

LAMP (İzotermal Döngü Aracılı Amplifikasyon) Yöntemi ile Patojen Tespit Sistemi Pathogen Detection System with LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) Method

Hülya Eraslan Gültekin^{1,2}, Bora Ayvaz², Sümeyra Vural Kaymaz³, Meltem Elitaş³, Ali Fuat Ergenç²

¹Mekatronik Mühendisliği Bölümü, Fen Bilimleri Enstitüsü
İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul
eraslanhu@itu.edu.tr

²Kontrol ve Otomasyon Mühendisliği Bölümü
İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul
ayvazb17@itu.edu.tr
ergenca@itu.edu.tr

³Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi
Sabancı Üniversitesi, İstanbul
sumeyra@sabanciuniv.edu.tr
melitas@sabanciuniv.edu.tr

Özetçe

Günümüzde biyosensör ile ilgili yapılan çalışmalara ilgi hızla artmaktadır. Özellikle 2019 yılı sonlarından beri mücadele ettiğimiz Covid-19 virüsü biyosensörlerin hayatımızdaki önemini bir kez daha hatırlatmıştır. Günlük yaşamın her alanında kullanılabilecek, hastalıkların yayılımını önleyecek, hızlı ve güvenilir patojen algılama sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu konuda nükleik asit amplifikasyonu yöntemleri üzerindeki çalışmalar önem kazanmıştır. Bunlardan ilki yaygın olarak bilinen PCR (Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonlu), diğeri ise LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification- Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon) tekniğidir. Bu çalışmada, LAMP yöntemi incelenerek, uygulama aşamaları ve gerekli ısıtıcı tasarımı üzerinde durularak *Escherichia coli* (*E. coli*) bakteri tespiti yapılmaktadır. Isıtıcı sistem PLC üzerinden kontrol edilip, istenilen sabit sıcaklık değerinde tutularak LAMP reaksiyonunun gerçekleşmesi sağlanmaktadır.

Abstract

Nowadays, interest in studies on biosensors is rapidly increasing. Especially the Covid-19 virus, which we have been fighting since the end of 2019, has once again reminded us of the importance of biosensors in our lives. There is a need for fast and reliable pathogen detection systems that can be used in all areas of daily life and prevent the spread of diseases. In this regard, studies on nucleic acid amplification methods have gained importance. The first of these methods is the widely known PCR (Polymerase Chain Reaction), and the other is the LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) method. In

this study, *Escherichia coli* (*E. coli*) bacteria detection is carried out by examining the LAMP method, focusing on the application stages and the necessary heater design. The heating system is controlled via PLC and the LAMP reaction is realized by keeping the desired constant temperature value.

1. Giriş

Zararlı mikroorganizmaların tespitinde kullanılan çeşitli yöntemler vardır. Bu yöntemler genellikle tespit edilmek istenilen mikroorganizmanın yapısına uygun biyolojik tanıma elemanı seçimine göre sınıflandırılmaktadır. Çeşitli analitlere (patojen vd.) bağlanan biyolojik tanıma elemanları olarak; proteinler, aptamerler, nükleik asitler, bakteriler, metal iyonları, peptidler, enzimler ve antikorlar gibi biyomoleküller literatürde yaygın olarak kullanılmıştır (Bhalla vd., 2016; Cesewski ve Johnson, 2020).

Biyolojik tanıma elemanının seçimi, biyolojik algılayıcının özgünlüğünü belirlediği için oldukça önemlidir. İhtiyaç duyulan en önemli özellikler yüksek seçicilik ve afinite olmalarıdır. Bu çalışmada bu özellikleri karşılayacak, literatürde çeşitli sistemlerde kullanılan nükleik asit amplifikasyonu yöntemi kullanılacaktır. Nükleik asit amplifikasyonu, çoğu gen tabanlı tespit yöntemi ve teşhis teknolojilerinin geliştirilmesinde kullanılan ilk adımdır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bazlı nükleik asit amplifikasyonu 1983 yılında Kary Mullis tarafından tasarlanmıştır (Mullis, K. B., 1990). PCR, termal döngüleyici kullanarak bir DNA zincirinin belirli bir bölgesinden DNA amplifikasyonu sağlar. Ayrık sıcaklık adımlarıyla (50°C-98°C) 20-40 tekrarlanan termal değişimden oluşur ve reaksiyonlar çoğunlukla birkaç saat içinde gerçekleşir. PCR amplifikasyon

ürünleri genellikle jel elektroforezi ile görselleştirilir. Bu yöntem, nükleik asit tespiti için altın standart olması ve laboratuvar koşulları için uygulanabilir olmasına rağmen, emek ve zaman alıcıdır, hacimli ve pahalı aletler ile eğitilmiş personel gerektirir.

