

Diagnóstico molecular rápido em ambulatório

Rapid molecular diagnostics in the outpatient setting

Diagnostic moléculaire rapide en ambuloire

Yulia Smal

CEO Europe at Mirai Genomics

Resumo

A tecnologia em Ponto de Cuidado (POCT) revolucionou o diagnóstico clínico com testes mais rápidos e eficientes. O avanço do teste molecular em POCT (mPOCT) combina a agilidade do POCT com a precisão da biologia molecular, permitindo diagnósticos precisos e eficazes. A biologia molecular amplia o espectro de diagnósticos, abrangendo desde infecções respiratórias até doenças genéticas. Os testes de biologia molecular, como a PCR (Polymerase Chain Reaction), são essenciais para o diagnóstico rápido e sensível de doenças infecciosas. A evolução de PCR em POCT evidencia sua relevância para ambientes com acesso limitado a laboratórios mais complexos e equipados. Contudo, a eficácia do mPOCT ainda exige formação adequada e seleção criteriosa dos sistemas, visando a simplicidade, robustez e clareza na interpretação dos resultados. Além disso os patógenos comuns para países em desenvolvimento precisam de ter maior representação nos mPOCT. As tecnologias de diagnóstico mPOC buscam ser acessíveis, simples e portáteis.

Este artigo faz uma revisão breve de aspectos tecnológicos que aproximam cada vez mais o diagnóstico laboratorial de referência ao paciente. Começando pelas tecnologias tradicionais como PCR que em tempos revolucionou diagnóstico molecular permitindo a detecção e análise quantitativa em tempo real discutem-se agora as tecnologias que estão a mudar mPOCT moderno. Assim, a PCR digital oferece quantificação absoluta de genes-alvo. Inovações em primers e sondas otimizam a precisão do diagnóstico molecular. A eficácia e custo dos testes moleculares são influenciados pela escolha do detetor, com sensores eletroquímicos surgindo como opção promissora de baixo custo para ambientes com recursos limitados. Técnicas de amplificação isotérmica permitiram baixar as exigências energéticas e restrições de armazenamento de reagentes que são aspectos críticos de POCT. A nanotecnologia potencializa diagnósticos moleculares em relação à qualidade dos resultados e miniaturização. Sistemas microfluidicos compactam várias funções em dispositivos minúsculos permitindo a automação que por sua vez reduz significativamente os erros de utilizador nos testes. Microarrays detectam múltiplos ácidos nucleicos e anticorpos ao mesmo tempo permitindo painéis diagnósticos sintomáticos. Sequenciações de nova e terceira gerações têm

potencial completamente substituir todas as outras tecnologias de mPOCT no futuro e já são fundamentais para diagnósticos e rastreamento de epidemias.

Palavras-chave: Teste de diagnóstico, reação em cadeia da polimerase, sequenciação de aminoácidos, tecnologia em ponto de cuidados.

Abstract

Point-of-care technology (POCT) has revolutionised clinical diagnostics with faster and more convenient tests. The advancement of molecular testing in POCT (mPOCT) combines the agility of POCT with the precision of molecular biology, enabling accurate and effective diagnoses. Molecular biology broadens the spectrum of diagnoses, covering everything from respiratory infections to genetic diseases. Molecular biology tests, such as PCR, are essential for the rapid and sensitive diagnosis of infectious diseases. The evolution of PCR in POCT highlights its relevance for environments with limited access to equipped laboratories. However, the effectiveness of mPOCT still requires adequate training and careful selection of systems, aiming for simplicity, robustness and clarity in the interpretation of results. In addition, pathogens common to developing countries need to be better represented in mPOCTs.

Molecular POC diagnostic technologies aim to be accessible, simple and portable. This article briefly reviews the technological aspects that are bringing reference laboratory-level diagnostics ever closer to the patient. Starting with traditional technologies such as real-time PCR, which once revolutionised molecular diagnostics by enabling real-time detection and quantitative analysis, the technologies that are changing modern mPOCT are discussed. Digital PCR offers absolute quantification of target genes. Innovations in primers and probes optimise the precision of molecular diagnostics. The effectiveness and cost of molecular tests are influenced by the choice of detector, with electrochemical sensors emerging as a promising low-cost option for resource-limited environments. Isothermal amplification

techniques have made it possible to lower the energy requirements and reagent storage restrictions that are critical aspects of POCT. Nanotechnology enhances molecular diagnostics in terms of the quality of results and miniaturisation. Microfluidic systems compact various functions into tiny devices, enabling automation which in turn significantly reduces human errors during the test. Microarrays detect multiple nucleic acids and antibodies at the same time, enabling symptomatic diagnostic panels. Next- and third-generation sequencing have the potential to completely replace all other mPOCT technologies in the future and are already a cornerstone of mPOCT.

Keywords: Diagnostic test, polymerase chain reaction, amino acid sequencing, point-of-care technology.

Resumé

La technologie au point de service (POCT) a révolutionné les diagnostics cliniques grâce à des tests plus rapides et plus pratiques. Les progrès des tests moléculaires dans les POCT (mPOCT) associent la souplesse des POCT à la précision de la biologie moléculaire, ce qui permet des diagnostics précis et efficaces. La biologie moléculaire élargit le spectre des diagnostics, des infections respiratoires aux maladies génétiques. Les tests de biologie moléculaire, tels que la PCR, sont essentiels au diagnostic rapide et sensible des maladies infectieuses. L'évolution de la PCR dans le cadre du POCT met en évidence sa pertinence dans les environnements où l'accès aux laboratoires équipés est limité. Toutefois, l'efficacité du mPOCT nécessite encore une formation adéquate et une sélection minutieuse des systèmes, visant la simplicité, la robustesse et la clarté dans l'interprétation des résultats. En outre, les pathogènes communs aux pays en développement doivent être mieux représentés dans les mPOCT.

Les technologies de diagnostic mPOC se veulent accessibles, simples et portables. Cet article passe brièvement en revue les aspects technologiques qui rapprochent de plus en plus les diagnostics de laboratoire de référence du patient. En commençant par les technologies traditionnelles telles que la PCR en temps réel, qui a révolutionné le diagnostic moléculaire en permettant la détection en temps réel et l'analyse quantitative, les technologies qui modifient le mPOCT moderne sont examinées. La PCR numérique permet une quantification absolue des gènes cibles. Les innovations en matière d'amorces et de sondes optimisent la précision des diagnostics moléculaires. L'efficacité et le coût des tests moléculaires sont influencés par le choix du détecteur, les capteurs électrochimiques apparaissant comme une option prometteuse et peu coûteuse pour les environnements aux ressources limitées. Les techniques d'amplification isotherme ont permis de réduire les besoins en énergie et les

restrictions de stockage des réactifs, qui sont des aspects critiques du POCT. Les nanotechnologies améliorent les diagnostics moléculaires en termes de qualité des résultats et de miniaturisation. Les systèmes microfluidiques compactent diverses fonctions dans de minuscules dispositifs, ce qui permet une automatisation qui, à son tour, réduit considérablement les erreurs de test. Les puces à ADN détectent plusieurs acides nucléiques et anticorps en même temps, ce qui permet d'établir des panels de diagnostic symptomatique. Le séquençage de la prochaine et de la troisième génération pourrait remplacer complètement toutes les autres technologies mPOCT à l'avenir et constitue déjà une pierre angulaire du mPOCT.

Mots-clés: Test de diagnostic, réaction en chaîne de la polymérase, séquençage des acides aminés, point de soins.

Introdução: Tecnologia em Ponto de Cuidado

A tecnologia em Ponto de Cuidado (POCT) tem transformado o panorama do diagnóstico clínico, permitindo a realização de testes perto do paciente, em diversos contextos. Esta evolução tem sido possível graças ao desenvolvimento de uma ampla variedade de testes POCT para diferentes condições médicas, que proporcionam uma abordagem mais rápida, conveniente e eficiente no diagnóstico e monitorização de doenças [1, 2, 3].

