νωτιαία μυϊκή ατροφία (SMA). Συγκεκριμένα, ο αριθμός των αντιγράφων του SMN2 μπορεί να

χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός δείκτης. Διαπιστώθηκε ότι η dPCR μπορεί να ανιχνεύσει 0-3 αντίγραφα του SMN1 και 0-5 αντίγραφα του SMN2, με CV 1,7-3,7% και 2,1-2,7% αντίστοιχα. Εκτός αυτού, το κατώτερο όριο και ο βαθμός διακύμανσης ήταν πολύ χαμηλότερα από εκείνα της RT-PCR (Stabley et al., 2015). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2018, εντοπίστηκαν με τη χρήση της ddPCR οι παθογόνοι πατρικοί γονιδιακοί τόποι στο ελεύθερο κυκλοφορούν εμβρυϊκό DNA και στο DNA του αμνιακού υγρού. Παράλληλα, επιβεβαιώθηκε η παρουσία στο DNA του αμνιακού υγρού των παθογόνων πατρικών γονιδιακών τόπων χρησιμοποιώντας την τεχνική της αλληλούχησης κατά Sanger, η οποία κατέδειξε τα ίδια αποτελέσματα με την ddPCR. Αυτό απέδειξε ότι η ddPCR θα μπορούσε να πραγματοποιήσει ποιοτική ανάλυση μικρών δειγμάτων και να παράσχει αποτελεσματική, γρήγορη και ασφαλή προγεννητική διάγνωση μονογονιδιακών κληρονομικών νόσων χρησιμοποιώντας ως δείγμα το κυκλοφορόν εμβρυϊκό DNA (Xu et al., 2018). Η dPCR παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια από τις συνήθεις τεχνικές προγεννητικού ελέγχου που χρησιμοποιούνται και επομένως έχει μεγάλες διαγνωστικές δυνατότητες στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο.

3.3.2. Ανίχνευση χρωμοσωμικής ανευπλοειδίας

Όταν χρησιμοποιείται ο NIPT για την ανίχνευση ανευπλοειδικών διαταραχών, η αποτελεσματικότητα του περιορίζεται από το γεγονός ότι το χαμηλό επίπεδο του cffDNA παρεμποδίζεται από άσχετο μητρικό DNA. Συγκριτικά η dPCR παρουσιάζει σταθερή και υψηλή απόδοση, δεδομένου ότι μπορεί να μετρήσει απευθείας τα μόρια-στόχους. Διαπιστώθηκε ότι η ευαισθησία της Chip digital PCR (CdPCR) ήταν κατά πολύ υψηλότερη από εκείνη της RT-PCR και της fluorogenic quantitative PCR στην ανίχνευση των εμβρύων με σύνδρομο τρισωμίας 21. Μέσω της σύγκρισης των αλληλουχιών της αμυλοειδούς πρωτεΐνης στο χρωμόσωμα 21 και του αριθμού αντιγράφων της GAPDH στο χρωμόσωμα 12, η cdPCR ξεχώρισε με ακρίβεια το έμβρυο με σύνδρομο τρισωμίας 21, ακόμα και όταν το cffDNA αποτελούσε το 10% του συνολικού ελεύθερου DNA (cell free DNA) στο πλάσμα (Fan & Quake, 2007). Σε μεταγενέστερη μελέτη, η dPCR συνδυάστηκε με τη συγκριτική ανάλυση της μεθυλίωσης της μητέρας και του εμβρύου, χρησιμοποιώντας την ποσοτικοποιημένη έκφραση του γονιδίου ZFY στο χρωμόσωμα Y ως εσωτερικό πρότυπο. Η επιγενετική-γενετική αυτή προσέγγιση εξέτασε επιτυχώς πέντε δείγματα πλάσματος με σύνδρομο τρισωμίας 21 (Tong et al., 2010). Χρησιμοποιώντας ddPCR, ο Tsui και οι συνεργάτες του ποσοτικοποίησαν την έκφραση των

μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphism, SNPs) και του PLAC4 στο cfDNA, εντοπίζοντας τέσσερις περιπτώσεις συνδρόμου τρισωμίας 21, με ευαισθησία 100% και ειδικότητα 89%. Αυτή η μέθοδος όμως μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για την ανίχνευση ετερόζυγων SNPs (Tsui et al., 2010). Πρόσφατα αναπτύχθηκε μια απλή αλλά αποτελεσματική μέθοδος NIPT για την ανίχνευση ανευπλοειδίας που βασίζεται στην υψηλή ευαισθησία της dPCR στην ανίχνευση μεμονωμένων μορίων και στην ισχύ της στον απόλυτο ποσοτικό προσδιορισμό. Χρησιμοποιώντας αυτή τη νέα μέθοδο, εξετάστηκε δείγμα περιφερικού αίματος της μητέρας και τα αποτελέσματα προέκυψαν εντός 4,5 ωρών. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα 60 κλινικών δειγμάτων αξιολογήθηκε η ακρίβεια και η δυνατότητα κλινικής εφαρμογής αυτής της νέας μη επεμβατικής μεθόδου, η οποία κατέδειξε ποσοστό συμφωνίας 100% σε σύγκριση με το NGS (Tan et al., 2019).

3.3.3. Ανίχνευση αυτοσωμικών υπολειπόμενων διαταραχών

Το 2008 αναφέρθηκε ότι με βάση τη σχετική δόση μετάλλαξης και την επιλογή ψηφιακού μεγέθους, η dPCR θα μπορούσε να ανιχνεύσει τη β θαλασσαιμία. Στην περίπτωση μετάλλαξης πατρικής και μητρικής προέλευσης ο ποσοτικός προσδιορισμός του μεταλλαγμένου DNA της μητέρας και του μεταλλαγμένου DNA του εμβρύου μπορεί να βοηθήσει στη διάγνωση του εμβρύου που κληρονομεί παθογόνα γονίδια (Chu et al., 2010, Lun et al., 2008). Το 2012 με βάση πατρικούς απλότυπους και την αναμορφωμένη σχετική δόση μετάλλαξης, σχεδιάστηκαν ανιχνευτές για τις σφαιρίνες και τα εξωτερικά SNPs τους για να εντοπίσουν την περιοχή ενδιαφέροντος. Επιπλέον, με βάση τα SNPs που χωρίζονται σε ομάδες α και β, πραγματοποιήθηκε dPCR για τον προσδιορισμό του γονοτύπου του εμβρύου. Κατά συνέπεια, δυο οικογένειες β θαλασσαιμίας ελέγχθηκαν (Lam et al., 2012). Επίσης την ίδια χρονιά, χρησιμοποιώντας το DYS14 (έναν ειδικό δείκτη για το χρωμόσωμα Y), η dPCR ανίχνευσε το 82% των αρσενικών εμβρύων και το 75% των θηλυκών εμβρύων με SCD, υποδεικνύοντας ότι η πιστότητά της είναι αρκετά υψηλή ώστε να υπερκεράσει την πρόκληση της χαμηλής ποσότητας cfDNA και του υψηλού επιπέδου μητρικού DNA (Barrett et al., 2012).

3.3.4. Ανίχνευση γυναικολογικών όγκων

Η ddPCR ως τεχνική απόλυτου ποσοτικού προσδιορισμού υψηλής απόδοσης και χαμηλού κόστους, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο του ενισχυμένου γονιδίου HER2. Η

ddPCR μπορεί να ανιχνεύσει τον απόλυτο αριθμό αντιγράφων του HER2 στον διηθητικό καρκίνο του μαστού, ξεπερνώντας κατά πολύ την ημιποσοτική PCR, την αλληλούχηση δεύτερης γενιάς και τις υβριδικές τεχνολογίες chip (hybrid chip technologies). Η ταύτιση μεταξύ της ddPCR και της εξέτασης IHC+FISH φτάνει το 93,9% (31/33) στα θετικά και το 100% (77/77) στα αρνητικά αποτελέσματα. Ο αριθμός αντιγράφων HER2 σχετίζεται με καρκίνους που έχουν αρνητικούς τους δυο ορμονικούς υποδοχείς (οιστρογόνων και προγεστερόνης), υπερεκφρασμένο Ki-67 και υψηλού βαθμού ιστολογία. Ως εκ τούτου, μια υψηλότερη τιμή φθορισμού κατά την ddPCR αντιγράφων HER2 μπορεί να υποδηλώνει υψηλότερη κακοήθεια και φτωχότερη πρόγνωση. Όταν ο αριθμός αντιγράφων κάθε κυττάρου υπερβαίνει το 3,2, θα πρέπει να συνίσταται στον ασθενή να λάβει στοχευμένη θεραπεία HER2 (Liu et al., 2016).

HR – θετικός καρκίνος του μαστού

Επί του παρόντος, τα δυο τρίτα των διηθητικών καρκίνων του μαστού μπορούν να ταξινομηθούν ως καρκίνος του μαστού Luminal A (ή B), που είναι HR θετικός. Η ddPCR έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στα φάρμακα στην ενδοκρινική θεραπεία (endocrine therapy, ET) του HR θετικού καρκίνου. Ο καρκίνος μπορεί να γίνει ανθεκτικός στους οιστρογονικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται επανειλημμένα στην ET. Τα τελευταία χρόνια οι μεταλλάξεις ενεργοποίησης του υποδοχέα οιστρογόνων 1 (ESR1) έχουν περάσει στο επίκεντρο της έρευνας. Η NGS έχει διαπιστώσει ότι περισσότερο από το 80% των μεταλλάξεων του ESR1 εμπλουτίζονται στην τυροσίνη 537 και στο ασπαρτικό οξύ 538 (ESR1 Y537S, Y537N, Y537C, D538G) και σχετίζονται με την αντίσταση στην ET (Rugo et al., 2016, Robinson et al., 2013, Jeselsohn et al., 2014). Όταν χρησιμοποιούνται αυτές οι περιοχές ως δείκτες αντίστασης στην ET, θα πρέπει πρώτα να προσδιορίζεται ο γονότυπος ESR1. Η ανάλυση cfDNA μπορεί να ξεπεράσει τα μειονεκτήματα της βιοψίας κατά την οποία το δείγμα λαμβάνεται με παρακέντηση. Κατά την ανάλυση του cfDNA, η συχνότητα μετάλλαξης μπορεί να ανιχνευθεί σε εξαιρετικά χαμηλή ποσότητα cfDNA. Στο 10-30% του ανθεκτικού στην ET HR θετικού διηθητικού καρκίνου του μαστού, η NGS έχει ανιχνεύσει τον εμπλουτισμό του γονιδίου ESR1-LBD (Wang et al., 2016, Takeshita et al., 2015). Η συχνότητα μετάλλαξης του ESR1 είναι χαμηλή στον πρωτοπαθή όγκο του μαστού (PBT) (Gu & Fuqua, 2016). Έχει αποδειχθεί θεωρητικά ότι η ddPCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ακριβή ανίχνευση των CNVs (Copy Number Variation) του γονιδίου HER2, με μεγάλες

προοπτικές στην κλινική χρήση. Μια πρόσφατη μελέτη ανίχνευσε την κατάσταση του HER2 στο cfDNA του γαστρικού καρκίνου (προεγχειρητικά, μετεγχειρητικά και σε υποτροπή) (Belgrader et al., 2013). Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με τραστοζουμάμπη παρουσίασε χρονική και χωρική ετερογένεια. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας η γενετική διαφοροποίηση ή η χρήση χημειοθεραπευτικών μπορεί να αλλάξει το προφίλ του HER2, γεγονός που μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα στη χάραξη θεραπευτικής στρατηγικής. Στην περίπτωση αυτή μπορεί να εισαχθεί η ddPCR για την ανίχνευση του καρκίνου του μαστού HER2 σε πραγματικό χρόνο. Σε μελέτη του 2016 αποδείχθηκε ότι η αναλογία των μεταλλάξεων cfDNA ESR1 σε ασθενείς με θετικό υποδοχέα οιστρογόνων καρκίνου του μαστού άλλαξε κατά τη διάρκεια της θεραπείας και ότι η αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων cfDNA ESR1 σχετίζεται με κακή έκβαση της θεραπείας (Takeshita et al., 2016). Κατά συνέπεια, η χρήση της ddPCR για την παρακολούθηση των επαναλαμβανόμενων μεταλλάξεων ESR1 στο cfDNA μπορεί να προβλέψει την ανταπόκριση στη θεραπεία με οιστρογόνα. Με μια πολύ υψηλή ευαισθησία, το όριο ανίχνευσής της θα μπορούσε να φτάσει το 0,05%, σε σύγκριση με το 1% στην πολυπλεχτική ειδική για κάθε αλληλόμορφο PCR πραγματικού χρόνου (Wang et al., 2015) και το 3,1% στην NGS (Guttery et al., 2015).

Τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (Triple negative breast cancer, TNBC)

Οι TNBC αποτελούν μια ομάδα εξαιρετικά ετερογενών καρκίνων. Οι υπότυποι, οι στόχοι και οι μεταλλάξεις στους TNBC ανιχνεύονται κατά κύριο λόγο σύμφωνα με τη μοριακή παθολογία και τα προφίλ γονιδιακής έκφρασης (Gevensleben et al., 2013, Garcia-Murillas et al., 2013). Πρόσφατα, διεξάχθηκε έρευνα για τον καρκίνο του μαστού σε προχωρημένο στάδιο με στόχο να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της αλλαγής της θεραπείας όταν ανιχνεύονται ctDNA μεταλλάξεις σε ασθενείς. Οι ερευνητές ανίχνευσαν τη μετάλλαξη ESR1 που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα φάρμακα κατά τη διάρκεια της ενδοκρinoθεραπείας χρησιμοποιώντας την ddPCR για ανάλυση βιοψίας υγρού. Αν και η έρευνα βρίσκεται σε εξέλιξη, τα προκαταρκτικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η ddPCR θα μπορούσε να ανιχνεύσει γρήγορα τη μετάλλαξη ESR1. Η ddPCR είναι μια οικονομικά αποδοτική λύση για τους ερευνητές ώστε να πραγματοποιήσουν σε πραγματικό χρόνο την παρακολούθηση της μετάλλαξης ESR1 σε χιλιάδες δείγματα ctDNA (Carausu et al., 2019).

Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας

Η ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTC) σε ασθενείς με καρκίνο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και την πρόβλεψη υποτροπής του καρκίνου. Καθιερώθηκε μια ευαίσθητη δοκιμασία που βασίζεται σε μετάγραφα HPV ογκογονιδίων υψηλής εξειδίκευσης για τα κύτταρα του τραχήλου της μήτρας. Η Digital-Direct-RT-PCR (DD-RT-PCR) συνδυάζει τον διαχωρισμό με φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας, την μονιμοποίηση με κυτταρολογία υγρής φάσης και την RT-PCR ενός σταδίου σε μια μορφή dPCR χαμηλής απόδοσης που επιτρέπει την άμεση ανάλυση και ανίχνευση μεμονωμένων CTC χωρίς απομόνωση RNA. Τα πειραματικά δείγματα κατέδειξαν ευαισθησία ενός θετικού κυττάρου HPV σε 500.000 αρνητικά κύτταρα HPV. Πειράματα εμπλουτισμού (spike-in) με έως 5 θετικά κύτταρα για HPV ανά ml αίματος με EDTA σε συνδυασμό με PCR ή ανοσοχημεία έδειξαν θετικά αποτελέσματα. Αυτή η εξαιρετικά ευαίσθητη DD-RT-PCR για την ανίχνευση CTC μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλους όγκους που εκφράζουν ειδικά για τον όγκο μετάγραφα (Pfitzner et al., 2014). Το 2017 πραγματοποιήθηκε μελέτη που συνέκρινε δυο μεθόδους ποσοτικοποίησης, την dPCR και την τυπική qPCR. Παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις RNA της κυτταρικής σειράς καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν κλινικά δείγματα από κύτταρα λεμφαδένων με διαφορετικά επίπεδα μεταγραφής του HPV το καθένα. Για την ανάλυση τόσο των κλινικών δειγμάτων όσο και των δειγμάτων διαδοχικής αραιώσης η dPCR και η qPCR επέδειξαν συγκρίσιμη ευαισθησία. Όσον αφορά όμως την αναπαραγωγιμότητα οι δυο μέθοδοι διέφεραν σημαντικά, ιδίως για δείγματα με χαμηλό υπόστρωμα. Η dPCR εμφάνισε σημαντικά χαμηλότερο μέσο συντελεστή διακύμανσης σε σχέση με την qPCR. Γενικά, η dPCR παρουσίασε σημαντική μείωση των σφαλμάτων υποδειγματοληψίας, γεγονός που αντανakλά τη μεγάλη ποσότητα του cDNA που είναι διαθέσιμη για ανάλυση (Carow et al., 2017).

Καρκίνος των ωοθηκών

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Link και συνεργάτες, αναλύθηκε η κλινική σημασία των μεταγράφων MACC1 και S100A4 για τον καρκίνο των ωοθηκών, καθώς αυτά ανιχνεύονταν συστηματικά στον ορό κατά τη χειρουργική επέμβαση και την

χημειοθεραπεία. Τα μετάγραφα αυτά ποσοτικοποιήθηκαν σε δείγματα ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών τόσο με RT-qPCR όσο και ddPCR. Σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες τα μετάγραφα MACC1 και S100A4 στον ορό ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών ήταν σημαντικά αυξημένα. Κατά την πρωτογενή διάγνωση τα υψηλά επίπεδα αυτών των μεταγράφων συσχετίστηκαν με προχωρημένα στάδια του καρκίνου και ως εκ τούτου θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της επιβίωσης έπειτα από χειρουργική επέμβαση. Η συγκεκριμένη μελέτη είναι η πρώτη που προτείνει τα συγκεκριμένα μετάγραφα ως δυνητικούς δείκτες υγρής βιοψίας του καρκίνου των ωοθηκών (Link et al., 2019).

3.4. Διάγνωση και διαχείριση λοιμώξεων στην Εντατικολογία

Η λοιμώδης παθολογία αποτελεί την κύρια αιτία εισαγωγής στις μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ). Η σήψη, η οποία ορίζεται από την παρουσία μιας απορρυθμισμένης απάντησης του ξενιστή στη λοίμωξη που προκαλεί δυσλειτουργία των οργάνων, είναι παρούσα σε ποσοστό έως και 30% όλων των ασθενών στις ΜΕΘ (Sakr et al., 2018). Μια από τις κύριες αιτίες της σήψης είναι η βαριάς μορφής εξωνοσοκομειακή πνευμονία (Severe community acquired pneumonia, sCAP) βακτηριακής ή ιογενούς προέλευσης (Aliberti et al., 2021). Η τρέχουσα πανδημία του κορονοϊού (COVID 19) έχει ενισχύσει σε μεγάλο βαθμό τα κρούσματα sCAP σε όλο τον κόσμο (Merino et al., 2022). Με τη σειρά της η λοίμωξη είναι μια από τις συχνότερες επιπλοκές σε ασθενείς που νοσούν σε κρίσιμη κατάσταση. Η υπονόμευση των φυσικών φραγμών του οργανισμού από επεμβατικές συσκευές, χειρουργικές επεμβάσεις ή τραύματα, διάσπαση του βλεννογόνου, πληγές προερχόμενες από πίεση, πνευμονική βλάβη που προκαλείται από τον αναπνευστήρα, ανοσοκαταστολή, κακή θρεπτική κατάσταση, χρήση αντιβιοτικών ευρέος φάσματος που μεταβάλλουν τη μικροβιακή χλωρίδα, σε συνδυασμό με την αυξημένη έκθεση σε ευκαιριακά, συχνά πολυανθεκτικά (Multidrug-resistance, MDR) παθογόνα (Strich & Palmore, 2017), αποτελούν προδιαθεσικούς παράγοντες που ευνοούν τις επίκτητες λοιμώξεις στις ΜΕΘ (Martin & Yost, 2011). Η πνευμονία που σχετίζεται με τη χρήση αναπνευστήρα (Ventilator-associated pneumonia, VAP) προσβάλλει το 10-25% όλων των ασθενών που υποβάλλονται σε μηχανικό αερισμό μετά από τουλάχιστον 48 ώρες (Cillóniz et al., 2021). Άλλες συχνές ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις που προσβάλλουν ασθενείς σε μονάδες εντατικής θεραπείας είναι η ουρολοίμωξη λόγω του καθετήρα, η λοίμωξη της

κυκλοφορίας του αίματος (Bloodstream infections, BSI), οι λοιμώξεις του δέρματος και των τραυμάτων, η ιγμορίτιδα και η γαστρεντερική λοίμωξη (συχνά με *Clostridium difficile*) (Martin & Yost, 2011). Η κλινική διαχείριση αυτών των λοιμωδών νοσημάτων ή επιπλοκών περιλαμβάνει αρκετές προκλήσεις, όπως η έγκαιρη διάγνωση με ταυτοποίηση του μικροοργανισμού, ο καθορισμός της σοβαρότητας, η εκτίμηση της πρόγνωσης και η καθοδήγηση της θεραπείας (Merino et al., 2022). Η ανίχνευση βακτηριακών και μυκητιακών παθογόνων μικροοργανισμών εξακολουθεί να βασίζεται σε μεθόδους όπως οι καλλιέργειες, οι οποίες απαιτούν μεγάλο χρόνο διεκπεραίωσης και συχνά αποδίδουν χαμηλά ποσοστά θετικών αποτελεσμάτων (Hu et al., 2021). Για τα ιογενή παθογόνα η μέθοδος αναφοράς είναι συχνά η qPCR (Buchan & Ledebouer, 2014, Walter & Wunderink, 2017, Jung et al., 2020). Η dPCR παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα που την καθιστούν ιδανική τεχνική για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό μικροβιακών γονιδίων.

3.4.1. Ταυτοποίηση βακτηρίων και μυκήτων στο αίμα ή σε άλλα κλινικά δείγματα

Η dPCR έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση διαφόρων βακτηριακών παθογόνων σε σηπτικούς ασθενείς ή ασθενείς με υποψία αιματολογικής λοίμωξης (BSI) (Hu et al., 2021, Yamamoto et al., 2018, Shin et al., 2021, Zheng et al., 2021). Σε μελέτη του 2018 αναφέρεται πως διαγνώστηκε επιτυχώς σηπτικός ασθενής με διάχυτη λοίμωξη από *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) με την ανίχνευση ειδικών αλληλουχιών του MTB σε ολικό DNA ελεύθερο κυττάρων (cfDNA) στο πλάσμα. Η dPCR χρησιμοποιήθηκε έπειτα από μια σειρά αναλύσεις με διάφορες μεθόδους που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα πτυέλων, ούρων και αίματος και έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η dPCR είναι πιο ευαίσθητη από τις άλλες μοριακές μεθόδους και τις μεθόδους καλλιέργειας και επιπλέον θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως λιγότερο επεμβατικό διαγνωστικό εργαλείο για τις λοιμώξεις από MTB (Yamamoto et al., 2018). Σε άλλες δυο μελέτες η dPCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση σε cfDNA σημαντικών αρνητικών κατά Gram παθογόνων υπεύθυνων για αιματολογικές λοιμώξεις που απομονώθηκαν από το πλάσμα βαρέως πασχόντων ασθενών. Οι εν λόγω μελέτες αναφέρουν χρόνο από τη συλλογή δείγματος έως το αποτέλεσμα τρεις έως τέσσερις ώρες και όριο ανίχνευσης μια 1cfu/ml βακτηρίων στο αίμα και επιπλέον δείχνουν ότι η dPCR

ήταν καταλληλότερη από την qPCR (Shin et al., 2021, Zheng et al., 2021). Ο Hu και οι συνεργάτες του συνέκριναν την dPCR με την μεταγονιδιωμιακή αλληλούχηση νέας γενιάς (mNGS) και με την καλλιέργεια αίματος ως προς την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών και γονιδίων αντιμικροβιακής αντοχής (antimicrobial resistance, AMR) χρησιμοποιώντας δείγματα από μια ομάδα σηπτικών ασθενών με υποψία BSIs. Η dPCR επέδειξε μεγάλες δυνατότητες για τον εντοπισμό παθογόνων μικροοργανισμών που σχετίζονται συχνότερα με BSIs όπως και γονιδίων AMR, καθώς ήταν ταχύτερη και πιο αποδοτική από την mNGS και την καλλιέργεια αίματος (Hu et al., 2021). Σε όλες τις προηγούμενες μελέτες η κλινική επικύρωση αποκάλυψε ότι η μέθοδος dPCR υπερείχε της καλλιέργειας αίματος όσον αφορά την ειδικότητα, την ευαισθησία και τον χρόνο διεκπεραίωσης, αποτελώντας μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο για την έγκαιρη και ακριβή διάγνωση των BSI (Hu et al., 2021, Shin et al., 2021, Zheng et al., 2021). Τέλος, ένα πρωτόκολλο ddPCR καθιερώθηκε ως ικανό να ανιχνεύει και να ποσοτικοποιεί γονίδια σημαντικών ενδονοσοκομειακών βακτηριακών ειδών στις ΜΕΘ, όπως *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus* (Zaragoza et al., 2014). Οι παραπάνω δοκιμασίες είναι συμβατές με τη διενέργεια διπλών αντιδράσεων, παρουσιάζουν χαμηλή μεταβλητότητα αντιγραφής και πολύ χαμηλό όριο ανίχνευσης (λιγότερο από 1 pg DNA). Οι τρέχουσες εργασίες επικεντρώνονται στην εφαρμογή πρωτοκόλλων ddPCR απευθείας στο αίμα και στο σχεδιασμό ενός πάνελ που επιτρέπει την εξέταση όσο το δυνατόν περισσότερων δειγμάτων ταυτόχρονα. Ο κύριος περιορισμός της dPCR σε σχέση με την καλλιέργεια αίματος ή την mNGS, αλλά όχι με την qPCR, είναι ότι μπορεί να ανιχνεύσει μόνο τα παθογόνα που περιλαμβάνονται στα πάνελ. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα που προκύπτουν υποστηρίζουν ότι η έγκαιρη ταυτοποίηση των ανθεκτικών στα φάρμακα παθογόνων με dPCR μπορεί να βελτιώσει τα αποτελέσματα της θεραπείας (Hu et al., 2021, Shin et al., 2021, Zheng et al., 2021).

Η dPCR έχει επίσης δοκιμαστεί για την ανίχνευση του *Candida spp* στο αίμα, επιδεικνύοντας και πάλι υψηλότερη ειδικότητα και ευαισθησία από την καλλιέργεια αίματος και την qPCR (και οι δυο μέθοδοι αρνητικά αποτελέσματα σε αυτούς τους ασθενείς). Η ανίχνευση του *Candida spp* με dPCR επέτρεψε την εφαρμογή της κατάλληλης αντιμυκητιασικής θεραπείας, η οποία οδήγησε σε βελτίωση των ασθενών, υποστηρίζοντας τη χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου για την έγκαιρη διάγνωση της καντιναιμίας (Chen et al., 2021).

Τέλος η dPCR έχει εφαρμοστεί για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών και σε κλινικά δείγματα εκτός του αίματος. Για παράδειγμα η μέθοδος της dPCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση βακτηρίων και μυκήτων σε πλευριτικά και περιτοναϊκά υγρά βαρέως πασχόντων ασθενών, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με τα αντίστοιχα που προέκυψαν με μεθόδους καλλιέργειας. Σε σύγκριση με τις καλλιέργειες των πλευριτικών και των περιτοναϊκών υγρών, που αποτελούν και τις κύριες μεθόδους ανίχνευσης, η dPCR παρουσίασε ευαισθησία 96% και 93%, ειδικότητα 87% και 60%, διαγνωστική αξία θετικού αποτελέσματος 92% και 87% και διαγνωστική αξία αρνητικού αποτελέσματος 93% και 75% αντίστοιχα. Τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη πως η dPCR μπορεί να αποτελέσει μια γρήγορη και ευαίσθητη εναλλακτική λύση για την ανίχνευση μυκητιασικών λοιμώξεων του υπεζωκότα και του περιτόναιου (Zhou et al., 2021).

3.4.2. Ποσοτικοποίηση του μικροβιακού φορτίου για την αξιολόγηση της σοβαρότητας, της πρόγνωσης και της θεραπείας

Η δυνατότητα ποσοτικοποίησης των μικροβιακών γονιδίων με dPCR την καθιστά ιδανική μέθοδο για τον καθορισμό της σοβαρότητας, την αξιολόγηση της πρόγνωσης και την καθοδήγηση της θεραπείας. Ο χρόνος έως την εμφάνιση θετικού αποτελέσματος των καλλιιεργειών αίματος έχει προταθεί ως εναλλακτικός δείκτης του βακτηριακού φορτίου που υπάρχει στο αίμα και της κακής κλινικής έκβασης σε ασθενείς με BSI (Blot et al., 1998, Khatib et al., 2005, Kim et al., 2010). Ορισμένες μελέτες έχουν επίσης συσχετίσει την επίμονη BSI, που ανιχνεύεται στις καλλιέργειες αίματος παρακολούθησης, ως δείκτη για ενδοαγγειακές επιπλοκές και για κίνδυνο θνησιμότητας (Fernández-Cruz et al., 2013, Choi & Chung, 2012, Hsu et al., 2014).

Σε δυο μελέτες η dPCR χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό του βακτηριακού DNA, μέσω ενίσχυσης είτε γονιδίων ειδικών για το είδος (Ziegler et al., 2019(a), Ziegler et al., 2019(b)), είτε του ριβοσωμικού DNA 16S (rDNA) στο αίμα βαρέως πασχόντων ασθενών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ένα υψηλό αρχικό φορτίο 16S rDNA σχετιζόταν τόσο με τη σήψη κατά την εισαγωγή όσο και με τη θνησιμότητα, γεγονός που υποδεικνύει μια πιθανή κλινική αξία για την ποσοτικοποίηση του βακτηριακού DNA στο αίμα κατά την εισαγωγή ασθενών. Η παρακολούθηση του βακτηριακού φορτίου των ασθενών κατά την πορεία μιας BSI έδειξε ότι οι μη επιζώντες

είχαν σημαντικά υψηλότερα φορτία DNA από τους επιζώντες. Διαπιστώθηκε επίσης ότι το υψηλό φορτίο DNA έτεινε να συνδέεται με παρατεταμένη αύξηση της C αντιδρώσας πρωτεΐνης και με εμφάνιση λεμφοπενίας (Ziegler et al., 2019 (b)). Το όφελος από την παρακολούθηση της κλινικής εξέλιξης με βάση τον προσδιορισμό του φορτίου του βακτηριακού DNA καταδείχθηκε από μελέτη στην οποία αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα της αντιμικροβιακής θεραπείας μέσω του προσδιορισμού του βακτηριακού DNA την ημέρα μηδέν και την ημέρα πέντε. Το φορτίο του βακτηριακού DNA παρουσίασε μεγάλη μείωση με την πάροδο του χρόνου (Bialasiewicz et al., 2019). Η dPCR έχει επίσης επιδείξει τη χρησιμότητά της για την αξιολόγηση σοβαρότητας και της πρόγνωσης σε σοβαρές ιογενείς λοιμώξεις. Το ιικό φορτίο του ιού Epstein Bar (EBV) ποσοτικοποιήθηκε με dPCR στο πλάσμα ασθενών με σηψαιμία που προήλθε από sCAP. Η υπόθεση ήταν ότι η επανενεργοποίηση του EBV και τα επίπεδα του ιικού φορτίου θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμο βιοδείκτη της ανοσοκαταστολής και της πρόγνωσης των ασθενών. Διαπιστώθηκε ότι η επανενεργοποίηση του EBV ήταν συχνή σε σηπτικούς ασθενείς και το ιικό φορτίο του αυξανόταν με την πάροδο του χρόνου και αυτό σχετιζόταν με τη μεγαλύτερη παραμονή στις ΜΕΘ και με την αυξημένη οργανική ανεπάρκεια. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με την αντίληψη ότι η επανενεργοποίηση του ιού είναι συνέπεια της αποτυχίας του ανοσοποιητικού να αντιμετωπίσει τη σήψη (Goh et al., 2020).

