METODE DETEKSI MOLEKULER BERBASIS GENOMIK DAN DIAGNOSTIK AKURASINYA DALAM PENGEMBANGAN DIAGNOSTIK KLINIK DI INDONESIA

Genomic Molecular Detection Methods and Diagnostic Accuracy in The Development of Clinical Diagnostics in Indonesia

Auraga Dewantoro¹, Widia Citra Anggundari², Umi Nuraeni³, Bambang Prasetya⁴, dan Yopi⁵

^{1,2,3,4,5}Badan Standardisasi Nasional
Kompleks PUSPIITEK Gedung 420-430, Kota Tangerang Selatan, Banten 15314
E-mail: auraga@bsn.go.id

Abstrak

Peningkatan prevalensi penyakit kanker semakin bertambah tiap tahunnya, begitu juga dengan meningkatnya jenis-jenis penyakit baru oleh organisme patogen yang sebelumnya belum diketahui. Kebutuhan metode diagnosis untuk *assesment* pasien serta metode identifikasi patogen terkini dibutuhkan dalam menurunkan resiko kematian pasien. Saat ini, pendekatan molekuler menunjukkan hasil yang potensial dalam diagnosis, sehingga pengembangan dan penerapan metode deteksi terkini berbasis molekuler dapat menjadi solusi. Berbagai literatur akan menjadi sumber diskusi pada ulasan ini dengan fokus pada penggunaan metode deteksi molekuler berbasis genomik di Indonesia serta potensinya yang ditunjukkan dari nilai akurasi diagnostiknya serta kebutuhan peran standardisasi dan penilaian kesesuaiannya. Penggunaan diagnostik molekuler penyakit kanker termasuk baru di Indonesia, namun secara regulasi sudah menjadi salah satu alternatif dalam diagnostik klinis. Pengembangannya cukup signifikan pada penyakit menular terutama pada saat pandemic COVID-19. Secara keseluruhan akurasi diagnostik molekuler berbasis genomik bervariasi tergantung dari jenis penyakit, gen acuan dan kondisi sampel menyebabkan perbedaan hasil pengujian, namun metode dPCR dan NGS menjadi teknologi terkini dengan sensitivitas tinggi yang masih membutuhkan validasi baik terhadap penyakit kanker dan menular. Peran standardisasi dan penilaian kesesuaian berperan dalam menghasilkan keterjaminan hasil diagnostik molekuler dalam menghasilkan reproduibilitas yang baik dan ketertelusuran hasil ke internasional.

Kata Kunci: diagnostik molekuler, akurasi diagnostik, sensitivitas, spesifisitas

Abstrak

The prevalence of cancer increases in every single year, as well as increases in new types of diseases by pathogenic organisms that are previously unknown. A diagnostic method for patient assessment in cancer and the latest method of pathogen identification is needed to reduce the risk of patient mortality. Currently, the molecular approach shows potential results in diagnosis, so the development and application of current molecular-based detection methods can be a solution. Various literatures will be a source of discussion in this review with a focus on the use of genomic-based molecular detection methods in Indonesia and their potential which are shown from their diagnostic accuracy value and the need for standardization and metrology roles. The use of molecular diagnostics for cancer diseases is relatively new in Indonesia, however, regulation has allowed becoming an alternative in clinical diagnostics. The development is quite significant in infectious diseases, especially during the COVID-19 pandemic. Overall, genomic-based molecular diagnostic accuracy varies depending on the type of disease, reference genes, and sample conditions causing differences in test results, however, the dPCR and NGS methods are the latest technologies with high sensitivity that still require validation against both chronic and infectious diseases. Standardization and metrology play an important role in assuring the molecular diagnostic methods produce reproducible results and internationally traceable.

Keywords: molecular diagnostic, diagnostik accuracy, sensitivity, specificity, metrology

1. PENDAHULUAN

Prevalensi penyakit di Indonesia terus mengalami peningkatan seiring berkembangnya zaman. Penyakit tidak menular (PTM) / *Non Communicable Diseases* (NCD) menjadi salah satu penyebab kematian terbesar di Indonesia dengan estimasi sebesar 73% yang didominasi penyakit kardiovaskular dan kanker (WHO 2018). Prevalensi kanker cenderung meningkat

dari 1.4 ‰ (2013) menjadi 1.79 ‰ pada tahun 2018 (Kementerian Kesehatan 2013; 2018). Tingginya kematian pasien pengidap kanker disebabkan terlambatnya deteksi dini yang dilakukan oleh pasien, sehingga diketahui sudah pada kondisi stadium lanjut. Kondisi ini disebabkan gejala yang dialami pasien biasa tidak disadari karena memiliki kemiripan dengan gejala penyakit pada umumnya, sehingga memang diperlukan metode yang mampu

mengetahui potensi tersebut. Kebutuhan diagnosis kanker juga diperlukan karena sangat berkaitan dengan penyimpangan gen tertentu pada jaringan kanker, sehingga penggunaan metode berbasis molekuler bisa menjadi salah satu opsi dalam diagnosis kanker.

Penyakit menular/ *Communicable Diseases* (CD) juga menjadi perhatian karena dapat mudah tersebar dengan tingkat infeksi yang berbeda-beda oleh jenis agen biologi tertentu. Organisme tersebut bersifat oportunistik pada sistem kekebalan tubuh manusia. Diagnosis penyakit menular selain melihat indikasi dari gejala, juga diperlukan identifikasi dari mikroorganisme patogen atau parasit penyebab penyakit. Gejala penyakit dapat memiliki banyak kesamaan yang menyulitkan diagnosis pasien, sehingga perlu diketahui organisme penyakit tersebut. Metode deteksi dengan standar kultur sebagai diagnosis contoh pada kasus *sepsis* masih menimbulkan hambatan terkait sensitivitas dan kecepatannya, maka pendekatan molekuler diharapkan dapat menjadi salah satu uji yang menghasilkan identifikasi yang lebih sensitif dan cepat (Mancini *et al.* 2010; Chin *et al.* 2013).