LAMP tekniği tıpkı PCR gibi bir DNA amplifikasyonu yoluyla tespit yapabilmektedir. Hedef dizide 6 ile 8 farklı bölgeyi tanıyan 4 ile 6 primer kullandığından, diziyeye özgü amplifikasyon durumunda PCR' a istisnai özgülüğe sahip daha basit ancak güçlü bir alternatif olarak öne çıkmaktadır. LAMP, sabit bir sıcaklıkta (60-65 °C) gerçekleştirilir, termal döngü ihtiyacını ortadan kaldırır, daha hızlıdır ve biyolojik numunelerde yaygın olarak bulunan inhibitörlerden daha az etkilenir (Papadakis, G. vd., 2020).

LAMP ve PCR, binlerce DNA kopyası üretmek için kullanılan in vitro amplifikasyon teknikleridir. LAMP' te üretilen DNA miktarı, RT-PCR gibi PCR tekniklerinde üretilen miktardan çok daha fazladır. LAMP, PCR tekniğine göre daha yeni bir tekniktir. Ancak eğitilmiş bir bilim adamının laboratuvar koşullarında gerçekleştirmesi teknik olarak basit ve kolaydır. Bu, onu COVID-19' un tespiti için de potansiyel olarak yararlı bir teknik haline getirmiştir.

LAMP tekniği, PCR ile karşılaştırıldığında hızlıdır. LAMP' te amplifikasyon yoluyla DNA kopyaları üretmek için yaklaşık 30dk' lık bekleme süresi gereklidir. PCR' daki bir dizi değişken sıcaklık döngüsü yerine LAMP' te sabit bir sıcaklık yaklaşık 60-65°C kullanır. LAMP, yüksek saflıkta DNA izolatlarına ihtiyaç duymaz. Böylelikle bu yöntemde zamandan ve maliyetten tasarruf sağlanır.

Literatürde stabil LAMP reaksiyonları sağlamak için çeşitli cihazlar geliştirilmiştir (Kaygusuz, D. vd., 2019; Jaroenram, W., 2019; Sayad, A. A. vd., 2018; Seo, J. H. vd., 2017). Bu çalışmalarının bazıları primer tasarımı (Goto, M., 2009; Mori, Y., 2001; Jaroenram, W., 2019), bazıları hassas okumalar elde etmek için görselleştirme metodolojisine (Kaygusuz, D., 2019; Papadakis, G., 2020; Seo, J. H., 2017) odaklanmıştır. Tespitler çoğunlukla çıplak gözle veya kameralarla bulanıklığın spektroskopik tespiti ile belirlenmiştir. LAMP reaksiyonları, genellikle su banyoları, ısı blokları veya fırınlar gibi kullanımı basit, düşük maliyetli ekipmanlarla gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Ancak bu aletlerin boyutları büyük ve kullanımları pratik değildir. Ayrıca, bazı durumlarda nükleik asit ekstraksiyonu, LAMP reaksiyonlarının hazırlanması ve tespitlerin yorumlanması için genellikle eğitilmiş bir kişiye ihtiyaç duyulmaktadır. COVID-19 vakalarının tespiti ve teşhisinde son zamanlarda hızlı, güvenilir ve kullanıma hazır testler için teşhis tahlillerinin ve teknolojilerinin laboratuvarlardan numune toplama noktalarına geçişi hızlanmıştır (Papadakis, G., 2020; Poschenrieder, A., 2019; Budd, J., 2020; Poschenrieder, A., 2019). Papadakis ve arkadaşları, klinik biyopsi örneklerinden COVID-19 teşhisi için kullanılacak gerçek zamanlı kolorimetrik LAMP sistemini geliştirmişlerdir. Benzer şekilde, bakteriyel patojenlerin tespiti için tam otomatik, düşük maliyetli, hızlı ve taşınabilir LAMP tahlillerinin geliştirilmesi hala başlangıç seviyesindedir. Yan' ın grubu gıda güvenliğine odaklanmış ve laboratuvar ekipmanı kullanarak 116 *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ve *Listeria monocytogenes*' in bakteri kültürü ve bakteri kolonileri için LAMP testi uygulamışlardır (Yan, M. vd., 2017) Bakteri kolonileri veya kültürlerinden herhangi bir DNA ekstraksiyonu ve saflaştırması olmadan hedef DNA'nın LAMP amplifikasyonunu