Uma das características marcantes da POCT é a sua aplicação fora do ambiente de laboratório convencional, permitindo uma resposta direta à necessidade de resultados rápidos e simplificados. Esta tendência, aliada à minimização do tempo de manuseamento, permite a obtenção de resultados rápidos aquém de uma melhor gestão dos recursos humanos frequentemente limitados e não especializados em tecnologias laboratoriais [4, 5].

A simplicidade na utilização e na interpretação dos resultados é vital para a eficácia de POCT. A minimização de erros do usuário e a facilidade de interpretação dos resultados são fatores cruciais. A integração destes procedimentos tem facilitado a utilização de POCT em diversos locais. Estes incluem pontos hospitalares de diagnóstico descentralizados como urgências e cuidados intensivos, serviços ambulatoriais como clínicas

e hospitais de ambulatório, e cuidados específicos aos idosos em lares e ao domicílio. Além disso, POCT tem sido utilizado em áreas com acesso limitado ao sistema de saúde, farmácias para a seleção de medicamentos apropriados, escritórios e fábricas para controlar a propagação de infecções, e em medicina militar.

Apesar das suas inúmeras vantagens, é importante salientar que POCT não está isento de desafios. Em alguns casos, podem surgir questões relacionadas com a sensibilidade e especificidade dos testes, que podem ser variáveis quando comparadas aos testes laboratoriais mais complexos. Estas limitações sublinham a importância de um entendimento profundo da aplicabilidade e do contexto clínico dos testes em POC [1, 3].

POCT molecular

Os testes em microbiologia não são um conceito novo, estando presentes há anos com testes rápidos de antigénio para condições como vírus das vias respiratórias superiores e faringite estreptocócica. Contudo, o advento do teste molecular em POCT (mPOCT) tem levado esta área a novos patamares, conjugando a acessibilidade de POCT com a precisão da tecnologia molecular.

O diagnóstico de mPOCT pode acelerar a terapia definitiva, evitar tratamentos desnecessários e promover práticas eficientes de prevenção de infecções. Isso é particularmente relevante em áreas como o controlo de antibióticos, onde os diagnósticos precisos são essenciais para evitar tratamentos desnecessários e resistência [6]. Com mPOCT, essa capacidade é ainda mais robusta, pois combina a acessibilidade dos testes de POCT com a precisão das tecnologias moleculares [7].

Comparados aos seus equivalentes tradicionais de imunoensaio, os testes moleculares de POC oferecem vantagens notáveis. Sua sensibilidade melhorada [8] e valor preditivo significam menos falsos negativos. Por exemplo, para excluir definitivamente uma infecção por gripe ou antigénio estreptocócico [9], um resultado negativo geralmente requer um teste adicional em laboratório, seja ele molecular ou baseado em cultura. No entanto, um resultado de teste de mPOCT negativo é autossuficiente como regra, eliminando a necessidade de tratamento empírico enquanto os resultados de seguimento estão pendentes [10].

Desenvolvimento de Diagnóstico de PCR em Pontos de Cuidados

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido uma ferramenta inestimável no diagnóstico molecular desde a sua introdução em 1983 por Kary Mullis [11]. Caracterizada pela sua sensibilidade e especificidade superiores, a PCR tornou-se uma técnica dominante na deteção de uma vasta gama de patógenos e alterações genéticas. Inicialmente, a PCR exigia três etapas distintas: extração de DNA, amplificação e deteção. A extração envolvia a separação do DNA do resto do material celular, seguida pela amplificação através de ciclos de temperatura controlada e deteção por métodos como eletroforese em gel.

Desde o início do século com o avanço tecnológico e um entendimento crescente dos patógenos e defeitos genéticos ao nível do DNA e mRNA, a PCR evoluiu consideravelmente nas últimas décadas [12, 13]. As técnicas tornaram-se mais rápidas, mais sensíveis, e mais fiáveis. A cultura de células e tecidos, assim como a imunquímica, estão a ser progressivamente substituídas por técnicas moleculares.

Nos últimos 15 anos, a tendência tem sido automatizar e miniaturizar os procedimentos de PCR. A PCR, outrora vista unicamente como um método laboratorial manual, sofreu uma mudança de paradigma, com as aplicações de cuidados no ponto de atendimento a expandir constantemente. Enquanto as plataformas moleculares em laboratório são cada vez mais orientadas para diagnóstico em escala, os dispositivos de mPOC são concebidos para serem usados rapidamente e *ad hoc*. Isso confere uma flexibilidade que pode ser crucial em situações de emergência ou em ambientes de saúde onde o acesso ao laboratório é limitado.

O desenvolvimento de sistemas de uso único com cartuchos integrados em portadores de teste de plástico fechados, pré-embalados com reagentes prontos a usar, simplificou o processo sendo necessário apenas carregar as amostras e iniciar a execução da PCR. O processamento da amostra é desencadeado pela mistura com reagentes liofilizados, e a mistura de reagentes move-se através de canais de plástico moldados para câmaras de reação para amplificação de DNA e deteção de sinal. Com reagentes variáveis, os cartuchos podem ser adaptados para detetar diferentes patógenos. A auto-

matização tornou o processo mais eficiente, reduzindo o risco de contaminação e erros humanos [14].

A tendência para a miniaturização continua com dispositivos de bancada que agora se assemelham a pequenas máquinas de café, anunciando um futuro de dispositivos totalmente portáteis. No entanto, esta tendência nem sempre é vista positivamente no diagnóstico infeccioso. A miniaturização pode limitar a sensibilidade de detecção de patógenos devido à natureza heterogênea e inhomogênea dos materiais da amostra, como zaragatoas, aspirados ou tecidos de biópsia, um aspeto que deve ser sempre considerado no desenvolvimento de dispositivos de diagnóstico microbiológico [15].

O desenvolvimento da PCR em POCT oferece grandes promessas, especialmente em regiões onde o acesso a laboratórios bem equipados é limitado. Estes avanços permitem a realização de testes de diagnóstico rápidos e precisos em ambulatórios, hospitais e até mesmo em áreas remotas, contribuindo para a melhoria do tratamento de doenças tropicais e outras condições médicas [16]. No entanto, a implementação de mPOC não é isenta de desafios. Os profissionais devem ser treinados adequadamente para usar esses dispositivos, e a qualidade e a precisão devem ser mantidas [8, 13].

Critérios de seleção para sistemas POCT

Para melhorar significativamente os cuidados médicos, um sistema de diagnóstico POCT deve ser integrado de forma eficaz nos processos clínicos. O desafio principal está frequentemente associado à falta de formação específica dos profissionais para trabalhos laboratoriais. A falta de tempo e experiência em laboratório pode levar a erros operacionais ou de diagnóstico, como contaminação não intencional da amostra [8, 15]. A seleção cuidadosa dos sistemas de diagnóstico é essencial para proteger os pacientes e reduzir o stress e responsabilidade do pessoal clínico. É necessário que a tecnologia para cada etapa do processo (pré-análise, análise e pós-análise) seja relevante no contexto onde ocorrem os testes (Figura 1) [3, 17]. A complexidade técnica, o tempo de manipulação e a velocidade do teste são fatores críticos. Nas rotinas agitadas ou com o pessoal com treinos limitados, só são viáveis tecnologias simples e robustas. As melhores soluções são sistemas totalmente automatizados, onde a entrada manual é reduzida ao carregamento da amostra e início da reação. A interpretação dos resultados deve ser clara e direta, sem necessidade de uma interpretação complementar, e o resultado de uma análise PCR não efetuada num laboratório central deve ser transferido automaticamente para o sistema de informação do laboratório caso seja possível.