Perkembangan diagnostik molekuler menjadi banyak perhatian dengan semakin meningkatnya dukungan riset ke arah *precision medicine*. Penerapan prinsip tersebut bermaksud menghasilkan pelayanan kesehatan yang sesuai dengan variabilitas individu. Berbagai metode dan teknologi terbaru mulai dikembangkan untuk mendapatkan informasi kesehatan secara akurat dan presisi seperti metode berbasis *Polymerase Chain Reaction* (PCR), sekuensing dan *microarray*. Pengembangan ini juga sedang dimulai di Indonesia dalam mendukung era revolusi industri 4.0 sebagai penerapan *precision medicine*. Pengembangan ini berupa metode deteksi baru dan instrumentasinya dalam menghasilkan diagnostik yang akurat. Metode deteksi baru atau hasil modifikasi ini, agar dapat diterima sebagai pertimbangan untuk diagnosis, harus memenuhi prinsip statistika yaitu akurasi diagnostik. Akurasi diagnostik digunakan untuk membuktikan metode mampu dalam mendeterminasi hasil diagnostik sehingga didapatkan kondisi penyakit yang akurat (Simundic 2009). Pengaturan hal tersebut diperlukan peran standar dan penilaian kesesuaian terkait reproduktibilitas hasil dan ketertelusurannya secara internasional. Perkembangan ini merupakan hal yang akan berkembang pesat di masa depan, sehingga diagnostik molekuler sangat diperlukan pengembangannya di Indonesia.

2. TINJAUAN PUSTAKA

Kanker merupakan suatu penyakit yang disebabkan akibat pertumbuhan sekelompok sel abnormal yang terjadi secara tidak terkendali. Sel tersebut muncul karena terjadinya serangkaian perubahan genetik dan epigenetik yang cenderung merubah aktivitas sejumlah gen dan produknya, sehingga menyebabkan berbagai perubahan fenotipik (De Silva *et al.* 2019).

Penyakit menular atau infeksi merupakan yang disebabkan oleh agen biologi atau produknya yang dapat menyebar dan menginfeksi ke orang lain. Dalam kondisi darurat tingkat kematiannya dapat meningkat hingga 60 kali lipat dibandingkan penyebab lainnya. Hal ini dapat mungkin terjadi saat epidemi atau wabah terjadi di suatu wilayah. Antisipasi kondisi tersebut dapat dilakukan salah satunya melalui pengujian cepat (*rapid assessment*) (Ameli 2015). Pengujian cepat juga harus memiliki akurasi yang tinggi dalam memperoleh informasi secara detail terkait penyebab agen biologi infeksi.

Diagnostik molekuler merupakan pengujian untuk menganalisa penanda biologi secara genomik atau proteomik untuk mendapatkan informasi kesehatan atau penyakit pasien dalam diagnostik klinis (Shukla *et al.* 2019). Diagnostik molekuler memiliki kelebihan diantaranya sensitivitas yang tinggi dan dapat mendeterminasi jenis patogen dan kekebalan antibiotiknya. Walaupun memiliki banyak kelebihan, masih terdapat hambatan terhadap pengaplikasian dalam diagnostik klinis dalam hal biaya yang efektif (Choe *et al.* 2015).

Sensitivitas merupakan proporsi jumlah kasus positif (*true positive*) dalam keseluruhan pengujian yang bernilai positif. Parameter ini mengevaluasi kemampuan metode pengujian dalam mendeteksi penyakit yang positif. Spesifitas adalah proporsi jumlah kasus negatif (*true negative*) dalam keseluruhan pengujian yang bernilai negatif. Berbeda dengan sensitivitas, spesifitas menduga pasien yang tidak memiliki penyakit atau negatif. Secara keseluruhan, metode dapat dilihat derajat kebenarannya melalui akurasi yang merupakan proporsi pengujian yang benar (*true positive* dan *true negative*) dalam seluruh populasi/ sampel pengujian (Zhu *et al.* 2010; Van Stralen *et al.* 2009).

3. METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan berupa studi literatur dari jurnal, buku dan artikel sebagai pembahasan pada ulasan ini dengan penekanan pada penggunaan metode deteksi molekuler genetik dan genomik di Indonesia dan pengumpulan hasil akurasi, sensitivitas dan spesifisitas dari berbagai jurnal terkait penyakit kanker dan penyakit menular dalam rentang 10 tahun terakhir (2010-2020). Peran standardisasi dan penilaian kesesuaiannya juga akan didiskusikan pada bagian akhir pembahasan.

Metode diagnostik molekuler pada ulasan ini mencakup PCR, sekuensing, LAMP, *in situ hybridization* (ISH) dan *microarray*. Diagnostik secara PCR meliputi konvensional PCR, *quantitative* PCR (qPCR), *digital* PCR (dPCR) dan *digital droplet* PCR (ddPCR). Penggunaan sekuensing dalam memastikan susunan basa sampel terkini meliputi *Next Generation Sequencing* (NGS). Selain ketiga metode tersebut juga terdapat metode *loop mediated isothermal amplification* (LAMP) dan ISH yang memiliki perbedaan dengan PCR. Diagnostik akurasi yang akan dibahas terbatas pada kemampuan determinasi metode melalui nilai akurasi, sensitivitas dan spesifisitas.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Metode Deteksi Molekuler Berbasis Genetik dan Genomik di Indonesia

Metode deteksi molekuler masih termasuk cukup baru dalam ilmu diagnostik klinis di Indonesia. Pada penyakit kanker, diagnostik utama pada mengacu pada pemeriksaan berbasis ilmu sitologi dan histologi melalui pengambilan sampel sel kanker dan diagnosa pencitraan. Diagnostik molekuler dijelaskan secara eksplisit masih terbatas pada kanker payudara, kanker paru dan Limfoma Non Hodgkin (LNH) sebagaimana terlihat pada Tabel 1 saja dalam cakupan pemeriksaan patologi anatomi (Kementerian Kesehatan 2015; 2016; 2019).