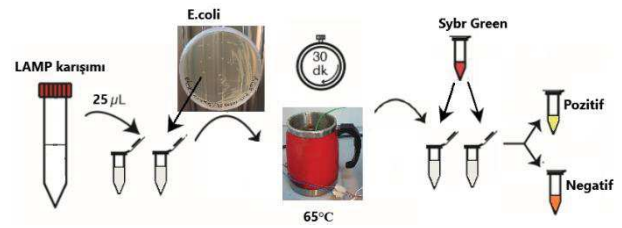
gerçekleştirmişlerdir. Laboratuvar gerektirmeyen LAMP reaksiyonları için Sayad ve arkadaşları (2017), *Salmonella* eklenmiş domates numunelerini tespit etmek için bir santrifüj mikroakışkan platformu geliştirmişlerdir. Reaksiyonların termal stabilitesini etkileyebilecek ve tekrarlanamayan sonuçları tetikleyebilecek bir LAMP reaksiyonu için gereken sabit sıcaklığı koruyacak bir sıcak hava tabancası kullanmışlardır. Seo ve arkadaşları (2017) tarafından karşılaştırılabilir bir çalışma yapılmıştır. *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* ve *Vibrio Parahaemolyticus* numunelerini kullanarak multiplaks patojen tespiti için kolorimetrik, yüksek verimli santrifüj LAMP mikro cihazı kullanmışlardır. Dijital döngü aracı izotermal amplifikasyon analizi için emülsiyon damlacıkları oluşturabilen ve yakalayabilen birkaç mikroakışkan çip geliştirilmiştir (Ma, Y. D., vd. 2018; Wan, L., vd. 2019). Bu teknolojilerin altında yatan motivasyon düşük tespit limitleridir. Ancak karmaşıklıkları, yüksek maliyetleri ve yüksek teknik ekipmana ihtiyaç duymaları dezavantajları arasındadır.

LAMP tekniğinin hızlı, güvenilir, sağlam ve kullanımı kolay özelliklerinden yararlanmak için, nükleik asit ekstraksiyonu, LAMP reaksiyonu ve algılama okumasını birleştirebilen taşınabilir, düşük maliyetli, kullanıcı dostu platformlar hala oldukça sınırlıdır(REF).

2. LAMP Yöntemi

LAMP tekniği, bakteri, virüs gibi hastalık yapan ve insan yaşamını tehdit eden çeşitli patojenlerin tespitinde kullanılan hızlı, pratik ve doğruluğu yüksek bir yöntemdir..

LAMP yöntemi, hedef dizide 6 ile 8 farklı bölgeyi tanıyan 4 ya da 6 primer kullanılarak sabit bir sıcaklıkta (60-65°C) termal döngüye ihtiyaç duymadan nükleik asit amplifikasyonu gerçekleştirir. Bu reaksiyon için LAMP karışımı hazırlanması gerekmektedir. Bu karışım; Bst 2.0 Warm Start DNA Polymerase (Thermopol Buffer 2.5µl, *MgSO₄* 1.5 µl, dNTPs 1.4µl, Bst 1µl) 16.1µl nükleaz içermeyen su, 2.5µl primer içeren 25µl' lik bir karışımdır. Primer karışımı, iki iç primer (1.6 µl, FIP ve BIP), iki dış primer (0.2 µl, F3 ve B3), iki döngü primeri (0.4 µl, LoopF ve LoopB)' den oluşmaktadır. LAMP reaksiyonları, 30 dakika boyunca 65°C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Yöntemin uygulama aşamaları Şekil 1' de gösterilmiştir.



Şekil 1: LAMP reaksiyon işlem basamakları.

Şekil 1' de de görüldüğü gibi verilen protokole göre oluşturulan LAMP karışımından 25 µl appendorf tüplere eklenir, ısıtma işleminden önce tüplerden birine pozitif numune (1 koloni *E. coli*), diğeri negatif ve diğer tüplere de ölçülmek istenen örnek eklenerek tüpler ısıtıcı sisteme konur. 65°C sabit sıcaklıkta 30 dakika bekletilerek nükleik asit amplifikasyonunun gerçekleşmesi sağlanır. 30 dakika

inkübasyon sonunda sonra 10µl Sybr Green boya eklenerek pozitif örnek bulunan tüplerde renk değişimi gözlemlenir.