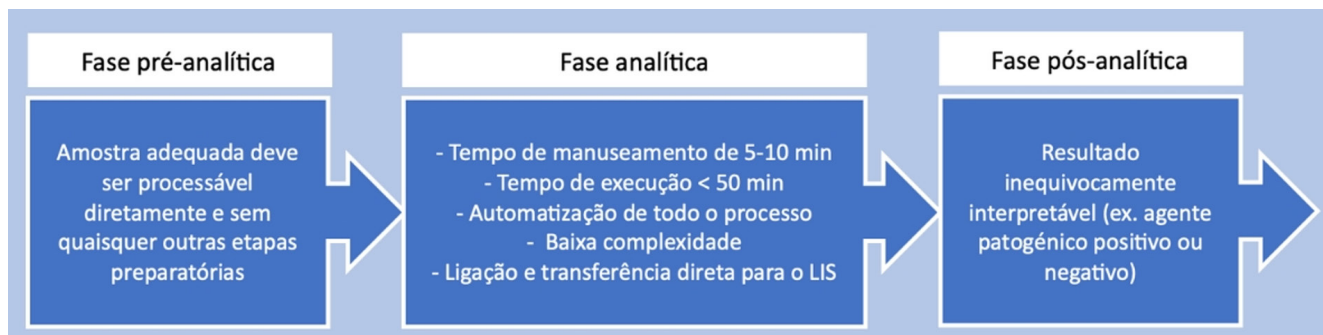


Figura 1: Critérios de seleção para equipamento diagnóstico POC [3]

Doenças infecciosas representam o maior grupo de testes mPOCT

Os testes de biologia molecular tornaram-se essenciais no diagnóstico de doenças infecciosas. A popularidade da PCR advém da sua rapidez e sensibilidade, permitindo a rápida determinação da etiologia de uma infeção, em contraste com as 36-48 horas normalmente necessárias para os diagnósticos microbiológicos clássicos. Tais atrasos podem ser fatais, levando a uma preferên-

cia por terapia antibiótica empírica, muitas vezes sem a confirmação do patógeno causador ou da sua resistência antimicrobiana, resultando em consequências indesejadas como o desenvolvimento de resistência [18]. Métodos de deteção direta de patógenos como a PCR e a imunocromatografia (ensaios de fluxo lateral ou tiras de teste) tornaram-se proeminentes. Enquanto a imunocromatografia oferece facilidade de uso, rapidez e custo moderado, a sua capacidade de desempenho é apenas moderada e depende de respostas de anticorpos

específicos ou de anticorpos disponíveis para organismos-alvo. Em situações em que a densidade de patógenos é provavelmente baixa, a maior sensibilidade da PCR torna-a uma escolha preferível [18].

Para além da sua função primária na detecção de patogénicos, a PCR pode também ser usada para análise simultânea de determinantes de resistência ou fatores de virulência, o que é cada vez mais crítico para isolar rapidamente os pacientes afetados por patógenos resistentes a múltiplas drogas na primeira oportunidade possível. Ensaio ligado que incorpora tecnologia multiplex permitem o processamento de questões mais complexas num único ciclo de PCR (por exemplo, detecção de: *S. aureus* mais detecção de resistência à metilina (mecA); dois determinantes (vanA e vanB) de resistência à vancomicina em enterococos; toxina B de *Clostridium difficile*, abrangendo também toxinas binárias e a deleção *tcdC* para detetar variantes altamente virulentas; *Mycobacterium tuberculosis* incluindo a resistência à rifampicina (*rpo*) para detetar estirpes de tuberculose multirresistentes; detecção simultânea de influenza A, A/H1N1 e influenza B). Existem sistemas que se baseiam na amplificação isotérmica para detetar os vírus influenza A/B e estreptococos do grupo A, apresentam sensibilidade e especificidade significativamente superiores em comparação com o método de detecção de antígeno, com resultados correspondentemente mais fiáveis [19, 20, 21].

Os recentes ensaios de novos sistemas estão a definir uma tendência clara para a amplificação de múltiplos patogénicos num único ensaio (PCR multiplex). A grande vantagem é o diagnóstico etiológico rápido e sensível de sintomas que podem ser causados por vários patogénicos, como a tosse ou diarreia. Existem sistemas de teste para “diagnóstico sindrómico”, permitindo a detecção de numerosos patogénicos responsáveis por várias infeções, juntamente com a detecção simultânea de marcadores de resistência [22, 23]. No entanto, esta detecção paralela exige uma maior interpretação dos resultados, sendo por agora mais adequada para uso laboratorial.

Os sistemas mais simples, apropriados para uso próximo ao paciente, ainda são dominados por ensaios PCR para patogénicos únicos ou duas variantes por exemplo, influenza A e B ou vancomicina-resistente vanA e vanB com genes Enterococci); tais abordagens duplex PCR podem ser vantajosas. Ligando os ensaios atuais às

especialidades médicas, nota-se que o campo da biologia molecular abriu novas áreas de aplicação, incluindo além das infeções sexualmente transmissíveis e respiratórias, diagnósticos de infeção (detecção de hepatite B e C) e aplicações promissoras fora da microbiologia [24].

Testes realizados no ponto de tratamento são frequentemente usados para avaliar parâmetros de saúde como glicose no sangue, lípidos, química clínica, química da urina, contagem de sangue, coagulação, marcadores cardíacos, e antígenos cancerígenos ou biomarcadores de proteínas [3]. Diagnósticos moleculares não são apropriados para medir estes parâmetros fenotípicos, dada a falta de um analito de ácido nucleico direto estabelecido. No entanto há um foco crescente em doenças com etiologia genómica. As especialidades que atualmente beneficiam dos produtos de nova geração incluem oncologia (transcrição de BCR-ABL), centros de coagulação (fator II e mutação do fator IV) e cardiologia (citocromo P450 2C19). O último ensaio mencionado combina PCR e hibridização em microarray para uso no ponto de cuidados e pode detetar uma variante do alelo do citocromo P450 2C19 (que normalmente determina resposta do paciente ao tratamento com clopidogrel [25] em 60 minutos. Testes moleculares POC para doenças não infecciosas ainda são raros, mas estão em rápido desenvolvimento.

As mPOCT são limitadas em comparação com os diagnósticos feitos em laboratório e focam em doenças urgentes, como Ebola e Zika, e marcadores de resistência, como a resistência à rifampicina na tuberculose. As infeções comumente testadas incluem Influenza A & B, Vírus Sincicial Respiratório (RSV), Estreptococos do Grupo A/B, Clamídia, Gonorréia, HPV, *Clostridium difficile*, Tuberculose, *Staphylococcus aureus* Resistente à Metilina (MRSA), HIV-1/2, Hepatite B/C, Malária, *Trichomonas*, Sífilis, *Helicobacter pylori*, Mononucleose, Dengue, Vírus Herpes Simples 1&2 (HSV 1&2), *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Candida* (relacionada à septicemia), doença de Lyme, e outros organismos entéricos e respiratórios.

Alguns patógenos com alta prevalência em países em desenvolvimento não são tão bem representados por mPOC, exigindo mais investigação e desenvolvimento para expandir a sua aplicação nessas regiões [17, 26]. Algumas das aplicações mais notáveis para países em desenvolvimento são:

- **HIV:** O diagnóstico rápido de HIV através do mPOC

tem sido fundamental na luta contra a epidemia global [26].

- **Malária:** Testes rápidos para detecção da malária permitem um tratamento imediato e adequado [27, 28].

- **Tuberculose:** mPOC tem sido utilizado para detecção rápida e tratamento da tuberculose, uma doença que continua a ser um grande desafio global [29].