3.4.3. Στόχευση της απόκρισης του ασθενούς

Αποτελέσματα που προέρχονται από τεχνολογίες υψηλής απόδοσης, όπως οι μικροσυστοιχίες ή η NGS, οι οποίες είναι σε θέση να αναλύσουν ολόκληρο το ανθρώπινο μεταγράφομα, έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη ειδικών αποκρίσεων του ασθενούς, οι οποίες είναι δυνητικά χρήσιμες για τη βελτίωση της διάγνωσης (Sweeney et al., 2015), τον καθορισμό της σοβαρότητας και την εκτίμηση της πρόγνωσης (Scicluna et al., 2017, Sweeney et al., 2018). Όσον αφορά το κομμάτι της διάγνωσης, η dPCR χρησιμοποιήθηκε σε μια σειρά μελέτες για να καθορίσει την αναλογία έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Η αναλογία αυτή χρησιμοποιήθηκε για να διαφοροποιηθεί η διάγνωση μεταξύ της σήψης και του συνδρόμου της συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), καθώς με τη χρήση της ddPCR κατά τη σήψη εντοπίστηκε η παρουσία μιας πρώιμης μοριακής απάντησης της IgM στο αίμα ασθενών, κάτι που δεν συνέβαινε σε ασθενείς με SIRS (Tamayo et al., 2014, Almansa et al., 2019).

Η dPCR έχει επίσης εφαρμοστεί για την αξιολόγηση του μεγέθους των βιολογικών διεργασιών που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της σήψης και είναι δύσκολο να ποσοτικοποιηθούν με τις μέχρι σήμερα διαθέσιμες μεθόδους. Για παράδειγμα, σε μια ομάδα ασθενών με λοίμωξη, σήψη ή σηπτικό σοκ καταδείχθηκε μια προοδευτική αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την επείγουσα κοκκιοποίηση αντίστοιχη με τη σοβαρότητα της κατάστασης (Martin-Fernandez et al., 2020).

Όσον αφορά την πρόγνωση, η dPCR χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί ο πιθανός ρόλος του μιτοχονδριακού DNA ως προγνωστικού παράγοντα θνησιμότητας σε ασθενείς με σηπτικό σοκ λόγω πολυανθεκτικών βακτηρίων (Busani et al., 2020). Επιπλέον, τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης του HLA – DRA που ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση dPCR αποτέλεσαν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα θνησιμότητας στη σήψη (Almansa et al., 2017). Τα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου είχαν ήδη προταθεί να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό εκείνων των ασθενών με σήψη που θα μπορούσαν να επωφεληθούν από ανοσοδιεγερτικά φάρμακα (Cajander et al., 2016). Το τελευταίο διάστημα, με τη βοήθεια της dPCR, αποκαλύφθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης ενός RNA (Rnase P) συσχετίζονται με τη σοβαρότητα της νόσου και την επιβίωση σε ασθενείς με COVID – 19 (Bruneau et al., 2022).

3.5. Εφαρμογές της dPCR στην εποχή του SARS-CoV-2/COVID 19

Η πανδημία που οφείλεται στο σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο λόγω του κορονοϊού 2 (SARS-CoV-2) εξακολουθεί να βρίσκεται σε εξέλιξη επηρεάζοντας αρκετές χώρες σε όλο τον κόσμο (Nyaruaba et al., 2022). Από την πρώτη αναφορά τον Δεκέμβριο του 2019 από το Wuhan της Κίνας, ο SARS-CoV-2 έχει εξαπλωθεί παγκοσμίως και έχει προκαλέσει κρίση της δημόσιας υγείας (Zhou et al., 2020). Παρόλο που η επείγουσα χρήση εμβολίων έχει αναπτυχθεί παγκοσμίως, η μοριακή διάγνωση της νόσου COVID 19 παραμένει σημαντική, κυρίως επειδή δεν μπορούν ή δεν θέλουν να εμβολιαστούν όλοι στον κόσμο και οι στρατηγικές εμβολιασμού διαφέρουν ανά χώρα (Chatterjee et al., 2021, Loomba et al., 2021). Επιπλέον, η εμφάνιση νέων παραλλαγών του SARS-CoV-2 που μπορούν να εξαπλωθούν ευκολότερα ή να θέσουν σε κίνδυνο την προστασία που παρέχει το εμβόλιο έχει οδηγήσει σε περισσότερα κρούσματα COVID 19 (Lucas et al., 2021, Luring & Malani, 2021). Ως εκ τούτου, για την ανίχνευση και απομόνωση των μολυσμένων ασθενών οι επιστήμονες έχουν διερευνήσει διάφορες δοκιμασίες ενίσχυσης

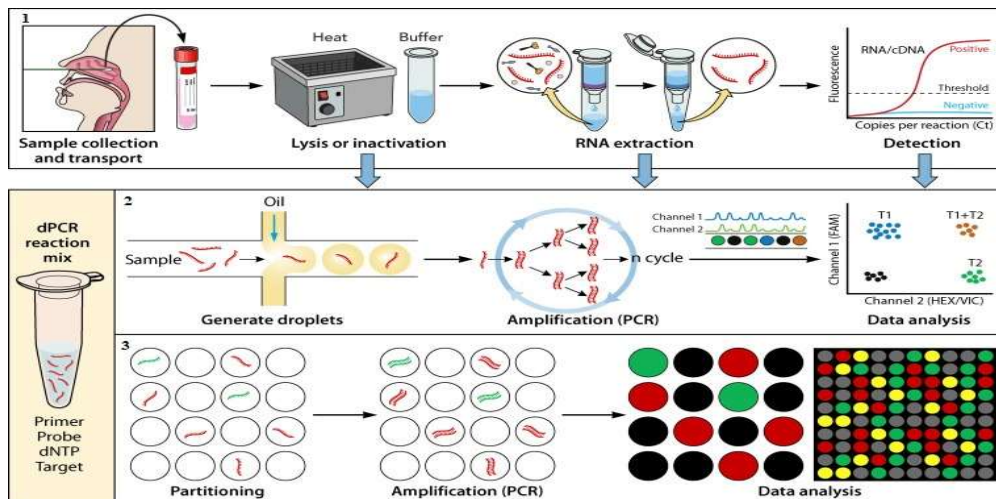
νουκλεϊκών οξέων (nucleic acid amplification tests, NAATs) (Centers for Disease Control and Prevention, 2023, Tali et al., 2021, Yu et al., 2021, Nyaruaba et al., 2021), συμπεριλαμβανομένης της RT-qPCR (Barreto et al., 2020, Synowiec et al., 2021, Smyrlaki et al., 2020) και της ισοθερμική ενίσχυση βρόχου (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP) (Thompson & Lei, 2020, Thi et al., 2020) και άλλων δοκιμασιών, όπως το CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) (Nouri et al., 2021, Broughton et al., 2020). Παρά τη χρήση των υφιστάμενων και την ανάπτυξη νέων NAATs, η κύρια τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 και τη διάγνωση της COVID 19 είναι η RT-qPCR (Nyaruaba et al., 2022).

Κατά τη διάρκεια της πανδημίας, για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 χρησιμοποιήθηκαν δυο μορφές dPCR, cdPCR και ddPCR. Η ροή των εργασιών από τη συλλογή του δείγματος έως και την ανίχνευση με dPCR αντίστροφης μεταγραφής RT – dPCR συνοψίζεται στην **Εικόνα 20**. Πριν από την RT-dPCR τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται και να υποβάλλονται σε επεξεργασία με τρόπο παρόμοιο με αυτόν της RT-qPCR. Τα δείγματα που συλλέγονται μπορούν να αναλυθούν ως ακατέργαστα λυτικά προϊόντα (Vasudevan et al., 2021) ή απευθείας με RT-dPCR ως νουκλεϊκά οξέα, έπειτα από καθαρισμό. Για την εξοικονόμηση κόστους τα δείγματα μπορούν να αναλυθούν πρώτα με RT-qPCR και στη συνέχεια τα ύποπτα ή τα αμφιλεγόμενα δείγματα μπορούν να αναλυθούν περαιτέρω με RT-dPCR (Liu et al., 2020, Nyaruaba et al., 2021). Η απόφαση για τη χρήση της RT-dPCR για την ανίχνευση και/ή τον ποσοτικό προσδιορισμό εξαρτάται αποκλειστικά από τη φύση του δείγματος (π.χ. δείγματα με χαμηλό ιικό φορτίο) και τον στόχο της διαδικασίας ανίχνευσης (π.χ. απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός, διακύμανση του αριθμού αντιγράφων ή γονιδιακή έκφραση κλπ) (Nyaruaba et al., 2022).

3.5.1. Επιλογή κατάλληλων εκκινητών και ανιχνευτών για τον έλεγχο του SARS-CoV-2

Από την αρχή της πανδημίας έχουν αναπτυχθεί διάφορα ζεύγη εκκινητών και ανιχνευτών για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 με RT-qPCR από διάφορα ιδρύματα δημόσιας υγείας σε όλο τον κόσμο. Λόγω των πολυάριθμων διαθέσιμων αλληλουχιών των ζευγών εκκινητών και ανιχνευτών, είναι δύσκολο να αποφασιστεί ποιο ζεύγος θα χρησιμοποιηθεί (Vogels et al., 2020). Ως εκ τούτου, η αναλυτική σύγκριση της ευαισθησίας, της ειδικότητας, της αποτελεσματικότητας και των ορίων ανίχνευσης αυτών των ζευγών για

την ανίχνευση στόχων χαμηλής συγκέντρωσης είναι κρίσιμη για κάθε δοκιμασία που αναπτύσσεται.



Εικόνα 20: Ροή εργασιών dPCR και αρχές ddPCR και cdPCR.

1. Επεξεργασία συλλογής δειγμάτων SARS-CoV-2. Τα βέλη δείχνουν συγκεκριμένα σημεία όπου τα δείγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανίχνευση. Τα δείγματα μπορούν να ανιχνευθούν ως ακατέργαστα λυτικά προϊόντα μετά την αδρανοποίηση, ως καθαρισμένο RNA μετά την εκχύλιση ή μετά από την RT-qPCR για περαιτέρω ανάλυση. Ct, κύκλος κατωφλίου. 2. Ροή εργασιών ddPCR. 3. Ροή εργασιών cdPCR (Nyaruaba et al., 2022).

Μελέτες έχουν διερευνήσει τις αποδόσεις διαφορετικών ζευγών εκκινητών και ανιχνευτών, τα οποία είχαν αρχικά σχεδιαστεί για RT-qPCR, χρησιμοποιώντας RT-dPCR (Liu et al., 2020, Kinloch et al., 2021, Park et al., 2021, Telwatt et al., 2021). Σε αυτές τις μελέτες η άμεση σύγκριση με την RT-qPCR έδειξε ότι η τιμή του κύκλου ποσοτικοποίησης (C_q) που παρατηρείται με την RT-qPCR εξαρτάται σημαντικά από τις αλληλουχίες των ζευγών εκκινητών και ανιχνευτών, ενώ οι αριθμοί αντιγράφων που προσδιορίζονται με την RT-dPCR δεν επηρεάζονται γενικά από τις αλληλουχίες των εκκινητών και των ανιχνευτών (Liu et al., 2020, Park et al., 2021). Η RT-dPCR έδειξε ότι είναι ικανή να ανιχνεύει χαμηλής συγκέντρωσης ιικά φορτία ακόμη και με μη βέλτιστα ζεύγη εκκινητών και ανιχνευτών (Liu et al., 2020). Επιπλέον υπάρχει η δυνατότητα να αναπτυχθεί μια λογαριθμική σχέση μεταξύ των τιμών C_q της RT-qPCR και του αριθμού αντιγράφων της RT-dPCR, η οποία να οδηγήσει στη δημιουργία ενός τύπου που θα χρησιμοποιείται σε κάθε δοκιμασία για την άμεση σύγκριση των τιμών C_q με τον αριθμό αντιγράφων χωρίς να χρειάζεται να επανεξεταστούν τα δείγματα (Kinloch et al., 2021, Yu et al., 2020). Τέλος, η RT-dPCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επικύρωση νέων

ζευγών εκκινητών και ανιχνευτών και για τη σύγκριση της αποτελεσματικότητάς του με εκείνη των υφιστάμενων ζευγών εκκινητών και ανιχνευτών (Telwatte et al., 2021). Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν πρωτόκολλα RT-dPCR ενός και δυο βημάτων. Διαπιστώθηκε ότι η αποτελεσματικότητα των ζευγών εκκινητών και ανιχνευτών αυξήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε μέθοδος RT-dPCR δυο βημάτων, σε αντίθεση με τη μέθοδο του ενός βήματος (Kinloch et al., 2021). Ταυτόχρονα τα ζεύγη με καλύτερη αποτελεσματικότητα ενίσχυσης ενδέχεται να παράγουν υψηλότερα πλάτη φθορισμού στα θετικά σταγονίδια, υπό τις ίδιες συγκεντρώσεις εκκινητών και ανιχνευτών. Επιπλέον σημαντικό ρόλο στην αξιολόγηση της απόδοσης των διάφορων συνόλων εκκινητών και ανιχνευτών διαδραματίζουν τόσο τα πρότυπα δείγματα αναφοράς, όσο και τα κλινικά δείγματα (Nyaruaba et al., 2022).

3.5.2. Ανάπτυξη πρότυπων δειγμάτων αναφοράς για τον έλεγχο του SARS-CoV-2

Τα πρότυπα δείγματα αναφοράς διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο στη μοριακή διάγνωση του SARS-CoV-2 από την αρχή της πανδημίας. Η καθιέρωση σταθερών, καλά χαρακτηρισμένων πρότυπων δειγμάτων αναφοράς βοηθά όχι μόνο στην επικύρωση των αποτελεσμάτων, αλλά και στην ανάλυση των μεθόδων, της ροής των εργασιών, των συσκευών και των διαγνωστικών κιτ για τον SARS-CoV-2 (Zhou et al., 2021, Niu et al., 2021, Whale et al., 2022, Wang et al., 2021, Xu et al., 2020). Ο ποσοτικός προσδιορισμός με qPCR απαιτεί δείγμα γνωστής ποσότητας για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης, η οποία με τη σειρά της χρησιμοποιείται για τον σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό (Nyaruaba et al., 2019, Quan et al., 2018, Whale et al., 2016). Αντίθετα, η dPCR μπορεί να πραγματοποιήσει απόλυτη ποσοτικοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών με ακρίβεια, χωρίς την ανάγκη πρότυπης καμπύλης. Καθ' όλη τη διάρκεια της πανδημίας το πλεονέκτημα αυτό της dPCR χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη εμπορικών υλικών αναφοράς για τον SARS-CoV-2 (Nyaruaba et al., 2022). Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι τα ποσοτικοποιημένα με dPCR πρότυπα δείγματα αναφοράς δίνουν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα ανάμεσα σε διαφορετικά εργαστήρια, ακόμα και όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικά όργανα dPCR (Zhou et al., 2021, Niu et al., 2021).

3.5.3. Περιβαλλοντική επιτήρηση του SARS-CoV-2

Πρόσφατα, οι στρατηγικές για την παρακολούθηση του SARS-CoV-2 εξελίχθηκαν από την προσέγγιση που βασίζεται αποκλειστικά στον ασθενή σε περιβαλλοντική επιτήρηση.

Η περιβαλλοντική επιτήρηση αποτελεί μια μη επεμβατική μέθοδο που διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην παρακολούθηση της νόσου και μπορεί να συμπληρώσει τις κλινικές εξετάσεις για την αξιολόγηση της υγείας του πληθυσμού (Liu et al., 2020, Chirizzi et al., 2021). Ωστόσο λόγω πολλών παραγόντων στο περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας αναστολέων, για την ανίχνευση θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια ιδιαίτερα ευαίσθητη και ανθεκτική στους αναστολείς μέθοδος. Αν και η qPCR χρησιμοποιείται ευρέως στις περιβαλλοντικές μελέτες για τον SARS CoV 2, συγκριτικές βιβλιογραφικές μελέτες έχουν δείξει ότι η RT-dPCR είναι πιο ευαίσθητη όσον αφορά την περιβαλλοντική επιτήρηση (Nyaruaba et al., 2022). Επιπλέον λόγω της κατάτμησης ενός δείγματος που οδηγεί σε αυξημένη ανοχή στους αναστολείς, τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών (CDC) έχουν επίσης συστήσει τη χρήση της RT-dPCR ενός σταδίου ως την πιο ευαίσθητη τεχνική για περιβαλλοντική δειγματοληψία, σε αντίθεση με την RT-qPCR (Centers for Disease Control and Prevention, 2020). Με την RT-dPCR μελετήθηκαν δείγματα αερολύματος (Liu et al., 2020, Chirizzi et al., 2021, Kayalar et al., 2021), επιφανειών (Jiang et al., 2020, Lv et al., 2020, Renninger et al., 2021) και υγρών αποβλήτων (Graham et al., 2021, D'Aoust et al., 2021, Ahmed et al., 2020, Zhou et al., 2021, Heijnen et al., 2021) και ποσοτικοποιήθηκαν επιτυχώς οι ποσότητες του SARS-CoV-2 σε αυτά. Σε αυτές τις μελέτες η RT-dPCR διαπιστώθηκε ότι είναι ευαίσθητη, ακριβής και εξαιρετικά ανθεκτική στους αναστολείς (Nyaruaba et al., 2022).

3.5.4. Ανίχνευση μεταλλάξεων του SARS-CoV-2

Οι ιοί RNA τείνουν να μεταλλάσσονται συχνά. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι η αιτία νέων παραλλαγών της νόσου που μπορεί να είναι πιο μολυσματικές ή ακόμη και πιο θανατηφόρες. Μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη της ακίδας του SARS-CoV-2 έχουν οδηγήσει σε νέες παραλλαγές, συμπεριλαμβανομένων των παραλλαγών που προκαλούν ανησυχία, όπως οι Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Delta (B.1.617.2), Gamma (P.1) και Omicron (B.1.1.529) οι οποίες έχουν την ικανότητα να εξαπλώνονται ταχύτατα, να προκαλούν ήπια έως σοβαρή νόσο, να διαφεύγουν την ανίχνευση με διαγνωστικές εξετάσεις, να εμφανίζουν ελαττωμένη ευαισθησία στα φάρμακα και να εμφανίζονται ανθεκτικά έναντι της φυσικής ή επίκτητης από εμβόλια ανοσίας (Science Brief: Emerging SARS-CoV-2 Variants., 2021, Harvey et al., 2021, SeyedAlinaghi et al., 2021, *Tracking SARS-CoV-2 Variants*, 2024, Torjesen, 2021). Επίσης οι ικές μεταλλάξεις αποτελούν δυνητική πρόκληση για τις μεθόδους ελέγχου νουκλεϊκών οξέων, οδηγώντας στην εμφάνιση

ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων (Bustin et al., 2020). Η αλληλούχηση παραμένει η κύρια μέθοδος για την ανίχνευση νέων παραλλαγών και μεταλλάξεων για τον SARS CoV 2. Δεδομένου όμως ότι η αλληλούχηση είναι δαπανηρή, δεν είναι άμεσα διαθέσιμη και δεν είναι πρακτική για τον έλεγχο όλων των δειγμάτων, μπορούν να αναπτυχθούν μέθοδοι με βάση την PCR για γρήγορο έλεγχο. Μόλις εντοπιστούν νέες θέσεις μετάλλαξης μπορούν να δημιουργηθούν ειδικοί εκκινητές για τις θέσεις αυτές για έλεγχο ρουτίνας με ευαίσθητες τεχνικές όπως η dPCR και η qPCR. Αξίζει εδώ να επισημανθεί πως με την κλασματοποίηση του δείγματος η dPCR έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει μεταλλάξεις που υπάρχουν σε χαμηλές συχνότητες σε εκμαγείο RNA άγριου τύπου, γεγονός που της παρέχει πλεονέκτημα έναντι της qPCR (Heijnen et al., 2021, Perchetti et al., 2021).

3.5.5. Ποσοτικός προσδιορισμός ιικού φορτίου του SARS-CoV-2

Τα ιικά φορτία του SARS-CoV-2 σε ασθενείς με COVID 19 μπορεί να διαφέρουν λόγω διαφόρων παραγόντων, όπως οι μέθοδοι συλλογής, η εξέλιξη και η σοβαρότητα της νόσου και ο τύπος του δείγματος (Tali et al., 2021, Veyer et al., 2021, Dhama et al., 2020, Pan et al., 2020). Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι οι τιμές C_q της RT-qPCR δεν μπορούν να ερμηνευθούν άμεσα ως ιικά φορτία χωρίς σχετική ποσοτικοποίηση (Han et al., 2021, Vierbaum et al., 2022). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι οι τιμές C_q για τον SARS CoV 2 δεν είναι αναπαραγώγιμες μεταξύ εργαστηρίων και πλατφορμών, ακόμη και όταν χρησιμοποιούνται ίδιας διαγνωστικής αξίας δείγματα (Vierbaum et al., 2022, Rhoads et al., 2021, Evans et al., 2021, Görzer et al., 2020, Sung et al., 2020). Οι τιμές C_q μπορεί να διαφέρουν από >10 (Rhoads et al., 2021) έως >1000 φορές σε αντίγραφα ανά χιλιοστόλιτρο για μια δεδομένη τιμή C_q όταν εφαρμόζονται πρωτόκολλα σχετικής ποσοτικοποίησης (Evans et al., 2021). Το γεγονός αυτό αποτελεί μια πρόκληση, καθώς δεν υπάρχει διεθνές αποδεκτό ποσοτικό πρότυπο υλικό αναφοράς SARS-CoV-2 για την RT-qPCR, το οποίο να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προτυποποίηση των μεθόδων και των οργάνων σε διαφορετικά εργαστήρια (Rhoads & Pinsky, 2021). Στον αντίποδα η RT-dPCR μπορεί να ξεπεράσει αυτόν τον περιορισμό λόγω του απόλυτου ποσοτικού προσδιορισμού που επιτυγχάνει χωρίς την ανάγκη σχετικής ποσοτικοποίησης. Επιπλέον, οι τιμές των αντιγράφων του ιού έχουν βρεθεί ότι είναι αρκετά αναπαραγώγιμες σε διαφορετικές πλατφόρμες και εργαστήρια όταν χρησιμοποιούνται τα ίδια υλικά αναφοράς (Zhou et al., 2021, Niu et al., 2021). Επομένως ο ακριβής και ευαίσθητος άμεσος ποσοτικός προσδιορισμός του ιικού φορτίου μέσω της RT-dPCR μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό παραγόντων που ενδέχεται να επηρεάζουν τα ιικά φορτία SARS-CoV-2 διαφορετικών δειγμάτων. Επίσης η παρακολούθηση των ιικών φορτίων σε ασθενείς μπορεί να βοηθήσει τους κλινικούς γιατρούς και τους ερευνητές να κατανοήσουν διάφορους παράγοντες, όπως η εξέλιξη της νόσου και οι συγκεντρώσεις RNA SARS CoV 2 σε διαφορετικούς τύπους δειγμάτων (Yu et al., 2020, Lu et al., 2020).

3.5.6. Ανάπτυξη διαγνωστικών κιτ του SARS-CoV-2

Επί του παρόντος μόνο τρία εμπορικά διαθέσιμα κιτ RT-dPCR έχουν λάβει έγκριση επείγουσας χρήσης (emergency use authorization, EUA) από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) για χρήση στην *in vitro* διάγνωση του SARS-CoV-2. Ο αριθμός αυτός είναι εντυπωσιακά μικρός σε σύγκριση με των αριθμό των κιτ RT-qPCR με έγκριση EUA από τον FDA για τον SARS-CoV-2 και άλλες λοιμώδεις νόσους, πιθανώς λόγω της σπανιότητας της μεθόδου (Yu et al., 2021). Σε αντίθεση με την RT-qPCR, όπου ορισμένα από τα κιτ μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εργαστήρια που μπορούν να εκτελέσουν εργαστηριακές δοκιμές μέτριας πολυπλοκότητας (M), και τα τρία κιτ RT-dPCR θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια που πληρούν τις προϋποθέσεις για την εκτέλεση ιδιαίτερα πολύπλοκων δοκιμών (H) (Yu et al., 2021). Επιπλέον, σε αντίθεση με τα περισσότερα κιτ RT-qPCR που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διαφορετικές πλατφόρμες, τα κιτ RT-dPCR είναι ειδικά για κάθε πλατφόρμα, γεγονός που μπορεί να αιτιολογήσει την απουσία πολλών διαθέσιμων εμπορικών κιτ RT-dPCR. Παρόλα αυτά τα κιτ RT-dPCR έχουν χρησιμοποιηθεί στην κλινική διάγνωση του SARS-CoV-2 (Veyer et al., 2021, Yu et al., 2020, Sun et al., 2021). Αυτά τα κιτ στοχεύουν σε ήδη καθορισμένα γονίδια του SARS-CoV-2, όπως τα γονίδια N και ORF1ab. Οι εταιρείες που παράγουν αυτά τα κιτ παράγουν επίσης, αν και όχι εγκεκριμένα από τον FDA, κιτ RT-dPCR για τον έλεγχο των παραλλαγών του SARS-CoV-2, τα οποία θα μπορούσαν να διαδραματίσουν κρίσιμο ρόλο στην ανίχνευση μεταλλάξεων που προκαλούνται από αυτές τις παραλλαγές.

3.5.7. Συνεισφορά στην αντική έρευνα έναντι του SARS-CoV-2

Τα αντικά φάρμακα είναι απαραίτητα για τη διαχείριση της νόσου καθώς συμβάλλουν στη μείωση της σοβαρότητας της νόσου στους μολυσμένους ασθενείς (Malin et al., 2020). Όταν εμφανίζεται ένα νέο παθογόνο, όπως ο SARS-CoV-2, οι ερευνητές δοκιμάζουν την αποτελεσματικότητα νέων ή/και υφιστάμενων φαρμάκων έναντι του νέου παθογόνου.

Συστήματα ποσοτικού προσδιορισμού, όπως η RT-qPCR και η RT-dPCR, χρησιμοποιούνται συχνά μετά την καλλιέργεια κυττάρων για τον προσδιορισμό του ποσοστού της ανασταλτικής επίδρασης αυτών των φαρμάκων (Wang et al., 2020). Χρησιμοποιώντας την RT-dPCR ως μέθοδο επιλογής μετά από πειράματα σε κύτταρα εξετάστηκε η αντική αποτελεσματικότητα του αντιεολονοσιακού φαρμάκου κινακρίνη (Qx) έναντι του SARS-CoV-2. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η Qx μπορεί να αναστείλει αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό του SARS-CoV-2 *in vitro* (Rojas et al., 2021). Σε άλλη μελέτη έγινε χρήση πολυπλεκτικής RT-dPCR για τον έλεγχο αποτελεσματικότητας των φαρμάκων, χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα το φάρμακο remdesivir (Nyaruaba et al., 2020). Αφού δοκιμαστούν τα φάρμακα η αποτελεσματικότητά τους μπορεί να ελεγχθεί *in vivo* με την παρακολούθηση των ικών φορτίων στους ασθενείς. Λόγω της μειωμένης διαθεσιμότητας σε πρότυπα αναφοράς μια μέθοδος άμεσου ποσοτικού προσδιορισμού, όπως η RT-dPCR, μπορεί να αποτελέσει τη μέθοδο επιλογής, έναντι της RT-qPCR, σε αυτές τις περιπτώσεις (Yu et al., 2020). Το πλεονέκτημα του άμεσου ποσοτικού προσδιορισμού έγινε εμφανές από μελέτη στην οποία η RT-dPCR χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του ικού φορτίου σε ασθενείς με COVID 19 κατά τη διάρκεια της θεραπείας, η οποία οδήγησε τελικά στη χορήγηση των φαρμάκων μοξιφλοξασίνη, ουμιφenoβίρη (Arbidol) και Pulidan (Lu et al., 2020).

4. Εφαρμογές dPCR στην Έρευνα

4.1. Βαθμονόμηση για αλληλούχηση υψηλής απόδοσης

Οι περιβαλλοντικές και κλινικές δειγματοληψίες για διαγνωστικές, εγκληματολογικές και μεταγονιδιωματικές εφαρμογές συχνά αποδίδουν μόνο νανογραμμάρια γενετικού υλικού, ποσότητα που θεωρείται ανεπαρκής για την προετοιμασία βιβλιοθηκών αλληλούχησης νέας γενιάς. Η συνήθης πρακτική είναι να ενισχύονται οι περιοχές ενδιαφέροντος με PCR ή με ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος, μέθοδοι που εισάγουν μεροληψία, σκόπιμα ή ακούσια, στη συνολική αντιπροσώπευση του δείγματος. Υπάρχει λοιπόν σαφής ανάγκη για μια απλή και αξιόπιστη μέθοδο για την εισαγωγή δειγμάτων ποσότητας της τάξης νανογραμμάρων ή και λιγότερη στις πλατφόρμες αλληλούχησης νέας γενιάς (White et al., 2009).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των βιβλιοθηκών αλληλούχησης νέας γενιάς με βάση τη μάζα, όπως συνίσταται στα πρωτόκολλα αλληλούχησης, παρουσιάζει τρία σημαντικά προβλήματα που τον καθιστούν ανακριβή σε βαθμό που διακυβεύονται τα αποτελέσματα της αλληλούχησης. Πρώτον, ο ποσοτικός προσδιορισμός με βάση τη μάζα απαιτεί ακριβή εκτίμηση του μήκους των μορίων για τον υπολογισμό της μοριακής συγκέντρωσης των θραυσμάτων DNA. Δεύτερον, με αυτόν τον τρόπο υπολογίζονται και τα αποικοδομημένα και κατεστραμμένα μόρια που δεν μπορούν να ενισχυθούν στο στάδιο της μαζικά παράλληλης ενίσχυσης. Τρίτον, οι μέθοδοι μέτρησης της μάζας του DNA στερούνται ευαισθησίας και είναι ανακριβείς σε ποσότητες ίσες ή και μικρότερες από λίγα νανογραμμάρια (White et al., 2009).

Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου και ιδιαίτερα η ψηφιακή PCR είναι ιδανικές υποψήφιες τεχνικές για τον ποσοτικό προσδιορισμό βιβλιοθηκών λόγω της εξαιρετικής ευαισθησίας τους. Οι ανιχνευτές TaqMan που χρησιμοποιούνται στην PCR πραγματικού χρόνου, έχουν την ιδιότητα της καταμέτρησης των μορίων και όχι της μάζας του DNA, αν και στη μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου, οι μετρήσεις είναι σχετικές και οι μέθοδοι με τις οποίες καθορίζονται τα πρότυπα συχνά συνδέουν τα αποτελέσματα της PCR με τη μάζα (White et al., 2009). Η πρώτη αναφορά ποσοτικοποίησης βιβλιοθηκών NGS με βάση την PCR παρουσίαζε μια δοκιμασία PCR πραγματικού χρόνου στην οποία χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική SYBRGreen (Meyer et al., 2007). Ωστόσο η χρήση της παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα, καθώς λόγω της παρεμβαλλόμενης φύσης της, το σήμα που ανιχνεύεται είναι ανάλογο με τη μάζα του DNA και όχι με τον αριθμό των μορίων. Επιπλέον οι αναλύσεις με χρήση SYBRGreen βασίζονται σε εξωτερικά πρότυπα που περιορίζουν την απόλυτη ακρίβεια και δεν είναι καθολικές για όλους τους τύπους δειγμάτων ενώ ταυτόχρονα καταγράφεται φθορισμός και από μη ειδικά προϊόντα (πχ διμερή εκκινητών) της αντίδρασης PCR. Έπειτα από την παραπάνω μελέτη εμφανίστηκε μια έκθεση από το Κέντρο Sanger που περιέγραφε τη χρήση ανιχνευτών TaqMan σε συνδυασμό με PCR πραγματικού χρόνου για την ποσοτικοποίηση βιβλιοθηκών NGS (Quail et al., 2008). Αν και αυτή η μέθοδος εξαλείφει ορισμένα από τα προβλήματα που σχετίζονται με τη χρήση της SYBRGreen, εμφανίζει τα ίδια μειονεκτήματα με όλες τις μεθόδους πραγματικού χρόνου.

Σε μια ανάλυση πραγματικού χρόνου το πρότυπο πρέπει να έχει την ίδια απόδοση ενίσχυσης και κατανομή μοριακού βάρους με το άγνωστο δείγμα. Κάτι τέτοιο σημαίνει

ότι ο χρήστης πρέπει να έχει στη διάθεσή του μια μαζική βιβλιοθήκη αλληλούχησης πολύ παρόμοια με τη βιβλιοθήκη που παρασκευάζεται και ότι οι κατανομές μοριακών βαρών τόσο του προτύπου όσο και της νέας βιβλιοθήκης είναι γνωστές, συχνά μια μη πρακτική απαίτηση για shotgun βιβλιοθήκες χαμηλής συγκέντρωσης. Επιπλέον αυτή η πρότυπη βιβλιοθήκη πρέπει να είναι εξαιρετικά υψηλής ποιότητας εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε ποσοτικοποίηση βάσει μάζας για τη βαθμονόμηση της ανάλυσης. Σε αντίθετη περίπτωση, η συγκέντρωση όλων των αγνώστων δειγμάτων θα υπερεκτιμηθεί και η απόδοση των εμπλουτισμένων σφαιριδίων ή συστάδων θα είναι χαμηλή (White et al., 2009).

Η μέθοδος της dPCR εξαλείφει τα προβλήματα που σχετίζονται με την ποσοτικοποίηση βάσει της μάζας και την PCR πραγματικού χρόνου, καθώς και την απαίτηση για χρήση πρότυπων δειγμάτων, μειώνοντας σημαντικά το κόστος της προετοιμασίας μιας βιβλιοθήκης για μαζική αλληλούχηση. Επιπλέον η ποσοτικοποίηση μέσω της dPCR εξοικονομεί χρόνο και αφήνει το υψηλού κόστους μηχανήμα αλληλούχησης ελεύθερο για τη διενέργεια μαζικών αλληλουχήσεων. Η ποσοτικοποίηση μέσω dPCR είναι αρκετά ακριβής στην καταμέτρηση των μορίων της βιβλιοθήκης που μπορούν να ενισχυθούν, ώστε να δικαιολογείται η κατάργηση της χρήσης προτύπων καθώς και του χρόνου και κόστους που συνδέονται με αυτά. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι εκατοντάδες εκατομμύρια φορές πιο ευαίσθητη από τα παραδοσιακά μέσα ποσοτικοποίησης και επιτρέπει την αλληλούχηση βιβλιοθηκών που παρασκευάζονται από δεκάδες έως εκατοντάδες πικογραμμάρια αρχικού υλικού, σε αντίθεση με τα μικρογραμμάρια DNA που απαιτούνται από τα πρωτόκολλα των κατασκευαστών. Η μειωμένη απαίτηση δείγματος επιτρέπει την εφαρμογή τεχνολογιών αλληλούχησης νέας γενιάς σε εξαιρετικά μικρά και πολύτιμα δείγματα χωρίς την ανάγκη πρότερης ενίσχυσης (White et al., 2009).

4.2. Ανάπτυξη κυτταρικών σειρών

Οι βιομηχανικές πλατφόρμες ανάπτυξης κυτταρικών σειρών (cell line development, CLD) αντιμετωπίζουν πιέσεις για την επιτάχυνση του χρόνου από την έναρξη της επιμόλυνσης έως και την τελική επιλογή κλώνου της κυτταρικής σειράς, καθώς η διαδικασία CLD βρίσκεται στην κρίσιμη πορεία προς τις πρώτες κλινικές δοκιμές στον άνθρωπο (Tan et al., 2022, Zhang et al., 2021, Hall et al., 2022, Schmieder et al., 2022). Επιπλέον ο αυξανόμενος αριθμός εξαιρετικά καινοτόμων και συχνά ασύμμετρων μορφών βιολογικών

φαρμάκων (asymmetrical biological drug formats) που περνούν από την έρευνα στην ανάπτυξη, αυξάνει σημαντικά την πολυπλοκότητα του προσδιορισμού του κατάλληλου κλώνου (Brinkmann & Kontermann, 2017). Για να αντιμετωπιστούν αυτές οι προκλήσεις έχουν αναπτυχθεί στρατηγικές για την προώθηση των πλατφορμών CLD, με έμφαση στη βελτιστοποίηση των φορέων έκφρασης και των μεθόδων ανάλυσης πρωτεϊνών (Wang et al., 2022, Srila et al., 2022, Tevelev et al., 2021). Ωστόσο τα τελευταία χρόνια τα γενετικά εργαλεία έχουν εξελιχθεί ώστε να επιτρέπεται η διαλογή και ο λεπτομερής χαρακτηρισμός των κυτταρικών σειρών που παράγονται με μεγάλη ακρίβεια.

Ιστορικά, οι γενετικές δοκιμές έχουν επικεντρωθεί στην επίδειξη της γενετικής ομοιογένειας και σταθερότητας τραπεζών κυτταρικών σειρών (Tevelev et al., 2021, Scarcelli et al., 2018, Tevelev et al., 2022, Clappier et al., 2023, Derouazi et al., 2005). Για τον επαναλαμβανόμενο χαρακτηρισμό της ίδιας κυτταρικής σειράς απαιτείται μια κατάλληλη μέθοδος που να παρουσιάζει χαμηλή μεταβλητότητα αλλά υψηλή ακρίβεια, ώστε να αποδεικνύεται η συνέπεια των δεδομένων και να κατευθύνονται ανάλογα οι δραστηριότητες ανάπτυξης. Μια σημαντική πτυχή του χαρακτηρισμού γενετικών κυτταρικών σειρών είναι ο προσδιορισμός του αριθμού αντιγράφων των ενσωματωμένων διαγονιδίων, ο οποίος απαιτεί μια μέθοδο ικανή να ποσοτικοποιεί αλληλουχίες ενδιαφέροντος εντός του γονιδιώματος του κυττάρου ξενιστή. Ενώ η ποσοτική PCR χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό του αριθμού αντιγράφων διαγονιδίων (Yang et al., 2022, Sergeeva et al., 2020, Torres et al., 2023), βασίζεται στον σχετικό προσδιορισμό των νουκλεϊκών οξέων με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η οποία συνεπάγεται εγγενώς υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ των δοκιμών με έναν κοινός αποδεκτό συντελεστή μεταβλητότητας (CV%) έως και 200% (Taylor et al., 2019). Η dPCR αναπτύχθηκε ως εναλλακτική τεχνολογία, η οποία επιτρέπει τον απόλυτο ποσοτικό προσδιορισμό των μορίων DNA από ένα δείγμα (Vogelstein & Kinzler, 1999). Η ικανότητα της ddPCR να παρέχει απόλυτο ποσοτικό προσδιορισμό των μορίων DNA χωρίς την ανάγκη εξωτερικών προτύπων, την καθιστά ένα ισχυρό εργαλείο για τη μέτρηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της γονιδιακής έκφρασης. Κατά τη διάρκεια της CLD οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως για τον λεπτομερή γενετικό χαρακτηρισμό, όπως ο προσδιορισμός των θέσεων ενσωμάτωσης (Clappier et al., 2023, Stadermann et al., 2021, Aeschlimann et al., 2019), η ανίχνευση των παραλλαγών αλληλουχίας χαμηλής συγκέντρωσης (Zhang et al., 2015) και η ανάλυση ολόκληρου του

μεταγραφώματος (Becker et al., 2011, Fischer et al., 2021) βασίζονται στην NGS. Παρόλα αυτά, οι τεχνικές που βασίζονται στην PCR παραμένουν ένα ουσιαστικό, ορθολογικό εργαλείο για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης λόγω της οικονομικής αποδοτικότητας και της ταχύτερης επεξεργασίας τους σε συνδυασμό με τη δυνατότητα παροχής πολλαπλών ενδείξεων από μια μόνο δοκιμή. Τα παραπάνω πλεονεκτήματα παρέχουν την ευκαιρία για δημιουργία μεθόδων υψηλής απόδοσης με βάση την PCR, κατάλληλες για ανάλυση σε πρώιμο στάδιο και διαλογή χιλιάδων κλώνων κατά τη διάρκεια της CLD. Το επίπεδο ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης με βάση την ddPCR μπορεί να επεκταθεί περαιτέρω μέσω της εφαρμογής multiplex PCR καθώς επιτρέπει τη διερεύνηση πολλών γονιδίων ταυτόχρονα σε μια μόνο αντίδραση (Te et al., 2015, Du et al., 2022, Nyaruaba et al., 2020, Dobnik et al., 2016, Whale et al., 2016).

Η ddPCR καθιερώθηκε ως μια εξαιρετικά αποτελεσματική, ακριβής και υψηλής πιστότητας μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενσωματωμένων διαγονιδίων και την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, καθιστώντας την ένα σημαντικό μέρος της ανάπτυξης κυτταρικών σειρών και του χαρακτηρισμού τραπεζών κυτταρικών σειρών. Η ddPCR μπορεί να υπολογίσει τους αριθμούς αντιγράφων των διαγονιδίων αξιόπιστα, με χαμηλή διακύμανση μεταξύ των δοκιμών. Επιπλέον η σύγκριση με δεδομένα RNA αλληλούχησης επαλήθευσε ότι οι τιμές της γονιδιακής έκφρασης μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με ακρίβεια μέσω της ddPCR και με την εφαρμογή μιας ευρείας πολυπλεξίας, η αποτελεσματικότητα και η απόδοση μπορούν να αυξηθούν περαιτέρω. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων της μεταγραφής με τη χρήση της ddPCR είναι μια καθολικά εφαρμόσιμη προσέγγιση, η οποία με ορισμένες τροποποιήσεις μπορεί να δώσει τη δυνατότητα της στοχευμένης ποσοτικοποίησης της μεταγραφής κατά τη διάρκεια ελεγχόμενων βιολογικών διεργασιών και διαλογής κλώνων. Ο έλεγχος για πολλαπλούς κυτταρικούς βιοδείκτες θα προωθήσει την ανάπτυξη κυτταρικών σειρών, συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου για κρίσιμες πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή και γονιδίων που επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα (π.χ. αποπτωτικά μονοπάτια) ή γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό μεταβολισμό και την αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Η χρήση της ddPCR σε σύγκριση με αυτήν της qPCR προσφέρει αυξημένη συνέπεια και αναπαραγωγιμότητα των απόλυτων τιμών του αριθμού αντιγράφων, που είναι απαραίτητες για τη συνεχή παρακολούθηση της σταθερότητας των κυτταρικών σειρών καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ανάπτυξης και του κύκλου ζωής του προϊόντος.

Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό λαμβάνοντας υπόψη τον κύκλο ζωής των βιολογικών προϊόντων, ο οποίος μπορεί να εκτείνεται σε αρκετές δεκαετίες από την πρώιμη ανάπτυξη κυτταρικών σειρών έως την επανατροφοδότηση νέων τραπεζών κυτταρικών σειρών (Heinzelmann et al., 2023). Παρόλο που και οι δυο μέθοδοι μπορούν να μετρήσουν με ακρίβεια τους αριθμούς αντιγράφων των διαγονιδίων και να αξιολογήσουν τη σταθερότητα του αριθμού αντιγράφων των κλώνων μιας κυτταρικής σειράς, μόνο η ddPCR επιτρέπει την επαρκή σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ ανεξάρτητων μεθόδων και πειραμάτων, όπως αποδεικνύεται από τις τιμές της CV% οι οποίες ανέρχονται μόλις στο 5%. Επίσης οι τιμές του αριθμού αντιγράφων, όπως προσδιορίζονται από την ddPCR, είναι κοντά στον πραγματικό αριθμό των υφιστάμενων γεγονότων ενσωμάτωσης, όπως επιβεβαιώνεται και από την ανάλυση κατά Southern, τον φθορίζον *in situ* υβριδισμό (Fluorescence in Situ Hybridization, FISH) και τον στοχευμένο πολλαπλασιασμό γενετικών τόπων (Targeted Locus Amplification, TLA) (Huhn et al., 2023, Dhiman et al., 2020).

4.3. Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (genetically modified organisms, GMO)

Για πολλά είδη φυτών, π.χ. αραβόσιτος, ελαιοκράμβη, ρύζι και σόγια υπάρχουν πολλαπλά γεγονότα γενετικής τροποποίησης. Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των GMO είναι σύνηθες να συσχετίζεται η γενετική τροποποίηση με ένα γονίδιο αναφοράς ειδικό για το είδος. Το γονίδιο αναφοράς μπορεί να εξυπηρετεί πολλαπλές λειτουργίες. Η πρωταρχική λειτουργία του είναι να ενημερώνει τον ερευνητή για την παρουσία ενός συγκεκριμένου είδους (συστατικού). Επιπλέον εάν ποσοτικοποιηθεί μπορεί να:

- Δώσει μια εκτίμηση της ποσότητας DNA του GMO που εξάγεται από το δείγμα
- Παρέχει δεδομένα σχετικά με την ποσότητα του DNA του είδους που είναι απαραίτητη εάν ο ερευνητής επιθυμεί να ποσοτικοποιήσει γεγονότα γενετικής τροποποίησης σχετικά με το είδος
- Επιτρέπει στον ερευνητή να προσδιορίσει το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) των συμβάντων γενετικής τροποποίησης του εν λόγω είδους στο δείγμα.

Όταν πολλαπλά γεγονότα γενετικής τροποποίησης συμβαίνουν στο ίδιο είδος, υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις για την αποδοτική, από πλευράς κόστους, ανίχνευση και ποσοτικοποίηση. Πολλά συμβάντα γενετικής τροποποίηση έχουν συμβεί με τη χρήση των ίδιων ή συναφών γενετικών στοιχείων, με αποτέλεσμα οι αλληλουχίες των ενθέσεων αυτών να είναι πανομοιότυπες ή να παρουσιάζουν υψηλή ομολογία. Αυτό έχει αξιοποιηθεί σε πολλά εργαστήρια που εφαρμόζουν τον λεγόμενο έλεγχο στοιχείων (element screening) ή την matrix approach για την ανίχνευση GMO. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι απαραίτητο να συμπληρωθεί αυτή η προσέγγιση με πρόσθετες μεθόδους που στοχεύουν σε συγκεκριμένα γεγονότα γενετικής τροποποίησης, προκειμένου να διευκολυνθεί η πλήρης κάλυψη όλων των εγκεκριμένων γεγονότων για ένα συγκεκριμένο είδος. Τα αποτελέσματα του ελέγχου μπορούν να αντιστοιχιστούν με ένα πίνακα αναφοράς που περιλαμβάνει δεδομένα παρουσίας/απουσίας για συγκεκριμένους δείκτες ελέγχου σε όλους τους γνωστούς GMO. Η αντιστοιχία μεταξύ των παρατηρούμενων προτύπων παρουσίας/απουσίας και των προτύπων συγκεκριμένων GMO στον πίνακα αναφοράς, υποδηλώνει πιθανή παρουσία των GMO στο εξεταζόμενο προϊόν. Η απουσία ευρημάτων για ορισμένα γενετικά στοιχεία αποτελεί ενδεικτική απόδειξη της απουσίας συγκεκριμένων GMO στα εξεταζόμενα προϊόντα, στο συγκεκριμένο LOD. Οι πληροφορίες αυτές μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για την επιλογή πιο ειδικών τύπων PCR για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό (Publications Office of the European Union, 2019).

Η χρήση της qPCR για αποδοτική από πλευράς κόστους ανίχνευση GMO τίθεται υπό αμφισβήτηση λόγω του μεγάλου και συνεχώς αυξανόμενου αριθμού GMO στην αγορά, συμπεριλαμβανομένων τόσο εγκεκριμένων όσο και μη εγκεκριμένων γεγονότων γενετικής τροποποίησης. Κάτι τέτοιο αποτελεί πρόβλημα διότι, πρώτον, κάθε ποσοτικοποίηση με qPCR απαιτεί μια πρότυπη καμπύλη υψηλής ποιότητας. Δεύτερον, σε περίπτωση ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πολλών γεγονότων γενετικής τροποποίησης ανά είδος (π.χ. σόγια), όλα αυτά τα ποσοτικά αναλυτικά αποτελέσματα (ανά γεγονός) πρέπει μερικές φορές να προστίθενται, όπως στην περίπτωση της αξιολόγησης της ορθής επισήμανσης τροφίμων ή ζωοτροφών. Ως αποτέλεσμα η συνολική σχετική τυπική απόκλιση (RSD) είναι ο συνδυασμός όλων των RSD, ως ρίζα των αθροιζόμενων τετραγώνων, γεγονός που μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα διότι ο ποσοτικός προσδιορισμός είναι ανακριβής και δύσκολος σε συγκεντρώσεις κοντά στο LOQ. Τρίτον,

οι αναστολείς της qPCR που εκχυλίζονται μαζί με το DNA του δείγματος μπορεί να προκαλέσουν πρόβλημα, καθώς μπορεί να οδηγήσουν σε άλλες αποδόσεις ενίσχυσης από αυτές που παρατηρούνται για τις πρότυπες καμπύλες, επηρεάζοντας έτσι την αξιοπιστία των ποσοτικών δεδομένων (Publications Office of the European Union, 2019).

Η χρήση της qPCR για αποδοτική από πλευράς κόστους ανίχνευση GMO τίθεται υπό αμφισβήτηση λόγω του μεγάλου και συνεχώς αυξανόμενου αριθμού GMO στην αγορά, συμπεριλαμβανομένων τόσο εγκεκριμένων όσο και μη εγκεκριμένων γεγονότων γενετικής τροποποίησης. Κάτι τέτοιο αποτελεί πρόβλημα διότι, πρώτον, κάθε ποσοτικοποίηση με qPCR απαιτεί μια πρότυπη καμπύλη υψηλής ποιότητας. Δεύτερον, σε περίπτωση ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πολλών γεγονότων γενετικής τροποποίησης ανά είδος (π.χ. σόγια), όλα αυτά τα ποσοτικά αναλυτικά αποτελέσματα (ανά γεγονός) πρέπει μερικές φορές να προστίθενται, όπως στην περίπτωση της αξιολόγησης της ορθής επισήμανσης τροφίμων ή ζωοτροφών. Ως αποτέλεσμα η συνολική σχετική τυπική απόκλιση (RSD) είναι ο συνδυασμός όλων των RSD, ως ρίζα των αθροιζόμενων τετραγώνων, γεγονός που μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα διότι ο ποσοτικός προσδιορισμός είναι ανακριβής και δύσκολος σε συγκεντρώσεις κοντά στο LOQ. Τρίτον, οι αναστολείς της qPCR που εκχυλίζονται μαζί με το DNA του δείγματος μπορεί να προκαλέσουν πρόβλημα, καθώς μπορεί να οδηγήσουν σε άλλες αποδόσεις ενίσχυσης από αυτές που παρατηρούνται για τις πρότυπες καμπύλες, επηρεάζοντας έτσι την αξιοπιστία των ποσοτικών δεδομένων (Publications Office of the European Union, 2019).

Η dPCR προσφέρει λύσεις και για τις τρεις αυτές μεγάλες προκλήσεις. Σε αντίθεση με την qPCR η ποσοτικοποίηση με dPCR δεν απαιτεί πρότυπη καμπύλη, διότι ο απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός που πραγματοποιείται με την dPCR είναι εγγενώς ποσοτικός. Όταν εφαρμόζεται για ένα ή πολλαπλά διαγονίδια καθώς και για το γονίδιο αναφοράς (ειδικό για κάθε είδος), μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα των γενετικών τροποποιήσεων σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς. Επιπλέον η κλασματοποίηση του δείγματος αυξάνει την αναλογία των στόχων χαμηλής συγκέντρωσης σε σχέση με το μη στοχευόμενο DNA. Κατά συνέπεια ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός των στόχων χαμηλής συγκέντρωσης από τους στόχους υψηλής συγκέντρωσης δεν αποτελεί γενικά πρόβλημα στην dPCR. Οι αναστολείς της PCR επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης, αλλά μόνο κατ' εξαίρεση οδηγούν σε πλήρη αναστολή της αντίδρασης ενίσχυσης. Για την qPCR ωστόσο η μερική αναστολή θα μείωνε την αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης και κατά συνέπεια

θα καθυστερούσε τη συσσώρευση του σήματος φθορισμού, οδηγώντας σε υποεκτίμηση της συγκέντρωσης του στόχου. Για την dPCR η μερική αναστολή δεν αποτελεί πρόβλημα, εφόσον η παρουσία ενός αντιγράφου μήτρας σε ένα μικροδιαμέρισμα ή σταγονίδιο αποδίδει θετικό σήμα ενίσχυσης ανιχνεύσιμο στο τελικό σημείο της αντίδρασης (Publications Office of the European Union, 2019).

Αρκετά εργαστήρια έχουν δοκιμάσει τις δυνατότητες της dPCR, είτε με τη μορφή μικροδιαμερισμάτων (cdPCR) είτε με τη μορφή σταγονιδίων (ddPCR), για την ανάλυση GMO. Ο λόγος των απόλυτων αριθμών αντιγράφων των διαγονιδίων ανά γονίδιο αναφοράς που προσδιορίστηκε με cdPCR βρέθηκε πανομοιότυπος με τον λόγο που μετρήθηκε με ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (qPCR), χρησιμοποιώντας ως πρότυπο δείγμα πλασμιδιακό DNA. Χρησιμοποιήθηκαν καλά χαρακτηρισμένα πιστοποιημένα πρότυπα για την επαλήθευση των διαφόρων παραδοχών της cdPCR, ορισμένες από τις οποίες αφορούν την στατιστική ανάλυση κατανομής Poisson. Οι παραδοχές αυτές είναι οι εξής: i) αναλύεται μεγάλος αριθμός αντιδράσεων PCR, μεγαλύτερος αριθμός επαναλήψεων/κλασματοποιήσεων σημαίνει μεγαλύτερη ισχύς για τη διαχείριση μικρών διαφορών (Pagano and Gauvreau, 2000), ii) τυχαία κατανομή του DNA-στόχου (Pinheiro et al., 2012), iii) ανεξάρτητος διαχωρισμός του DNA-στόχου (Bhat et al., 2009) iv) ότι κάθε μικροδιαμέρισμα που περιέχει ένα ή περισσότερα αντίγραφα DNA δίνει σήμα και v) ότι κάθε μόριο είναι δίκλωνο DNA (Bhat et al., 2010).

4.4. Έλεγχος των υδάτων

Παρά τις παγκόσμιες βελτιώσεις στα επίπεδα υγιεινής και στα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης, ένα μέρος του παγκόσμιου πληθυσμού εξακολουθεί να μην έχει πρόσβαση σε καθαρό, ασφαλές και πόσιμο νερό. Σύμφωνα με έκθεση των Ηνωμένων Εθνών το ποσοστό αυτό είναι περίπου το 26% του παγκόσμιου πληθυσμού, 2 δισεκατομμύρια άτομα που ανήκουν κυρίως σε χώρες με χαμηλό εισόδημα (UN-Water, 2021).

Το νερό αποτελεί μέσο μετάδοσης πληθώρας παθογόνων μικροοργανισμών που ευθύνονται για τις λεγόμενες υδατογενείς ασθένειες. Τα περιττώματα των ζώων και του ανθρώπου είναι από τις κύριες πηγές μόλυνσης και η κοπρανο-στοματική οδός είναι η πιο κοινή οδός μετάδοσης, κυρίως λόγω της άμεσης κατάποσης ή της χρήσης μολυσμένου νερού για το πλύσιμο των τροφίμων (Cabral, 2010, Shayo et al., 2023). Οι εντερικοί ιοί, συμπεριλαμβανομένων των αδενοϊών, των εντεροϊών, όπως οι ιοί κοξάκι και οι πολιοϊοί,

οι ιοί της ηπατίτιδας Α και Ε, οι ροταϊοί, οι αστροϊοί και οι νοροϊοί είναι οι πιο διαδεδομένοι στα κόπρανα μολυσμένων ατόμων και παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε υδάτινο περιβάλλον, γεγονός που τους καθιστά σημαντικούς για την ανθρώπινη υγεία (Hamza & Bibby, 2019). Ομοίως, όσον αφορά τα βακτήρια η μόλυνση του νερού προέρχεται κυρίως από πηγές κοπράνων. Σε αυτά περιλαμβάνονται εκτός από τα *Escherichia coli* και τον *Enterococcus spp.* και τα βακτήρια *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, καθώς και τα γένη *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter* και *Yersinia* (Tiwari et al., 2022, Shayo et al., 2023). Μεταξύ των υδάτινων περιβάλλοντων που εμπλέκονται στη μετάδοση παθογόνων μικροοργανισμών τα υγρά απόβλητα αποτελούν ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα, καθώς αποτελούν μια πολυποίκιλη μήτρα που προέρχεται από οικιακές, νοσοκομειακές, γεωργικές και βιομηχανικές δραστηριότητες. Οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (Wastewater treatment plants, WWTPs) έχουν σχεδιαστεί για την απομάκρυνση των οργανικών και ανόργανων μολυσματικών παραγόντων από τα λύματα. Ωστόσο μερικές φορές η απολύμανση δεν είναι απολύτως αποτελεσματική, καθιστώντας τις ίδιες τις εγκαταστάσεις ως δεξαμενή για πολυάριθμους μολυσματικούς, γόνιμο έδαφος για γεγονότα ανασυνδυασμού και οδό μετάδοσης μεταξύ διαφορετικών τμημάτων της κοινωνίας (Singh et al., 2019, Rizzo et al., 2013). Η παρακολούθηση τόσο της παρουσίας όσο και της παραμονής των παθογόνων μικροοργανισμών στις πηγές νερού είναι ύψιστης σημασίας και απαιτεί την εφαρμογή ανθεκτικών και αξιόπιστων τεχνολογιών, ικανών να παρέχουν αδιαμφισβήτητα αποτελέσματα. Σε αυτό το πλαίσιο η dPCR αποτελεί μια εξαιρετική τεχνολογία της οποίας ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα είναι η παράκαμψη των αναστολέων που απαντώνται συνήθως στο νερό και στα λύματα, εξασφαλίζοντας ακριβή ανίχνευση ακόμη και σε πολύπλοκα εκμαγεία (Cao et al., 2014, Hoshino & Inagaki, 2012). Κατά την προ-COVID εποχή η qPCR αποτελούσε την κύρια μοριακή τεχνική στον τομέα της μικροβιολογίας του νερού, συμπεριλαμβανομένης της επιτήρησης των λυμάτων (Botes et al., 2012, Oliver et al., 2015, Stokdyk et al., 2020, Brooks et al., 2019, An et al., 2020, Fujioka et al., 2015, Wang et al., 2016). Ωστόσο λόγω των πολλά υποσχόμενων χαρακτηριστικών της η dPCR χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο την τελευταία δεκαετία και έχουν δημοσιευθεί αρκετές μελέτες που αξιολογούν την αποτελεσματικότητά της. Οι περισσότερες από αυτές αποκάλυψαν ίση ή υψηλότερη ακρίβεια (Wang et al., 2016), ευαισθησία (Crain et al., 2021, Jahne et al.,

2019) και αξιοπιστία σε σύγκριση με την qPCR, καθώς και τη μικρότερη ευαισθησία σε αναστολές (Wang et al., 2016, Crain et al., 2021, Jahne et al., 2019). Επιπλέον όπως αποδείχτηκε η dPCR προσφέρει λύση στο ζήτημα της υπερεκτίμησης των στόχων στην RT-qPCR που σχετίζεται με τη σχετική ποσοτικοποίηση και την ανάγκη για πρότυπη καμπύλη (Varela et al., 2018).