Metode pemeriksaan molekuler yang digunakan secara umum berupa imunohistokimia (IHK/IHC) yang berbasis antibodi klonal, namun pada kasus tertentu seperti pada kanker payudara masih tetap diperlukan konfirmasi dari metode *in situ* hibridisasi atau *gene array* jika hasilnya meragukan (Wresnindyatsih 2015; Kemenkes 2018). Metode *in situ* hibridisasi (ISH) merupakan pengujian sitogenetik dengan melakukan pelabelan jaringan menggunakan probe dan *fluorescent dye* atau disebut juga teknik pengecatan kromosom. Analisis sitogenetik yang

dapat digunakan meliputi *fluorescent in situ hybridization* (FISH) dan *chromogenic fluorescent in situ hybridization* (CISH) (Witari 2014). *Gene array* merupakan metode yang dapat mengklasifikasikan jenis penyakit, mengidentifikasi target *novel* molekuler dan prediksi respon terapi dengan sensitivitas dan spesifitas yang tinggi, namun teknologi ini masih sangat mahal (Wu *et al.* 2018). Secara umum, metode molekuler berbasis genetik dan genomik masih belum menjadi diagnosis utama dalam penentuan diagnosis klinis untuk kanker, walaupun secara ideal diperlukan informasi genetik pasien.

Tabel 1 Pemeriksaan molekuler kanker berdasarkan pedoman Kementerian Kesehatan

Tipe Kanker	Pemeriksaan Molekuler	Penggunaan
Kanker Payudara	IHK, ISH, <i>gene array</i>	Diagnosis, terapi target
Kanker Paru	IHK	Diagnosis, terapi target
Kanker Kolorektal	Diagnosis genetik HNPCC	Diagnosis genetik resiko tinggi
Kanker Otak	Tumor marker	Diagnosis tumor sekunder; terapi target
Kanker Serviks	<i>Genotyping / hybrid capture</i>	Deteksi dini
Kanker Nasofaring	DNA viral load & serologi	Skrining
Limfoma Non Hodgkin (LNH)	IHK, ISH	Diagnosis
Kanker Rektum	Tumor marker	Diagnosis penunjang

Selain diagnosis, penggunaan uji molekuler berbasis genetik atau genomik di Indonesia berperan dalam membantu memberikan informasi untuk pemeriksaan penunjang, deteksi dini, skrining dan terapi target. Penggunaan metode IHK juga menjadi metode utama lebih dalam mendeteksi mutasi gen tertentu atau *tumor marker* pada pasien untuk penentuan obat berdasarkan terapi target dan pemeriksaan penunjang. Pemeriksaan molekuler juga dilakukan pada tahap deteksi dini untuk mendeteksi *Human papillomavirus* (HPV) menggunakan *hybrid capture II assay* (HC-II) (Kemenkes 2018) atau PCR jika dimungkinkan (Lipinwati 2012). Skrining juga dilakukan pada kasus kanker nasofaring dalam mendeteksi infeksi Epstein-Barr virus secara serologi menggunakan ELISA atau *viral load* dengan qPCR (Savitri & Mubarika 2012).

Berbeda halnya dengan kanker, diagnosis penyakit menular sudah banyak menggunakan PCR untuk mengidentifikasi patogen terutama pada organisme yang dikategorikan untuk wabah. Berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 1501/MENKES/PER/X/2010 tentang Jenis Penyakit Menular Tertentu yang Dapat Menyebabkan Wabah dan Upaya Penanggulangan dari 17 penyakit yang dianggap dapat menyebabkan wabah, 5 diantaranya yaitu H1N1, H5N1, meningitis menokok, demam kuning dan chikungunya menjadi salah satu opsi penegakan diagnosis. Pandemi infeksi novel coronavirus (COVID-19) juga menjadi wabah baru yang mengacu pada diagnostik molekuler qPCR di tahun 2020. Wabah COVID-19 telah mendorong berbagai instansi pemerintah dan swasta untuk mengadakan instrumen PCR dan sekuensing dalam memperoleh diagnosis yang akurat sesuai panduan WHO. Sebanyak 44 lembaga pemerintah termasuk rumah sakit dan balai rujukan pemerintah telah didukung oleh kemampuan diagnosis COVID-19 dengan standar *biosafety level-2* dan qPCR per tanggal 19 Maret 2020 (Kemenkes 2020). Pandemi ini mendorong sistem kesehatan Indonesia terkait pentingnya diagnostik molekuler dalam diagnosis penyakit.

4.2 Akurasi Diagnostik Metode Molekuler Terkini Berbasis Genetik dan Genomik

Pada penyakit kanker penggunaan ISH (FISH dan CISH) merupakan *gold standard* dalam mendeteksi kelainan kromosom ataupun gen pada jaringan kanker (Budiarto 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Lin *et al.* (2017) dengan menggunakan FISH mampu mendapatkan nilai rata-rata sensitivitas sebesar

80.8 % dan nilai spesifitas 100 % pada kanker kandung kemih dari beberapa kromosom dan gen, sedangkan Zappacosta *et al.* (2013) dengan metode CISH mendeteksi gen p16 dengan nilai sensitivitas 96.4% dan nilai spesifitas 100% pada kanker serviks. Metode ini juga mendukung pengukuran dari IHK ketika terjadi keraguan dalam ekspresi protein (Wresnindyatsih 2015).

Penggunaan qPCR juga ditunjukkan mampu mengukur perubahan HER2 *copy number* dan amplifikasinya secara presisi dan reproduktibel yang merupakan suatu terobosan baru dalam diagnostik kanker (Ayatollahi 2017). Seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2 kasus kanker payudara, penggunaan qPCR oleh Zoppoli *et al.* (2017) menghasilkan nilai sensitivitas dan spesifitas 86.1% dan 99%, dengan akurasi 91.6%. Hasil penelitian Park *et al.* (2014) juga menunjukkan dengan nilai yang tidak berbeda jauh yaitu 93% (sensitivitas) dan 89.8% (spesifitas). Performa PCR juga menunjukkan nilai akurasi diagnostik yang lebih baik pada diagnostik HPV kanker serviks dibandingkan menggunakan ISH, karena ada kemungkinan ISH melewati beberapa dengan *copy* sel HPV yang rendah sehingga menutupi keberadaan HPV (Biesaga 2012). Kondisi sampel kanker PCR seperti penyimpanannya, inhibitor dan lainnya juga harus dipastikan karena akan mempengaruhi akurasi diagnostik qPCR dan reproduktibilitasnya (Sanders *et al.* 2014). Penggunaan deteksi gen ini selain dapat digunakan untuk diagnostik, juga berpotensi untuk menduga resiko seseorang mengidap kanker tertentu atau deteksi dini (Shukla *et al.* 2019).