- **Dengue e outras doenças tropicais:** Essas ferramentas podem facilitar o controle e a contenção de surtos de doenças tropicais em áreas endêmicas [30].

Aspetos tecnológicos

Para serem eficazes, as tecnologias de diagnóstico POC devem ser descartáveis, economicamente viáveis, simples de utilizar e portáteis. Devem estar aptas a analisar pequenos volumes de fluidos corporais, como sangue, saliva e urina. O custo é um elemento crucial nas aplicações de saúde global, e devem ser tomadas medidas para minimizar os gastos, utilizando o mínimo de reagentes dispendiosos, optando por métodos de fabrico económicos para produção em massa e garantindo o controlo de qualidade. A miniaturização é fundamental para o desenvolvimento de dispositivos de diagnóstico POC portáteis. Adicionalmente, ao considerar o uso clínico de dispositivos de diagnóstico médico, é imprescindível levar em conta as condições ambientais de locais com recursos limitados, como a falta de água, eletricidade inconstante, temperaturas elevadas e humidade.

PCR em tempo real ou qPCR

A PCR em tempo real, ou qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction), tornou-se uma tecnologia central na era moderna do diagnóstico molecular, substituindo a PCR convencional em muitos testes clínicos [31]. Esta tecnologia permite monitorizar os resultados durante a reacção de amplificação, o que determina rapidamente a positividade e fornece adicionalmente resultados quantitativos através do número de ciclos térmicos completados [32]. A análise da curva de fusão, uma característica exclusiva da qPCR, utiliza diferenças nos polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) do produto qPCR para diferenciar produtos qPCR específicos (alvo) e não específicos [33]. Esta técnica permite resultados quantitativos mais precisos através da exclusão de produtos não específicos, aumentando a precisão e especificidade da qPCR em várias aplicações clínicas [34]. Ao mesmo tempo, a PCR em tempo real também demonstrou a viabilidade de testes moleculares descen-

tralizados, estando bem representada em plataformas de diagnóstico mPOC [17]. A descentralização do diagnóstico molecular permite uma resposta mais rápida no diagnóstico e tratamento de infeções e outras condições médicas.

A qPCR, portanto, representa uma inovação significativa na tecnologia de PCR, oferecendo detecção em tempo real, análise quantitativa, e capacidade de diferenciar produtos específicos e não específicos, abrindo novas possibilidades no diagnóstico rápido e preciso de várias condições médicas.

PCR digital ou dPCR

A dPCR realiza quantificação absoluta de genes alvo em amostras ao dividir a reacção de amplificação em milhares de secções independentes usando microplacas, capilares, emulsões de óleo ou microarrays. A amplificação dividida reduz a competição entre modelos, aumentando a sensibilidade da reacção, o que permite à dPCR detetar baixos níveis de patógenos, mutações menores e alvos de alelos raros [35, 36]. Está, por isso, apta a quantificar vírus com diversidade de sequência e amostras com baixo conteúdo de microrganismos, como BK polyomavirus, HRV e HIV. Estudos mostraram que a dPCR pode monitorizar com precisão a carga viral do HRV com diversidade de sequência [37] e reservatórios latentes de HIV [38], além de quantificar pequenas quantidades de HPV [39] e MTB em amostras de sangue dos pacientes pediátricos assintomáticos [40]. Além disso, pode quantificar mutações menores em DNA e detetar <0.1% de variantes raras em contextos virais selvagens, algo desafiador para outras técnicas de diagnóstico molecular [41]. Comparativamente à qPCR, a dPCR permite quantificação absoluta sem depender de uma curva de padrão. No entanto, a sua quantificação precisa depende da definição correta do limiar para distinguir gotículas positivas e negativas, e vários fatores influenciam essa discriminação. Além disso, os instrumentos e reagentes da tecnologia dPCR são caros, aumentando os custos de diagnóstico, e o sistema de preparação de gotículas tem maior risco de contaminação, levando a potenciais falsos-positivos [42].

Primers e Sondas

O avanço nas tecnologias de conceção de primers e sondas tem desempenhado um papel fundamental no desenvolvimento e aperfeiçoamento dos métodos de

PCR, permitindo um diagnóstico molecular mais preciso e versátil [43].

As inovações podem ser classificadas como incrementais ou fundamentais ou disruptivas. As mudanças incrementais na concepção de primers são frequentemente necessárias para manter a especificidade e sensibilidade dos testes contra alvos patogênicos sujeitos a mutação, como a detecção de novos traços de resistência antimicrobiana e a identificação de estirpes emergentes [44]. Alterações disruptivas na concepção ou mistura de primers dentro de um teste têm o objetivo de melhorar a especificidade dos produtos de amplificação ou amplicons [45].

Diferentes técnicas de amplificação podem exigir uma variedade de primers. Por exemplo, são necessários quatro a seis iniciadores para a amplificação isotérmica por LAMP discutido afrente, em comparação com apenas dois para a PCR convencional [46]. Primers adicionais também são utilizados em técnicas especializadas como a PCR aninhada, que normalmente envolve duas reações de amplificação sequenciais com pares de primers diferentes.

A inovação também se estende às sondas, como a sonda TaqMan, uma sonda de hidrólise cujo sinal de fluores-

cência é derivado da degradação [47]. Embora possa ser afetada pelas impurezas de uma amostra, aumentando o sinal de fundo, tecnologias alternativas como a sonda Eprobe superam esse desafio devido a um mecanismo de quenching diferente [48, 49].

Deteção do sinal

A qualidade e o custo de uma plataforma molecular é influenciado pelo tipo de detetor utilizado (Tabela 1). Os mais comuns são os dispositivos com sensores ópticos acoplados por carga (CCD) e os chips CMOS, sendo estes últimos geralmente menos dispendiosos. No entanto, para descentralizar os testes moleculares em ambientes com restrições de custo, é essencial reduzir os gastos com hardware. Fotodíodos, que são mais econômicos do que chips CCD ou CMOS, permitem detectar a emissão de luz, sendo ideais para resultados qualitativos simples. Uma alternativa promissora de baixo custo são os sensores electroquímicos, que detetam alterações na voltagem devido à reação química, podendo revolucionar os testes em ambientes com recursos limitados. Embora as tecnologias de biossensores sejam muito promissoras, apresentam muitos desafios para passar do laboratório para a sua utilização como POCT a larga escala [50].

Tabela 1: Comparação dos detetores do sinal

	Princípio operacional	Sensitividade/ especificidade	Limitações	Custo
Sensores óticos	Deteção de fluorescência emitida durante o processo de PCR	Altamente sensível e específico, discrimina diferentes sequências ácidos nucleicos	Sensível à contaminação e requer preparação rigorosa da amostra	Alto
Fotodíodos	Geração de uma corrente elétrica quando exposto à luz	Menos específico e seletivo. Mais adequado para resultados qualitativos	Não é adequado para aplicações requerentes alta especificidade ou deteção residual de sinal emitido	Relativamente barato
Sensores electroquímicos	Medição de corrente ou voltagem elétrica de elétrons livres doados por reações químicas	Pode oferecer alta sensibilidade e especificidade	Interferência com outras espécies eletroativas, exigências de calibração e sensibilidade a fatores ambientais	Custo depende do design, dos materiais e do alvo. Tem potencial de baixo custo

Amplificação isotérmica

Para além da PCR convencional, várias técnicas alternativas de amplificação de ácido nucleico estão agora no mercado [13, 51, 52]. Historicamente, esses processos foram desenvolvidos para contornar a proteção de patente PCR. Entre os métodos isotérmicos, o LAMP (Amplificação Isotérmica Mediada por Loop) é talvez o mais conhecido, embora não seja necessariamente o mais sensível [46]. Atualmente, estão em uso comercial LAMP, NEAR, DAS, HDA, NASBA, TMA, StartAmp PCR entre outros [53, 54]. Alguns métodos até permitem a realização de genotipagem [55]. A amplificação isotérmica dispensa a necessidade de ciclos repetidos de desnaturação e resfriamento enzimáticos, processos típicos da PCR convencional, realizando-se numa temperatura constante que é ideal para a atividade enzimática. Esta simplificação é possível graças à utilização de enzimas especializadas, desenvolvidas especificamente para atuar em uma temperatura constante [56]. O processo torna-se significativamente mais curto (menos de 40 minutos) e a instrumentação é mais simples. Uma vez que só visa atingir uma temperatura constante os blocos térmicos são menos exigentes resultando num preço mais baixo e menor consumo de energia bem como pode ser incorporado mais facilmente em componentes miniaturizados e dispositivos microfluídicos.