4.4.1. Παρακολούθηση λυμάτων

Η αποτελεσματικότητα που επέδειξε η dPCR στα πλαίσια της επιδημιολογίας των λυμάτων κατά την COVID εποχή, ανέδειξε τη σημασία της και προώθησε τη χρήση της και για την παρακολούθηση άλλων παθογόνων. Για παράδειγμα, η ddPCR χρησιμοποιήθηκε σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων στη Νότια Αφρική για την αξιολόγηση της παρουσίας γονιδίων ανθεκτικότητας έναντι στα αντιβιοτικά (ARGs) που σχετίζονται με την αντοχή στη φυματίωση. Εντοπίστηκαν ARGs που σχετίζονται με αμινογλυκοσίδες και με το νέο φάρμακο βεδακιλίνη (Mtetwa et al., 2021). Η ίδια ερευνητική ομάδα προσδιόρισε επίσης τη συγκέντρωση τόσο του συνόλου των μυκοβακτηριδίων όσο και των μελών του συμπλέγματος *Mycobacterium tuberculosis*, αποδεικνύοντας τη χαμηλή επίδραση της επεξεργασίας στην απομάκρυνσή τους (Mtetwa et al., 2022). Πιο πρόσφατα, αξιολογήθηκε η αφθονία των *sul2* (αντοχή στις σουλφοναμίδες) και *tetW* (αντοχή στην τετρακυκλίνη) σε αστικά συστήματα διανομής νερού και λυμάτων στο Αλικάντε της Ισπανίας. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για τους δύο ARGs με μεγαλύτερη αφθονία στα νοσοκομειακά λύματα και στις εισροές των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων (Maestre-Carballa et al., 2024, Ferraro et al., 2024).

4.4.2. Παρακολούθηση επιφανειακών υδάτων

Κατά παρόμοιο τρόπο στον τομέα παρακολούθησης των επιφανειακών υδάτων, ο αριθμός των μελετών που χρησιμοποιούν την dPCR έχει αυξηθεί ραγδαία. Η αποτελεσματικότητα της dPCR αξιολογήθηκε στη μέτρηση του *E. coli* και των μικροβιακών δεικτών εντοπισμού πηγής (microbial source tracking markers, MST) στη λεκάνη απορροής του ποταμού Rouge και στην παραλία Rouge (περιοχή Μεγάλων Λιμνών, ΗΠΑ). Ανακαλύφθηκε ότι η μόλυνση από ανθρώπινα κόπρανα κατά μήκους της παραλίας Rouge και στα χαμηλότερα τμήματα της λεκάνης απορροής σχετίζεται κυρίως με γεγονότα βροχής, ενώ η μόλυνση από κόπρανα γλάρων αποδείχθηκε ότι είναι το κύριο είδος

μόλυνσης στην παραλία (Staley et al., 2018). Σε μελέτη, που είχε ως στόχο την αξιολόγηση της συγκέντρωσης Comammox (COMplete AMMonia Oxidizers) σε 13 λίμνες στην Ελβετία, στην Αυστρία και τη Γερμανία, χρησιμοποιήθηκε μια δοκιμασία ddPCR για την ανίχνευση του γονιδίου amoA. Το αποτέλεσμα ήταν η αποκάλυψη της τάσης του *Nitrospira* να ζει στη διεπιφάνεια ιζήματος/επιφάνειας νερού παρά σε πελαγικές ζώνες (Harringer & Alfreider, 2021). Επιπλέον η ddPCR εφαρμόστηκε πρόσφατα στην παρακολούθηση των ARGs σε ποτάμια και θαλάσσια ύδατα. Μελέτη εντόπισε την παρουσία των γονιδίων β λακταμάσης AmpC και *intl1* σε γονιδιωματικό και πλασμιδιακό DNA από τους ποταμούς της Νότιας Αφρικής, αναδεικνύοντας έναν δυνητικό κίνδυνο διάδοσης της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς (Coertze & Bezuidenhout, 2018). Σε παρόμοια μελέτη αποκαλύφθηκε η μακροχρόνια εμφάνιση των γονιδίων *sul2* (48%) και *intl1* (76%) σε θαλάσσια δείγματα πλαγκτόν (Di Cesare et al., 2018).

4.4.3. Παρακολούθηση πόσιμου νερού

Η εξασφάλιση της πρόσβασης του πληθυσμού σε ασφαλές πόσιμο νερό είναι απαραίτητη για την προώθηση της συνεχιζόμενης και βιώσιμης κοινωνικής και οικονομικής προόδου (Luvhimbi et al., 2022). Πρόσφατες μελέτες χρησιμοποίησαν την ddPCR για την παρακολούθηση της παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, ιών και πρωτόζωων, προκειμένου να αξιολογηθεί η ποιότητα του πόσιμου νερού. Για παράδειγμα, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες ddPCR ειδικές για συγκεκριμένα είδη για τη διερεύνηση της μικροβιακής ανάπτυξης και των μεταβολών της μικροβιακής οικολογίας σε αμερικάνικα συστήματα διανομής νερού λόγω της χρήσης ορθοφωσφορικού $(\text{PO}_4)^{3-}$. Το $(\text{PO}_4)^{3-}$ χρησιμοποιείται συνήθως για την αντιμετώπιση της διάβρωσης του μολύβδου. Ωστόσο μέσω της συγκεκριμένης έρευνας επιβεβαιώθηκε η συμμετοχή του στην αύξηση του συνολικού αριθμού των βακτηρίων και στη μεταβολή της μικροβιακής κοινότητας. Συγκεκριμένα καταγράφηκε αύξηση των μη φυματικών μυκοβακτηρίων και μείωση του *Legionella pneumophila* (Spencer-Williams et al., 2023). Σε άλλη μελέτη εξετάστηκε, μέσω της χρήσης ddPCR, ένα πλήρες σύστημα πόσιμου νερού και των πύργων ψύξης για τη συνύπαρξη διαφόρων ειδών *Legionella* και των φυσικών πρωτοζωικών ξενιστών τους (*Acanthamoeba spp.* and *Naegleria fowleri*). Η μελέτη αυτή αποκάλυψε σημαντική συνύπαρξη των *L. pneumophila*, *L. micdadei*, *L. bozemanii* και *N. fowleri* (Logan-Jackson & Rose, 2021). Τέλος, η ddPCR

χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της ποιότητας του νερού σε συστήματα συνεχούς υδροδότησης και περιοδικής υδροδότησης στο Nagpur της Ινδίας. Όπως αναμενόταν, βακτήρια όπως το *Shigella*, το εντεροδιεισδυτικό *Escherichia coli* (EIEC), το εντεροτοξινογόνο *E. coli* (ETEC), πρωτόζωα όπως το *Cryptosporidium* spp. και το *Giardia* spp., ιοί όπως οι νοροϊοί GI και GII και ο αδενοϊός A-F ήταν λιγότερο διαδεδομένοι στις οικιακές βρύσες που εξυπηρετούνταν από συστήματα συνεχούς υδροδότησης σε σύγκριση με εκείνες που εξυπηρετούνταν από συστήματα περιοδικής υδροδότησης (Bivins et al., 2021).

5. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία περιγράφηκαν οι βασικές αρχές που διέπουν την dPCR καθώς και οι τεχνολογίες κατανομής του δείγματος στις διάφορες χρησιμοποιούμενες πλατφόρμες. Επιπλέον παρουσιάστηκε ο πειραματικός σχεδιασμός της μεθόδου και έγινε αναφορά σε παραμέτρους που σχετίζονται με την ποσοτικοποίηση καθώς και σε κάποια τεχνικά κριτήρια, τα οποία διασφαλίζουν ότι η μέθοδος λειτουργεί σωστά. Επίσης έγινε εκτενής αναφορά στις εφαρμογές της dPCR στη σύγχρονη Διαγνωστική και στην έρευνα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι έχει αναφερθεί μέχρι τώρα, είναι φανερό πως η dPCR αποτελεί μια μέθοδο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης DNA υψηλής πιστότητας και ευαισθησίας, η οποία διαθέτει πλεονεκτήματα όπως η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση χαμηλών συγκεντρώσεων DNA και η ανθεκτικότητα στους αναστολείς της PCR. Ωστόσο και αυτή υπόκειται σε περιορισμούς και σε κάποια σημεία υστερεί σε σχέση με την qPCR. Παρόλα αυτά η μέθοδος της dPCR συνεχίζει να εξελίσσεται με στόχο να ενισχύσει την απόδοση και την αξιοπιστία της.

5.1. Συγκριτική παράθεση των μεθοδολογιών των dPCR και qPCR

Τόσο η ποσοτική η qPCR όσο και η dPCR παρέχουν ευαίσθητη και ειδική ανίχνευση και ακριβή ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων. Οι δυο τεχνολογίες παρουσιάζουν ομοιότητες αλλά και διαφορές που καθιστούν την καθεμία καταλληλότερη επιλογή για συγκεκριμένες εφαρμογές. Η βασική διαφορά τους έγκειται στη στρατηγική που χρησιμοποιούν για τη μέτρηση της ποσότητας της αλληλουχίας στόχου. Στην περίπτωση της qPCR, η αντίδραση παρακολουθείται καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ενίσχυσης

και η ποσοτικοποίηση βασίζεται στην ανάλυση του φθορίζοντος σήματος στην εκθετική φάση. Αντίθετα, η dPCR συλλέγει σήματα φθορισμού μέσω της μέτρησης του τελικού σημείου και χρησιμοποιεί τον αριθμό των θετικών κλασματοποιήσεων επί του συνόλου για τον εκ των υστέρων υπολογισμό της συγκέντρωσης στόχου. Η dPCR αναγάγει την ποσοτικοποίηση στην απαρίθμηση μιας σειράς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων μετατρέποντας έτσι ένα συνεχές ή αναλογικό σήμα σε μια σειρά δυαδικών ή ψηφιακών σημάτων (Quan et al., 2018). Σε αντίθεση με την qPCR, η dPCR δεν βασίζεται σε καμπύλες βαθμονόμησης για την ποσοτικοποίηση του δείγματος. Ως εκ τούτου αποφεύγει τα προβλήματα που σχετίζονται με τις διακυμάνσεις στην αποτελεσματικότητα των αντιδράσεων (Svec et al., 2015). Ο ποσοτικός προσδιορισμός με dPCR βασίζεται σε στατιστική ανάλυση που ορίζει μαθηματικά την εγγενή ακρίβεια και τις παραμέτρους αυτής της αναλυτικής μεθόδου (Quan et al., 2018).

Η dPCR αναμένεται να παρουσιάζει μικρότερη ευαισθησία σε αναστολές που μειώνουν τη δραστηριότητα των ενζύμων όπως απλά άλατα (ασβέστιο, νάτριο), πολυφαινόλες, απορρυπαντικά, πολυσακχαρίτες, EDTA (Schrader et al., 2012). Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει την υψηλότερη ανοχή της dPCR σε διάφορους τύπους αναστολέων σε σύγκριση με την qPCR (Taylor et al., 2017, Nixon et al., 2014, Dingle et al., 2013, Rački et al., 2014, Zhao et al., 2016, Hoshino & Inagaki, 2012, Sedlak et al., 2014). Ωστόσο η ανθεκτικότητα στους αναστολές εξαρτάται ειδικά από τον ανασταλτικό παράγοντα (Nixon et al., 2014). Συνεπώς το παραπάνω συμπέρασμα δεν είναι ασφαλές να γενικευθεί. Κάθε αντιδραστήριο και γνωστός αναστολέας θα πρέπει να αξιολογείται διεξοδικά ως προς την πιθανή ανασταλτική του δράση (Nixon et al., 2014). Η dPCR μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για κλινικά δείγματα όπως κόπρανα, πτύελα και ιστοί που είναι γνωστό ότι περιέχουν πολλούς αναστολές (Nixon et al., 2014, Dingle et al., 2013). Παρόλα αυτά, σε μια μελέτη αναφέρθηκε ότι η dPCR εμφανίζει μειωμένη απόδοση σε κλινικά δείγματα, κάτι που δεν συμβαίνει όταν χρησιμοποιούνται πρότυπα DNA (Hayden et al., 2012), εγείροντας ερωτήματα για την ικανότητα βελτιστοποίησης της μεθόδου (Taylor et al., 2015).

Η dPCR υπερτερεί της qPCR σε αναλύσεις διακύμανσης του αριθμού αντιγράφων (Huggett et al., 2013, Whale et al., 2012, Zhong et al., 2011) και σε αναλύσεις αφθονίας των μεταλλάξεων σε μελέτες ιώσεων (Taylor et al., 2015) καθώς και μελέτες για τον καρκίνο (Fontanelli et al., 2015, Sanmamed et al., 2014). Η dPCR που βασίζεται στη

χρήση σταγονιδίων παρουσίασε μεγαλύτερη ακρίβεια με μειωμένο συντελεστή διακύμανσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA του HIV (Strain et al., 2013) ή των miRNAs του ορού (Hindson et al., 2013). Εκφράστηκαν όμως ανησυχίες ότι η ακρίβεια της dPCR θα μπορούσε να πλήττεται καθώς στον ποσοτικό προσδιορισμό του RNA του HIV εμφανίζει ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Kiselinova et al., 2014). Σε συμφωνία με τις στατιστικές εκτιμήσεις η ακρίβεια της dPCR εξαρτάται τόσο από τον αριθμό των επαναλήψεων όσο και από τη συγκέντρωση του προτύπου (Whale et al., 2012). Είναι ενδιαφέρον ότι η RT-dPCR μπορεί να αποκαλύψει την απροσδόκητη μεταβλητότητα στα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων που χρησιμοποιούνται ως πρότυπα στην RT-qPCR (Alikian et al., 2016).

Μια συγκριτική αξιολόγηση της απόδοσης μεταξύ μιας καθιερωμένης ανάλυσης qPCR και μιας ανάλυσης dPCR που βασίζεται σε σταγονίδια, έδειξε συγκρίσιμη ευαισθησία ανίχνευσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό του HIV 1 DNA είτε με dPCR σταγονιδίων (Henrich et al., 2012), είτε με την πλατφόρμα SlipChip (Shen et al., 2011). Σε άλλες μελέτες η RT-dPCR και η RT-ddPCR έδειξαν μικρότερη ευαισθησία από την RT – qPCR για την ποσοτικοποίηση του RNA του CMV (Nixon et al., 2014, Hayden et al., 2012) και του RNA του HIV (Kiselinova et al., 2014), όταν το ικό φορτίο ήταν χαμηλό. Αντίθετα, η RT-dPCR έδειξε υψηλότερη ευαισθησία από την RT-qPCR για την ανίχνευση του βιοδείκτη BCR-ABL όταν συνδυάστηκε με ένα βήμα προενίσχυσης (Goh et al., 2011), αλλά δεν είχε την ίδια καλή απόδοση χωρίς την προενίσχυση (Alikian et al., 2016). Η χαμηλότερη ευαισθησία της dPCR σε σύγκριση με την qPCR αποδίδεται κυρίως στην διαφορά του συνολικού όγκου της αντίδρασης (Huggett et al., 2013, Nixon et al., 2014, Hayden et al., 2012). Ενδιαφέρον στοιχείο αποτελεί ότι μια παράλληλη σύγκριση μιας ανάλυσης dPCR που πραγματοποιήθηκε σε μια συσκευή Megapixel και μια ανάλυση qPCR αποκάλυψε παρόμοια δυναμικά εύρη (Heyries et al., 2011). Τα παραπάνω αποτελέσματα συνάδουν με το γεγονός ότι η qPCR μπορεί να περιοριστεί από την ενίσχυση χωρίς πρότυπο στο χαμηλότερο εύρος συγκέντρωσης και από την εξαρτώμενη από το DNA αναστολή της PCR στο ανώτερο εύρος της συγκέντρωσης του στόχου.

Το γεγονός ότι η dPCR δεν απαιτεί χρήση πρότυπων δειγμάτων θα πρέπει να προσδίδει πλεονέκτημα στην αναπαραγωγικότητα της ανάλυσης (Huggett et al., 2013). Συγκριτικά, είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η qPCR πάσχει από φτωχή αναπαραγωγικότητα (Bustin et al., 2013, Dijkstra et al., 2014, Hayden et al., 2007, Zhang et al., 2007). Ο συντελεστής

διακύμανσης είναι γενικά χαμηλότερος όταν χρησιμοποιείται η dPCR σε σύγκριση με την qPCR, ωστόσο, τα δεδομένα που συγκρίνουν την ημερήσια ή την διεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα της dPCR και της qPCR είναι ελάχιστα. Σε μια τέτοια μελέτη η ddPCR παρουσίασε πολύ υψηλότερη ημερήσια αναπαραγωγικότητα από την qPCR στην ποσοτικοποίηση των miRNAs του ορού (Hindson et al., 2013).

Παρά τον σχετικά περιορισμένο αριθμό εμπεριστατωμένων μελετών που συγκρίνουν τις επιδόσεις της dPCR και της qPCR, προκύπτουν μερικά βασικά σημεία. Πρώτον, ο μικρός όγκος κατανομής συμβάλλει στην ανθεκτικότητα της dPCR σε μια μεγάλη ποικιλία αναστολέων. Επιπλέον η dPCR είναι πιο ακριβής για τον ποσοτικό προσδιορισμό της σχετικής αφθονίας (π.χ. CNV, φορτίο μεταλλαγμένων αλληλόμορφων).

Αν και η dPCR έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της qPCR δεν έχει καταφέρει να την αντικαταστήσει πλήρως. Η χαμηλή απόδοση σε σύγκριση με την qPCR και οι μεγαλύτεροι χρόνοι απόκρισης των σημερινών συστημάτων dPCR δεν έχουν επιτρέψει στην τεχνική αυτή να μετατραπεί σε ανάλυση ρουτίνας (De La Soldedad Lagunes-Castro et al., 2022). Ένα βασικό επιχείρημα που θα μπορούσε να υποστηρίξει την ευρεία χρήση της dPCR σε κλινικές συνθήκες θα ήταν η αναμενόμενη υψηλή αναπαραγωγικότητα, ωστόσο, η ημερήσια και η διεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα της dPCR δεν έχει ακόμη αξιολογηθεί αυστηρά.

5.2. Μειονεκτήματα της dPCR

Ως τεχνική ενίσχυσης ενός μορίου με υψηλό λόγο σήματος/θορύβου και ευαισθησία, η dPCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων DNA (Lun et al., 2008). Ωστόσο εξακολουθούν να υπάρχουν περιορισμοί. Ο όγκος του δείγματος σε κάθε μικροδιαμέρισμα της αντίδρασης καθορίζει το κατώτατο όριο ανίχνευσης. Το δυναμικό εύρος ανίχνευσης ελαττώνεται, δεδομένου ότι ο αριθμός των μικροδιαμερισμάτων είναι περιορισμένος. Σε αυτά τα μικροδιαμερίσματα δεν ενισχύεται όλο το DNA, με αποτέλεσμα συνεχή σήματα και ψευδή ποσοτικοποίηση χαμηλού επιπέδου, ιδίως στην RT-dPCR στην οποία η αντίστροφη μεταγραφή των στόχων μπορεί να είναι ελλιπής και να μην ανιχνεύονται όλα τα αντίγραφα (Mao et al., 2019). Επιπλέον έχουν αναφερθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις νουκλεϊκών οξέων μπορούν να οδηγήσουν σε κορεσμό της dPCR, γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία της επαρκούς αραιώσης (Deurenberg et al., 2016, Rohit et al., 2019, Roy et al., 2019, Costa et al., 2019).

Εκτός αυτού η dPCR δεν είναι κατάλληλη για την ενίσχυση τμημάτων μεγάλου μήκους. Η χαμηλή απόδοση εκχύλισης και ο υψηλός κίνδυνος μόλυνσης του δείγματος αποτελούν εμπόδια που πρέπει επίσης να ξεπεραστούν. Η αντίδραση dPCR εξακολουθεί να σχεδιάζεται σύμφωνα με τις παραμέτρους των συσκευών, παράγοντας μεγάλη διαφορά στα αποτελέσματα της ανάλυσης (Kuypers & Jerome, 2017). Η αποκλειστικότητα των αντιδραστηρίων με βάση τη χρησιμοποιούμενη πλατφόρμα αποτελεί έναν ακόμα περιορισμό καθώς δεν επιτρέπει την εργασία με μια διαφορετική πλατφόρμα, συμπεριλαμβανομένης της πολυπλεχτικής προσέγγισης (De La Solvedad Lagunes-Castro et al., 2022). Επιπλέον η cdPCR αντιμετωπίζει προβλήματα λόγω του υψηλού κόστους και της χαμηλής απόδοσης. Η ddPCR γίνεται ασταθής στην ανίχνευση δειγμάτων με χαμηλό αριθμό αντιγράφων και πρέπει να επαναλαμβάνεται για να ληφθούν τα κατάλληλα δεδομένα (Mao et al., 2019). Ορισμένα πρωτόκολλα dPCR εμφανίζουν δυναμικό εύρος ανίχνευσης παρόμοιο ή μικρότερο από αυτό που προσφέρει μια ανάλυση qPCR, γεγονός που σε ορισμένες περιπτώσεις ελαττώνει την ευαισθησία της ανάλυσης. Τέλος το κόστος του εξοπλισμού και των αντιδραστηρίων εξακολουθεί να είναι υψηλό (Ramírez et al., 2018, Wilson et al., 2014).

5.3. Μελλοντικές προοπτικές της dPCR

Η dPCR χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ευαισθησία, ακρίβειά και δυνατότητα ποσοτικοποίησης, καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη διερεύνησης νέων δυνατοτήτων της και των μελλοντικών προοπτικών της. Στο πλαίσιο αυτό, η συγκεκριμένη τεχνολογία εξελίσσεται με ταχείς ρυθμούς και οι προσπάθειες επικεντρώνονται στην ενίσχυση της απόδοσης και της αξιοπιστίας της. Γίνονται προσπάθειες για την ανάπτυξη πολύ ειδικών και ευαίσθητων μορίων φθορισμού για τη βελτίωση της διάκρισης του σήματος από τον θόρυβο του υποβάθρου (Whale et al., 2016). Έχει ήδη προταθεί μέθοδος για τη δημιουργία εικονικών χρωματικών καναλιών φθορισμού σε συσκευές dPCR με τη χρήση καθολικών μορίων αναφοράς (universal reporter molecules), επεκτείνοντας τα τυπικά χρωματικά κανάλια και προσφέροντας εξαιρετική ευαισθησία για την ανίχνευση μεταλλάξεων. Η προσέγγιση αυτή είναι οικονομικά αποδοτική και ευέλικτη και θεωρείται πολλά υποσχόμενη για εφαρμογές σε πεδία όπως η διαγνωστική του καρκίνου. Μελλοντικές μελέτες μπορούν να διερευνήσουν την επέκταση αυτής της μεθοδολογίας και σε άλλες τεχνικές (Schlenker et al., 2021).

Επιπλέον η εισαγωγή προηγμένων αλγορίθμων φέρνει επανάσταση στην ανάλυση δεδομένων της dPCR, επιτρέποντας την ακριβέστερη ποσοτικοποίηση αντιγράφων-στόχων. Τα τελευταία χρόνια έχει εισαχθεί ένας αλγόριθμος image-to-answer προσαρμοσμένος για την επεξεργασία των εικόνων της dPCR, βελτιώνοντας τον εντοπισμό των μικροδιαμερισμάτων, την εξαγωγή της τιμής F και την επακόλουθη ανάλυση. Ο αλγόριθμος αξιοποιώντας τεχνικές όπως ο «μετασχηματισμός Hough» και ο «τρισδιάστατος μετασχηματισμός προβολής» επιτυγχάνει ακριβή εντοπισμό των μικροδιαμερισμάτων και διόρθωση της έντασης του φθορισμού. Επίσης εξασφαλίζει αξιόπιστη απόδοση στην ανάλυση συστημάτων dPCR που βασίζονται σε τσιπ, προσφέροντας μια ευέλικτη λύση για τις τρέχουσες και τις μελλοντικές πλατφόρμες (Yan et al., 2022).

Επιπρόσθετα έχει παρουσιαστεί μια προσέγγιση για τον απόλυτο ποσοτικό προσδιορισμό που συνδυάζει δύο διαφορετικούς αλγόριθμους, ανιχνεύοντας και διακρίνοντας αποτελεσματικά τα θετικά σταγονίδια. Η επεκτασιμότητα της συγκεκριμένης προσέγγισης υπόσχεται αυξημένη ακρίβεια με την αύξηση του αριθμού των σταγονιδίων, καθιστώντας την ως ένα πολύτιμο εργαλείο για την ακριβή ψηφιακή ανάλυση διαφόρων μολυσματικών ασθενειών (Lee et al., 2023).

Τα τελευταία χρόνια η dPCR έχει αναπτυχθεί περαιτέρω με τη βοήθεια μικρορευστονικών τσιπ. Οι πλατφόρμες που προκύπτουν από τη χρήση της συγκεκριμένης τεχνολογίας ταξινομούνται κυρίως σε δυο ομάδες, dPCR νερού σε έλαιο και dPCR συστοιχίας μικροδιαμερισμάτων. Αυτές οι πλατφόρμες απλοποιούν σημαντικά την διαδικασία της dPCR (Ren et al., 2023). Σε αντίθεση με τις πλατφόρμες ddPCR, οι πλατφόρμες που χρησιμοποιούν μικροδιαμερίσματα, λόγω της κατανομής του δείγματος σε μεγάλο αριθμό μικροδιαμερισμάτων ίσου όγκου, δημιουργούν σταγονίδια τα οποία είναι ομοιόμορφα και σταθερά (Ramakrishnan et al., 2012, Heyries et al., 2011, Sefrioui et al., 2015, Conte et al., 2015, Zonta et al., 2016). Επιπλέον οι dPCR που χρησιμοποιούν μικρορευστονικά τσιπ μπορούν να απεικονιστούν άμεσα με ένα σχετικά απλό μικροσκόπιο φθορισμού, γεγονός το οποίο είναι βολικό για τον έλεγχο της ποιότητας των δεδομένων. Τα προϊόντα του τσιπ μπορούν να αποθηκευτούν σε περιβάλλον αποθήκευσης για περισσότερους από δώδεκα μήνες και να εξακολουθούν να είναι χρησιμοποιήσιμα. Η δυνατότητα αυτή προσφέρει οφέλη όπως η ευελιξία, η φορητότητα και το χαμηλό κόστος μαζί με την υψηλή ακρίβεια και την επαναληψιμότητα (Liu et al., 2019, Si et al., 2020, Ning et al., 2018). Η

μικρορευστονική λόγω των διαφόρων πλεονεκτημάτων της, όπως ο μικρός όγκος δείγματος και η γρήγορη ταχύτητα αντίδρασης, έχει καταστεί ιδανική για την ανάπτυξη τεχνολογιών διάγνωσης ασθενειών, οι οποίες διαθέτουν χαμηλό κόστος και υψηλή ακρίβεια (Xu et al., 2020, X. Xu & He, 2021).

Η dPCR βρίσκει ολοένα και περισσότερες εφαρμογές στα πεδία της διαγνωστικής και της έρευνας. Στην περίπτωση των μεταγονιδιωματικών αναλύσεων, για παράδειγμα, η ικανότητα της συγκεκριμένης τεχνικής να ποσοτικοποιεί με ακρίβεια συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA σε πολύπλοκα δείγματα να αποδεικνύεται ανεκτίμητη για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλομορφίας και την ταυτοποίηση οργανισμών, ιδίως σε κλινικά περιβάλλοντα (Kuypers & Jerome, 2017). Επιπλέον μια πρόσφατη μελέτη περιγράφει την απόδοση μιας multiplex dPCR, η οποία ανιχνεύει ταυτόχρονα τον SARS-CoV-2, τους ιούς της γρίπης Α, τους εντεροϊούς και τους νοροϊούς των γονιδιακών ομάδων Ι και ΙΙ. Παρά το γεγονός ότι η συγκεκριμένη μελέτη δεν διεξήχθη σε κλινικά δείγματα αλλά σε απόβλητα, παρόλα αυτά τα αποτελέσματά της είναι ελπιδοφόρα (Malla et al., 2023).