Tabel 2 Nilai akurasi diagnostik metode molekuler pada beberapa penyakit kanker

Metode	Penyakit	Akurasi (%)	Sensitivitas (%)	Spesifitas (%)	Deskripsi	Sumber
NGS	Mutasi gen	-	92.7	100	Deteksi >1 mutasi gen dari beberapa penyakit	Chin <i>et al.</i> (2013)
DNA Microarray	Kanker Kolorektal	84.2	85.2	85.7	Skriming	Koga <i>et al.</i> (2014)
FISH	Kanker Kandung Kemih	-	80.8	100	Deteksi penyimpangan kromosom 3, 7, 17 dan gen p16	Lin <i>et al.</i> (2017)
CISH	Kanker Serviks	-	96.4	100	Deteksi gen p16	Zappacosta <i>et al.</i> (2013)
qPCR	Kanker Payudara	91.6	86.1	99	Deteksi gen HER2	Zoppoli <i>et al.</i> (2017)
	Kanker Payudara	-	93	89.8	Deteksi gen HER2	Park <i>et al.</i> (2014)
	Kanker Payudara	-	90	85.7	Deteksi gen HER2	Tantiwetru eangdet <i>et al.</i> (2018)
ddPCR	Kanker Payudara	-	82.8	97.3	Deteksi gen HER2	Wang <i>et al.</i> (2017)
	Kanker Lambung	-	76.5	83.8	Deteksi gen EFTUD2 dan HER2	Liu <i>et al.</i> (2019)

Diagnostik pada satu gen yang terekspresi dianggap masih kurang sesuai. Penggunaan beberapa gen atau ratusan gen yang berbeda perlu di deteksi karena kanker memengaruhi stabilitas genetik yang menyebabkan beberapa mutasi (Sugimura 1992; Loeb 2003). Salah satu metode yang mampu melakukan hal tersebut adalah DNA *microarray* atau DNA *chip*. Kemampuan mendeteksi ratusan gen yang bisa menghasilkan *novel* gen sangat bermanfaat dalam identifikasi kanker dan *pharmacogenomic* (Kaushik *et al* 2018). Pelaksanaan *skrining* kanker kolorektal menggunakan DNA *microarray* menunjukkan kemampuan dalam deteksi 43 kandidat *biomarker* untuk menentukan pendarahan oleh kanker (Koga *et al.* 2014) dan pada kanker payudara menunjukkan terdapat 221 gen yang *up-regulated* dan 206 gen yang *down-regulated* dibandingkan sel normal (Xiang *et al.* 2015). Nilai sensitivitas dan spesifitas yang dihasilkan sebesar 85.2% dan 85.7% dengan akurasi 84.2% (Tabel 2) pada skrining kanker kolorektal (Koga *et al.* 2014). Tantangan dari metode ini adalah kompleksitasnya terutama dalam tahap validasi. Validasi yang dilakukan tidak terbatas pada instrumen, reagen, *microarray*, protokol dan labeling, namun juga pada perangkat lunak yang memproses instrumen (Wu *et al.* 2005).

Hingga pada saat ini teknologi yang paling sensitif dalam diagnosis molekuler dalam studi kanker adalah digital PCR dan NGS, terutama dalam mutasi dan abberasi. Pengukuran yang lebih akurat pada digital PCR disebabkan adanya pengembangan pengukuran dari populasi molekuler ke *single DNA molecules* yaitu *single DNA PCR* (Patrinos *et al.* 2017). Beberapa penelitian telah dilakukan terkait akurasi diagnostik *droplet digital PCR* (ddPCR) pada kanker payudara seperti pada Tantiwetruangdet *et al.* (2018) dengan nilai sensitivitas 90% dan nilai spesifitas 85.7% dengan komparasi sampel yang sudah di analisis menggunakan FISH. Hasil yang cukup relevan juga didapatkan oleh Wang *et al.* (2017) menunjukkan potensi pengukuran HER2 kanker payudara dengan nilai sensitivitas 82.8% dan nilai spesifitas 97.3% dengan alur kerja yang lebih sederhana dibandingkan kombinasi IHK dan FISH. Studi pada kanker lambung juga menunjukkan nilai sensitivitas (76.5%) dan spesifitas (83.8%) yang potensial menggunakan ctDNA dalam analisis *liquid biopsy* rutin dibandingkan FISH. Selain nilai

tersebut, nilai *limit of detection* (LOD) dari segi analitik juga harus cocok dengan pertimbangan pengetahuan medis dan jumlah *false positive* yang tidak terlalu banyak, beberapa kasus nilai spesifitas yang tinggi lebih disukai (Karlin-Neumann & Bizouarn 2018).

Terakhir, merupakan teknologi yang mampu mensekuens urutan basa dari DNA/RNA yang dapat menarget beberapa gen dari banyak template DNA yaitu NGS. Kemampuan NGS ditunjukkan dengan kemampuan mendeteksi 17 mutasi gen terpilih yang berhubungan dengan kanker pada 20 sampel dengan nilai sensitivitas 92.7% dan nilai spesifitas 100% (Chin *et al.* 2013). Walaupun memiliki kemampuan dalam mensekuens banyak sampel, akurasi dari NGS masih perlu untuk di kembangkan kembali karena rata-rata instrumen NGS memiliki eror 0.002-0.008 atau satu error setiap 125-500 bp, sehingga masih perlu divalidasi dengan Sanger *sequencing* yang sudah sering digunakan (Keller & Messe 2015).