3. Isıtıcı Sistem Tasarımı ve Kontrolü

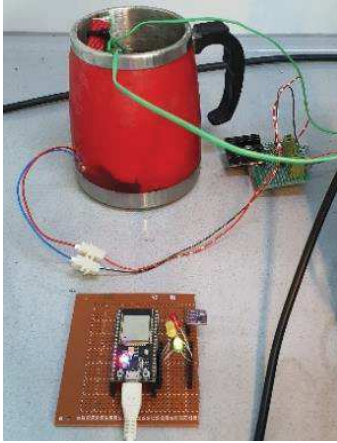
LAMP reaksiyonlarının istenilen sabit sıcaklıkta gerçekleşmesi amacıyla endüstriyel standartlara uygun sıcaklık kontrol düzeneği tasarımı ve gerçekleştirilmesi yapılmıştır. Sıcaklık kontrol sisteminin sahip olduğu özellikler şu şekildedir:

- Basamak referans sıcaklık kontrolü
- Rampa referans sıcaklık kontrolü
- Kontrolör parametresi tayini
- Ortam sıcaklığı ve nemi takibi
- Endüstriyel sistem donanımı
- İnternet üzerinden erişilebilir kullanıcı arayüzü
- Güvenlik önlemleri

Sıcaklık kontrol sistemi; sistem donanımı, kontrol sistemi, sistem otomasyonu, internet tabanlı kullanıcı arayüzü başlıkları altında incelenebilir.

3.1. Sistem Donanımı

Sıcaklık kontrol sistemi donanımında endüstriyel kontrolör, endüstriyel giriş/çıkış modülleri, 0-24V PWM üretici, sıcaklık sensörleri ve nem sensörü bulunmaktadır. LAMP deneyleri, doğru akım ile sıcaklığı kontrol edilebilen bir konteyner içerisinde gerçekleştirilmektedir. Sıcaklık kontrolünün gerçekleştirildiği konteyner, konteyner direncini süren 0-24V PWM üretici ve ortam sıcaklık-nem ölçüm sistemi Şekil 2' de görüldüğü gibidir.



Şekil 2: Sıcaklık kontrol sistemi.

Sistemde bulunan ana kontrolör, matematiksel kontrolörlerin ve kumanda devrelerinin gerçekleştirilmesinde, sensör verilerinin okunması ve kaydedilmesinde görev almaktadır. Kontrolör, bu görevlere uygun olacak şekilde endüstriyel standartlarda seçilmiştir. Test düzeneğinde ana kontrolcü olarak Allen-Bradley ControlLogix kontrolör kullanılmıştır. Bu kontrolör tüm kontrol yazılımlarını içerisinde bulundurmakta ve sistem giriş/çıkışlarını düzenlemektedir. Ayrıca kontrolöre seri olarak 1 analog giriş, 1 analog çıkış, bir dijital giriş ve 1 dijital çıkış modülü eklenmiştir. Sistemin kontrolör yapısı Şekil 3' te görüldüğü gibidir.

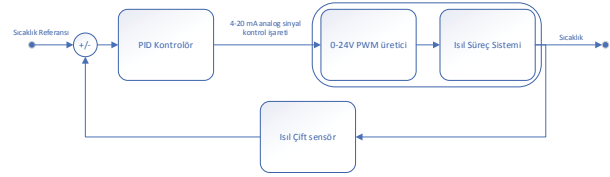


Şekil 3: Sistem kontrolör yapısı.

Sistemde 2 adet K tipi ısı çift sıcaklık sensörü kullanılmıştır. Isıl çift sensörlerinden bir tanesi konteyner sıcaklığının ölçümünde, bir tanesi ise konteyner içerisinde bulunan sıvının sıcaklığının ölçümünde kullanılmıştır. Ayrıca konteyner dışındaki ortam sıcaklığının ve ortam neminin ölçülmesinde SHT31 sensörü kullanılmıştır. SHT31 sensörünün okunması, verisinin işlenmesi ve veri haberleşmesi yöntemleri ile kullanıcı arayüzüne iletilmesinde ESP32 mikrokontrolör kullanılmıştır.