Συμπερασματικά, η dPCR συνεχίζει να εξελίσσεται με ελπιδοφόρες προοπτικές, συμπεριλαμβανόμενης της εφαρμογής νέων τεχνολογιών και της επέκτασης σε νέους τομείς, όπως η μεταγονιδιωματική. Οι καινοτόμες προσεγγίσεις που αποσκοπούν στην βελτίωση της ευαισθησίας και της ακρίβειας, ανοίγουν το δρόμο για ένα ευρύ φάσμα διαγνωστικών και ερευνητικών εφαρμογών σε βιοϊατρικούς και περιβαλλοντικούς τομείς (Mirabile et al., 2024).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adriko, M., Tinkitina, B., Arinaitwe, M., Kabatereine, N. B., Nanyunja, M., & M Tukahebwa, E. (2018). Impact of a national deworming campaign on the prevalence of soil-transmitted helminthiasis in Uganda (2004-2016): Implications for national control programs. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(7), e0006520. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006520>
- Aeschlimann, S. H., Graf, C., Mayilo, D., Lindecker, H., Urda, L., Kappes, N., Burr, A. L., Simonis, M., Splinter, E., Van Min, M., & Laux, H. (2019). Enhanced CHO Clone Screening: Application of Targeted Locus Amplification and Next-Generation Sequencing Technologies for Cell Line Development. *Biotechnology Journal*, 14(7). <https://doi.org/10.1002/biot.201800371>
- Ahmed, W., Bertsch, P. M., Angel, N., Bibby, K., Bivins, A., Dierens, L., Edson, J., Ehret, J., Gyawali, P., Hamilton, K. A., Hosegood, I., Hugenholtz, P., Jiang, G., Kitajima, M., Sichani, H. T., Shi, J., Shimko, K. M., Simpson, S. L., Smith, W. J. M., Symonds, E. M., ... Mueller, J. F. (2020). Detection of SARS-CoV-2 RNA in commercial passenger aircraft and cruise ship wastewater: a surveillance tool for assessing the presence of COVID-19 infected travellers. *Journal of travel medicine*, 27(5), taaa116. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa116>
- Agosto, L. M., Yu, J. J., Dai, J., Kaletsky, R., Monie, D., & O'Doherty, U. (2007). HIV-1 integrates into resting CD4⁺ T cells even at low inoculums as demonstrated with an improved assay for HIV-1 integration. *Virology*, 368(1), 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.06.001>
- Aizawa, Y., Koyama, A., Ishihara, T., Onodera, O., & Saitoh, A. (2016). Performance of a real-time PCR-based approach and droplet digital PCR in detecting human parechovirus type 3 RNA. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 84, 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.09.009>
- Akagi, Y., Rao, S. R., Morita, Y., & Tamiya, E. (2004). Optimization of fluorescent cell-based assays for high-throughput analysis using microchamber array chip formats. *Science and Technology of Advanced Materials*, 5(3), 343–349. <https://doi.org/10.1016/j.stam.2004.01.011>
- Aliberti, S., Dela Cruz, C. S., Amati, F., Sotgiu, G., & Restrepo, M. I. (2021). Community-acquired pneumonia. *Lancet (London, England)*, 398(10303), 906–919. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00630-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00630-9)
- Alikian, M., Whale, A. S., Akiki, S., Piechocki, K., Torrado, C., Myint, T., Cowen, S., Griffiths, M., Reid, A. G., Apperley, J., White, H., Huggett, J. F., & Foroni, L. (2016). RT-qPCR and RT-Digital PCR: A Comparison of Different Platforms for the Evaluation of Residual Disease in Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical Chemistry*, 63(2), 525–531. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.262824>

- Almansa, R., Ortega, A., Ávila-Alonso, A., Heredia-Rodríguez, M., Martín, S., Benavides, D., Martín-Fernandez, M., Rico, L., Aldecoa, C., Rico, J., López de Cenarruzabeitia, I., Beltrán de Heredia, J., Gomez-Sanchez, E., Aragón, M., Andrés, C., Calvo, D., Andaluz-Ojeda, D., Liu, P., Blanco-Antona, F., Blanco, L., ... Bermejo-Martin, J. F. (2019). Quantification of Immune Dysregulation by Next-generation Polymerase Chain Reaction to Improve Sepsis Diagnosis in Surgical Patients. *Annals of surgery*, 269(3), 545–553. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000002406>
- An, X., Wang, J., Pu, Q., Li, H., Pan, T., Li, H., Pan, F., & Su, J. (2020). High-throughput diagnosis of human pathogens and fecal contamination in marine recreational water. *Environmental Research*, 190, 109982. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109982>
- Anna, S. L., Bontoux, N., & Stone, H. A. (2003). Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels. *Applied Physics Letters*, 82(3), 364–366. <https://doi.org/10.1063/1.1537519>
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*, 5(2), 209–219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
- Bachman, J. (2013). Reverse-Transcription PCR (RT-PCR). *Methods in Enzymology on CD-ROM/Methods in Enzymology*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420037-1.00002-6>
- Barreto, H. G., de Pádua Milagres, F. A., de Araújo, G. C., Daúde, M. M., & Benedito, V. A. (2020). Diagnosing the novel SARS-CoV-2 by quantitative RT-PCR: variations and opportunities. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 98(12), 1727–1736. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01992-x>
- Barrett, A. N., McDonnell, T. C., Chan, K. C., & Chitty, L. S. (2012). Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia. *Clinical chemistry*, 58(6), 1026–1032. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.178939>
- Bateman, A. C., Greninger, A. L., Atienza, E. E., Limaye, A. P., Jerome, K. R., & Cook, L. (2017). Quantification of BK Virus Standards by Quantitative Real-Time PCR and Droplet Digital PCR Is Confounded by Multiple Virus Populations in the WHO BKV International Standard. *Clinical chemistry*, 63(3), 761–769. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.265512>
- Becker, J., Hackl, M., Rupp, O., Jakobi, T., Schneider, J., Szczepanowski, R., Bekel, T., Borth, N., Goesmann, A., Grillari, J., Kaltschmidt, C., Noll, T., Pühler, A., Tauch, A., & Brinkrolf, K. (2011). Unraveling the Chinese hamster ovary cell line transcriptome by next-generation sequencing. *Journal of Biotechnology*, 156(3), 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.09.014>
- Becker-André, M., & Hahlbrock, K. (1989). Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration

assay (PATY). *Nucleic acids research*, 17(22), 9437–9446.
<https://doi.org/10.1093/nar/17.22.9437>

Beer, N. R., Wheeler, E. K., Lee-Houghton, L., Watkins, N., Nasarabadi, S., Hebert, N., Leung, P., Arnold, D. W., Bailey, C. G., & Colston, B. W. (2008). On-Chip Single-Copy Real-Time Reverse-Transcription PCR in Isolated Picoliter Droplets. *Analytical Chemistry*, 80(6), 1854–1858. <https://doi.org/10.1021/ac800048k>

Belgrader, P., Tanner, S. C., Regan, J. F., Koehler, R., Hindson, B. J., & Brown, A. S. (2013). Droplet digital PCR measurement of HER2 copy number alteration in formalin-fixed paraffin-embedded breast carcinoma tissue. *Clinical chemistry*, 59(6), 991–994. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.197855>

Beverung, C., Radke, C., & Blanch, H. (1999). Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. *Biophysical Chemistry*, 81(1), 59–80. [https://doi.org/10.1016/s0301-4622\(99\)00082-4](https://doi.org/10.1016/s0301-4622(99)00082-4)

Bialasiewicz, S., Duarte, T. P. S., Nguyen, S. H., Sukumaran, V., Stewart, A., Appleton, S., Pitt, M. E., Bainomugisa, A., Jennison, A. V., Graham, R., Coin, L. J. M., & Hajkowicz, K. (2019). Rapid diagnosis of *Capnocytophaga canimorsus* septic shock in an immunocompetent individual using real-time Nanopore sequencing: a case report. *BMC infectious diseases*, 19(1), 660. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4173-2>

Bisoffi, Z., Gobbi, F., Buonfrate, D., & Van den Ende, J. (2012). Diagnosis of Malaria Infection with or without Disease. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 4(1), e2012036. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2012.036>

Bisoffi, Z., Leoni, S., Angheben, A., Beltrame, A., Esemé, F. E., Gobbi, F., Lodesani, C., Marocco, S., & Buonfrate, D. (2016). Chronic malaria and hyper-reactive malarial splenomegaly: a retrospective study on the largest series observed in a non-endemic country. *Malaria journal*, 15, 230. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1274-x>

Bisoffi, Z., Sirima, S. B., Menten, J., Pattaro, C., Angheben, A., Gobbi, F., Tinto, H., Lodesani, C., Neya, B., Gobbo, M., & Van den Ende, J. (2010). Accuracy of a rapid diagnostic test on the diagnosis of malaria infection and of malaria-attributable fever during low and high transmission season in Burkina Faso. *Malaria journal*, 9, 192. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-192>

Bivins, A., Lowry, S., Wankhede, S., Hajare, R., Murphy, H. M., Borchardt, M., Labhasetwar, P., & Brown, J. (2021). Microbial water quality improvement associated with transitioning from intermittent to continuous water supply in Nagpur, India. *Water Research*, 201, 117301. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117301>

Blanco, N., Williams, A. J., Tang, D., Zhan, D., Misaghi, S., Kelley, R. F., & Simmons, L. C. (2020). Tailoring translational strength using Kozak sequence variants improves bispecific antibody assembly and reduces product-related impurities in CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(7), 1946–1960. <https://doi.org/10.1002/bit.27347>

- Blot, F., Schmidt, E., Nitenberg, G., Tancrede, C., Leclercq, B., Laplanche, A., & Andremont, A. (1998). Earlier positivity of central-venous- versus peripheral-blood cultures is highly predictive of catheter-related sepsis. *Journal of clinical microbiology*, 36(1), 105–109. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.1.105-109.1998>
- Botes, M., De Kwaadsteniet, M., & Cloete, T. E. (2012). Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(1), 91–108. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6399-3>
- Boukellal, H., Selimović, Š., Jia, Y., Cristobal, G., & Fraden, S. (2008). Simple, robust storage of drops and fluids in a microfluidic device. *Lab on a Chip*, 9(2), 331–338. <https://doi.org/10.1039/b808579j>
- Brinkmann, U., & Kontermann, R. E. (2017). The making of bispecific antibodies. *mAbs*, 9(2), 182–212. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1268307>
- Brooks, Y. M., Spirito, C. M., Bae, J. S., Hong, A., Mosier, E. M., Sausele, D. J., Fernandez-Baca, C. P., Epstein, J. L., Shapley, D. J., Goodman, L. B., Anderson, R. R., Glaser, A. L., & Richardson, R. E. (2019). Fecal indicator bacteria, fecal source tracking markers, and pathogens detected in two Hudson River tributaries. *Water Research*, 171, 115342. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115342>
- Broughton, J. P., Deng, X., Yu, G., Fasching, C. L., Servellita, V., Singh, J., Miao, X., Streithorst, J. A., Granados, A., Sotomayor-Gonzalez, A., Zorn, K., Gopez, A., Hsu, E., Gu, W., Miller, S., Pan, C. Y., Guevara, H., Wadford, D. A., Chen, J. S., & Chiu, C. Y. (2020). CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature biotechnology*, 38(7), 870–874. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>
- Bruneau, T., Wack, M., Poulet, G., Robillard, N., Philippe, A., Puig, P. L., Bélec, L., Hadjadj, J., Xiao, W., Kallberg, J. L., Kernéis, S., Diehl, J. L., Terrier, B., Smadja, D. M., Taly, V., Veyer, D., & Péré, H. (2022). Circulating Ubiquitous RNA, A Highly Predictive and Prognostic Biomarker in Hospitalized Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 75(1), e410–e417. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab997>
- Buchan, B. W., & Ledebor, N. A. (2014). Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. *Clinical microbiology reviews*, 27(4), 783–822. <https://doi.org/10.1128/CMR.00003-14>
- Busani, S., De Biasi, S., Nasi, M., Paolini, A., Venturelli, S., Tosi, M., Girardis, M., & Cossarizza, A. (2020). Increased Plasma Levels of Mitochondrial DNA and Normal Inflammasome Gene Expression in Monocytes Characterize Patients With Septic Shock Due to Multidrug Resistant Bacteria. *Frontiers in immunology*, 11, 768. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00768>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009).

The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G., Wittwer, C. T., Schjerling, P., Day, P. J., Abreu, M., Aguado, B., Beaulieu, J., Beckers, A., Bogaert, S., Browne, J. A., . . . Vandesompele, J. (2013). The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nature Methods*, 10(11), 1063–1067. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2697>

Bustin, S., Coward, A., Sadler, G., Teare, L., & Nolan, T. (2020). CoV2-ID, a MIQE-compliant sub-20-min 5-plex RT-PCR assay targeting SARS-CoV-2 for the diagnosis of COVID-19. *Scientific reports*, 10(1), 22214. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79233-x>

Cabral, J. P. S. (2010). Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657–3703. <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>

Cajander, S., Tina, E., Bäckman, A., Magnuson, A., Strålin, K., Söderquist, B., & Källman, J. (2016). Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Measurement of HLA-DRA Gene Expression in Whole Blood Is Highly Reproducible and Shows Changes That Reflect Dynamic Shifts in Monocyte Surface HLA-DR Expression during the Course of Sepsis. *PloS one*, 11(5), e0154690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154690>

Cao, Y., Raith, M. R., & Griffith, J. F. (2014). Droplet digital PCR for simultaneous quantification of general and human-associated fecal indicators for water quality assessment. *Water Research*, 70, 337–349. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.008>

Carausu, M., Bidard, F. C., Callens, C., Melaabi, S., Jeannot, E., Pierga, J. Y., & Cabel, L. (2019). ESR1 mutations: a new biomarker in breast cancer. *Expert review of molecular diagnostics*, 19(7), 599–611. <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1631799>

Carow, K., Read, C., Häfner, N., Runnebaum, I. B., Corner, A., & Dürst, M. (2017). A comparative study of digital PCR and real-time qPCR for the detection and quantification of HPV mRNA in sentinel lymph nodes of cervical cancer patients. *BMC research notes*, 10(1), 532. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2846-8>

Centers for Disease Control and Prevention. (2020). Wastewater surveillance testing methods. *Atlanta, Georgia*.

Centers for Disease Control and Prevention. (2021). Nucleic acid amplification tests (NAATs). *Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA*

Chakrabarti, L., Chaerkady, R., Wang, J., Weng, S. H. S., Wang, C., Qian, C., Cazares, L., Hess, S., Amaya, P., Zhu, J., & Hatton, D. (2022). Mitochondrial membrane potential-enriched CHO host: a novel and powerful tool for improving biomanufacturing capability. *mAbs*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.2020081>

- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Rainer, J. E., Nguyen, P. N., & Thomas, C. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 16(23), 11141–11156. <https://doi.org/10.1093/nar/16.23.11141>
- Chang, H. W., Ali, S. Z., Cho, S. K., Kurman, R. J., & Shih, I. M. (2002). Detection of allelic imbalance in ascitic supernatant by digital single nucleotide polymorphism analysis. *PubMed*, 8(8), 2580–2585. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12171887> (a)
- Chang, H. W., Lee, S. M., Goodman, S. N., Singer, G., Cho, S. K., Sokoll, L. J., Montz, F. J., Roden, R., Zhang, Z., Chan, D. W., Kurman, R. J., & Shih, I. M. (2002). Assessment of Plasma DNA Levels, Allelic Imbalance, and CA 125 as Diagnostic Tests for Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 94(22), 1697–1703. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.22.1697> (b)
- Chatterjee, N., Mahmood, Z., & Marcussen, E. (2021). Politics of Vaccine Nationalism in India: Global and Domestic Implications. *Forum for Development Studies*, 48(2), 357–369. <https://doi.org/10.1080/08039410.2021.1918238>
- Chelly, J., Kaplan, J. C., Maire, P., Gautron, S., & Kahn, A. (1988). Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue. *Nature*, 333(6176), 858–860. <https://doi.org/10.1038/333858a0>
- Chen, B., Xie, Y., Zhang, N., Li, W., Liu, C., Li, D., Bian, S., Jiang, Y., Yang, Z., Li, R., Feng, Y., Zhang, X., & Shi, D. (2021). Evaluation of Droplet Digital PCR Assay for the Diagnosis of Candidemia in Blood Samples. *Frontiers in microbiology*, 12, 700008. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.700008>
- Chen, Z., Liao, P., Zhang, F., Jiang, M., Zhu, Y., & Huang, Y. (2016). Centrifugal micro-channel array droplet generation for highly parallel digital PCR. *Lab on a Chip*, 17(2), 235–240. <https://doi.org/10.1039/c6lc01305h>
- Chirizzi, D., Conte, M., Feltracco, M., Dinoi, A., Gregoris, E., Barbaro, E., La Bella, G., Ciccamese, G., La Salandra, G., Gambaro, A., & Contini, D. (2021). SARS-CoV-2 concentrations and virus-laden aerosol size distributions in outdoor air in north and south of Italy. *Environment international*, 146, 106255. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106255>
- Choi, S. H., & Chung, J. W. (2012). Time to positivity of follow-up blood cultures in patients with persistent Staphylococcus aureus bacteremia. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 31(11), 2963–2967. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1648-0>
- Chu, T., Bunce, K., Hogge, W. A., & Peters, D. G. (2010). Statistical considerations for digital approaches to non-invasive fetal genotyping. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(22), 2863–2866. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq544>

- Cillóniz, C., Torres, A., & Niederman, M. S. (2021). Management of pneumonia in critically ill patients. *BMJ (Clinical research ed.)*, 375, e065871. <https://doi.org/10.1136/bmj-2021-065871>
- Clappier, C., Böttner, D., Heinzelmann, D., Stadermann, A., Schulz, P., Schmidt, M., & Lindner, B. (2023). Deciphering integration loci of CHO manufacturing cell lines using long read nanopore sequencing. *New Biotechnology*, 75, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2023.03.003>
- Coertze, R. D., & Bezuidenhout, C. C. (2018). The prevalence and diversity of AmpC β -lactamase genes in plasmids from aquatic systems. *Water Science & Technology*, 2017(2), 603–611. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.188>
- Cohen, D. E., Schneider, T., Wang, M., & Chiu, D. T. (2010). Self-Digitization of Sample Volumes. *Analytical Chemistry*, 82(13), 5707–5717. <https://doi.org/10.1021/ac100713u>
- Colley, D. G., Bustinduy, A. L., Secor, W. E., & King, C. H. (2014). Human schistosomiasis. *Lancet (London, England)*, 383(9936), 2253–2264. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61949-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61949-2)
- Conte, D., Verri, C., Borzi, C., Suatoni, P., Pastorino, U., Sozzi, G., & Fortunato, O. (2015). Novel method to detect microRNAs using chip-based QuantStudio 3D digital PCR. *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2097-9>
- Costa, D., Johani, K., Melo, D., Lopes, L., Lima, L. L., Tipple, A., Hu, H., & Vickery, K. (2019). Biofilm contamination of high-touched surfaces in intensive care units: epidemiology and potential impacts. *Letters in Applied Microbiology*, 68(4), 269–276. <https://doi.org/10.1111/lam.13127>
- Courtois, F., Olguin, L. F., Whyte, G., Theberge, A. B., Huck, W. T. S., Hollfelder, F., & Abell, C. (2009). Controlling the Retention of Small Molecules in Emulsion Microdroplets for Use in Cell-Based Assays. *Analytical Chemistry*, 81(8), 3008–3016. <https://doi.org/10.1021/ac802658n>
- Crain, C., Kezer, K., Steele, S., Owiti, J., Rao, S., Victorio, M., Austin, B., Volner, A., Draper, W., Griffith, J., Steele, J., & Seifert, M. (2021). Application of ddPCR for detection of *Enterococcus* spp. in coastal water quality monitoring. *Journal of Microbiological Methods*, 184, 106206. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106206>
- Crisan D. (1994). Molecular diagnostic testing for determination of myeloid lineage in acute leukemias. *Annals of clinical and laboratory science*, 24(4), 355–363.
- Dahm R. (2005). Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental biology*, 278(2), 274–288. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.028>
- Dangla, R., Kayi, S. C., & Baroud, C. N. (2013). Droplet microfluidics driven by gradients of confinement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(3), 853–858. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209186110>

Dao Thi, V. L., Herbst, K., Boerner, K., Meurer, M., Kremer, L. P., Kirrmaier, D., Freistaedter, A., Papagiannidis, D., Galmozzi, C., Stanifer, M. L., Boulant, S., Klein, S., Chlanda, P., Khalid, D., Barreto Miranda, I., Schnitzler, P., Kräusslich, H. G., Knop, M., & Anders, S. (2020). A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Science translational medicine*, 12(556), eabc7075. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc7075>

D'Aoust, P. M., Mercier, E., Montpetit, D., Jia, J. J., Alexandrov, I., Neault, N., Baig, A. T., Mayne, J., Zhang, X., Alain, T., Langlois, M. A., Servos, M. R., MacKenzie, M., Figeys, D., MacKenzie, A. E., Graber, T. E., & Delatolla, R. (2021). Quantitative analysis of SARS-CoV-2 RNA from wastewater solids in communities with low COVID-19 incidence and prevalence. *Water research*, 188, 116560. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116560>

Das, D., Lin, C. W., & Chuang, H. S. (2022). LAMP-Based Point-of-Care Biosensors for Rapid Pathogen Detection. *Biosensors*, 12(12), 1068. <https://doi.org/10.3390/bios12121068>

De La Solderad Lagunes-Castro, M., López-Monteon, A., Guzmán-Gómez, D., & Ramos-Ligonio, A. (2022). Metabarcoding and Digital PCR (dPCR): Application in the Study of Neglected Tropical Diseases. In *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.106272>

De Spiegelaere, W., Malatinkova, E., Lynch, L., Van Nieuwerburgh, F., Messiaen, P., O'Doherty, U., & Vandekerckhove, L. (2014). Quantification of integrated HIV DNA by Repetitive-Sampling AIU-HIV PCR on the basis of Poisson statistics. *Clinical Chemistry*, 60(6), 886–895. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.219378>

Derouazi, M., Martinet, D., Schmutz, N. B., Flaction, R., Wicht, M., Bertschinger, M., Hacker, D., Beckmann, J., & Wurm, F. (2005). Genetic characterization of CHO production host DG44 and derivative recombinant cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(4), 1069–1077. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.111>

Deurenberg, R. H., Bathoorn, E., Chlebowicz, M. A., Couto, N., Ferdous, M., García-Cobos, S., Kooistra-Smid, A. M., Raangs, E. C., Rosema, S., Veloo, A. C., Zhou, K., Friedrich, A. W., & Rossen, J. W. (2016). Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *Journal of Biotechnology*, 243, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.022>

Deutscher M. P. (2006). Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic acids research*, 34(2), 659–666. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj472>

Dhama, K., Khan, S., Tiwari, R., Sircar, S., Bhat, S., Malik, Y. S., Singh, K. P., Chaicumpa, W., Bonilla-Aldana, D. K., & Rodriguez-Morales, A. J. (2020). Coronavirus Disease 2019-COVID-19. *Clinical microbiology reviews*, 33(4), e00028-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00028-20>

- Dhiman, H., Campbell, M., Melcher, M., Smith, K. D., & Borth, N. (2020). Predicting favorable landing pads for targeted integrations in Chinese hamster ovary cell lines by learning stability characteristics from random transgene integrations. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3632–3648. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.008>
- Di Cesare, A., Petrin, S., Fontaneto, D., Losasso, C., Eckert, E. M., Tassistro, G., Borello, A., Ricci, A., Wilson, W. H., Pruzzo, C., & Vezzulli, L. (2018). ddPCR applied on archived Continuous Plankton Recorder samples reveals long-term occurrence of class 1 integrons and a sulphonamide resistance gene in marine plankton communities. *Environmental Microbiology Reports*, 10(4), 458–464. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12665>
- Diehl, F., Li, M., He, Y., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Dressman, D. (2006). BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nature Methods*, 3(7), 551–559. <https://doi.org/10.1038/nmeth898>
- Dijkstra, J., Van Kempen, L., Nagtegaal, I., & Bustin, S. (2014). Critical appraisal of quantitative PCR results in colorectal cancer research: Can we rely on published qPCR results? *Molecular Oncology*, 8(4), 813–818. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.12.016>
- Dimov, I. K., Lu, R., Lee, E. P., Seita, J., Sahoo, D., Park, S., Weissman, I. L., & Lee, L. P. (2014). Discriminating cellular heterogeneity using microwell-based RNA cytometry. *Nature Communications*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms4451>
- Ding, M., Shen, L., Xiao, L., Liu, X., & Hu, J. (2020). A cell line development strategy to improve a bispecific antibody expression purity in CHO cells. *Biochemical Engineering Journal*, 166, 107857. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107857>
- Dingle, T. C., Sedlak, R. H., Cook, L., & Jerome, K. R. (2013). Tolerance of Droplet-Digital PCR vs Real-Time Quantitative PCR to Inhibitory Substances. *Clinical Chemistry*, 59(11), 1670–1672. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.211045>
- Dobnik, D., Štebih, D., Blejec, A., Morisset, D., & Žel, J. (2016). Multiplex quantification of four DNA targets in one reaction with Bio-Rad droplet digital PCR system for GMO detection. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep35451>
- Dong, L., Meng, Y., Sui, Z., Wang, J., Wu, L., & Fu, B. (2015). Comparison of four digital PCR platforms for accurate quantification of DNA copy number of a certified plasmid DNA reference material. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep13174>
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2003). Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15), 8817–8822. <https://doi.org/10.1073/pnas.1133470100>

- Du, W., Li, L., Nichols, K. P., & Ismagilov, R. F. (2009). SlipChip. *Lab on a Chip*, 9(16), 2286. <https://doi.org/10.1039/b908978k>
- Du, Y., Yan, Z., Song, K., Jin, J., Xiao, L., Sun, Z., Tan, Y., Zhang, P., Du, Z., Yang, R., Zhao, Y., & Song, Y. (2022). Development and evaluation of a multiplex droplet digital polymerase chain reaction method for simultaneous detection of five biothreat pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.970973>
- Dueck, M. E., Lin, R., Zayac, A., Gallagher, S., Chao, A. K., Jiang, L., Datwani, S. S., Hung, P., & Stieglitz, E. (2019). Precision cancer monitoring using a novel, fully integrated, microfluidic array partitioning digital PCR platform. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55872-7>
- Duffy, D. C., McDonald, J. C., Schueller, O. J. A., & Whitesides, G. M. (1998). Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*, 70(23), 4974–4984. <https://doi.org/10.1021/ac980656z>
- Edwards, M. C., & Gibbs, R. A. (1994). Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Research*, 3(4), S65–S75. <https://doi.org/10.1101/gr.3.4.s65>
- El Khattabi, L. A., Rouillac-Le Sciellour, C., Le Tessier, D., Luscan, A., Coustier, A., Porcher, R., Bhouri, R., Nectoux, J., Sérazin, V., Quibel, T., Mandelbrot, L., Tsatsaris, V., Vialard, F., & Dupont, J. M. (2016). Could Digital PCR Be an Alternative as a Non-Invasive Prenatal Test for Trisomy 21: A Proof of Concept Study. *PloS one*, 11(5), e0155009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155009>
- Erali, M., Voelkerding, K. V., & Wittwer, C. T. (2008). High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and molecular pathology*, 85(1), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.03.012>
- European Commission: Joint Research Centre, Trapmann, S., Burns, M., Corbisier, P., Gatto, F., Robouch, P., Sowa, S., & Emons, H. (2020). *Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories : 3rd edition*, Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2760/738565>
- European Network of GMO Laboratories (ENGL), Marchesi, U., Mazzara, M., Broll, H., De Giacomo, M., Grohmann, L., Herau, V., Holst-Jensen, A., Houghs, L., Hübert, P., Laurensse, E., Morisset, D., Papazova, N., Pietsch, K., Pla, M., Sandberg, M., Savini, C., Waiblinger, H.-U., & Woll, K. (2015). *Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing*. https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%2020_10_2015.pdf
- Evans, D., Cowen, S., Kammel, M., O'Sullivan, D. M., Stewart, G., Grunert, H. P., Moran-Gilad, J., Verwilt, J., In, J., Vandesompele, J., Harris, K., Hong, K. H., Storey, N., Hingley-Wilson, S., Dühring, U., Bae, Y. K., Foy, C. A., Braybrook, J., Zeichhardt, H., & Huggett, J. F. (2021). The Dangers of Using Cq to Quantify Nucleic Acid in Biological Samples: A Lesson From COVID-19. *Clinical chemistry*, 68(1), 153–162. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab219>

- Fan, Y., Chen, J., Liu, M., Xu, X., Zhang, Y., Yue, P., Cao, W., Ji, Z., Su, X., Wen, S., Kong, J., Zhou, G., Li, B., Dong, Y., Liu, A., & Bao, F. (2022). Application of Droplet Digital PCR to Detection of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium leprae Infections: A Narrative Review. *Infection and Drug Resistance*, Volume 15, 1067–1076. <https://doi.org/10.2147/idr.s349607>
- Fan, H. C., & Quake, S. R. (2007). Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. *Analytical chemistry*, 79(19), 7576–7579. <https://doi.org/10.1021/ac0709394>
- Fernández-Cruz, A., Marín, M., Kestler, M., Alcalá, L., Rodríguez-Créixems, M., & Bouza, E. (2013). The value of combining blood culture and SeptiFast data for predicting complicated bloodstream infections caused by Gram-positive bacteria or Candida species. *Journal of clinical microbiology*, 51(4), 1130–1136. <https://doi.org/10.1128/JCM.02882-12>
- Fernando, D. D., Reynolds, S. L., Zakrzewski, M., Mofiz, E., Papenfuss, A. T., Holt, D., & Fischer, K. (2018). Phylogenetic relationships, stage-specific expression and localisation of a unique family of inactive cysteine proteases in *Sarcoptes scabiei*. *Parasites & vectors*, 11(1), 301. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2862-0>
- Ferraro, G. B., Bonomo, C., Brandtner, D., Mancini, P., Veneri, C., Briancesco, R., Coccia, A. M., Lucentini, L., Suffredini, E., Bongiorno, D., Musso, N., Stefani, S., & La Rosa, G. (2024). Characterisation of microbial communities and quantification of antibiotic resistance genes in Italian wastewater treatment plants using 16S rRNA sequencing and digital PCR. *The Science of the Total Environment*, 933, 173217. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173217>
- Fischer, S., Mathias, S., Stadermann, A., Yang, S., Schmieder, V., Zeh, N., Schmidt, N., Richter, P., Wright, S., Zimmermann, E., Ley, Y., Van Der Meer, J., Hartsch, T., Bernloehr, C., Otte, K., Bradl, H., Gamer, M., & Schulz, P. (2021). Loss of a newly discovered microRNA in Chinese hamster ovary cells leads to upregulation of N-glycolylneuraminic acid sialylation on monoclonal antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 119(3), 832–844. <https://doi.org/10.1002/bit.28015>
- Fontanelli, G., Baratè, C., Ciabatti, E., Guerrini, F., Grassi, S., Del Re, M., Morganti, R., Petrini, I., Arici, R., Barsotti, S., Metelli, M. R., Danesi, R., & Galimberti, S. (2015). Real-Time PCR and Droplet Digital PCR: two techniques for detection of the JAK2V617F mutation in Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *International Journal of Laboratory Hematology*, 37(6), 766–773. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12404>
- Fujioka, R., Solo-Gabriele, H., Byappanahalli, M., & Kirs, M. (2015). U.S. Recreational Water Quality Criteria: A Vision for the Future. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(7), 7752–7776. <https://doi.org/10.3390/ijerph120707752>
- Galuszynski, N. C., & Potts, A. J. (2020). Application of High Resolution Melt analysis (HRM) for screening haplotype variation in a non-model plant genus: Cyclopia (Honeybush). *PeerJ*, 8, e9187. <https://doi.org/10.7717/peerj.9187>

- Gansen, A., Herrick, A. M., Dimov, I. K., Lee, L. P., & Chiu, D. T. (2012). Digital LAMP in a sample self-digitization (SD) chip. *Lab on a Chip*, 12(12), 2247. <https://doi.org/10.1039/c2lc21247a>
- Garcia-Murillas, I., Lambros, M., & Turner, N. C. (2013). Determination of HER2 amplification status on tumour DNA by digital PCR. *PloS one*, 8(12), e83409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083409>
- Gevensleben, H., Garcia-Murillas, I., Graeser, M. K., Schiavon, G., Osin, P., Parton, M., Smith, I. E., Ashworth, A., & Turner, N. C. (2013). Noninvasive detection of HER2 amplification with plasma DNA digital PCR. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(12), 3276–3284. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3768>
- Giovannelli, I., Ciccone, N., Vaggelli, G., Malva, N. D., Torricelli, F., Rossolini, G. M., & Gianecchini, S. (2016). Utility of droplet digital PCR for the quantitative detection of polyomavirus JC in clinical samples. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 82, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.07.008>
- Goh, C., Burnham, K. L., Ansari, M. A., de Cesare, M., Golubchik, T., Hutton, P., Overend, L. E., Davenport, E. E., Hinds, C. J., Bowden, R., & Knight, J. C. (2020). Epstein-Barr virus reactivation in sepsis due to community-acquired pneumonia is associated with increased morbidity and an immunosuppressed host transcriptomic endotype. *Scientific reports*, 10(1), 9838. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66713-3>
- Goh, H., Lin, M., Fukushima, T., Saglio, G., Kim, D., Choi, S., Kim, S., Lee, J., Lee, Y., Oh, S., & Kim, D. (2011). Sensitive quantitation of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia using nanofluidic digital polymerase chain reaction assay. *Leukemia & Lymphoma/Leukemia and Lymphoma*, 52(5), 896–904. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.555569>
- Gopinath, H., Aishwarya, M., & Karthikeyan, K. (2018). Tackling scabies: novel agents for a neglected disease. *International journal of dermatology*, 57(11), 1293–1298. <https://doi.org/10.1111/ijd.13999>
- Görzer, I., Buchta, C., Chiba, P., Benka, B., Camp, J. V., Holzmann, H., Puchhammer-Stöckl, E., & Aberle, S. W. (2020). First results of a national external quality assessment scheme for the detection of SARS-CoV-2 genome sequences. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 129, 104537. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104537>
- Graham, K. E., Loeb, S. K., Wolfe, M. K., Catoe, D., Sinnott-Armstrong, N., Kim, S., Yamahara, K. M., Sassoubre, L. M., Mendoza Grijalva, L. M., Roldan-Hernandez, L., Langenfeld, K., Wigginton, K. R., & Boehm, A. B. (2021). SARS-CoV-2 RNA in Wastewater Settled Solids Is Associated with COVID-19 Cases in a Large Urban