Berbeda halnya dengan kanker, pada penyakit menular penggunaan diagnostik molekuler merupakan "*gold standard*" dalam identifikasi patogen penyebab penyakit. Penggunaan metode berbasis qPCR merupakan yang paling banyak digunakan karena dapat mendeteksi amplifikasi pada kondisi *real time* dan menghasilkan data semi kuantitatif. Metode ini menggunakan pelabelan *fluorescent dye* atau probe dalam mendeteksi gen target (Patrinos *et al.* 2017). Beberapa uji deteksi seperti dilihat pada Tabel 3 menunjukkan nilai sensitivitas dan spesifitas yang baik dalam deteksi virus dan bakteri (Nunes *et al.* 2019; Esposito *et al.* 2019). Penggunaannya menjadi sangat populer pada era masa pandemi COVID-19, namun menimbulkan paradigma baru dalam akurasi diagnostiknya sebagai "*gold standard*". Pada kasus COVID-19 Young *et al.* (2020) secara meta analisis mengungkapkan penggunaan CT-scan dada lebih sensitif dan cepat dibandingkan qPCR, walaupun heterogenitas populasi yang cukup tinggi. Keefektifan qPCR yang cenderung kurang sensitif ini bisa disebabkan template yang digunakan berupa cDNA dari proses transkripsi balik yang menghasilkan kurva standar dengan variabilitas lebih tinggi dibandingkan menggunakan RNA, sehingga kurva RNA memberikan estimasi akurasi dan ketidakpastian yang lebih terpercaya (Sanders *et al.* 2014).

Tabel 3 Nilai akurasi diagnostik metode molekuler dalam deteksi penyakit menular/infeksi

Metode	Patogen	Akurasi (%)	Sensitivitas (%)	Spesifisitas (%)	Deskripsi	Sumber
LAMP	<i>C. difficile</i>	-	88.1	96.7	Deteksi gen toxin <i>C. difficile</i> pada feses	Hong <i>et al.</i> (2014)
dPCR/ ddPCR	SARS-CoV-2	93	90	100	Sampel respiratori	Dong <i>et al.</i> (2020)
	<i>C. trachomatis</i>	-	73.3	99.1	Deteksi infeksi mata	Roberts <i>et al.</i> (2013)
DNA microarray	14 jenis bakteri dan 4 jenis fungi	-	100	97.1	Deteksi patogen pada cairan cerebrospinal	Cao <i>et al.</i> (2018)
Metagenom icNGS	Berbagai macam bakteri dan virus	100	95	96	Deteksi patogen pada cairan cerebrospinal	Hasan <i>et al.</i> (2020)
	Hantavirus	92.5	100	97.63	Diagnosis hantavirus pulmonary syndrome	Nunes <i>et al.</i> (2019)
qPCR	<i>Neisseria spp.</i>	-	100	96.7	Deteksi penyakit celiac asosisasi disbiosis	Esposito <i>et al.</i> (2019)

Penggunaan metode yang lebih akurat mendorong diagnosis penyakit menular menuju penggunaan dPCR, *microarray* dan NGS. Penggunaan dPCR mampu mengatasi tingginya *false negative* dari qPCR dari sampel swab faring hingga didapatkan nilai sensitivitas dan nilai spesifitas 90% dan 100% dengan akurasi keseluruhan 93% (Dong *et al.* 2020). Penggunaan pada infeksi *C. trachomatis* juga menunjukkan hasil yang signifikan, namun masih perlu ditingkatkan (Roberts *et al.* 2013). Konfirmasi lanjutan menggunakan sequencig seperti NGS atau DNA *microarray* dapat menjadi pilihan dengan beberapa target dan sampel. Pendeteksian infeksi pada cairan cerebrospinal dilakukan oleh Hasan *et al.* (2020) mampu mengungkap berbagai macam bakteri dan virus dengan tingkat akurasi yang tinggi dan hasil yang sama dengan Cao *et al.* (2018) menggunakan DNA *microarray* (Tabel 3). Secara pemeriksaan rutin metode-metode tersebut tergolong sangat mewah, namun kedepannya diperkirakan akan lebih dapat diterima dari segi biaya.

Pengembangan metode penyakit infeksi terkadang juga membutuhkan waktu yang sangat cepat tanpa proses laboratorium yang panjang. Salah satu metode tersebut adalah LAMP. Berbeda dengan PCR, LAMP memiliki prinsip kerja pada kondisi suhu *isothermal*, sehingga proses ini dapat memangkas waktu transisi siklus suhu. Walaupun tidak sepopuler PCR, metode ini memiliki kelebihan dalam uji cepat dan murah (Mori & Notomi 2009). Metode ini mampu mendeteksi mikroorganisme *C. difficile* pembawa gen toxin A (*tcdA*) tersebut dengan nilai sensitivitas dan spesifitas 88.1% dan 96.7% yang lebih tinggi dibandingkan metode *fluorescent immunoassay* (Hong *et al.*

2014). Sebuah studi meta analisis juga menunjukkan hal yang sama dalam kemampuan LAMP mendeteksi *C. difficile* secara cepat dan efektif sebagai *standalone diagnostic test* (Chen *et al.* 2015). Nilai akurasi diagnostik LAMP sangat berpengaruh pada hasil desain primer dan probe yang digunakan karena memiliki desain yang lebih kompleks dibandingkan PCR. LAMP juga tidak dapat dilakukan secara *multiplex* (Sahoo *et al.* 2016).

Secara keseluruhan beberapa nilai akurasi diagnostik dari berbagai sumber terkumpul pada Tabel 2 dan Tabel 3. Setiap metode molekuler memiliki keakuratan diagnostik yang berbeda-beda tergantung jenis penyakit, instrumentasi dan target yang diukur. Nilai-nilai tersebut memberikan gambaran mengenai peranan metode-metode tersebut dalam proses diagnosis klinis dan tidak bisa menjadi justifikasi nilai akurasi absolut karena penggunaan pada setiap penyakit bisa menghasilkan nilai yang berbeda. Penggunaan nilai sensitivitas dan spesifisitas dianggap sudah menggambarkan kemampuan metode dalam mendeterminasi hasil *true positive* dan *true negative* yang kemudian akan dilakukan prediksi positif dan negative penyakit tersebut (Leefflang & Allerberger 2018). Pengembangan diagnostik molekuler secara umum mampu memberikan tingkat sensitivitas dan spesifitas yang tinggi dan kecepatan pengujian yang baik dibandingkan metode konvensional (Patrinos *et al.* 2017).