Em comparação com a PCR, as reações isotérmicas perdem alguma especificidade nos eventos de hibridização, mas isso é compensado através da otimização de condições e da adição de diferentes componentes enzimáticos e bioquímicos, uma modificação que se provou satisfatória numa vasta gama de aplicações [52]. Durante a pandemia de Sars-Cov-2 várias configurações de POCT PCR isotérmicas deram um salto no desenvolvimento chegando ao mercado de diagnóstico.

As tecnologias moleculares rápidas baseados em amplificação isotérmica estão a ser cada vez mais utilizados para o diagnóstico de infecções virais tropicais e na virologia veterinária. Fornecidos como equipamentos portáteis, oferecem uma vantagem em áreas com pouca infraestrutura e podem fornecer resultados fiáveis [57, 58, 59, 60, 61]. Atualmente, a falta de clareza existente sobre quais são os testes moleculares mais viáveis medicamente e economicamente para que tipo de pacientes requer uma avaliação científica adicional.

Nanotecnologia

A nanotecnologia está a tornar-se rapidamente uma ferramenta poderosa no campo do diagnóstico molecular. Utilizando as propriedades exclusivas de materiais em escala nano, os cientistas são capazes de criar sistemas de deteção sensíveis e específicos para uma variedade de aplicações clínicas.

O nanodiagnóstico é um campo emergente que utiliza propriedades nanoescópicas para manipular e analisar monomoléculas. Com as suas características físico-químicas e ópticas únicas tais como deteção rápida, maior sensibilidade [62]. As nanopartículas, devido à sua elevada relação superfície/volume, permitem a ligação densa de moléculas e a criação de múltiplos sítios de ligação para biomarcadores. Isso resulta em um efeito multivalente, aumentando a sensibilidade e especificidade de ensaios para detetar biomarcadores de doenças e outros alvos moleculares [63].

Partículas nanométricas de ouro e prata são as nanopartículas metálicas mais utilizadas em diagnósticos. Elas exibem uma forte absorção quando excitadas com radiação eletromagnética, e as suas químicas superficiais podem ser modificadas através da enxertia ou conjugação com várias sondas, como anticorpos e ácidos nucleicos [64, 65].

A técnica mais frequentemente utilizada para testes de diagnóstico rápido é o imuno-ensaio de fluxo lateral, devido ao seu baixo custo, facilidade de utilização, e acessibilidade [66].

Han et al., aplicando a nanotecnologia, desenvolveram um teste rápido para detetar a proteína S1 de SARS-CoV-2 com 100% de sensibilidade e 99,5% de especificidade. A aplicação dos métodos nanotecnológicos proporcionou uma deteção a olho nu e por fluorescência. A função colorimétrica permite o diagnóstico no local, enquanto a função de fluorescência pode quantificar o vírus para doentes críticos, com limites de deteção extremamente baixos para a proteína S1.

Sistemas microfluídicos

Um sistema/dispositivo microfluídico é caracterizado como um sistema de fluxo de fluido portátil, pequeno, não-turbulento e altamente organizado, composto por um conjunto de microcanais moldados ou enca-

vados num material [67, 68]. Analogamente aos circuitos elétricos, estes microcanais podem ser projetados para executar tarefas complexas. Os microcanais que compõem o chip microfluídico estão interligados para concretizar um conjunto de características desejadas; por exemplo, os canais podem ser organizados de forma a que o sistema microfluídico realize pré-tratamento de amostras, separação, diluição, mistura, reação química, detecção e extração de produtos [68] permitindo a análise rápida de múltiplos alvos em paralelo, ou multiplexagem [69]. Dispositivos microfluídicos que integram uma ou várias destas funções laboratoriais num único circuito são designados como dispositivos laboratório num chip (lab-on-a-chip) [70]. Considerando a variedade de aplicações possíveis, os sistemas microfluídicos podem ser vistos como uma alternativa promissora aos sistemas macroescala presentes em laboratórios típicos de biosciência e biomédica. Os chips de diagnóstico microfluídico possuem características únicas que os tornam apropriados para aplicações no ponto de atendimento, incluindo modularidade, portabilidade, baixo consumo de reagentes e amostras, e alta sensibilidade [71].

Além disso, os dispositivos microfluídicos têm sido combinados com outras tecnologias emergentes, como a nanotecnologia, para criar sistemas ainda mais avançados e sensíveis [72].

Em resumo, os sistemas microfluídicos apresentam o potencial para transformar a forma como os diagnósticos moleculares são realizados, oferecendo análises mais rápidas, mais eficientes e acessíveis, particularmente em cenários de POCT.

Automatização

A automação nos testes diagnósticos tem testemunhado um avanço sem precedentes graças às inovações em tecnologias discutidas neste artigo. Uma das maiores realizações nesta área é a capacidade de realizar testes de origem nucleica de maneira totalmente automatizada.

Cartuchos de teste descartáveis e sistemas microfluídicos têm sido fundamentais na miniaturização e integração dos processos de teste [74]. A automatização abrange todo o processo de teste de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT), incluindo a preparação/extração de amostra, amplificação, e detecção, todos conduzidos sem intervenção do utilizador. Essa abordagem não apenas

reduz o potencial de erro humano, mas também acelera o processo de teste.

Os sistemas de microflúidos dos cartuchos são a base dos POC PCR atuais. Eles controlam o fluxo de reagentes e amostras através de canais minúsculos, conduzindo-os através de etapas sucessivas de preparação, amplificação, e detecção de ácido nucleico. A gestão automatizada desses procedimentos de teste utiliza uma combinação de tecnologias. Microcircuitos podem inicializar os sensores e iniciar processos mecânicos. Bombas, válvulas, e outros componentes de deslocamento, como pinças, podem ser precisamente controlados para manipular fluidos em escalas diminutas com alta precisão [75].

Microarrays

Microarrays são constituídos por uma matriz bidimensional de biomoléculas impressas ou sintetizadas em vidro, silicone, plástico ou membrana de nylon. Eles são capazes de detetar ácidos nucleicos e anticorpos, que se ligam à biomolécula imobilizada, podendo ser, por exemplo, um oligonucleótido ou uma proteína. Essa tecnologia, que permite a detecção de múltiplos alvos amplificados, potencialmente milhares, é frequentemente utilizada em um microarray com a adição de corantes e marcadores [76]. Em aplicações para doenças infecciosas, os microarrays estão organizados tipicamente em painéis síndromicos ou testes multiplex para grupos de alvos de doenças infecciosas com sintomas comuns [77]. Uma reação positiva pode ser identificada com scanners avançados através do uso de etiquetagem alvo com sondas fluorescentes ou anticorpos. Já foram propostas e introduzidas várias aplicações, incluindo a detecção de *M. tuberculosis* resistente à rifampicina e isoniazida [77], a detecção de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina [78] e a detecção de herpesvírus a partir de CSF [80]. No entanto os desenvolvimentos mais recentes estão focados na diagnóstico genéticos pré-natal e em oncologia.