3.2. Kontrol Sistemi

Sistemde bulunan kontrol sistemi, bir PID kontrolör ile kapalı çevrime alınan ısı süreç sisteminden oluşmaktadır. Geribesleme aracı olarak ise çıkışı °C sıcaklık cinsinde anlamlandırılan K tipi ısı çift sensörleri ile yapılmaktadır. Kontrol sisteminin geribesleme aracı olan ısı çiftin konteyner sıcaklığını ölçen ısı çift mi ya da sıvı sıcaklığını ölçen ısı çift mi olacağı kullanıcı tarafından seçilebilmektedir. Sistemin kontrol diyagramı Şekil 4' te verilmektedir.



Şekil 4: Sıcaklık kontrol diyagramı.

Şekil 4' te görülen ısı süreç sistemi konteyner ve konteyner içerisine koyulan sıvıdan oluşan, matematiksel olarak 1. Derece transfer fonksiyonu ile ifade edilebilen sistemdir. Isıl süreç sisteminin parametrik transfer fonksiyonu modeli denklem 1' de görüldüğü gibidir.

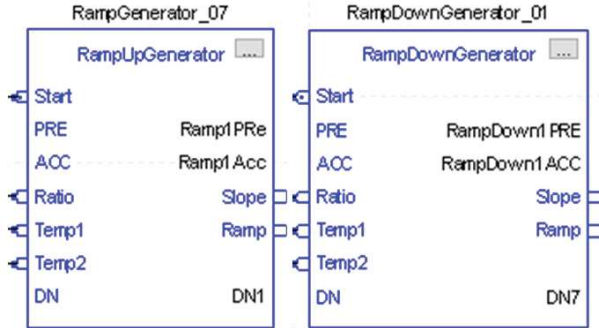
$$T(s) = \frac{R_t}{R_t C_{sıvı} s + 1} \quad (1)$$

Denklem 1' de görülen transfer fonksiyonu modelindeki R_t ifadesi konteynerin ısı direncine, $C_{sıvı}$ ifadesi ise konteyner içerisine konulan sıvının ısı kapasitesi katsayısına karşılık gelmektedir. Konteyner içerisine konulan sıvının değişmesi durumunda PID kontrolörün kontrol parametreleri kullanıcı tarafından değiştirilebilmektedir.

3.3. Sistem Otomasyonu

Sistem otomasyonu, istenilen sürece uygun kontrol referanslarının oluşturulabilmesi, deney parametrelerinin test sürecinde sabit kalması, veri kaydı yapılabilmesi, uzun soluklu testlerin gerçekleştirilebilmesi ve farklı süreç senaryolarının uygulanabilmesi hedeflenerek yapılmıştır.

Farklı süreç senaryoları, kontrol sisteminin referansına göre oluşturulmaktadır. Kullanıcı tercihinin göre kontrol sistemi referansı basamak giriş veya rampa giriş olabilmektedir. Bu tercihler ve referans üreticileri sistemin otomasyon yazılımında gerçekleştirilmiştir. Yazılımda rampa giriş üretici olarak oluşturulan fonksiyon blokları Şekil 5’ te yer almaktadır.



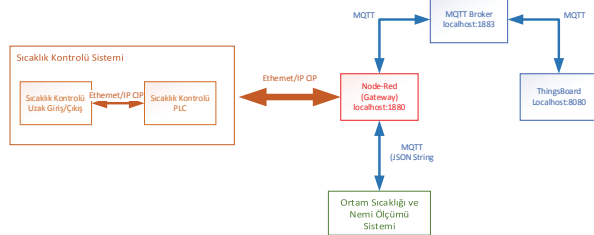
Şekil 5: Rampa referans blokları.

Şekil 5’ te görülen rampa referans blokları giriş olarak başlangıç sıcaklık değeri, bitiş sıcaklık değeri, sıcaklık artışı eğimi bilgilerini alarak bu değerlere göre rampa referans üretmektedir.