4.3 Tantangan Standardisasi dan Penilaian Kesesuaian dalam Diagnostik Molekuler di Indonesia

Jika dilihat bagaimana deteksi molekuler di Indonesia, sudah menjadi salah satu pilihan dalam diagnostik penyakit kanker dan cukup

berkembang pada penyakit menular. Kondisi pandemi COVID-19 menjadi kondisi paling mendorong dalam penggunaan diagnostik molekuler di Indonesia. Dalam mendukung kondisi ini peran standarisasi dan penilaian kesesuaiannya sangat penting dalam memastikan keakuratan hasil pengujian molekuler.

Pengujian pada diagnostik molekuler terkadang tidak dapat diandalkan karena kurangnya peran standarisasi. Hasil pengujian secara ideal seharusnya sama dengan peralatan dan bahan kimia yang sama. Salah satu faktor yang berperan terhadap hasil yang bervariasi adalah kondisi pre analitik atau terkait sampel dan penanganannya, sehingga perlu divalidasi secara klinis. Secara ideal, standar dalam analisis molekuler melingkupi dari proses *sampling*, penanganan sampel hingga hasil ekstraksi DNA dan gen acuan dari tingkat penyimpanan, kualitas dan kuantitas yang memang diperlukan dalam diagnostik klinis (Shukla *et al.* 2019; Agrawal *et al.* 2017). Selain itu, keberagaman internal standar pada berbagai produk kit diagnostik asam nukleat, terutama pada saat COVID-19 ini juga harus menjadi perhatian lembaga standar karena belum diketahui secara pasti tingkat keakuratannya, walaupun sudah sesuai dengan WHO. Hal tersebut harus didukung dari ketertelusuran terkait adanya *primary reference material*/bahan acuan primer yang memiliki kemurnian tertinggi yang dimiliki oleh *National Metrology Institute* (NMI) sebagai rantai ketertelusuran yang tidak terputus ke internasional (Beastall *et al.* 2017).

Pembuatan bahan acuan primer asam nukleat ini bisa dilakukan menggunakan metode dPCR. Metode ini tidak membutuhkan kalibrator, memiliki ketahanan tinggi terhadap inhibitor, pengujian pada kondisi efisiensi yang suboptimal dan reproduibilitas yang baik dari berbagai reagen, primer dan instrumen dPCR yang berbeda, sehingga cocok sebagai metode pengukuran referensi tingkat tinggi dan metode untuk penetapan nilai bahan acuan (Devonshire *et al.* 2015; Nixon *et al.* 2014; Pavšič *et al.* 2016). Beberapa NMI seperti NIST membuat bahan acuan untuk kanker payudara (SRM 273) untuk menghitung *copy number* HER2 (He *et al.* 2016); NIM menggunakannya untuk membuat dua CRM SARS CoV-2 RNA dengan menghitung *copy number* gen E, ORF 1 dan N (NIM 2020). Penggunaan qPCR juga dimungkinkan dalam pembuatan bahan acuan seperti yang dilakukan oleh Tübitak Ume NMI (*National Metrology Institute*) Turki dengan menetapkan nilai (*quantification cycle*) Cq dan standar deviasinya. Maka kebutuhan bahan acuan yang terstandar diperlukan secara nasional karena berperan

dalam keterjaminan hasil diagnostik dan pengembangan standarnya. BSN sebagai lembaga standar nasional diharapkan dapat mewujudkan kebutuhan standar baik adopsi ataupun merancang dari awal serta kebutuhan bahan acuan yang tersedia untuk diagnostik.

5 KESIMPULAN

Diagnostik molekuler berbasis genomik merupakan suatu terobosan baru dalam bidang diagnostik klinis di Indonesia. Metode-metode yang berkembang saat ini baik secara nasional dan internasional memiliki akurasi diagnostik yang berbeda dari segi jenis penyakit, gen acuan dan sampel yang digunakan. Keberagaman hasil tersebut sangat diperlukan peran standarisasi dan penilaian kesesuaian dalam ketertelusuran hasil ke internasional menggunakan bahan acuan dan pengembangan standar yang menghasilkan hasil diagnosis yang akurat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang kepada Pusrisbang SDM BSN yang telah memfasilitasi kajian studi pada kajian berlangsung. Juga tidak lupa penulis ucapkan terima kasih kepada rekan-rekan peneliti di Pusrisbang SDM juga yang memberikan koreksi, saran dan masukan ilmu yang sangat bermanfaat sehingga artikel ini dapat tersusun dengan baik

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal, L., Engel, K. B., Greytak, S. R., & Moore, H. M. (2018, October). Understanding preanalytical variables and their effects on clinical biomarkers of oncology and immunotherapy. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 52, pp. 26-38). Academic Press.
- Ameli, J. 2015. Communicable diseases and outbreak control. *Turkish Journal of Emergency Medicine*, 15(Suppl 1), 20–26. <https://doi.org/10.5505/1304.7361.2015.19970>
- Ayatollahi, H., Fani, A., Karimiani, E. G., Homaei, F., Shajiei, A., Sheikh, M., ... & Shams, S. F. (2017). Chromogenic in situ Hybridization Compared with Real time Quantitative Polymerase Chain Reaction to Evaluate HER2/neu Status in Breast Cancer. *Iranian journal of pathology*, 12(2), 128.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. (2013). Laporan Nasional Riset Kesehatan Dasar 2013. Jakarta: Kementerian