A VereChip é um bom exemplo de um chip comercializado. Veredus pode produzir chips personalizados que utilizam ensaios desenhados pelo cliente. No entanto, o tempo de resposta de duas horas para os resultados e o elevado custo dos testes (\$100 para MTB em países desenvolvidos) impedem que a Verechip se torne uma verdadeira solução POC. Essas limitações sublinham os desafios na aplicação prática dos mi-

croarrays, apesar de suas capacidades únicas e avançadas de detecção. Antevê-se que tanto os microarrays de DNA como os sorológicos terão um papel relevante nas futuras tecnologias aplicadas em laboratórios de microbiologia clínica.

Sequenciação de próximas gerações

A sequenciação genética, que abrange a primeira, segunda e terceira geração de sequenciação (TGS), é crucial para identificar patógenos infecciosos, distinguindo tanto os conhecidos quanto os desconhecidos. A sequenciação de Sanger, representando a primeira geração, é adequada para sequenciação direcionada de pequena escala em locais específicos. Contudo, com avanços na tecnologia de sequenciação após o Projeto Genoma Humano, surgiram as técnicas de sequenciação de nova geração (NGS) e TGS de alto rendimento e custo-benefício [81].

NGS pode ler bilhões de sequências de nucleotídeos sem necessidade de cultura celular e identifica todo o DNA. É benéfica para detecção de patógenos quando testes tradicionais não conseguem determinar a causa. Estudos demonstram a capacidade da NGS de detectar múltiplos patógenos simultaneamente com maior precisão [82]. A NGS oferece não apenas identificação de patógenos, mas também insights sobre resistência a medicamentos, genes de virulência e a resposta imunológica do hospedeiro [81]. Além disso, pode identificar patógenos raros de amostras diversas que testes padrão não detetam como *Chlamydia psittaci* no líquido de lavagem broncoalveolar [83], *Naegleria flexneri* e *Brucella* no líquido cefalorraquidiano [84], e os vírus Chikungunya e caxumba no sangue [85]. Esta sequenciação é fundamental para rastrear epidemias, entender a evolução do patógeno e responder rapidamente a doenças infecciosas. No entanto, existem desafios, como a necessidade de ácidos nucleicos de alta qualidade, a necessidade de amplificação PCR, leitura de sequência curta e a complexidade da interpretação dos dados [86, 87, 88].

A sequenciação clínica já está consolidada em áreas como testes pré-natais, testes oncológicos, farmacogenética e doenças infecciosas (testes de resistência a medicamentos). Contudo, a dimensão e complexidade de muitos sistemas NGS atualmente disponíveis ainda não permitem aplicações descentralizadas e no ponto de atendimento. Muitos fornecedores de NGS têm começado a direcionar o desenvolvimento de produtos, quase exclusivamente, de aplicações de pesquisa para aplicações clínicas, mas a comercialização de plataformas NGS para sequenciação clínica no ponto de atendimento ainda é um desenvolvimento distante apesar de muito promissor e por isso merece um pouco de mais atenção.

TGS foi introduzida em 2015 pela Oxford Nanopore Technologies, a TGS usa mudanças na corrente elétrica para sequenciar DNA ou RNA à medida que passam por um nanoporo [89]. Oferece sequenciação rápida de alto rendimento com leituras ultra-longas sem necessidade de etiquetagem, simplificando o processo e reduzindo os custos [90]. Ao contrário da NGS, a TGS pode sequenciar RNA diretamente, encurtando o tempo de detecção. Além disso, detecta espécies patogênicas que a NGS pode não identificar devido ao seu comprimento de leitura melhorado [91]. Dispositivos portáteis de TGS têm sido usados para análise em tempo real de vários vírus, adequados para monitoramento em situações com recursos limitados [92]. Apesar de sua promessa, a alta taxa de erro da TGS ainda é um desafio, mas com refinamentos contínuos, ela tem tudo para se destacar na detecção de patógenos conhecidos e elusivos [93].

Conflitos de interesse

A autora Yulia Smal é atualmente CEO do mercado Europeu da Mirai Genomics. Esta afiliação não influenciou a objetividade ou integridade deste artigo. A autora declara não haver conflitos de interesse relevantes relacionados com esta afiliação institucional.

Bibliografia

- [1] Kost G.J. Goals, guidelines, and principles for point-of-care testing. Em: Kost G.J editor. Principles and practice of point-of-care testing. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 2002, pp 3–12
- [2] Price CP. Point of care testing. BMJ. 2001;322(7297):1285-8.
- [3] Luppa PB, Junker R. Point-of-Care Testing. Principles and Clinical Applications. Springer. 2018

- [4] St John A, Price CP. Existing and Emerging Technologies for Point-of-Care Testing. Clin Biochem Ver. 2014;35(3):155-67.
- [5] World Bank. World development report: making services work for poor people. New York (NY): World Bank. 2004.
- [6] Lipsitch M., e Siber, G. R. How Can Vaccines Contribute to Solving the Antimicrobial Resistance Problem? Mbio. 2016;7(3):e00428-16.