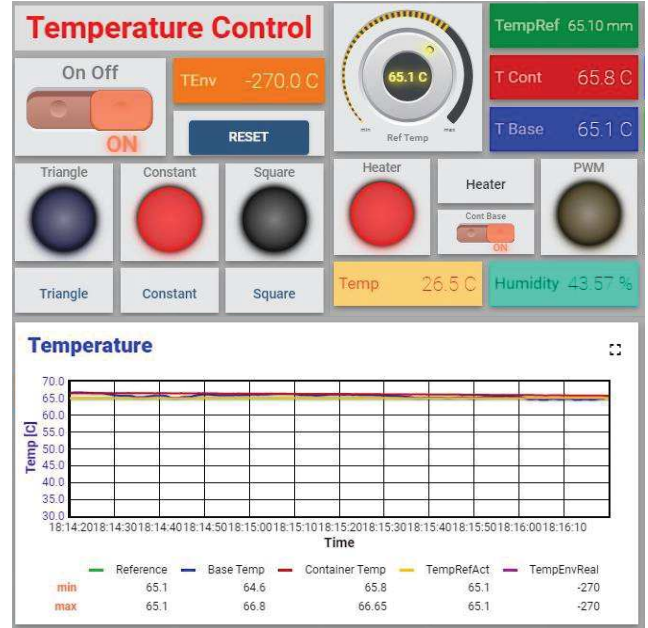
Ayrıca sistem otomasyonunda çeşitli kumanda devreleri ve yazılımlar ile çeşitli güvenlik önlemleri geliştirilmiştir. Bu güvenlik önlemlerine göre sistemin çalıştırılabilmesi ve sürdürülebilmesi için güvenlik koşulları karşılanmalıdır. Herhangi bir anda güvenlik koşullarının bozulması durumunda sistem kendini durdurarak güvenli durumuna geri dönmektedir.

3.4. İnternet Tabanlı Kullanıcı Arayüzü

Sistemde kullanıcı deneyiminin artırılması ve deney verilerine erişimin kolaylaşması için endüstriyel veri haberleşmesi altyapısı kurulmuş, endüstriyel nesnelerin interneti çözümleri uygulanmış ve internet ara yüzü tasarlanmıştır. Sistemler arasındaki haberleşme diyagramı Şekil 6’ da, sistem kullanıcı ara yüzü Şekil 7’ de yer almaktadır.



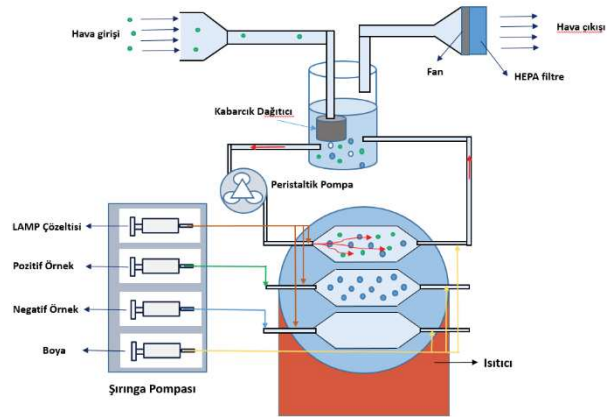
Şekil 6: Sistemler arası haberleşme diyagramı.



Şekil 7: Sistem kullanıcı arayüzü.

3.5. Deney Düzenneği

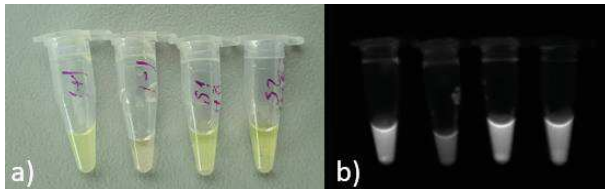
LAMP yöntemi ile ortamda bulunan patojen tespiti sağlamak için öncelikle ortam havasının örneklenmesi gerekmektedir. Bunun için tasarlanan hava örnekleme düzeneği, çip dizaynı, şırınga pompası modeli ve ısıtıcı sistem modeli Şekil 8’ de yer almaktadır.



Şekil 8: LAMP yöntemi ile patojen tespit sistemi.

4. Sonuçlar

Tasarlanan ısıtıcı sistem ile gerçekleştirilen LAMP deneyi sonuçları Şekil 9’ da verilmektedir. Şekil 9.a) LAMP reaksiyonu gerçekleşmiş tüpleri, Şekil 9.b) bu numunelerin UV ışık altındaki görüntülerini içermektedir. Bu deneyde sırasıyla 1. tüp pozitif numune, 2. tüp negatif numune, 3. tüp hava örnekleme alınan LB besiyerine 1 koloni *E.coli* eklenmiş numune ve 4. tüp ise hava örnekleme alınan LB besiyerine 5 koloni *E.coli* eklenmiş numunelerdir.



Şekil 9: a) LAMP yöntemi uygulaması, b) LAMP yöntemi UV görüntülemesi.