Sewershed. *Environmental science & technology*, 55(1), 488–498. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06191>

Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor protocols*, 2019(2), 10.1101/pdb.prot095182. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>

Greninger, A. L., Bateman, A. C., Atienza, E. E., Wendt, S., Makhsous, N., Jerome, K. R., & Cook, L. (2017). Copy Number Heterogeneity of JC Virus Standards. *Journal of clinical microbiology*, 55(3), 824–831. <https://doi.org/10.1128/JCM.02337-16>

Gu, G., & Fuqua, S. A. (2016). ESR1 Mutations in Breast Cancer: Proof-of-Concept Challenges Clinical Action. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(5), 1034–1036. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2549>

Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., Reed, G. H., Pryor, R. J., Chen, J., & Wittwer, C. T. (2003). Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clinical chemistry*, 49(3), 396–406. <https://doi.org/10.1373/49.3.396>

Guo, C., Chen, F., Xiao, Q., Catterall, H. B., Robinson, J. H., Wang, Z., Mock, M., & Hubert, R. (2021). Expression liabilities in a four-chain bispecific molecule. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(10), 3744–3759. <https://doi.org/10.1002/bit.27850>

Guttery, D. S., Page, K., Hills, A., Woodley, L., Marchese, S. D., Rghebi, B., Hastings, R. K., Luo, J., Pringle, J. H., Stebbing, J., Coombes, R. C., Ali, S., & Shaw, J. A. (2015). Noninvasive detection of activating estrogen receptor 1 (ESR1) mutations in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Clinical chemistry*, 61(7), 974–982. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.238717>

Haase, A. T., Retzel, E. F., & Staskus, K. A. (1990). Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(13), 4971–4975. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.13.4971>

Hall Sedlak, R., & Jerome, K. R. (2014). The potential advantages of digital PCR for clinical virology diagnostics. *Expert review of molecular diagnostics*, 14(4), 501–507. <https://doi.org/10.1586/14737159.2014.910456>

Hall, C. A., Kravitz, R. H., Johnson, K. F., Sanek, N. A., Maiti, P., Ziemba, K. R., Liu, J., Andreev, D. O., Chrostowski, V. L., Collins, I. J., & Bleck, G. T. (2022). Shortening the biologics clinical timeline with a novel method for generating stable, high-producing cell pools and clones. *Biotechnology and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1002/bit.28323>

Hamza, I. A., & Bibby, K. (2019). Critical issues in application of molecular methods to environmental virology. *Journal of Virological Methods*, 266, 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.01.008>

Han, M. S., Byun, J. H., Cho, Y., & Rim, J. H. (2021). RT-PCR for SARS-CoV-2: quantitative versus qualitative. *The Lancet. Infectious diseases*, 21(2), 165. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30424-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30424-2)

Harringer, M., & Alfreider, A. (2021). Primer evaluation and development of a droplet digital PCR protocol targeting amoA genes for the quantification of Comammox in lakes. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82613-6>

Harvey, W. T., Carabelli, A. M., Jackson, B., Gupta, R. K., Thomson, E. C., Harrison, E. M., Ludden, C., Reeve, R., Rambaut, A., COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, Peacock, S. J., & Robertson, D. L. (2021). SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nature reviews. Microbiology*, 19(7), 409–424. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0>

Hatch, A. C., Fisher, J. S., Tovar, A. R., Hsieh, A. T., Lin, R., Pentoney, S. L., Yang, D. L., & Lee, A. P. (2011). 1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR. *Lab on a Chip*, 11(22), 3838. <https://doi.org/10.1039/c1lc20561g>

Hayden, R. T., Gu, Z., Ingersoll, J., Abdul-Ali, D., Shi, L., Pounds, S., & Caliendo, A. M. (2012). Comparison of Droplet Digital PCR to Real-Time PCR for Quantitative Detection of Cytomegalovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(2), 540–546. <https://doi.org/10.1128/jcm.02620-12>

Hayden, R. T., Gu, Z., Sam, S. S., Sun, Y., Tang, L., Pounds, S., & Caliendo, A. M. (2015). Comparative evaluation of three commercial quantitative cytomegalovirus standards by use of digital and real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*, 53(5), 1500–1505. <https://doi.org/10.1128/JCM.03375-14>

Hayden, R. T., Hokanson, K. M., Pounds, S. B., Bankowski, M. J., Belzer, S. W., Carr, J., Diorio, D., Forman, M. S., Joshi, Y., Hillyard, D., Hodinka, R. L., Nikiforova, M. N., Romain, C. A., Stevenson, J., Valsamakis, A., & Balfour, H. H. (2007). Multicenter Comparison of Different Real-Time PCR Assays for Quantitative Detection of Epstein-Barr Virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(1), 157–163. <https://doi.org/10.1128/jcm.01252-07>

Haynes, R. J., Kline, M. C., Toman, B., Scott, C., Wallace, P., Butler, J. M., & Holden, M. J. (2013). Standard reference material 2366 for measurement of human cytomegalovirus DNA. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 15(2), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.09.007>

Heijnen, L., Elsinga, G., de Graaf, M., Molenkamp, R., Koopmans, M. P. G., & Medema, G. (2021). Droplet digital RT-PCR to detect SARS-CoV-2 signature mutations of variants of concern in wastewater. *The Science of the total environment*, 799, 149456. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149456>

Heinzelmann, D., Lindner, B., Renner, B., Fischer, S., Schulz, P., & Schmidt, M. (2023). Droplet digital PCR: A comprehensive tool for genetic analysis and prediction of

bispecific antibody assembly during cell line development. *New Biotechnology*, 78, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2023.10.001>

Henegariu, O., Hirschmann, P., Kilian, K., Kirsch, S., Lengauer, C., Maiwald, R., Mielke, K., & Vogt, P. (1994). Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnostic for deletions in AZF, a genetic Y factor expressed during spermatogenesis. *Andrologia*, 26(2), 97–106. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1994.tb00765.x>

Henrich, T. J., Gallien, S., Li, J. Z., Pereyra, F., & Kuritzkes, D. R. (2012). Low-level detection and quantitation of cellular HIV-1 DNA and 2-LTR circles using droplet digital PCR. *Journal of virological methods*, 186(1-2), 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.08.019>

Heyries, K. A., Tropini, C., VanInsberghe, M., Doolin, C., Petriv, O. I., Singhal, A., Leung, K., Hughesman, C. B., & Hansen, C. L. (2011). Megapixel digital PCR. *Nature Methods*, 8(8), 649–651. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1640>

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 11(9), 1026–1030. <https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026>

Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., Kitano, T. K., Hodel, M. R., Petersen, J. F., Wyatt, P. W., Steenblock, E. R., Shah, P. H., Bousse, L. J., Troup, C. B., Mellen, J. C., . . . Colston, B. W. (2011). High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>

Hindson, C. M., Chevillet, J. R., Briggs, H. A., Gallichotte, E. N., Ruf, I. K., Hindson, B. J., Vessella, R. L., & Tewari, M. (2013). Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature Methods*, 10(10), 1003–1005. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2633>

Hoffman, N. G., Cook, L., Atienza, E. E., Limaye, A. P., & Jerome, K. R. (2008). Marked variability of BK virus load measurement using quantitative real-time PCR among commonly used assays. *Journal of clinical microbiology*, 46(8), 2671–2680. <https://doi.org/10.1128/JCM.00258-08>

Holtze, C., Rowat, A. C., Agresti, J. J., Hutchison, J. B., Angilè, F. E., Schmitz, C. H. J., Köster, S., Duan, H., Humphry, K. J., Scanga, R. A., Johnson, J. S., Pisignano, D., & Weitz, D. A. (2008). Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. *Lab on a Chip*, 8(10), 1632. <https://doi.org/10.1039/b806706f>

Hong, J. W., & Quake, S. R. (2003). Integrated nanoliter systems. *Nature Biotechnology*, 21(10), 1179–1183. <https://doi.org/10.1038/nbt871>

Hoshino, T., & Inagaki, F. (2012). Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(6), 390–395. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.06.006>

Hougs, L., Gatto, F., Goerlich, O., Grohmann, L., Lieske, K., Mazzara, M., Narendja, F., Ovesná, J., Papazova, N., Scholtens, I., & European Network of GMO Laboratories. (2017). Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. In *Publication Office of the European Union* (JRC 109940). Publications Office of the European Union. <https://doi.org/10.2760/645114> (Original work published 2017)

Hsu, M. S., Huang, Y. T., Hsu, H. S., & Liao, C. H. (2014). Sequential time to positivity of blood cultures can be a predictor of prognosis of patients with persistent *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(9), 892–898. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12608>

Hu, B., Tao, Y., Shao, Z., Zheng, Y., Zhang, R., Yang, X., Liu, J., Li, X., & Sun, R. (2021). A Comparison of Blood Pathogen Detection Among Droplet Digital PCR, Metagenomic Next-Generation Sequencing, and Blood Culture in Critically Ill Patients With Suspected Bloodstream Infections. *Frontiers in microbiology*, 12, 641202. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.641202>

Huang, J. T., Liu, Y. J., Wang, J., Xu, Z. G., Yang, Y., Shen, F., Liu, X. H., Zhou, X., & Liu, S. M. (2015). Next generation digital PCR measurement of hepatitis B virus copy number in formalin-fixed paraffin-embedded hepatocellular carcinoma tissue. *Clinical chemistry*, 61(1), 290–296. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.230227>

Hudecova I. (2015). Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. *Clinical biochemistry*, 48(15), 948–956. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.03.015>

Huggett, J. F., Cowen, S., & Foy, C. A. (2015). Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clinical chemistry*, 61(1), 79–88. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221366>

Huggett, J. F., Foy, C. A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J. A., Haynes, R., Hellemans, J., Kubista, M., Mueller, R. D., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T., & Bustin, S. A. (2013). The Digital MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 59(6), 892–902. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.206375>

Huhn, S., Chang, M., Jiang, B., Tang, X., Betenbaugh, M., & Du, Z. (2023). Genomic features of recombinant CHO clones arising from transposon-based and randomized integration. *Journal of Biotechnology*, 373, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2023.05.009>

Jackman, R. J., Duffy, D. C., Ostuni, E., Willmore, N. D., & Whitesides, G. M. (1998). Fabricating Large Arrays of Microwells with Arbitrary Dimensions and Filling Them

Using Discontinuous Dewetting. *Analytical Chemistry*, 70(11), 2280–2287. <https://doi.org/10.1021/ac971295a>

Jahne, M. A., Brinkman, N. E., Keely, S. P., Zimmerman, B. D., Wheaton, E. A., & Garland, J. L. (2019). Droplet digital PCR quantification of norovirus and adenovirus in decentralized wastewater and graywater collections: Implications for onsite reuse. *Water Research*, 169, 115213. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115213>

Jarvis, J., Melin, J., Göransson, J., Stenberg, J., Fredriksson, S., Gonzalez-Rey, C., Bertilsson, S., & Nilsson, M. (2006). Digital quantification using amplified single-molecule detection. *Nature Methods*, 3(9), 725–727. <https://doi.org/10.1038/nmeth916>

Jeannot, E., Becette, V., Campitelli, M., Calmédjane, M. A., Lappartient, E., Ruff, E., Saada, S., Holmes, A., Bellet, D., & Sastre-Garau, X. (2016). Circulating human papillomavirus DNA detected using droplet digital PCR in the serum of patients diagnosed with early stage human papillomavirus-associated invasive carcinoma. *The journal of pathology. Clinical research*, 2(4), 201–209. <https://doi.org/10.1002/cjp2.47>

Jeselsohn, R., Yelensky, R., Buchwalter, G., Frampton, G., Meric-Bernstam, F., Gonzalez-Angulo, A. M., Ferrer-Lozano, J., Perez-Fidalgo, J. A., Cristofanilli, M., Gómez, H., Arteaga, C. L., Giltane, J., Balko, J. M., Cronin, M. T., Jarosz, M., Sun, J., Hawryluk, M., Lipson, D., Otto, G., Ross, J. S., ... Miller, V. A. (2014). Emergence of constitutively active estrogen receptor- α mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20(7), 1757–1767. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2332>

Jiang, Y., Wang, H., Hao, S., Chen, Y., He, J., Liu, Y., Chen, L., Yu, Y., & Hua, S. (2020). Digital PCR is a sensitive new technique for SARS-CoV-2 detection in clinical applications. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 511, 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.10.032>

Jung, J., Seo, E., Yoo, R. N., Sung, H., & Lee, J. (2020). Clinical significance of viral-bacterial codetection among young children with respiratory tract infections: Findings of RSV, influenza, adenoviral infections. *Medicine*, 99(2), e18504. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000018504>

Kang, D., Ali, M. M., Zhang, K., Huang, S. S., Peterson, E., Digman, M. A., Gratton, E., & Zhao, W. (2014). Rapid detection of single bacteria in unprocessed blood using Integrated Comprehensive Droplet Digital Detection. *Nature Communications*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms6427>

Kayalar, Ö., Arı, A., Babuççu, G., Konyalılar, N., Doğan, Ö., Can, F., Şahin, Ü. A., Gaga, E. O., Levent Kuzu, S., Arı, P. E., Odabaşı, M., Taşdemir, Y., Sıddık Cindoruk, S., Esen, F., Sakın, E., Çalışkan, B., Tecer, L. H., Fıçıcı, M., Altın, A., Onat, B., ... Bayram, H. (2021). Existence of SARS-CoV-2 RNA on ambient particulate matter samples: A nationwide study in Turkey. *The Science of the total environment*, 789, 147976. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147976>

- Khalil, S., Abbas, O., Kibbi, A. G., & Kurban, M. (2017). Scabies in the age of increasing drug resistance. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(11), e0005920. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005920>
- Khatib, R., Riederer, K., Saeed, S., Johnson, L. B., Fakih, M. G., Sharma, M., Tabriz, M. S., & Khosrovaneh, A. (2005). Time to positivity in Staphylococcus aureus bacteremia: possible correlation with the source and outcome of infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41(5), 594–598. <https://doi.org/10.1086/432472>
- Kim, J., Gregson, D. B., Ross, T., & Laupland, K. B. (2010). Time to blood culture positivity in Staphylococcus aureus bacteremia: association with 30-day mortality. *The Journal of infection*, 61(3), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.06.001>
- Kinloch, N. N., Ritchie, G., Dong, W., Cobarrubias, K. D., Sudderuddin, H., Lawson, T., Matic, N., Montaner, J. S. G., Leung, V., Romney, M. G., Lowe, C. F., Brumme, C. J., & Brumme, Z. L. (2021). SARS-CoV-2 RNA Quantification Using Droplet Digital RT-PCR. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 23(8), 907–919. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.04.014>
- Kinloch, N. N., Ritchie, G., Dong, W., Cobarrubias, K. D., Sudderuddin, H., Lawson, T., Matic, N., Montaner, J. S., Leung, V., Romney, M. G., Lowe, C. F., Brumme, C. J., & Brumme, Z. L. (2021). SARS-COV-2 RNA quantification using Droplet Digital RT-PCR. *Journal of Molecular Diagnostics*, 23(8), 907–919. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.04.014>
- Kinpara, T. (2004). A Picoliter Chamber Array for Cell-Free Protein Synthesis. *The Journal of Biochemistry*, 136(2), 149–154. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh102>
- Kiselinova, M., Pasternak, A. O., De Spiegelaere, W., Vogelaers, D., Berkhout, B., & Vandekerckhove, L. (2014). Comparison of Droplet Digital PCR and Seminested Real-Time PCR for Quantification of Cell-Associated HIV-1 RNA. *PLoS ONE*, 9(1), e85999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085999>
- Kiss, M. M., Ortoleva-Donnelly, L., Beer, N. R., Warner, J., Bailey, C. G., Colston, B. W., Rothberg, J. M., Link, D. R., & Leamon, J. H. (2008). High-Throughput Quantitative Polymerase Chain Reaction in Picoliter Droplets. *Analytical Chemistry*, 80(23), 8975–8981. <https://doi.org/10.1021/ac801276c>
- Koch, H., Jeschke, A., & Becks, L. (2015). Use of ddPCR in experimental evolution studies. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(3), 340–351. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12467>
- Koepfli, C., Nguitragool, W., Hofmann, N. E., Robinson, L. J., Ome-Kaius, M., Sattabongkot, J., Felger, I., & Mueller, I. (2016). Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR). *Scientific reports*, 6, 39183. <https://doi.org/10.1038/srep39183>

- Kumaresan, P., Yang, C. J., Cronier, S. A., Blazej, R. G., & Mathies, R. A. (2008). High-Throughput Single Copy DNA Amplification and Cell Analysis in Engineered Nanoliter Droplets. *Analytical Chemistry*, 80(10), 3522–3529. <https://doi.org/10.1021/ac800327d>
- Kuypers, J., & Jerome, K. R. (2017). Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology. *Journal of clinical microbiology*, 55(6), 1621–1628. <https://doi.org/10.1128/JCM.00211-17>
- Lam, K. W., Jiang, P., Liao, G. J., Chan, K. C., Leung, T. Y., Chiu, R. W., & Lo, Y. M. (2012). Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by targeted massively parallel sequencing of maternal plasma: application to β -thalassemia. *Clinical chemistry*, 58(10), 1467–1475. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.189589>
- LaMonte, G., Lim, M. Y., Wree, M., Reimer, C., Nachon, M., Corey, V., Gedeck, P., Plouffe, D., Du, A., Figueroa, N., Yeung, B., Bifani, P., & Winzeler, E. A. (2016). Mutations in the Plasmodium falciparum Cyclic Amine Resistance Locus (PfCARL) Confer Multidrug Resistance. *mBio*, 7(4), e00696-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00696-16>
- Landier, J., Parker, D. M., Thu, A. M., Carrara, V. I., Lwin, K. M., Bonnington, C. A., Pukrittayakamee, S., Delmas, G., & Nosten, F. H. (2016). The role of early detection and treatment in malaria elimination. *Malaria journal*, 15, 363. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1399-y>
- Lauring, A. S., & Malani, P. N. (2021). Variants of SARS-CoV-2. *JAMA*, 10.1001/jama.2021.14181. Advance online publication. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.14181>
- Lee, Y. S., Choi, J. W., Kang, T., & Chung, B. G. (2023). Deep Learning-Assisted Droplet Digital PCR for Quantitative Detection of Human Coronavirus. *BioChip Journal*, 17(1), 112–119. <https://doi.org/10.1007/s13206-023-00095-2>
- Leiby, D. A. (2011). Transfusion-Transmitted Babesiaspp.: Bull's-Eye on Babesia microti. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 14–28. <https://doi.org/10.1128/cmr.00022-10>
- Li, H., Xue, G., & Yeung, E. S. (2001). Selective Detection of Individual DNA Molecules by Capillary Polymerase Chain Reaction. *Analytical Chemistry*, 73(7), 1537–1543. <https://doi.org/10.1021/ac001125p>
- Li, J. J., Xiong, C., Liu, Y., Liang, J. S., & Zhou, X. W. (2016). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Emergence As an Alternative Technology for Herbal Medicine Identification. *Frontiers in plant science*, 7, 1956. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01956>
- Li, M., Diehl, F., Dressman, D., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2006). BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nature Methods*, 3(2), 95–97. <https://doi.org/10.1038/nmeth850>

- Li, X. H., Kondrashin, A., Greenwood, B., Lindblade, K., Loku Galappaththy, G., & Alonso, P. (2019). A Historical Review of WHO Certification of Malaria Elimination. *Trends in parasitology*, 35(2), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.011>
- Liang, W., Xu, L., Sui, Z., Li, Y., Li, L., Wen, Y., Li, C., Ren, S., & Liu, G. (2016). Quantification of plasmid DNA reference materials for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* based on UV, HR-ICP-MS and digital PCR. *Chemistry Central journal*, 10(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s13065-016-0201-0>
- Link, D. R., Anna, S. L., Weitz, D. A., & Stone, H. A. (2004). Geometrically Mediated Breakup of Drops in Microfluidic Devices. *Physical Review Letters*, 92(5). <https://doi.org/10.1103/physrevlett.92.054503>
- Link, T., Kuhlmann, J. D., Kobelt, D., Herrmann, P., Vassileva, Y. D., Kramer, M., Frank, K., Göckenjan, M., Wimberger, P., & Stein, U. (2019). Clinical relevance of circulating MACC1 and S100A4 transcripts for ovarian cancer. *Molecular oncology*, 13(5), 1268–1279. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12484>
- Liu, A., Guan, G., Du, P., Gou, H., Liu, Z., Liu, J., Ma, M., Yang, J., Li, Y., Niu, Q., Ren, Q., Bai, Q., Yin, H., & Luo, J. (2012). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method based on two species-specific primer sets for the rapid identification of Chinese *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitology international*, 61(4), 658–663. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.07.004>
- Liu, P., Wang, Y., & Li, X. (2019). Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(5), 871–879. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.03.002>
- Liu, X., Feng, J., Zhang, Q., Guo, D., Zhang, L., Suo, T., Hu, W., Guo, M., Wang, X., Huang, Z., Xiong, Y., Chen, G., Chen, Y., & Lan, K. (2020). Analytical comparisons of SARS-COV-2 detection by qRT-PCR and ddPCR with multiple primer/probe sets. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 1175–1179. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1772679>
- Liu, Y., Ning, Z., Chen, Y., Guo, M., Liu, Y., Gali, N. K., Sun, L., Duan, Y., Cai, J., Westerdahl, D., Liu, X., Xu, K., Ho, K. F., Kan, H., Fu, Q., & Lan, K. (2020). Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature*, 582(7813), 557–560. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2271-3>
- Liu, Y., Zhu, Y., Peng, Y., Zheng, X., Lu, D., Mao, M., & Zheng, G. (2016). *Zhonghua bing li xue za zhi = Chinese journal of pathology*, 45(2), 117–119. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2016.02.012>
- Logan-Jackson, A., & Rose, J. B. (2021). Cooccurrence of Five Pathogenic *Legionella* spp. and Two Free-Living *Amoebae* Species in a Complete Drinking Water System and Cooling Towers. *Pathogens*, 10(11), 1407. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111407>
- Loomba, S., de Figueiredo, A., Piatek, S. J., de Graaf, K., & Larson, H. J. (2021). Measuring the impact of COVID-19 vaccine misinformation on vaccination intent in the

UK and USA. *Nature human behaviour*, 5(3), 337–348. <https://doi.org/10.1038/s41562-021-01056-1>

Lu, R., Wang, J., Li, M., Wang, Y., Dong, J., & Cai, W. (2020). SARS-CoV-2 detection using digital PCR for COVID-19 diagnosis, treatment monitoring and criteria for discharge. *medRxiv* (Cold Spring Harbor Laboratory). <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.20042689>

Lucas, C., Vogels, C. B. F., Yildirim, I., Rothman, J. E., Lu, P., Monteiro, V., Gehlhausen, J. R., Campbell, M., Silva, J., Tabachnikova, A., Peña-Hernandez, M. A., Muenker, M. C., Breban, M. I., Fauver, J. R., Mohanty, S., Huang, J., Yale SARS-CoV-2 Genomic Surveillance Initiative, Shaw, A. C., Ko, A. I., Omer, S. B., ... Iwasaki, A. (2021). Impact of circulating SARS-CoV-2 variants on mRNA vaccine-induced immunity. *Nature*, 600(7889), 523–529. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04085-y>

Lun, F. M. F., Chiu, R. W. K., Chan, K. C. A., Leung, T. Y., Lau, T. K., & Lo, Y. M. D. (2008). Microfluidics Digital PCR Reveals a Higher than Expected Fraction of Fetal DNA in Maternal Plasma. *Clinical Chemistry*, 54(10), 1664–1672. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.111385>

Lun, F. M., Tsui, N. B., Chan, K. C., Leung, T. Y., Lau, T. K., Charoenkwan, P., Chow, K. C., Lo, W. Y., Wanapirak, C., Sanguansermisri, T., Cantor, C. R., Chiu, R. W., & Lo, Y. M. (2008). Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50), 19920–19925. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810373105>

Luvhimbi, N., Tshitangano, T. G., Mabunda, J. T., Olaniyi, F. C., & Edokpayi, J. N. (2022). Water quality assessment and evaluation of human health risk of drinking water from source to point of use at Thulamela municipality, Limpopo Province. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10092-4>

Lv, J., Yang, J., Xue, J., Zhu, P., Liu, L., & Li, S. (2020). Detection of SARS-CoV-2 RNA residue on object surfaces in nucleic acid testing laboratory using droplet digital PCR. *The Science of the total environment*, 742, 140370. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140370>

Ma, Y., Chang, W., Luo, K., Wang, C., Liu, S., Yen, W., & Lee, G. (2017). Digital quantification of DNA via isothermal amplification on a self-driven microfluidic chip featuring hydrophilic film-coated polydimethylsiloxane. *Biosensors and Bioelectronics*, 99, 547–554. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.026>

Madic, J., Zocovic, A., Senlis, V., Fradet, E., Andre, B., Muller, S., Dangla, R., & Droniou, M. (2016). Three-color crystal digital PCR. *Biomolecular Detection and Quantification*, 10, 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.10.002>

- Maestre-Carballa, L., Navarro-López, V., & Martinez-Garcia, M. (2024). City-scale monitoring of antibiotic resistance genes by digital PCR and metagenomics. *Environmental Microbiome*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s40793-024-00557-6>
- Malin, J. J., Suárez, I., Priesner, V., Fätkenheuer, G., & Rybníček, J. (2020). Remdesivir against COVID-19 and Other Viral Diseases. *Clinical microbiology reviews*, 34(1), e00162-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00162-20>
- Malla, B., Shrestha, S., & Haramoto, E. (2023). Optimization of the 5-plex digital PCR workflow for simultaneous monitoring of SARS-CoV-2 and other pathogenic viruses in wastewater. *The Science of the Total Environment*, 913, 169746. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169746>
- Mangano, V. D., Perandin, F., Tiberti, N., Guerriero, M., Migliaccio, F., Prato, M., Bargagna, L., Tais, S., Degani, M., Verra, F., Bisoffi, Z., & Bruschi, F. (2019). Risk of transfusion-transmitted malaria: evaluation of commercial ELISA kits for the detection of anti-Plasmodium antibodies in candidate blood donors. *Malaria journal*, 18(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2650-0>
- Mansfield, E. S., Robertson, J. M., Lebo, R. V., Lucero, M. Y., Mayrand, P. E., Rappaport, E., Parrella, T., Sartore, M., Surrey, S., & Fortina, P. (1993). Duchenne/Becker muscular dystrophy carrier detection using quantitative PCR and fluorescence-based strategies. *American journal of medical genetics*, 48(4), 200–208. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320480406>
- Mao, X., Liu, C., Tong, H., Chen, Y., & Liu, K. (2019). Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *PubMed*, 11(12), 7209–7222. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31934273>
- Martin, S. J., & Yost, R. J. (2011). Infectious diseases in the critically ill patients. *Journal of pharmacy practice*, 24(1), 35–43. <https://doi.org/10.1177/0897190010388906>
- Martin-Fernandez, M., Vaquero-Roncero, L. M., Almansa, R., Gómez-Sánchez, E., Martín, S., Tamayo, E., Esteban-Velasco, M. C., Ruiz-Granado, P., Aragón, M., Calvo, D., Rico-Feijoo, J., Ortega, A., Gómez-Pesquera, E., Lorenzo-López, M., López, J., Doncel, C., González-Sánchez, C., Álvarez, D., Zarca, E., Ríos-Llorente, A., ... Heredia-Rodríguez, M. (2020). Endothelial dysfunction is an early indicator of sepsis and neutrophil degranulation of septic shock in surgical patients. *BJS open*, 4(3), 524–534. <https://doi.org/10.1002/bjs5.50265>
- Matsubara, Y., Kerman, K., Kobayashi, M., Yamamura, S., Morita, Y., Takamura, Y., & Tamiya, E. (2004). On-Chip Nanoliter-Volume Multiplex TaqMan Polymerase Chain Reaction from A Single Copy Based on Counting Fluorescence Released Microchambers. *Analytical Chemistry*, 76(21), 6434–6439. <https://doi.org/10.1021/ac0497149>
- Mazutis, L., Araghi, A. F., Miller, O. J., Baret, J., Frenz, L., Janoshazi, A., Taly, V., Miller, B. J., Hutchison, J. B., Link, D., Griffiths, A. D., & Ryckelynck, M. (2009). Droplet-Based Microfluidic Systems for High-Throughput Single DNA Molecule

Isothermal Amplification and Analysis. *Analytical Chemistry*, 81(12), 4813–4821. <https://doi.org/10.1021/ac900403z>

McDermott, G. P., Do, D., Litterst, C. M., Maar, D., Hindson, C. M., Steenblock, E. R., Legler, T. C., Jouvenot, Y., Marrs, S. H., Bemis, A., Shah, P., Wong, J., Wang, S., Sally, D., Javier, L., Dinio, T., Han, C., Brackbill, T. P., Hodges, S. P., . . . Lowe, A. J. (2013). Multiplexed Target Detection Using DNA-Binding Dye Chemistry in Droplet Digital PCR. *Analytical Chemistry*, 85(23), 11619–11627. <https://doi.org/10.1021/ac403061n>

Merino, I., de la Fuente, A., Domínguez-Gil, M., Eiros, J. M., Tedim, A. P., & Bermejo-Martín, J. F. (2022). Digital PCR applications for the diagnosis and management of infection in critical care medicine. *Critical care (London, England)*, 26(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13054-022-03948-8>