- [7] Maurin M. Point-of-care molecular tests for infectious diseases. *Clin Chim Acta*. 2019; 493:138-47.
- [8] Pariyo GW, Gouws E, Bryce J, Burnham G. Improving Facility-Based Care for Sick Children in Uganda: Training Is Not Enough. *Health Policy and Plan*. 2005;20 (suppl 1):i58-i68.
- [9] Weber NC, Klepser ME, Akers JM, Klepser DG, Adams AJ. Use of CLIA-waived point-of-care tests for infectious diseases in community pharmacies in the United States. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(2):253-64
- [10] Pollock, N. R., et al. Correlation of SARS-CoV-2 nucleic acid test and rapid antigen test cycle threshold values. medRxiv 2020.11.10.20227371 [Preprint]. 2020 [cited 2023 Jul 13]. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.11.10.20227371v1>
- [11] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullins KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-91.
- [12] Lee D, Chen P-J, Lee G-B. The evolution of real-time PCR machines to real-time PCR chips. *Biosens Bioelectron*. 2010;25(7):1820-4.
- [13] Niemz A, Ferguson T M, Boyle D S. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends in Biotechnology*. 2011;29(5):240-50.
- [14] Mark D, Haerberle S, Roth G, von Stetten F, Zengerle R. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chem Soc Rev*. 2010;9(3): 1152-82.
- [15] Reischl U, Drosten C, Geißdörfer W, Göbel U, Hoffmann KS, Mauch H, Meyer T, Moter A, von Müller L, Panning M et al. MiQ 1: Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT), 3rd Edition, Em: Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards (MiQ) Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. Urban & Fischer, Munich; 2011. p. 1–80
- [16] Yager P, Edwards T, Fu E, Helton K, Nelson K, Tam M R, Weigl B H. Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature*. 2006;442(7101):412-8.
- [17] Drain P K, Hyle E P, Noubary F, Freedberg K A, Wilson D, Bishai W R, Rodriguez W, Bassett IV. Diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings. *The Lancet Infect Dis*. 2014;14(3):239-49.
- [18] Stürenburg E, Junker R. Patientennahe Diagnostik in der Mikrobiologie. *Dtsch Arzteblatt*. 2009;106:48–54
- [19] Bosevska G, Panovski N, Janceska E, Mikik V, Topuzovska IK, Milenkovic Z. Comparison of Directigen Flu A+B with Real Time PCR in the Diagnosis of Influenza. *Folia Med (Plovdiv)*. 2015;57(2):104–10
- [20] Jokela P, Vuorinen T, Waris M, Manninen R. Performance of the Alere i influenza A&B assay and mariPOC test for the rapid detection of influenza A and B viruses. *J Clin Virol*. 2015;70:72–6
- [21] Nguyen Van JC, Caméléna F, Dahoun M, Pilmis B, Mizrahi A, Lourtet J, Behilil S, Enouf V, Le Monnier A. Prospective evaluation of the Alere i Influenza A&B nucleic acid amplification versus Xpert Flu/RSV. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;85(1):19–22
- [22] Spina A, Kerr KG, Cormican M, Barbut F, Eigentler A, Zerva L, Tassios P, Popescu GA, Rafila A, Eerola E, Batista J, Maass M, Aschbacher R, Olsen KE, Allerberger F. Spectrum of enteropathogens detected by the Film-Array GI Panel in a multicentre study of community-acquired gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(8):719–28
- [23] Babady NE. The FilmArray respiratory panel: an automated, broadly multiplexed molecular test for the rapid and accurate detection of respiratory pathogens. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013;13(8):779–88
- [24] Stimpfle F, Karathanos A, Droppa M, Metzger J, Rath D, Müller K, Tavlaki E, Schäffeler E, Winter S, Schwab M, Gawaz M, Geisler T. Impact of point-of-care testing for CYP2C19 on platelet inhibition in patients with acute coronary syndrome and early dual antiplatelet therapy in the emergency setting. *Thromb Res*. 2014;134(1):105–10
- [25] Shahin M H A, Johnson J A. Clopidogrel and warfarin pharmacogenetic tests: what is the evidence for use in clinical practice?. *Curr Opin Cardiol*. 2013;28(3):305-14
- [26] Pai N P, Vadnais C, Denking C, Engel N, Pai M. Point-of-care testing for infectious diseases: Diversity, complexity, and barriers in low- and middle-income countries. *PLOS Medicine*. 2012;9(9):e1001306.
- [27] Rao V B, Schellenberg D, Ghani A C. Overcoming Health Systems Barriers to Successful Malaria Treatment. *Trends Parasitol*. 2013;29(4):164-80.
- [28] Maltha J, Gillet P, Jacobs J. Malaria rapid diagnostic tests in endemic settings. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(5):399-407.
- [29] Steingart K R, Schiller I, Horne D J, Pai M, Boehme C C, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;2014(1):CD009593.
- [30] Blacksell S D, Paris D H, Chierakul W, Wuthiekanun V, Teeratakull A, Kantipong P, Day N P J. Prospective evaluation of commercial antibody-based rapid tests in combination with a loop-mediated isothermal amplification PCR assay for detection of *Orientia tsutsugamushi* during the acute phase of scrub typhus infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19(3):391-5.
- [31] Bustin S A, Benes V, Nolan T, Pfaffl M W. Quantitative real-time PCR – a perspective. *J Mol Endocrinol*. 2005;34(3):597-601.
- [32] Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumula A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*. 2005;6(4):279-84.
- [33] Wittwer C T, Reed G H, Gundry C N, Vandersteven J G, Pryor R J. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem*. 2003;49(6 Pt 1): 853-60.
- [34] Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*. 2005;6:62.
- [35] Das S, Hammond-McKibben D, Guralski D, Lobo S, Fiedler PN. Development of a sensitive molecular diagnostic assay for detecting *Borrelia burgdorferi* DNA from the blood of Lyme disease patients by digital PCR. *PLoS One*. 2020;15:e0235372
- [36] Zhang L, Parvin R, Fan Q and Ye F. Emerging digital PCR technology in precision medicine. *Biosens Bioelectron*. 2022;211:114344
- [37] Sedlak RH, Nguyen T, Palileo I, Jerome KR and Kuypers J. Superiority of Digital Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) over Real-Time RT-PCR for Quantitation of Highly Divergent Human Rhinoviruses. *J Clin Microbiol*. 2017;55:442-9
- [38] van Snippenberg W, Gleeurup D, Rutsaert S, Vandekerckhove L, De Spiegelaere W and Trypsteen W. Triplex digital PCR assays for the quantification of intact proviral HIV-1 DNA. *Methods*. 2022;201:41-8
- [39] Bonlokke S, Stougaard M, Sorensen BS, Booth BB, Hogdall E, Nyvang GB, Lindegaard JC, Blaakaer J, Bertelsen J, Fuglsang K, et al. The diagnostic value of circulating Cell-Free HPV DNA in plasma from cervical cancer patients. *Cells*. 2022;11:2170
- [40] Lyu L, Li Z, Pan L, Jia H, Sun Q, Liu Q and Zhang Z. Evaluation of digital PCR assay in detection of *M. tuberculosis* IS6110 and IS1081 in tuberculosis patients plasma. *BMC Infect Dis*. 2020;20:657
- [41] Salipante S J and Jerome K R. Digital PCR-An emerging technology with broad applications in microbiology. *Clin Chem*. 2020;66:117-23
- [42] Kojabad A A, Farzanehpour M, Galeh H E G, Dorostkar R, Jafarpour A, Bollandian M and Nodoooshan M M. Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives. *J Med Virol*. 2021;93:4182-97
- [43] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl M W, Shipley G L, Vandesompele J, Wittwer C T. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22
- [44] Kimura Y, Soma T, Kasahara N, Delobel D, Hanami T, Tanaka Y, de Hoon M J L, Hayashizaki Y, Usui K, Harders M. Edesign: Primer and enhanced internal probe design tool for quantitative PCR experiments and genotyping assays. *PLoS One*. 2016; 11(2):e0146950
- [45] Bustin SA, Nolan T. RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(8):3004
- [46] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(12):e63
- [47] Holland P M, Abramson R D, Watson R, Gelfand D H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(16):7276-80
- [48] Hanami T, Delobel D, Kanamori H, Tanaka Y, Kimura Y, Nakasone A, Soma T, Hayashizaki Y, Usui K, Herbers M. Eprobes mediated real-time PCR monitoring and melting curve analysis. *PLoS One*. 2013;8(8):e70942
- [49] Tsuchiya K, Tabe Y, Ai T, Ohkawa T, Usui K, Yuri M, Misawa S, Morishita S, Takaku T, Kakimoto A, Yang H, Matsushita H, Hanami T, Yamanaka Y, Okuzawa A, Horii T, Hayashizaki Y, Ohsaka A. Eprobe mediated RT-qPCR for the detection of leukemia-associated fusion genes. *PLoS One*. 2018;13(10):e0202429
- [50] Khan M Z H, Hasan M R, Hossain S I, Ahommed M S, Daizy M. Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: state of the art. *Biosens Bioelectron*. 2020;166:112431
- [51] St John A, Price C P. Existing and emerging technologies for point-of-care testing. *Clin Biochem Rev*. 2014;35:155–67
- [52] Crow P, Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab Chip*. 2012;12:2469–86
- [53] de Paz H.D. Molecular isothermal techniques for combating infectious diseases: towards low-cost point-of-care diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2014;14(7):827-43
- [54] Kawai Y, Kimura Y, Lezhava A, Kanamori H, Usui K, Hanami T, Soma T, Morlighem J-E, Saga S, Ishizu Y, Aoki S, Endo R, Oguchi-Katayama A, Kogo Y, Mitani Y, et al. One-step detection of the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus by