- Kesehatan.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. (2018). Laporan Nasional Rikesdas 2018. Jakarta : Kementerian Kesehatan.
- Beastall, G. H., Brouwer, N., Quiroga, S., & Myers, G. L. (2017). Traceability in laboratory medicine: a global driver for accurate results for patient care. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 55(8), 1100-1108
- Biesaga, B., Szostek, S., Klimek, M., Jakubowicz, J., & Wysocka, J. (2012). Comparison of the sensitivity and specificity of real-time PCR and in situ hybridization in HPV16 and 18 detection in archival cervical cancer specimens. *Folia histochemica et cytopathologica*, 50(2), 239-247.
- Bizouarn, F., & Karlin-Neumann, G. (2018). *Digital PCR: Methods and Protocols*. Springer.
- Budiarto, B. R. (2016). Polymerase Chain Reaction (PCR) Perkembangan dan Perannya Dalam Diagnostik Kesehatan. *Biotrends*, 6(2), 29-38.
- Cao, J., Gao, S., Chen, J., Zhu, B., Min, R., & Wang, P. (2018). The preparation and clinical application of diagnostic DNA microarray for the detection of pathogens in intracranial bacterial and fungal infections. *Experimental and therapeutic medicine*, 16(2), 1304-1310.
- Chin, E. L. H., da Silva, C., & Hegde, M. 2013. Assessment of clinical analytical sensitivity and specificity of next-generation sequencing for detection of simple and complex mutations. *BMC Genetics*, 14(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-6>
- Choe, H., Deirmengian, C. A., Hickok, N. J., Morrison, T. N., & Tuan, R. S. 2015. Molecular diagnostics. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 23(0), S26-S31. <https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-14-00409>
- De Silva, S., Tennekoon, K. H., & Karunanayake, E. H. 2019. Overview of the genetic basis toward early detection of breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 11, 71-80.
- Devonshire, A. S., Honeyborne, I., Gutteridge, A., Whale, A. S., Nixon, G., Wilson, P., ... Huggett, J. F. 2015. Highly reproducible absolute quantification of mycobacterium tuberculosis complex by digital PCR. *Analytical Chemistry*, 87(7), 3706-3713. <https://doi.org/10.1021/ac5041617>
- Dong, L., Zhou, J., Niu, C., Wang, Q., Pan, Y., Sheng, S., ... Fang, X. 2020. Highly accurate and sensitive diagnostic detection of SARS-CoV-2 by digital PCR. *MedRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.03.14.20036129>
- Esposito, M. V., Nardelli, C., Granata, I., Pagliuca, C., D'Argenio, V., Russo, I., ... Sacchetti, L. 2020. Setup of quantitative PCR for oral neisseria spp. evaluation in celiac disease diagnosis. *Diagnostics*, 10(1).
- Nixon G, Garson JA, Grant P, Nastouli E, Foy. .2014. Comparative study of sensitivity, linearity, and resistance to loop mediated isothermal amplification assays for quantification of inhibition of digital and nondigital polymerase chain reaction and human cytomegalovirus. *Analytical Chemistry*, 86, 4387-4394.
- Hasan, M. R., Sundararaju, S., Tang, P., Tsui, K. M., Lopez, A. P., Janahi, M., ... Tilley, P. 2020. A metagenomics-based diagnostic approach for central nervous system infections in hospital acute care setting. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11.
- He, H. J., Almeida, J. L., Lund, S. P., Steffen, C. R., Choquette, S., & Cole, K. D. 2016. Development of NIST standard reference material 2373: genomic dna standards for HER2 measurements. *Biomolecular Detection and Quantification*, 8, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.02.001>
- Hong, G., Park, K. S., Ki, C. S., Lee, N. Y. (2014). Evaluation of the illumigene C. difficile assay for toxigenic Clostridium difficile detection: A prospective study of 302 consecutive clinical fecal samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 80(3), 177-180. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.08.014>
- Kaushik, S., Kaushik, S., & Sharma, D. (2018). Functional genomics. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*, 1-3, 118-133. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20222-7>
- Keller, A., & Meese, E. 2014. *Nucleic Acids as Molecular Diagnostics*. New Jersey: Wiley.
- Kementertian Kesehatan. 2015. Panduan Penatalaksanaan Kanker Payudara. Jakarta: Kementerian Kesehatan.
- Kementerian Kesehatan. 2020. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor HK.0 1.07/Menkes/2U/2020 Tentang Jejaring Laboratorium Pemeriksaan Coronana Virus Disease 2019 (COVID- 1 9).

- Kementerian Kesehatan. 2016. *Panduan Penatalaksanaan Kanker Kolorektal*. Jakarta: Kementerian Kesehatan.
- Kementerian Kesehatan. 2019. *Panduan Penatalaksanaan Kanker Payudara*. Jakarta: Kementerian Kesehatan.
- Kementrian Kesehatan. 2016. *Panduan Penatalaksanaan LIMFOMA non Hodgkin's*. Jakarta: Kementerian Kesehatan.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2009. *Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 2046/MENKES/PER/XII/2011 tentang Jenis Penyakit Menular Tertentu Yang Dapat Menimbulkan Wabah Dan Upaya Penanggulangan*.
- Kementerian Kesehatan. 2016. *Panduan Penatalaksanaan Tumor Otak*. Jakarta: Kementerian Kesehatan.
- Koga, Y., Yamazaki, N., Takizawa, S., Kawauchi, J., Nomura, O., Yamamoto, S., ... Matsumura, Y. (2014). Gene expression analysis using a highly sensitive DNA microarray for colorectal cancer screening. *Anticancer Research*, 34(1), 169–176.
- Leeflang, M. M. G., & Allerberger, F. 2019. How to: evaluate a diagnostic test. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(1), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.011>
- Lin, T., Liu, Z., Liu, L., Yang, L., Han, P., Zhang, P., & Wei, Q. 2017. Prospective evaluation of fluorescence in situ hybridization for diagnosing urothelial carcinoma. *Oncology Letters*, 13(5), 3928–3934. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5926>
- Lipinwati. 2014. Diagnosis molekuler Human Papilloma Virus (HPV) penyebab kanker serviks. *Jambi Medical Journal*, 2(1), 78–86.
- Liu, Y., Yang, M., Jiang, T., Lan, C., Yuan, H., Zhao, G., . 2019. Quantitative analysis of HER2 amplification by droplet digital PCR in the follow-Up of gastric cancer patients being treated with trastuzumab after surgery. *Gastroenterology Research and Practice*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/1750329>
- Loeb, L. A., Loeb, K. R., & Anderson, J. P. 2003. Multiple mutations and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(3), 776–781. <https://doi.org/10.1073/pnas.0334858100>
- Mancini, N., Carletti, S., Ghidoli, N., Cichero, P., Burioni, R., & Clementi, M. 2009. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 235–251. <https://doi.org/10.1128/CMR.00043-09>
- Maulani, H., & Bloom, D. 2015. *Sensitivitas dan Spesifisitas Polimerase Chain Reaction pada Diagnosis Her2 / Neu Karsinoma Payudara Duktal Invasif melaporkan karsinoma payudara merupakan (Chromogen In Situ Hybridization), FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Namun metode ini .* 2(3), 283–290.
- Mori, Y., & Notomi, T. 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 15(2), 62–69. <https://doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>
- NIM. 2020. The development and application of reference materials for SARS-CoV-2 Testing. *NIM Newsletter* 1: 2-5.
- Nunes, B. T. D., De Mendonça, M. H. R., De Brito Smith, D., Moraes, A. F., Cardoso, C. C., Prazeres, I. T. E., ... De Almeida Medeiros, D. B. 2019. Development of RT-qPCR and semi-nested RT-PCR assays for molecular diagnosis of hantavirus pulmonary syndrome. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(12), 1–24. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0007884>
- Park, S., Wang, H. Y., Kim, S., Ahn, S., Lee, D., Cho, Y., ... Lee, H. (2014). Quantitative RT-PCR assay of HER2 mRNA expression in formalin-fixed and paraffin-embedded breast cancer tissues. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(10), 6752–6759.
- Pavšič, J., Žel, J., & Milavec, M. 2016. Assessment of the real-time PCR and different digital PCR platforms for DNA quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(1), 107–121. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9107-2>
- Roberts, C. H., Last, A., Molina-Gonzalez, S., Cassama, E., Butcher, R., Nabicassa, M., ... Holland, M. J. (2013). Development and evaluation of a next-generation digital PCR diagnostic assay for ocular *Chlamydia trachomatis* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7), 2195–2203. <https://doi.org/10.1128/JCM.00622-13>
- Sahoo, P. R., Sethy, K., Mohapatra, S., & Panda, D. 2016. Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases. *Veterinary World*, 9(5), 465–469. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.465-469>