Meyer, M., Briggs, A. W., Maricic, T., Höber, B., Höffner, B., Krause, J., Weihmann, A., Pääbo, S., & Hofreiter, M. (2007). From micrograms to picograms: quantitative PCR reduces the material demands of high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Research*, 36(1), e5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1095>

Mirabile, A., Sangiorgio, G., Bonacci, P. G., Bivona, D., Nicitra, E., Bonomo, C., Bongiorno, D., Stefani, S., & Musso, N. (2024). Advancing Pathogen Identification: The Role of Digital PCR in Enhancing Diagnostic Power in Different Settings. *Diagnostics*, 14(15), 1598. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14151598>

Mistry, R. K., Kelsall, E., Sou, S. N., Barker, H., Jenns, M., Willis, K., Zurlo, F., Hatton, D., & Gibson, S. J. (2021). A novel hydrogen peroxide evolved CHO host can improve the expression of difficult to express bispecific antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(6), 2326–2337. <https://doi.org/10.1002/bit.27744>

Mordvinov, V. A., Ershov, N. I., Pirozhkova, D. S., Pakharukov, Y. V., & Pakharukova, M. Y. (2017). ABC transporters in the liver fluke *Opisthorchis felinus*. *Molecular and biochemical parasitology*, 216, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.07.001>

Morley A. A. (2014). Digital PCR: A brief history. *Biomolecular detection and quantification*, 1(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.06.001>

Morrison, T., Hurley, J., Garcia, J., Yoder, K., Katz, A., Roberts, D., Cho, J., Kanigan, T., Ilyin, S. E., Horowitz, D., Dixon, J. M., & Brenan, C. J. (2006). Nanoliter high throughput quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*, 34(18), e123. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl639>

Mounsey, K. E., & McCarthy, J. S. (2013). Treatment and control of scabies. *Current opinion in infectious diseases*, 26(2), 133–139. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32835e1d57>

Mtsetwa, H. N., Amoah, I. D., Kumari, S., Bux, F., & Reddy, P. (2021). Wastewater-Based Surveillance of Antibiotic Resistance Genes Associated with Tuberculosis Treatment Regimen in KwaZulu Natal, South Africa. *Antibiotics*, 10(11), 1362. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111362>

- Mtetwa, H. N., Amoah, I. D., Kumari, S., Bux, F., & Reddy, P. (2022). Molecular surveillance of tuberculosis-causing mycobacteria in wastewater. *Heliyon*, 8(2), e08910. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08910>
- Mullis K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56–65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
- Muro-Cacho C. A. (1997). In situ PCR. Overview of procedures and applications. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 2, c15–c29. <https://doi.org/10.2741/a169>
- Mutirangura, A., Greenberg, F., Butler, M. G., Malcolm, S., Nicholls, R. D., Chakravarti, A., & Ledbetter, D. H. (1993). Multiplex PCR of three dinucleotide repeats in the Prader-Willi/Angelman critical region (15q11-q13): molecular diagnosis and mechanism of uniparental disomy. *Human molecular genetics*, 2(2), 143–151. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.2.143>
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 439, 231–250. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
- Nicot, F., Cazabat, M., Lhomme, S., Marion, O., Sauné, K., Chiabrando, J., Dubois, M., Kamar, N., Abravanel, F., & Izopet, J. (2016). Quantification of HEV RNA by Droplet Digital PCR. *Viruses*, 8(8), 233. <https://doi.org/10.3390/v8080233>
- Ning, Y., Cui, X., Yang, C., Jing, F., Bian, X., Yi, L., & Li, G. (2018). A self-digitization chip integrated with hydration layer for low-cost and robust digital PCR. *Analytica Chimica Acta*, 1055, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.12.029>
- Niu, C., Wang, X., Zhang, Y., Lu, L., Wang, D., Gao, Y., Wang, S., Luo, J., Jiang, Y., Wang, N., Guo, Y., Zhu, L., & Dong, L. (2021). Interlaboratory assessment of quantification of SARS-CoV-2 RNA by reverse transcription digital PCR. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 413(29), 7195–7204. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03680-2>
- Nixon, G., Garson, J. A., Grant, P., Nastouli, E., Foy, C. A., & Huggett, J. F. (2014). Comparative Study of Sensitivity, Linearity, and Resistance to Inhibition of Digital and Nondigital Polymerase Chain Reaction and Loop Mediated Isothermal Amplification Assays for Quantification of Human Cytomegalovirus. *Analytical Chemistry*, 86(9), 4387–4394. <https://doi.org/10.1021/ac500208w>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Nouri, R., Tang, Z., Dong, M., Liu, T., Kshirsagar, A., & Guan, W. (2021). CRISPR-based detection of SARS-CoV-2: A review from sample to result. *Biosensors & bioelectronics*, 178, 113012. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113012>

- Nyaruaba, R., Li, C., Mwaliko, C., Mwau, M., Odiwuor, N., Muturi, E., Muema, C., Xiong, J., Li, J., Yu, J., & Wei, H. (2021). Developing multiplex ddPCR assays for SARS-CoV-2 detection based on probe mix and amplitude based multiplexing. *Expert review of molecular diagnostics*, 21(1), 119–129. <https://doi.org/10.1080/14737159.2021.1865807>
- Nyaruaba, R., Mwaliko, C., Dobnik, D., Neužil, P., Amoth, P., Mwau, M., Yu, J., Yang, H., & Wei, H. (2022). Digital PCR Applications in the SARS-CoV-2/COVID-19 Era: a Roadmap for Future Outbreaks. *Clinical Microbiology Reviews*, 35(3). <https://doi.org/10.1128/cmr.00168-21>
- Nyaruaba, R., Mwaliko, C., Hong, W., Amoth, P., & Wei, H. (2021). SARS-CoV-2/COVID-19 laboratory biosafety practices and current molecular diagnostic tools. *Journal of biosafety and biosecurity*, 3(2), 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.jobb.2021.10.001>
- Nyaruaba, R., Mwaliko, C., Kering, K. K., & Wei, H. (2019). Droplet digital PCR applications in the tuberculosis world. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 117, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2019.07.001>
- Oliver, D. M., Hanley, N. D., Van Niekerk, M., Kay, D., Heathwaite, A. L., Rabinovici, S. J. M., Kinzelman, J. L., Fleming, L. E., Porter, J., Shaikh, S., Fish, R., Chilton, S., Hewitt, J., Connolly, E., Cummins, A., Glenk, K., McPhail, C., McRory, E., McVittie, A., . . . Quilliam, R. S. (2015). Molecular tools for bathing water assessment in Europe: Balancing social science research with a rapidly developing environmental science evidence-base. *AMBIO*, 45(1), 52–62. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0698-9>
- Ostuni, E., Chen, C. S., Ingber, D. E., & Whitesides, G. M. (2001). Selective Deposition of Proteins and Cells in Arrays of Microwells. *Langmuir*, 17(9), 2828–2834. <https://doi.org/10.1021/la001372o>
- Pakharukova, M. Y., Vavilin, V. A., Sripa, B., Laha, T., Brindley, P. J., & Mordvinov, V. A. (2015). Functional Analysis of the Unique Cytochrome P450 of the Liver Fluke *Opisthorchis felinus*. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(12), e0004258. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004258>
- Pan, Y., Zhang, D., Yang, P., Poon, L. L. M., & Wang, Q. (2020). Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *The Lancet. Infectious diseases*, 20(4), 411–412. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30113-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30113-4)
- Papageorgiou, E. A., & Patsalis, P. C. (2012). Non-invasive prenatal diagnosis of aneuploidies: new technologies and clinical applications. *Genome medicine*, 4(5), 46. <https://doi.org/10.1186/gm345>
- Park, C., Lee, J., Hassan, Z. U., Ku, K. B., Kim, S. J., Kim, H. G., Park, E. C., Park, G. S., Park, D., Baek, S. H., Park, D., Lee, J., Jeon, S., Kim, S., Lee, C. S., Yoo, H. M., & Kim, S. (2021). Comparison of Digital PCR and Quantitative PCR with Various SARS-CoV-2 Primer-Probe Sets. *Journal of microbiology and biotechnology*, 31(3), 358–367. <https://doi.org/10.4014/jmb.2009.09006>

- Pavšič, J., Žel, J., & Milavec, M. (2016). Digital PCR for direct quantification of viruses without DNA extraction. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(1), 67–75. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9109-0>
- Pekin, D., Skhiri, Y., Baret, J. C., Le Corre, D., Mazutis, L., Salem, C. B., Millot, F., El Harrak, A., Hutchison, J. B., Larson, J. W., Link, D. R., Laurent-Puig, P., Griffiths, A. D., & Taly, V. (2011). Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab on a chip*, 11(13), 2156–2166. <https://doi.org/10.1039/c1lc20128j>
- Perchetti, G. A., Zhu, H., Mills, M. G., Shrestha, L., Wagner, C., Bakhsh, S. M., Lin, M. J., Xie, H., Huang, M. L., Mathias, P., Bedford, T., Jerome, K. R., Greninger, A. L., & Roychoudhury, P. (2021). Specific allelic discrimination of N501Y and other SARS-CoV-2 mutations by ddPCR detects B.1.1.7 lineage in Washington State. *Journal of medical virology*, 93(10), 5931–5941. <https://doi.org/10.1002/jmv.27155>
- Pfitzer, C., Schröder, I., Scheungraber, C., Dogan, A., Runnebaum, I. B., Dürst, M., & Häfner, N. (2014). Digital-Direct-RT-PCR: a sensitive and specific method for quantification of CTC in patients with cervical carcinoma. *Scientific reports*, 4, 3970. <https://doi.org/10.1038/srep03970>
- Pinheiro, L. B., Coleman, V. A., Hindson, C. M., Herrmann, J., Hindson, B. J., Bhat, S., & Emslie, K. R. (2011). Evaluation of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification. *Analytical Chemistry*, 84(2), 1003–1011. <https://doi.org/10.1021/ac202578x>
- Pomari, E., Piubelli, C., Perandin, F., & Bisoffi, Z. (2019). Digital PCR: a new technology for diagnosis of parasitic infections. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(12), 1510–1516. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.06.009>
- Publications Office of the European Union. (2019). *Overview and recommendations for the application of digital PCR*. Publications Office of the EU. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/fbc6d552-75f5-11e9-9f05-01aa75ed71a1/language-en>
- Pumford, E. A., Lu, J., Spaczai, I., Prasetyo, M. E., Zheng, E. M., Zhang, H., & Kamei, D. T. (2020). Developments in integrating nucleic acid isothermal amplification and detection systems for point-of-care diagnostics. *Biosensors & bioelectronics*, 170, 112674. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112674>
- Quail, M. A., Kozarewa, I., Smith, F., Scally, A., Stephens, P. J., Durbin, R., Swerdlow, H., & Turner, D. J. (2008). A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. *Nature Methods*, 5(12), 1005–1010. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1270>

- Quan, P. L., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 18(4), 1271. <https://doi.org/10.3390/s18041271>
- Rački, N., Dreo, T., Gutierrez-Aguirre, I., Blejec, A., & Ravnikar, M. (2014). Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant Methods*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-014-0042-6>
- Ramakrishnan, R., Qin, J., Jones, R. C., & Weaver, L. S. (2012). Integrated Fluidic Circuits (IFCS) for digital PCR. *Methods in Molecular Biology*, 423–431. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-134-9_27
- Ramírez, J. D., Herrera, G., Hernández, C., Cruz-Saavedra, L., Muñoz, M., Flórez, C., & Butcher, R. (2018). Evaluation of the analytical and diagnostic performance of a digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) assay to detect *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(12), e0007063. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007063>
- Reddy, S., Schunk, P. R., & Bonnecaze, R. T. (2005). Dynamics of low capillary number interfaces moving through sharp features. *Physics of Fluids*, 17(12). <https://doi.org/10.1063/1.2140691>
- Ren, J., Xu, G., Liu, H., He, N., Zhao, Z., Wang, M., Gu, P., Chen, Z., Deng, Y., Wu, D., & Li, S. (2023). A Chamber-Based digital PCR based on a microfluidic chip for the absolute quantification and analysis of KRAS mutation. *Biosensors*, 13(8), 778. <https://doi.org/10.3390/bios13080778>
- Renninger, N., Nastasi, N., Bope, A., Cochran, S. J., Haines, S. R., Balasubrahmaniam, N., Stuart, K., Bivins, A., Bibby, K., Hull, N. M., & Dannemiller, K. C. (2021). Indoor Dust as a Matrix for Surveillance of COVID-19. *mSystems*, 6(2), e01350-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01350-20>
- Rhoads, D. D., & Pinsky, B. A. (2021). The Truth about SARS-CoV-2 Cycle Threshold Values Is Rarely Pure and Never Simple. *Clinical chemistry*, 68(1), 16–18. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab146>
- Rhoads, D., Peaper, D. R., She, R. C., Nolte, F. S., Wojewoda, C. M., Anderson, N. W., & Pritt, B. S. (2021). College of American Pathologists (CAP) Microbiology Committee Perspective: Caution Must Be Used in Interpreting the Cycle Threshold (Ct) Value. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 72(10), e685–e686. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1199>
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M., Michael, I., & Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *The Science of the Total Environment*, 447, 345–360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.032>

Robinson, D. R., Wu, Y. M., Vats, P., Su, F., Lonigro, R. J., Cao, X., Kalyana-Sundaram, S., Wang, R., Ning, Y., Hodges, L., Gursky, A., Siddiqui, J., Tomlins, S. A., Roychowdhury, S., Pienta, K. J., Kim, S. Y., Roberts, J. S., Rae, J. M., Van Poznak, C. H., Hayes, D. F., ... Chinnaiyan, A. M. (2013). Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nature genetics*, 45(12), 1446–1451. <https://doi.org/10.1038/ng.2823>

Rohit, A., Kumar, D. S., Dhinakaran, I., Joy, J., Kumar, D. V., Ballamoole, K. K., Karunasagar, I., Karola, P., & Dag, H. (2019). Whole-genome-based analysis reveals multiclonal *Serratia marcescens* outbreaks in a non-Neonatal Intensive Care Unit setting in a tertiary care hospital in India. *Journal of Medical Microbiology*, 68(4), 616–621. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000947>

Roy, S., Hartley, J., Dunn, H., Williams, R., Williams, C. A., & Breuer, J. (2019). Whole-genome Sequencing Provides Data for Stratifying Infection Prevention and Control Management of Nosocomial Influenza A. *Clinical Infectious Diseases*, 69(10), 1649–1656. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz020>

Rugo, H. S., Rumble, R. B., Macrae, E., Barton, D. L., Connolly, H. K., Dickler, M. N., Fallowfield, L., Fowble, B., Ingle, J. N., Jahanzeb, M., Johnston, S. R., Korde, L. A., Khatcheressian, J. L., Mehta, R. S., Muss, H. B., & Burstein, H. J. (2016). Endocrine Therapy for Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Guideline. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(25), 3069–3103. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.1487>

Rutsaert, S., Bosman, K., Trypsteen, W., Nijhuis, M., & Vandekerckhove, L. (2018). Digital PCR as a tool to measure HIV persistence. *Retrovirology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0399-0>

Safiabadi Tali, S. H., LeBlanc, J. J., Sadiq, Z., Oyewunmi, O. D., Camargo, C., Nikpour, B., Armanfard, N., Sagan, S. M., & Jahanshahi-Anbuhi, S. (2021). Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clinical microbiology reviews*, 34(3), e00228-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00228-20>

Safiabadi Tali, S. H., LeBlanc, J. J., Sadiq, Z., Oyewunmi, O. D., Camargo, C., Nikpour, B., Armanfard, N., Sagan, S. M., & Jahanshahi-Anbuhi, S. (2021). Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clinical microbiology reviews*, 34(3), e00228-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00228-20>

Sakr, Y., Jaschinski, U., Wittebole, X., Szakmany, T., Lipman, J., Namendys-Silva, S. A., Martin-Loeches, I., Leone, M., Lupu, M. N., Vincent, J. L., & ICON Investigators (2018). Sepsis in Intensive Care Unit Patients: Worldwide Data From the Intensive Care over Nations Audit. *Open forum infectious diseases*, 5(12), ofy313. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy313>

Salas Rojas, M., Silva Garcia, R., Bini, E., Pérez de la Cruz, V., León Contreras, J. C., Hernández Pando, R., Bastida Gonzalez, F., Davila-Gonzalez, E., Orozco Morales, M., Gamboa Domínguez, A., Sotelo, J., & Pineda, B. (2021). Quinacrine, an Antimalarial Drug with Strong Activity Inhibiting SARS-CoV-2 Viral Replication In Vitro. *Viruses*, 13(1), 121. <https://doi.org/10.3390/v13010121>

Salipante, S. J., & Jerome, K. R. (2020). Digital PCR-An Emerging Technology with Broad Applications in Microbiology. *Clinical chemistry*, 66(1), 117–123. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2019.304048>

Sanmamed, M. F., Fernández-Landázuri, S., Rodríguez, C., Zárate, R., Lozano, M. D., Zubiri, L., Perez-Gracia, J. L., Martín-Algarra, S., & González, A. (2014). Quantitative Cell-Free Circulating BRAFV600E Mutation Analysis by Use of Droplet Digital PCR in the Follow-up of Patients with Melanoma Being Treated with BRAF Inhibitors. *Clinical Chemistry*, 61(1), 297–304. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.230235>

Scarcelli, J. J., Hone, M., Beal, K., Ortega, A., Figueroa, B., Starkey, J. A., & Anderson, K. (2018). Analytical subcloning of a clonal cell line demonstrates cellular heterogeneity that does not impact process consistency or robustness. *Biotechnology Progress*, 34(3), 602–612. <https://doi.org/10.1002/btpr.2646>

Schaerli, Y., Wootton, R. C., Robinson, T., Stein, V., Dunsby, C., Neil, M. a. A., French, P. M. W., deMello, A. J., Abell, C., & Hollfelder, F. (2008). Continuous-Flow Polymerase Chain Reaction of Single-Copy DNA in Microfluidic Microdroplets. *Analytical Chemistry*, 81(1), 302–306. <https://doi.org/10.1021/ac802038c>

Schlenker, F., Kipf, E., Borst, N., Hutzenlaub, T., Zengerle, R., Von Stetten, F., & Juelg, P. (2021). Virtual Fluorescence Color Channels by Selective Photobleaching in Digital PCR Applied to the Quantification of KRAS Point Mutations. *Analytical Chemistry*, 93(30), 10538–10545. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01488>

Schmieder, V., Fieder, J., Drerup, R., Gutierrez, E. A., Guelch, C., Stolzenberger, J., Stumbaum, M., Mueller, V. S., Higel, F., Bergbauer, M., Bornhoeft, K., Wittner, M., Gronemeyer, P., Braig, C., Huber, M., Reisenauer-Schapp, A., Mueller, M. M., Schuette, M., Puengel, S., . . . Fischer, S. (2022). Towards maximum acceleration of monoclonal antibody development: Leveraging transposase-mediated cell line generation to enable GMP manufacturing within 3 months using a stable pool. *Journal of Biotechnology*, 349, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.03.010>

Schneider, T., Yen, G. S., Thompson, A. M., Burnham, D. R., & Chiu, D. T. (2013). Self-Digitization of Samples into a High-Density Microfluidic Bottom-Well Array. *Analytical Chemistry*, 85(21), 10417–10423. <https://doi.org/10.1021/ac402383n>

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>

- Schuler, F., Schwemmer, F., Trotter, M., Wadle, S., Zengerle, R., Von Stetten, F., & Paust, N. (2015). Centrifugal step emulsification applied for absolute quantification of nucleic acids by digital droplet RPA. *Lab on a Chip*, 15(13), 2759–2766. <https://doi.org/10.1039/c5lc00291e>
- Scicluna, B. P., van Vught, L. A., Zwinderman, A. H., Wiewel, M. A., Davenport, E. E., Burnham, K. L., Nürnberg, P., Schultz, M. J., Horn, J., Cremer, O. L., Bonten, M. J., Hinds, C. J., Wong, H. R., Knight, J. C., van der Poll, T., & MARS consortium (2017). Classification of patients with sepsis according to blood genomic endotype: a prospective cohort study. *The Lancet. Respiratory medicine*, 5(10), 816–826. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30294-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30294-1)
- Science Brief: Emerging SARS-CoV-2 Variants. (2021). In National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD), Division of Viral Diseases, *CDC COVID-19 Science Briefs*. Centers for Disease Control and Prevention (US).
- Sedlak, R. H., & Jerome, K. R. (2012). Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.009>
- Sedlak, R. H., & Jerome, K. R. (2013). Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.009>
- Sedlak, R. H., Cook, L., Cheng, A., Magaret, A., & Jerome, K. R. (2014). Clinical utility of droplet digital PCR for human cytomegalovirus. *Journal of clinical microbiology*, 52(8), 2844–2848. <https://doi.org/10.1128/JCM.00803-14>
- Sedlak, R. H., Cook, L., Huang, M. L., Magaret, A., Zerr, D. M., Boeckh, M., & Jerome, K. R. (2014). Identification of chromosomally integrated human herpesvirus 6 by droplet digital PCR. *Clinical chemistry*, 60(5), 765–772. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.217240>
- Sedlak, R. H., Hill, J. A., Nguyen, T., Cho, M., Levin, G., Cook, L., Huang, M. L., Flamand, L., Zerr, D. M., Boeckh, M., & Jerome, K. R. (2016). Detection of Human Herpesvirus 6B (HHV-6B) Reactivation in Hematopoietic Cell Transplant Recipients with Inherited Chromosomally Integrated HHV-6A by Droplet Digital PCR. *Journal of clinical microbiology*, 54(5), 1223–1227. <https://doi.org/10.1128/JCM.03275-15>
- Sedlak, R. H., Kuypers, J., & Jerome, K. R. (2014). A multiplexed droplet digital PCR assay performs better than qPCR on inhibition prone samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 80(4), 285–286. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.004>
- Sedlak, R. H., Nguyen, T., Palileo, I., Jerome, K. R., & Kuypers, J. (2017). Superiority of Digital Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) over Real-Time RT-PCR for Quantitation of Highly Divergent Human Rhinoviruses. *Journal of clinical microbiology*, 55(2), 442–449. <https://doi.org/10.1128/JCM.01970-16>

- Sefrioui, D., Sarafan-Vasseur, N., Beaussire, L., Barette, M., Gangloff, A., Blanchard, F., Clatot, F., Sabourin, J., Sesboüé, R., Frebourg, T., Michel, P., & Di Fiore, F. (2015). Clinical value of chip-based digital-PCR platform for the detection of circulating DNA in metastatic colorectal cancer. *Digestive and Liver Disease*, 47(10), 884–890. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2015.05.023>
- Sergeeva, D., Lee, G. M., Nielsen, L. K., & Grav, L. M. (2020). Multicopy Targeted Integration for Accelerated Development of High-Producing Chinese Hamster Ovary Cells. *ACS Synthetic Biology*, 9(9), 2546–2561. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00322>
- SeyedAlinaghi, S., Mirzapour, P., Dadras, O., Pashaei, Z., Karimi, A., MohsseniPour, M., Soleymanzadeh, M., Barzegary, A., Afsahi, A. M., Vahedi, F., Shamsabadi, A., Behnezhad, F., Saeidi, S., Mehraeen, E., & Shayesteh Jahanfar (2021). Characterization of SARS-CoV-2 different variants and related morbidity and mortality: a systematic review. *European journal of medical research*, 26(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s40001-021-00524-8>
- Shayo, G. M., Elimbinzi, E., Shao, G. N., & Fabian, C. (2023). Severity of waterborne diseases in developing countries and the effectiveness of ceramic filters for improving water quality. *Bulletin of the National Research Centre/Bulletin of the National Research Center*, 47(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-023-01088-9>
- Shen, F., Davydova, E. K., Du, W., Kreutz, J. E., Piepenburg, O., & Ismagilov, R. F. (2011). Digital Isothermal Quantification of Nucleic Acids via Simultaneous Chemical Initiation of Recombinase Polymerase Amplification Reactions on SlipChip. *Analytical Chemistry*, 83(9), 3533–3540. <https://doi.org/10.1021/ac200247e>
- Shen, F., Du, W., Kreutz, J. E., Fok, A., & Ismagilov, R. F. (2010). Digital PCR on a SlipChip. *Lab on a Chip*, 10(20), 2666. <https://doi.org/10.1039/c004521g>
- Shih, I. M., Zhou, W., Goodman, S. N., Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2001). Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *PubMed*, 61(3), 818–822. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11221861>
- Shin, J., Shina, S., Jung, S. H., Park, C., Cho, S. Y., Lee, D. G., & Chung, Y. J. (2021). Duplex dPCR System for Rapid Identification of Gram-Negative Pathogens in the Blood of Patients with Bloodstream Infection: A Culture-Independent Approach. *Journal of microbiology and biotechnology*, 31(11), 1481–1489. <https://doi.org/10.4014/jmb.2103.03044>
- Shuber, A. P., Skoletsky, J., Stern, R., & Handelin, B. L. (1993). Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. *Human molecular genetics*, 2(2), 153–158. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.2.153>
- Si, H., Xu, G., Jing, F., Sun, P., Zhao, D., & Wu, D. (2020). A multi-volume microfluidic device with no reagent loss for low-cost digital PCR application. *Sensors and Actuators B Chemical*, 318, 128197. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128197>

- Singer, G., Kurman, R. J., Chang, H., Cho, S. K., & Shih, I. (2002). Diverse Tumorigenic Pathways in Ovarian Serous Carcinoma. *American Journal of Pathology*, 160(4), 1223–1228. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62549-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62549-7)
- Singh, R., Singh, A. P., Kumar, S., Giri, B. S., & Kim, K. (2019). Antibiotic resistance in major rivers in the world: A systematic review on occurrence, emergence, and management strategies. *Journal of Cleaner Production*, 234, 1484–1505. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.243>
- Sint, D., Raso, L., & Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(5), 898–905. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210x.2012.00215.x>
- Slomovic, S., & Schuster, G. (2008). Stable PNPase RNAi silencing: its effect on the processing and adenylation of human mitochondrial RNA. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(2), 310–323. <https://doi.org/10.1261/rna.697308>
- Smyrlaki, I., Ekman, M., Lentini, A., Rufino de Sousa, N., Papanicolaou, N., Vondracek, M., Aarum, J., Safari, H., Muradrasoli, S., Rothfuchs, A. G., Albert, J., Högberg, B., & Reinius, B. (2020). Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. *Nature communications*, 11(1), 4812. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18611-5>
- Spencer-Williams, I., Meyer, M., DePas, W., Elliott, E., & Haig, S. (2023). Assessing the Impacts of Lead Corrosion Control on the Microbial Ecology and Abundance of Drinking-Water-Associated Pathogens in a Full-Scale Drinking Water Distribution System. *Environmental Science & Technology*, 57(48), 20360–20369. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c05272>
- Sposito, A. J., & DeVoe, D. L. (2017). Staggered trap arrays for robust microfluidic sample digitization. *Lab on a Chip*, 17(23), 4105–4112. <https://doi.org/10.1039/c7lc00846e>
- Sreejith, K. R., Ooi, C. H., Jin, J., Dao, D. V., & Nguyen, N. T. (2018). Digital polymerase chain reaction technology - recent advances and future perspectives. *Lab on a chip*, 18(24), 3717–3732. <https://doi.org/10.1039/c8lc00990b>
- Srila, W., Baumann, M., Borth, N., & Yamabhai, M. (2022). Codon and signal peptide optimization for therapeutic antibody production from Chinese hamster ovary (CHO) cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 622, 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.06.072>
- Srisutham, S., Saralamba, N., Malleret, B., Rénia, L., Dondorp, A. M., & Imwong, M. (2017). Four human Plasmodium species quantification using droplet digital PCR. *PloS one*, 12(4), e0175771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175771>

- Stabley, D. L., Harris, A. W., Holbrook, J., Chubbs, N. J., Lozo, K. W., Crawford, T. O., Swoboda, K. J., Funanage, V. L., Wang, W., Mackenzie, W., Scavina, M., Sol-Church, K., & Butchbach, M. E. (2015). SMN1 and SMN2 copy numbers in cell lines derived from patients with spinal muscular atrophy as measured by array digital PCR. *Molecular genetics & genomic medicine*, 3(4), 248–257. <https://doi.org/10.1002/mgg3.141>
- Stadermann, A., Gamer, M., Fieder, J., Lindner, B., Fehrmann, S., Schmidt, M., Schulz, P., & Gorr, I. H. (2021). Structural analysis of random transgene integration in CHO manufacturing cell lines by targeted sequencing. *Biotechnology and Bioengineering*, 119(3), 868–880. <https://doi.org/10.1002/bit.28012>
- Staley, Z. R., Boyd, R. J., Shum, P., & Edge, T. A. (2018). Microbial Source Tracking Using Quantitative and Digital PCR To Identify Sources of Fecal Contamination in Stormwater, River Water, and Beach Water in a Great Lakes Area of Concern. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(20). <https://doi.org/10.1128/aem.01634-18>
- Stokdyk, J. P., Finstahl, A. D., Walsh, J. F., Spencer, S. K., De Lambert, J. R., Anderson, A. C., Rezanian, L. W., Kieke, B. A., & Borchardt, M. A. (2020). Viral, bacterial, and protozoan pathogens and fecal markers in wells supplying groundwater to public water systems in Minnesota, USA. *Water Research*, 178, 115814. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115814>
- Strain, M. C., Lada, S. M., Luong, T., Rought, S. E., Gianella, S., Terry, V. H., Spina, C. A., Woelk, C. H., & Richman, D. D. (2013). Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PloS one*, 8(4), e55943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055943>
- Strich, J. R., & Palmore, T. N. (2017). Preventing Transmission of Multidrug-Resistant Pathogens in the Intensive Care Unit. *Infectious disease clinics of North America*, 31(3), 535–550. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2017.05.010>
- Sugiura, S., Nakajima, M., Iwamoto, S., & Seki, M. (2001). Interfacial Tension Driven Monodispersed Droplet Formation from Microfabricated Channel Array. *Langmuir*, 17(18), 5562–5566. <https://doi.org/10.1021/la010342y>
- Sun, Y., Ding, C., Chen, Q., Xie, J., Yu, J., Shi, Y., Jiang, C., Zhang, Z., He, H., Ge, Y., Li, W., He, J., & Gao, Y. (2021). Digital PCR assay for the effective detection of COVID-19 patients with SARS-CoV-2 low viral load. *Journal of virological methods*, 295, 114185. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114185>
- Sundberg, S. O., Wittwer, C. T., Gao, C., & Gale, B. K. (2010). Spinning Disk Platform for Microfluidic Digital Polymerase Chain Reaction. *Analytical Chemistry*, 82(4), 1546–1550. <https://doi.org/10.1021/ac902398c>
- Sung, H., Han, M. G., Yoo, C. K., Lee, S. W., Chung, Y. S., Park, J. S., Kim, M. N., Lee, H., Hong, K. H., Seong, M. W., Lee, K., Chun, S., Lee, W. G., Kwon, G. C., & Min, W. K. (2020). Nationwide External Quality Assessment of SARS-CoV-2 Molecular Testing, South Korea. *Emerging infectious diseases*, 26(10), 2353–2360. <https://doi.org/10.3201/eid2610.202551>

Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., & Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular detection and quantification*, 3, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>

Sweeney, T. E., Perumal, T. M., Henao, R., Nichols, M., Howrylak, J. A., Choi, A. M., Bermejo-Martin, J. F., Almansa, R., Tamayo, E., Davenport, E. E., Burnham, K. L., Hinds, C. J., Knight, J. C., Woods, C. W., Kingsmore, S. F., Ginsburg, G. S., Wong, H. R., Parnell, G. P., Tang, B., Moldawer, L. L., ... Langley, R. J. (2018). A community approach to mortality prediction in sepsis via gene expression analysis. *Nature communications*, 9(1), 694. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03078-2>

Sweeney, T. E., Shidham, A., Wong, H. R., & Khatri, P. (2015). A comprehensive time-course-based multicohort analysis of sepsis and sterile inflammation reveals a robust diagnostic gene set. *Science translational medicine*, 7(287), 287ra71. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa5993>

Sykes, P. J., Neoh, S. H., Brisco, M. J., Hughes, E., Condon, J., & Morley, A. A. (1992). Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *PubMed*, 13(3), 444–449. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1389177>

Synowiec, A., Szczepański, A., Barreto-Duran, E., Lie, L. K., & Pyrc, K. (2021). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a Systemic Infection. *Clinical microbiology reviews*, 34(2), e00133-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00133-20>

Tajadini, M., Panjehpour, M., & Javanmard, S. H. (2014). Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Advanced biomedical research*, 3, 85. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.127998>

Takeshita, T., Yamamoto, Y., Yamamoto-Ibusuki, M., Inao, T., Sueta, A., Fujiwara, S., Omoto, Y., & Iwase, H. (2015). Droplet digital polymerase chain reaction assay for screening of ESR1 mutations in 325 breast cancer specimens. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 166(6), 540–553.e2. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.09.003>

Takeshita, T., Yamamoto, Y., Yamamoto-Ibusuki, M., Inao, T., Sueta, A., Fujiwara, S., Omoto, Y., & Iwase, H. (2016). Clinical significance of monitoring ESR1 mutations in circulating cell-free DNA in estrogen receptor positive breast cancer patients. *Oncotarget*, 7(22), 32504–32518. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8839>

Talarico, S., Safaeian, M., Gonzalez, P., Hildesheim, A., Herrero, R., Porras, C., Cortes, B., Larson, A., Fang, F. C., & Salama, N. R. (2015). Quantitative Detection and Genotyping of *Helicobacter pylori* from Stool using Droplet Digital PCR Reveals Variation in Bacterial Loads that Correlates with cagA Virulence Gene Carriage. *Helicobacter*, 21(4), 325–333. <https://doi.org/10.1111/hel.12289>

- Taly, V., Pekin, D., Benhaim, L., Kotsopoulos, S. K., Le Corre, D., Li, X., Atochin, I., Link, D. R., Griffiths, A. D., Pallier, K., Blons, H., Bouché, O., Landi, B., Hutchison, J. B., & Laurent-Puig, P. (2013). Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clinical chemistry*, 59(12), 1722–1731. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.206359>
- Tamayo, E., Almansa, R., Carrasco, E., Ávila-Alonso, A., Rodríguez-Fernández, A., Wain, J., Heredia, M., Gomez-Sanchez, E., Soria, S., Rico, L., Iglesias, V., Martínez-Martínez, A., Andaluz-Ojeda, D., Herreras, J. I., Eiros, J. M., & Bermejo-Martin, J. F. (2014). Quantification of IgM molecular response by droplet digital PCR as a potential tool for the early diagnosis of sepsis. *Critical care (London, England)*, 18(3), 433. <https://doi.org/10.1186/cc13910>
- Tan, C., , Chen, X., , Wang, F., , Wang, D., , Cao, Z., , Zhu, X., , Lu, C., , Yang, W., , Gao, N., , Gao, H., , Guo, Y., , & Zhu, L., (2019). A multiplex droplet digital PCR assay for non-invasive prenatal testing of fetal aneuploidies. *The Analyst*, 144(7), 2239–2247. <https://doi.org/10.1039/c8an02018c>
- Tan, K. W., Ji, P., Qian, Z., Gao, Q., Wang, S., Li, Q., Gu, M., Zhang, Q., Hou, C., Huang, Y., Lian, D., Wang, J., Zhang, Z., Zhang, S., Wu, J., & Zhou, W. (2022). Rapidly accelerated development of neutralizing COVID-19 antibodies by reducing cell line and CMC development timelines. *Biotechnology and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1002/bit.28302>
- Tan, Y., Fisher, J. S., Lee, A. I., Cristini, V., & Lee, A. P. (2004). Design of microfluidic channel geometries for the control of droplet volume, chemical concentration, and sorting. *Lab on a Chip*, 4(4), 292. <https://doi.org/10.1039/b403280m>
- Tang, L., Sun, Y., Buelow, D., Gu, Z., Caliendo, A. M., Pounds, S., & Hayden, R. T. (2016). Quantitative Assessment of Commutability for Clinical Viral Load Testing Using a Digital PCR-Based Reference Standard. *Journal of clinical microbiology*, 54(6), 1616–1623. <https://doi.org/10.1128/JCM.03346-15>
- Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P., & Krudsood, S. (2009). Malaria diagnosis: a brief review. *The Korean journal of parasitology*, 47(2), 93–102. <https://doi.org/10.3347/kjp.2009.47.2.93>
- Taylor, S. C., Carbonneau, J., Shelton, D. N., & Boivin, G. (2015). Optimization of Droplet Digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR: Clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations. *Journal of Virological Methods*, 224, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.08.014>
- Taylor, S. C., Laperriere, G., & Germain, H. (2017). Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02217-x>

- Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., & Fenrich, J. (2019). The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology*, 37(7), 761–774. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>
- Te, S. H., Chen, E. Y., & Gin, K. Y. (2015). Comparison of Quantitative PCR and Droplet Digital PCR Multiplex Assays for Two Genera of Bloom-Forming Cyanobacteria, *Cylindrospermopsis* and *Microcystis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15), 5203–5211. <https://doi.org/10.1128/aem.00931-15>
- Telwatte, S., Kumar, N., Vallejo-Gracia, A., Kumar, G. R., Lu, C. M., Ott, M., Wong, J. K., & Yukl, S. A. (2021). Novel RT-ddPCR assays for simultaneous quantification of multiple noncoding and coding regions of SARS-CoV-2 RNA. *Journal of virological methods*, 292, 114115. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114115>
- Tevelev, B., Chambers, A., Ghosh, S., Zhang, Y., Marzili, L., Rouse, J. C., Han, S., Moffat, M., & Scarcelli, J. J. (2022). A genetic off-target event in a site-specific integration cell line expressing monoclonal antibody has no impact on commercial suitability. *Biotechnology Progress*, 39(2). <https://doi.org/10.1002/btpr.3320>
- Tevelev, B., Patel, H., Shields, K., Wei, W., Cooley, C., Zhang, S., Bitzas, G., Duan, W., Khetemene, L., Jakobek, R., D'Antona, A., Sievers, A., King, A., Tam, A., Zhang, Y., Sousa, E., Cohen, J., Wroblewska, L., Marshall, J., . . . Scarcelli, J. J. (2021). Genetic rearrangement during site specific integration event facilitates cell line development of a bispecific molecule. *Biotechnology Progress*. <https://doi.org/10.1002/btpr.3158>
- Thompson, A. M., Gansen, A., Paguirigan, A. L., Kreutz, J. E., Radich, J. P., & Chiu, D. T. (2014). Self-Digitization Microfluidic Chip for Absolute Quantification of mRNA in Single Cells. *Analytical Chemistry*, 86(24), 12308–12314. <https://doi.org/10.1021/ac5035924>
- Thompson, D., & Lei, Y. (2020). Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection. *Sensors and actuators reports*, 2(1), 100017. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2020.100017>
- Thorsen, T., Roberts, R. W., Arnold, F. H., & Quake, S. R. (2001). Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device. *Physical Review Letters*, 86(18), 4163–4166. <https://doi.org/10.1103/physrevlett.86.4163>
- Tian, Q., Song, Q., Xu, Y., Zhu, Q., Yu, B., Jin, W., Jin, Q., & Mu, Y. (2015). A localized temporary negative pressure assisted microfluidic device for detecting keratin 19 in A549 lung carcinoma cells with digital PCR. *Analytical Methods*, 7(5), 2006–2011. <https://doi.org/10.1039/c4ay02604g>
- Tice, J. D., Song, H., Lyon, A. D., & Ismagilov, R. F. (2003). Formation of Droplets and Mixing in Multiphase Microfluidics at Low Values of the Reynolds and the Capillary Numbers. *Langmuir*, 19(22), 9127–9133. <https://doi.org/10.1021/la030090w>

Tilstone, W. J. (2006). *Forensic science: An Encyclopedia of History, Methods, and Techniques*. Bloomsbury Publishing USA.

Tiwari, A., Ahmed, W., Oikarinen, S., Sherchan, S. P., Heikinheimo, A., Jiang, G., Simpson, S. L., Greaves, J., & Bivins, A. (2022). Application of digital PCR for public health-related water quality monitoring. *The Science of the Total Environment*, 837, 155663. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155663>

Tong, S. Y., & Giffard, P. M. (2012). Microbiological applications of high-resolution melting analysis. *Journal of clinical microbiology*, 50(11), 3418–3421. <https://doi.org/10.1128/JCM.01709-12>

Tong, Y. K., Jin, S., Chiu, R. W., Ding, C., Chan, K. C., Leung, T. Y., Yu, L., Lau, T. K., & Lo, Y. M. (2010). Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach. *Clinical chemistry*, 56(1), 90–98. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.134114>

Torjesen I. (2021). Covid-19: Omicron may be more transmissible than other variants and partly resistant to existing vaccines, scientists fear. *BMJ (Clinical research ed.)*, 375, n2943. <https://doi.org/10.1136/bmj.n2943>

Torres, M., Betts, Z., Scholey, R., Elvin, M., Place, S., Hayes, A., & Dickson, A. J. (2023). Long term culture promotes changes to growth, gene expression, and metabolism in CHO cells that are independent of production stability. *Biotechnology and Bioengineering*, 120(9), 2389–2402. <https://doi.org/10.1002/bit.28399>

Tracking SARS-CoV-2 variants. (2024, March 27). <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>

Tsui, N. B., Akolekar, R., Chiu, R. W., Chow, K. C., Leung, T. Y., Lau, T. K., Nicolaides, K. H., & Lo, Y. M. (2010). Synergy of total PLAC4 RNA concentration and measurement of the RNA single-nucleotide polymorphism allelic ratio for the noninvasive prenatal detection of trisomy 21. *Clinical chemistry*, 56(1), 73–81. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.132662>

Tsukahara, T., Nagakura, H., Horita, N., Sato, T., Shinkai, M., Kudo, M., Ueda, A., & Kaneko, T. (2016). Digital PCR assay detection of circulating Mycobacterium tuberculosis DNA in pulmonary tuberculosis patient plasma. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 99, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.04.004>

Unger, M. A., Chou, H., Thorsen, T., Scherer, A., & Quake, S. R. (2000). Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography. *Science*, 288(5463), 113–116. <https://doi.org/10.1126/science.288.5463.113>

UN-Water, 2021: Summary Progress Update 2021 – SDG 6 – water and sanitation for all. Version: July 2021. Geneva, Switzerland.

Ushio, R., Yamamoto, M., Nakashima, K., Watanabe, H., Nagai, K., Shibata, Y., Tashiro, K., Tsukahara, T., Nagakura, H., Horita, N., Sato, T., Shinkai, M., Kudo, M., Ueda, A., & Kaneko, T. (2016). Digital PCR assay detection of circulating *Mycobacterium tuberculosis* DNA in pulmonary tuberculosis patient plasma. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 99, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.04.004>

Van Dorssen, C. F., Gordon, C. A., Li, Y., Williams, G. M., Wang, Y., Luo, Z., Gobert, G. N., You, H., Mcmanus, D. P., & Gray, D. J. (2017). Rodents, goats and dogs – their potential roles in the transmission of schistosomiasis in China. *Parasitology*, 144(12), 1633–1642. <https://doi.org/10.1017/s0031182017000907>

Varela, M. F., Monteiro, S., Rivadulla, E., Santos, R., & Romalde, J. L. (2018). Development of a novel digital RT-PCR method for detection of human sapovirus in different matrices. *Journal of Virological Methods*, 254, 21–24. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.01.005>

Vasudevan, H. N., Xu, P., Servellita, V., Miller, S., Liu, L., Gopez, A., Chiu, C. Y., & Abate, A. R. (2021). Digital droplet PCR accurately quantifies SARS-CoV-2 viral load from crude lysate without nucleic acid purification. *Scientific reports*, 11(1), 780. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80715-1>

Verra, F., Angheben, A., Martello, E., Giorli, G., Perandin, F., & Bisoffi, Z. (2018). A systematic review of transfusion-transmitted malaria in non-endemic areas. *Malaria journal*, 17(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2181-0>

Veyer, D., Kernéis, S., Poulet, G., Wack, M., Robillard, N., Taly, V., L'Honneur, A. S., Rozenberg, F., Laurent-Puig, P., Bélec, L., Hadjadj, J., Terrier, B., & Péré, H. (2021). Highly Sensitive Quantification of Plasma Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 RNA Sheds Light on its Potential Clinical Value. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 73(9), e2890–e2897. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1196>

Vierbaum, L., Wojtalewicz, N., Grunert, H. P., Lindig, V., Duehring, U., Drosten, C., Corman, V., Niemeyer, D., Ciesek, S., Rabenau, H. F., Berger, A., Obermeier, M., Nitsche, A., Michel, J., Mielke, M., Huggett, J., O'Sullivan, D., Busby, E., Cowen, S., Vallone, P. M., ... Kammel, M. (2022). RNA reference materials with defined viral RNA loads of SARS-CoV-2-A useful tool towards a better PCR assay harmonization. *PloS one*, 17(1), e0262656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262656>

Vogels, C. B. F., Brito, A. F., Wyllie, A. L., Fauver, J. R., Ott, I. M., Kalinich, C. C., Petrone, M. E., Casanovas-Massana, A., Catherine Muenker, M., Moore, A. J., Klein, J., Lu, P., Lu-Culligan, A., Jiang, X., Kim, D. J., Kudo, E., Mao, T., Moriyama, M., Oh, J. E., Park, A., ... Grubaugh, N. D. (2020). Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nature microbiology*, 5(10), 1299–1305. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0761-6>

- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1999). Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 9236–9241. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9236>
- Vulto, P., Podszun, S., Meyer, P., Hermann, C., Manz, A., & Urban, G. A. (2011). Phaseguides: a paradigm shift in microfluidic priming and emptying. *Lab on a Chip*, 11(9), 1596. <https://doi.org/10.1039/c0lc00643b>
- Vynck, M., Trypsteen, W., Thas, O., Vandekerckhove, L., & De Spiegelaere, W. (2016). The Future of Digital Polymerase Chain Reaction in Virology. *Molecular diagnosis & therapy*, 20(5), 437–447. <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0224-1>
- Walter, J. M., & Wunderink, R. G. (2017). Severe Respiratory Viral Infections: New Evidence and Changing Paradigms. *Infectious disease clinics of North America*, 31(3), 455–474. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2017.05.004>
- Wang, C. Y. T., McCarthy, J. S., Stone, W. J., Bousema, T., Collins, K. A., & Bialasiewicz, S. (2018). Assessing Plasmodium falciparum transmission in mosquito-feeding assays using quantitative PCR. *Malaria journal*, 17(1), 249. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2382-6>
- Wang, D., Wang, Z., Gao, Y., Wu, X., Dong, L., Dai, X., & Gao, Y. (2021). Validation of the analytical performance of nine commercial RT-qPCR kits for SARS-CoV-2 detection using certified reference material. *Journal of virological methods*, 298, 114285. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114285>
- Wang, D., Yamahara, K. M., Cao, Y., & Boehm, A. B. (2016). Absolute Quantification of Enterococcal 23S rRNA Gene Using Digital PCR. *Environmental science & technology*, 50(7), 3399–3408. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05747>
- Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., Shi, Z., Hu, Z., Zhong, W., & Xiao, G. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell research*, 30(3), 269–271. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>
- Wang, P., Bahreini, A., Gyanchandani, R., Lucas, P. C., Hartmaier, R. J., Watters, R. J., Jonnalagadda, A. R., Trejo Bittar, H. E., Berg, A., Hamilton, R. L., Kurland, B. F., Weiss, K. R., Mathew, A., Leone, J. P., Davidson, N. E., Nikiforova, M. N., Brufsky, A. M., Ambros, T. F., Stern, A. M., Puhalla, S. L., ... Oesterreich, S. (2016). Sensitive Detection of Mono- and Polyclonal ESR1 Mutations in Primary Tumors, Metastatic Lesions, and Cell-Free DNA of Breast Cancer Patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(5), 1130–1137. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1534>
- Wang, T., Liu, J. H., Zhang, J., Wang, L., Chen, C., & Dai, P. G. (2015). A multiplex allele-specific real-time PCR assay for screening of ESR1 mutations in metastatic breast cancer. *Experimental and molecular pathology*, 98(2), 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.03.004>

- Wang, Y., Qiu, H., Minshull, J., Tam, W., Hu, X., Mieczkowski, C., Zheng, W., Chu, C., Liu, W., Boldog, F., Gustafsson, C., Gries, J., & Xu, W. (2022). An innovative platform to improve asymmetric bispecific antibody assembly, purity, and expression level in stable pool and cell line development. *Biochemical Engineering Journal*, 188, 108683. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108683>
- Weerakoon, K. G., Gordon, C. A., Cai, P., Gobert, G. N., Duke, M., Williams, G. M., & McManus, D. P. (2017). A novel duplex ddPCR assay for the diagnosis of schistosomiasis japonica: proof of concept in an experimental mouse model. *Parasitology*, 144(8), 1005–1015. <https://doi.org/10.1017/S003118201700021X>
- Weerakoon, K. G., Gordon, C. A., Gobert, G. N., Cai, P., & McManus, D. P. (2016). Optimisation of a droplet digital PCR assay for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection: A duplex approach with DNA binding dye chemistry. *Journal of microbiological methods*, 125, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.03.012>
- Weerakoon, K. G., Gordon, C. A., Williams, G. M., Cai, P., Gobert, G. N., Olveda, R. M., Ross, A. G., Olveda, D. U., & McManus, D. P. (2017). Droplet Digital PCR Diagnosis of Human Schistosomiasis: Parasite Cell-Free DNA Detection in Diverse Clinical Samples. *The Journal of infectious diseases*, 216(12), 1611–1622. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix521>
- Whale, A. S., Bushell, C. A., Grant, P. R., Cowen, S., Gutierrez-Aguirre, I., O'Sullivan, D. M., Žel, J., Milavec, M., Foy, C. A., Nastouli, E., Garson, J. A., & Huggett, J. F. (2016). Detection of Rare Drug Resistance Mutations by Digital PCR in a Human Influenza A Virus Model System and Clinical Samples. *Journal of clinical microbiology*, 54(2), 392–400. <https://doi.org/10.1128/JCM.02611-15>
- Whale, A. S., Devonshire, A. S., Karlin-Neumann, G., Regan, J., Javier, L., Cowen, S., Fernandez-Gonzalez, A., Jones, G. M., Redshaw, N., Beck, J., Berger, A. W., Combaret, V., Kjersgaard, N. D., Davis, L., Fina, F., Forshew, T., Andersen, R. F., Galbiati, S., Hernández, Á. G., . . . Huggett, J. F. (2016). International Interlaboratory Digital PCR Study Demonstrating High Reproducibility for the Measurement of a Rare Sequence Variant. *Analytical Chemistry*, 89(3), 1724–1733. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03980>
- Whale, A. S., Huggett, J. F., & Tzonev, S. (2016). Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomolecular Detection and Quantification*, 10, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.05.002>
- Whale, A. S., Huggett, J. F., Cowen, S., Speirs, V., Shaw, J., Ellison, S., Foy, C. A., & Scott, D. J. (2012). Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. *Nucleic Acids Research*, 40(11), e82. <https://doi.org/10.1093/nar/gks203>
- Whale, A. S., von der Heide, E. K., Kohlenberg, M., Brinckmann, A., Baedker, S., Karalay, O., Fernandez-Gonzalez, A., Busby, E. J., Bustin, S. A., Hauser, H., Missel, A.,

- O'Sullivan, D. M., Huggett, J. F., Pfaffl, M. W., & Nolan, T. (2022). Digital PCR can augment the interpretation of RT-qPCR Cq values for SARS-CoV-2 diagnostics. *Methods (San Diego, Calif.)*, 201, 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.08.006>
- White, R. A., Blainey, P. C., Fan, H. C., & Quake, S. R. (2009). Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing. *BMC Genomics*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-116>
- Wiktor, P., Brunner, A., Kahn, P., Qiu, J., Magee, M., Bian, X., Karthikeyan, K., & LaBaer, J. (2015). Microreactor Array Device. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep08736>
- Wilson, M., Glaser, K. C., Adams-Fish, D., Boley, M., Mayda, M., & Molestina, R. E. (2015). Development of droplet digital PCR for the detection of *Babesia microti* and *Babesia duncani*. *Experimental parasitology*, 149, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.12.003>
- Xu, G., Si, H., Jing, F., Sun, P., Zhao, D., & Wu, D. (2020). A Double-Deck Self-Digitization microfluidic chip for digital PCR. *Micromachines*, 11(12), 1025. <https://doi.org/10.3390/mi11121025>
- Xu, L., Liang, W., Yang, X., Wen, Y., Li, L., Yang, Z., ... & Fa, C. (2020). SARS-CoV-2 RNA reference materials. *Chin Sci Bull*, 65(22), 2363–2370.
- Xu, P., Zou, Y., Li, J., Huang, S., Gao, M., Kang, R., Xie, H., Wang, L., Yan, J., & Gao, Y. (2018). *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics*, 35(2), 224–227. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2018.02.017>
- Xu, X., & He, N. (2021). Application of adaptive pressure-driven microfluidic chip in thyroid function measurement. *Chinese Chemical Letters*, 32(5), 1747–1750. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2021.01.008>
- Yamamoto, M., Ushio, R., Watanabe, H., Tachibana, T., Tanaka, M., Yokose, T., Tsukiji, J., Nakajima, H., & Kaneko, T. (2018). Detection of *Mycobacterium tuberculosis*-derived DNA in circulating cell-free DNA from a patient with disseminated infection using digital PCR. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 66, 80–82. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.11.018>
- Yan, Z., Zhang, H., Wang, X., Gaňová, M., Lednický, T., Zhu, H., Liu, X., Korabečná, M., Chang, H., & Neužil, P. (2022). An image-to-answer algorithm for fully automated digital PCR image processing. *Lab on a Chip*, 22(7), 1333–1343. <https://doi.org/10.1039/d1lc01175h>
- Yang, R., Paparini, A., Monis, P., & Ryan, U. (2014). Comparison of next-generation droplet digital PCR (ddPCR) with quantitative PCR (qPCR) for enumeration of *Cryptosporidium* oocysts in faecal samples. *International journal for parasitology*, 44(14), 1105–1113. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.08.004>

- Yang, Y., Li, Z., Li, Q., Ma, K., Lin, Y., Feng, H., & Wang, T. (2022). Increase recombinant antibody yields through optimizing vector design and production process in CHO cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(13–16), 4963–4975. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12051-5>
- Yu, C. Y., Chan, K. G., Yean, C. Y., & Ang, G. Y. (2021). Nucleic Acid-Based Diagnostic Tests for the Detection SARS-CoV-2: An Update. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(1), 53. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11010053>
- Yu, C. Y., Chan, K. G., Yean, C. Y., & Ang, G. Y. (2021). Nucleic Acid-Based Diagnostic Tests for the Detection SARS-CoV-2: An Update. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(1), 53. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11010053>
- Yu, F., Yan, L., Wang, N., Yang, S., Wang, L., Tang, Y., Gao, G., Wang, S., Ma, C., Xie, R., Wang, F., Tan, C., Zhu, L., Guo, Y., & Zhang, F. (2020). Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(15), 793–798. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa345>
- Zahedi, A., Paparini, A., Jian, F., Robertson, I., & Ryan, U. (2015). Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. *International journal for parasitology. Parasites and wildlife*, 5(1), 88–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.12.001>
- Zaragoza, R., Ramírez, P., & López-Pueyo, M. J. (2014). Infección nosocomial en las unidades de cuidados intensivos [Nosocomial infections in intensive care units]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 32(5), 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.02.006>
- Zhang, H., Jenkins, G., Zou, Y., Zhu, Z., & Yang, C. J. (2012). Massively Parallel Single-Molecule and Single-Cell Emulsion Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Using Agarose Droplet Microfluidics. *Analytical Chemistry*, 84(8), 3599–3606. <https://doi.org/10.1021/ac2033084>
- Zhang, K., Lin, G., & Li, J. (2016). Quantitative nucleic acid amplification by digital PCR for clinical viral diagnostics. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 54(9), 1427–1433. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-1101>
- Zhang, S., Bartkowiak, L., Nabiswa, B., Mishra, P., Fann, J., Ouellette, D., Correia, I., Regier, D., & Liu, J. (2015). Identifying low-level sequence variants via next generation sequencing to aid stable CHO cell line screening. *Biotechnology Progress*, 31(4), 1077–1085. <https://doi.org/10.1002/btpr.2119>
- Zhang, T., Grenier, S., Nwachukwu, B., Wei, C., Lipton, J. H., & Kamel-Reid, S. (2007). Inter-Laboratory Comparison of Chronic Myeloid Leukemia Minimal Residual Disease Monitoring. *Journal of Molecular Diagnostics*, 9(4), 421–430. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2007.060134>

- Zhang, Z., Chen, J., Wang, J., Gao, Q., Ma, Z., Xu, S., Zhang, L., Cai, J., & Zhou, W. (2021). Reshaping cell line development and CMC strategy for fast responses to pandemic outbreak. *Biotechnology Progress*, 37(5). <https://doi.org/10.1002/btpr.3186>
- Zhao, Y., Xia, Q., Yin, Y., & Wang, Z. (2016). Comparison of Droplet Digital PCR and Quantitative PCR Assays for Quantitative Detection of *Xanthomonas citri* Subsp. *citri*. *PLoS ONE*, 11(7), e0159004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159004>
- Zheng, Y., Jin, J., Shao, Z., Liu, J., Zhang, R., Sun, R., & Hu, B. (2021). Development and clinical validation of a droplet digital PCR assay for detecting *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in patients with suspected bloodstream infections. *Microbiology Open*, 10(6), e1247. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1247>
- Zhong, Q., Bhattacharya, S., Kotsopoulos, S., Olson, J., Taly, V., Griffiths, A. D., Link, D. R., & Larson, J. W. (2011). Multiplex digital PCR: breaking the one target per color barrier of quantitative PCR. *Lab on a chip*, 11(13), 2167–2174. <https://doi.org/10.1039/c1lc20126c>
- Zhong, Q., Bhattacharya, S., Kotsopoulos, S., Olson, J., Taly, V., Griffiths, A. D., Link, D. R., & Larson, J. W. (2011). Multiplex digital PCR: breaking the one target per color barrier of quantitative PCR. *Lab on a Chip*, 11(13), 2167. <https://doi.org/10.1039/c1lc20126c>
- Zhou, F., Sun, S., Sun, X., Chen, Y., & Yang, X. (2021). Rapid and sensitive identification of pleural and peritoneal infections by droplet digital PCR. *Folia microbiologica*, 66(2), 213–219. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00834-0>
- Zhou, H., Liu, D., Ma, L., Ma, T., Xu, T., Ren, L., Li, L., & Xu, S. (2021). A SARS-CoV-2 Reference Standard Quantified by Multiple Digital PCR Platforms for Quality Assessment of Molecular Tests. *Analytical chemistry*, 93(2), 715–721. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03996>
- Zhou, J. B., Kong, W. H., Wang, S., Long, Y. B., Dong, L. H., He, Z. Y., & Liu, M. Q. (2021). Detection of SARS-CoV-2 RNA in Medical Wastewater in Wuhan During the COVID-19 Outbreak. *Virologica Sinica*, 36(5), 1077–1079. <https://doi.org/10.1007/s12250-021-00373-z>
- Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. D., Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., Zheng, X. S., ... Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zhou, W., Galizia, G., Goodman, S. N., Romans, K. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Choti, M. A., & Montgomery, E. A. (2001). Counting alleles reveals a connection between chromosome 18q loss and vascular invasion. *Nature Biotechnology*, 19(1), 78–81. <https://doi.org/10.1038/83572>

- Zhu, Q., Gao, Y., Yu, B., Ren, H., Qiu, L., Han, S., Jin, W., Jin, Q., & Mu, Y. (2012). Self-priming compartmentalization digital LAMP for point-of-care. *Lab on a Chip*, 12(22), 4755. <https://doi.org/10.1039/c2lc40774d>
- Ziegler, I., Cajander, S., Rasmussen, G., Ennefors, T., Mölling, P., & Strålin, K. (2019). High nuc DNA load in whole blood is associated with sepsis, mortality and immune dysregulation in *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Infectious diseases (London, England)*, 51(3), 216–226. <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1562205> (a)
- Ziegler, I., Lindström, S., Källgren, M., Strålin, K., & Mölling, P. (2019). 16S rDNA droplet digital PCR for monitoring bacterial DNAemia in bloodstream infections. *PloS one*, 14(11), e0224656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224656> (b)
- Zinchenko, A., Devenish, S. R. A., Kintses, B., Colin, P., Fischlechner, M., & Hollfelder, F. (2014). One in a Million: Flow Cytometric Sorting of Single Cell-Lysate Assays in Monodisperse Picolitre Double Emulsion Droplets for Directed Evolution. *Analytical Chemistry*, 86(5), 2526–2533. <https://doi.org/10.1021/ac403585p>
- Zonta, E., Garlan, F., Pécuchet, N., Perez-Toralla, K., Caen, O., Milbury, C., Didelot, A., Fabre, E., Blons, H., Laurent-Puig, P., & Taly, V. (2016). Multiplex detection of rare mutations by picoliter droplet based Digital PCR: sensitivity and specificity considerations. *PLoS ONE*, 11(7), e0159094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159094>

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.