- the RT-SmartAmp assay and its clinical validation. *PLoS One*. 2012;7(1):e30236.
- [55] Delobel D, Furutani Y, Nagoshi S, Tsubota A, Miyasaka A, Watashi K, Wakita T, Matsuura T, Usui K. SEB genotyping: SmartAmp-Eprimer binary code genotyping for complex, highly variable targets applied to HBV. *BMC Infect Dis*. 2022;22(1):516.
- [56] Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, 2008;27(3):224-43.
- [57] Abd El Wahed A, Patel P, Faye O, Thaloengsok S, Heidenreich D, Matangkamongbut P, Manopwisedjaroen K, Sakuntabhai A, Sall A A, Hufert F T, Weidmann M. Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Diagnostics of Dengue Infection. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129682
- [58] Abd El Wahed A, Patel P, Heidenreich D, Hufert FT, Weidmann M. Reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for the detection of middle East respiratory syndrome coronavirus. *PLoS Curr*. 2013;5. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcurr.62df1c7c75fc96cd59034531e2e8364>
- [59] Escadafal C, Faye O, Sall A A, Faye O, Weidmann M, Strohmeier O, von Stetten F, Drexler J, Eberhard M, Niedrig M, Patel P. Rapid molecular assays for the detection of yellow fever virus in low-resource settings. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(3):e2730
- [60] Euler M, Wang Y, Heidenreich D, Patel P, Strohmeier O, Hakenberg S, Niedrig M, Hufert FT, Weidmann M. Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of biothreat agents. *J Clin Microbiol*. 2013;51(4):1110-7
- [61] Faye O, Faye O, Soropogui B, Patel P, Abd El Wahed A, Loucoubar C, Fall G, Kiory D, Magassouba N, Keita S, Kondé M K, et al. Development and deployment of a rapid recombinase polymerase amplification Ebola virus detection assay in Guinea in 2015. *Euro Surveill*. 2015;20(44)
- [62] Asdaq S M B, Iqbal A, Sahu R, Bhattacharjee B, Paul T, Deka B, Fattepur S, Widayati R, Vijaya J, Al Mohaimi M, et al. Nanotechnology Integration for SARS-CoV-2 Diagnosis and Treatment: An Approach to Preventing Pandemic. *Nanomaterials*. 2021;11:1841.
- [63] Colino C I, Millán C G, Lanao JM. Nanoparticles for Signaling in Biodiagnosis and Treatment of Infectious Diseases. *Int. J. Mol. Sci*. 2018;19:1627.
- [64] Luciano K, Wang X, Liu Y, Eyley G, Qin Z, Xia X. Noble Metal Nanoparticles for Point-of-Care Testing: Recent Advancements and Social Impacts. *Bioengineering*. 2022;9:666
- [65] Daniel M C, Astruc D. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev*. 2004;104(1):293-346.
- [66] Han H, Wang C, Yang X, Zheng S, Cheng X, Liu Z, Zhao B, Xiao R. Rapid field determination of SARS-CoV-2 by a colorimetric and fluorescent dual-functional lateral flow immunoassay biosensor. *Sens. Actuators B Chem*. 2022;351:130897
- [67] Whitesides G M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 2006;442(7101):368-73.
- [68] Yang S-M, Lv S, Zhang W, Cui Y. Microfluidic Point-of-Care (POC) Devices in Early Diagnosis: A Review of Opportunities and Challenges. *Sensors*. 2022;22:1620.
- [69] Sackmann E K, Fulton A L, Beebe D J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*. 2014;507(7491):181-9.
- [70] Volpatti L R, Yetisen A K. Commercialization of microfluidic devices. *Trends Biotechnol*. 2014;32(7):347-50
- [71] Sharma B, Sharma A. Microfluidics: Recent Advances Toward Lab-on-Chip Applications in Bioanalysis. *Adv Eng Mater*. 2021;24:2100738
- [72] Wang D, He S, Wang X, Yan Y, Liu J, Wu S, Liu S, Lei Y, Chen M, Li L, et al. Rapid lateral flow immunoassay for the fluorescence detection of SARS-CoV-2 RNA. *Nat Biomed Eng*. 2020;4:1150-8
- [73] Whitesides G M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 2006;442(7101):368-73
- [74] Yager P, Edwards T, Fu E, Helton K, Nelson K, Tam M R, Weigl B H. Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature*. 2006;442(7101):412-8
- [75] Sia S K, Whitesides G M. Microfluidic devices fabricated in Poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis*. 2003;24(21):3563-76
- [76] Schena M, Shalon D, Davis R W, Brown P O. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*. 1995;270(5235):467-70
- [77] Ivnitski D, O'Neil D J, Gattuso A, Schlicht R, Calidonna M, Fisher R. Nucleic acid approaches for detection and identification of biological warfare and infectious disease agents. *Biotechniques*. 2003;35(4):862-9
- [78] Gryadunov D, Mikhailovich V, Lapa S. Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11:531-9
- [79] Cramer A, Marfurt J, Mugittu K. Rapid microarray-based method for monitoring of all currently known single-nucleotide polymorphisms associated with parasite resistance to antimalaria drugs. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3685-91
- [80] Jääskeläinen A J, Piiparinen H, Lappalainen M, Vaehri A. Improved multiplex-PCR and microarray for herpesvirus detection from CSF. *J Clin Virol*. 2008;42:172-5
- [81] Duan H, Li X, Mei A, Li P, Liu Y, Li X, Li W, Wang C, Xie S. The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in infectious diseases. *BMC Infect Dis*. 2021;21:62
- [82] Huang J, Jiang E, Yang D, Wei J, Zhao M, Feng J, Cao J. Metagenomic Next-generation sequencing versus traditional pathogen detection in the diagnosis of peripheral pulmonary infectious lesions. *Infect Drug Resist*. 2020;13:567-76
- [83] Dong Y, Gao Y, Chai Y, Shou S. Use of quantitative metagenomics next-generation sequencing to confirm fever of unknown origin and infectious disease. *Front Microbio*. 2022;13:931058
- [84] Gu L, Liu W, Ru M, Lin J, Yu G, Ye J, Zhu Z A, Liu Y, Chen J, Lai G, Wen W. The application of metagenomic next-generation sequencing in diagnosing Chlamydia psittaci pneumonia: A report of five cases. *BMC Pulm Med*. 2020;20:65
- [85] Jerome H, Taylor C, Sreenu VB, Klymenko T, Filipe A D S, Jackson C, Davis C, Ashraf S, Wilson-Davies E, Jesudason N, et al: Metagenomic next-generation sequencing aids the diagnosis of viral infections in febrile returning travellers. *J Infect*. 2019;79:383-8
- [86] Yu X, Jiang W, Shi Y, Ye H, Lin J. Applications of sequencing technology in clinical microbial infection. *J Cell Mol Med*. 2019;23:7143-50
- [87] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection. *Annu Rev Pathol*. 2019;14:319-38
- [88] Zhang L, Chen F, Zeng Z, Xu M, Sun F, Yang L, Bi X, Lin Y, Gao Y, Hao H, et al. Advances in metagenomics and its application in environmental microorganisms. *Front Microbiol*. 2021;12:766364
- [89] Wang X, Liu Y, Liu H, Pan W, Ren J, Zheng X, Tan Y, Chen Z, Deng Y, He N, et al. Recent advances and application of whole genome amplification in molecular diagnosis and medicine. *Med Comm*. 2022;3:e116
- [90] Athanasopoulou K, Boti M A, Adamopoulos P G, Skourou P C, Scorilas A. Third-Generation sequencing: The spearhead towards the radical transformation of modern genomics. *Life (Basel)*. 2021;12:30
- [91] Mongan A E, Tuda J S B, Runtuwene L R. Portable sequencer in the fight against infectious disease. *J Hum Genet*. 2020;65:35-40
- [92] Wongsurawat T, Jenjaroenpun P, Taylor M K, Lee J, Tolardo AL, Parvathareddy J, Kandel S, Wadley TD, Kaewnapan B, Athipanyasilp N, et al. Rapid Sequencing of Multiple RNA Viruses in Their Native Form. *Front Microbiol*. 2019;10:260
- [93] Akaçin I, Ersoy S, Doluca O, Güngörmüşler M. Comparing the significance of the utilization of next generation and third generation sequencing technologies in microbial metagenomics. *Microbiol Res*. 2022;264:127154