Bu çalışmada LAMP reaksiyonlarının istenilen sabit sıcaklıkta gerçekleşmesi için tasarlanan ve sıcaklık kontrolü stabil olarak sağlanan ısıtıcı sistem, patojen algılama sistemi için oldukça önemli bir aşamadır. Bu ısıtıcı sistem maliyeti düşük, kontrolü kolay ve taşınabilir sistemlere dönüştürülebilir niteliktedir. Bu tür sistemler biyosensör teknolojisinin gelişmesine, insan yaşamını tehdit eden çeşitli bakteri, virüs vb. patojenlerin erkenden tespit edilmesine ve salgınların önlenmesine katkı sağlamaktadır. Hızlı ve güvenilir sonuçlar elde edilebilecek yöntemler ve cihazlar toplum sağlığı açısından oldukça önem arz etmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma 43498 proje numarası ile İTÜ BAP Birimi tarafından desteklenmiştir. LAMP deneyleri başlangıç aşamasında Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi laboratuvarında yürütülmüştür. Bu destekler için teşekkürlerimizi sunarız.

Kaynakça

- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>.
- Budd, J., Miller, B. S., Manning, E. M., Lampos, V., Zhuang, et al. (2020). Digital technologies in the public-health response to COVID-19. *Nature medicine*, 26, 1183-1192. doi:10.1038/s41591-020-1011-4.
- Cesewski, E., & Johnson, B. N. (2020). Electrochemical biosensors for pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 112214.
- Jaroenram, W., Cecere, P., & Pompa, P. P. (2019). Xylenol orange-based loop-mediated DNA isothermal amplification for sensitive naked-eye detection of *Escherichia coli*. *Journal of microbiological methods*, 156, 9-14. doi:10.1016/j.mimet.2018.11.020.
- Kaygusuz, D., Vural, S., Aytekin, A. O., Lucas, S. J., Elitas, M. (2019). DaimonDNA: A portable, low-cost loop-mediated isothermal amplification platform for naked-eye detection of genetically modified organisms in resource-limited settings. *Biosensors & Bioelectronics*, 141, 111409. doi:10.1016/j.bios.2019.111409.
- Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., & Hanaki, K. (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques*, 46, 167-172. doi:10.2144/000113072.
- Ma, Y. D., Luo, K., Chang, W. H., Lee, G. B. (2018). A microfluidic chip capable of generating and trapping emulsion droplets for digital loop-mediated isothermal

amplification analysis. *Lab on a chip*, 18, 296-303. doi:10.1039/c7lc01004d.

- Mullis, K. B. (1990). Recombinant DNA technology and molecular cloning. *Scientific American*, 262, 181-231.)
- Papadakis, G. et al. (2020). Real-time colorimetric LAMP methodology for quantitative nucleic acid detection at the point-of-care bioRxiv. doi:10.1101/2020.07.22.215251.
- Poschenrieder, A., Thaler, M., Junker, R., Luppa, P. B. (2019). Recent advances in immunodiagnosics based on biosensor technologies—from central laboratory to the point of care. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 411, 7607-7621. doi:10.1007/s00216-019-01915-x.
- Sayad, A. A., Ibrahim, F., Mukim Uddin, S., Cho, J., Madou, M., Thong, K. L. (2018). A microdevice for rapid, monoplex and colorimetric detection of foodborne pathogens using a centrifugal microfluidic platform. *Biosensors & Bioelectronics*, 100, 96-104. doi:10.1016/j.bios.2017.08.060.
- Seo, J. H., Park, B. H., Oh, S. J., Choi, G., Lee, E. Y., & Seo, T. S. (2017). Development of a high-throughput centrifugal loop-mediated isothermal amplification microdevice for multiplex foodborne pathogenic bacteria detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 246, 146-153. doi:10.1016/j.snb.2017.02.051).
- Wan, L., Gao, J., Chen, T., Dong, C., Li, H., Wen, Y. Z., Lun, Z. R., Jia, Y., Mak, P. I., Martins, R. P. (2019). LampPort: a handheld digital microfluidic device for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biomedical microdevices*, 21, 9. doi:10.1007/s10544-018-0354-9.
- Yan, M., Li, W., Zhou, Z., Peng, H., Luo, Z., Xu, L. (2017). Direct detection of various pathogens by loop-mediated isothermal amplification assays on bacterial culture and bacterial colony. *Microbial pathogenesis*, 102, 1-7. doi:10.1016/j.micpath.2016.10.025.