- Sanders, R., Mason, D. J., Foy, C. A., & Huggett, J. F. (2014). Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analysing clinical samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(26), 6471–6483. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7857-x>
- Savitri, E. & Mubarika SH .2012. Profil viral load Ebstein-Barr virus dan titer antibodi IgA (VCA-P18+EBNA-1_ pada karsinoma nasofaring di Makassar dan Yogyakarta. *Journal of The Indonesian Medical Association*, 62(5), 174–177.
- Shukla, K. K., Sharma, P., & Misra, S. 2019. Molecular diagnostics in cancer patients. In *Molecular Diagnostics in Cancer Patients*. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-5877-7>
- Simundic, A. M. 2009. Measures of diagnostic accuracy: basic definitions. *Ejifcc*, 19(4), 203–211. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27683318> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4975285/pdf/ejifcc-19-203.pdf>
- Sugimura, T., Terada, R., Yokota, J., Hirohashi, S., & Wakabayashi, K. (1992). Multiple genetic alterations in human carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 98(11), 5–12. <https://doi.org/10.1289/ehp.92985>
- Tantiwettrueangdet, A., Panvichian, R., Wongwaisayawan, S., Sueangoen, N., & Lertsithichai, P. 2018. Droplet digital PCR using HER2/EIF2C1 ratio for detection of HER2 amplification in breast cancer tissues. *Medical Oncology*, 35(12), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s12032-018-1210-8>
- Van Stralen, K. J., Stel, V. S., Reitsma, J. B., Dekker, F. W., Zoccali, C., & Jager, K. J. 2009. Diagnostic methods I: Sensitivity, specificity, and other measures of accuracy. *Kidney International*, 75(12), 1257–1263. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.92>
- Wang, Y., Tsang, J. Y. S., Cui, Y., Cui, J., Lin, Y., Zhao, S., ... Ke, Z. 2017. Robust and accurate digital measurement for HER2 amplification in HER2 equivocal breast cancer diagnosis. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07176-x>
- Wei, C., Wen-En, L., Yang-Ming, L., Shan, L., & Yi-Ming, Z. (2015). Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification in detection of *Clostridium difficile* in stool samples: a meta-analysis. *Archives of medical science: AMS*, 11(5), 927.
- WHO. (2018). Noncommunicable Disease. Geneva : *World Health Organization*.
- Witari, N. P. D. 2014. In Situ Hybridization Pada Kanker Payudara. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan Indonesia*, 6(3), 158–165. <https://doi.org/10.20885/jkki.vol6.iss3.art7>
- Wu, L., Williams, P. M., & Koch, W. H. 2005. Clinical applications of microarray-based diagnostic tests. *BioTechniques*, 39(4), 577–582.
- Wu L, Williams M, Koch WH. 2018. Clinical applications of microarray-based diagnostic tests. *Biotechniques* (39) 4S.
- Xiang, Y.J., Fu, Q.Y., Ma, Z.B., Gao, D.Z., Zhang, Q., Li, Y.Y., ... Guo, M.M. 2015. Screening for candidate genes related to breast cancer with cDNA microarray analysis. *Chronic Diseases and Translational Medicine*, 1(2), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2015.02.001>
- Young, D., Tatarian, L., Mujtaba, G., Chow, P., Ibrahim, S., Joshi G., ... Hussain K., Chendrasekhar A. (2020). Chest CT versus RT-PCR for Diagnostic Accuracy of COVID-19 Detection: A Meta-Analysis. *Journal of Vascular Medicine & Surgery*, 8(4), 1–4. <https://doi.org/10.35248/23296925.20.8.392>
- Zappacosta, R., Colasante, A., Viola, P., D'Antuono, T., Lattanzio, G., Capanna, S., ... Rosini, S. (2013). Chromogenic in situ hybridization and p16/Ki67 dual staining on formalin-fixed paraffin-embedded cervical specimens: Correlation with HPV-DNA test, E6/E7 mRNA test, and potential clinical applications. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/453606>
- Zhu, W., Zeng, N., & Wang, N. 2010. Sensitivity, specificity, accuracy, associated confidence interval and ROC analysis with practical SAS® implementations. In *Northeast SAS Users Group 2010: Health Care and Life Sciences*.
- Zoppoli, G., Garuti, A., Cirmena, G., di Cantogno, L. V., Botta, C., Gallo, M., ... Ballestrero, A. 2017. Her2 assessment using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction reliably identifies HER2 overexpression without amplification in breast cancer cases. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1195-7>