



Salmonella spp. tespiti için ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) ile kombine üç boyutlu (3B) yazıcıda mikroakışkan çip imalatı

Meltem Eryıldız¹, Vildan Bilgiç², Seda Ekici³, Akın Yiğın⁴, Mehmet Demirci⁵

¹ Beykent Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

² Teknigen Biyoteknoloji, İstanbul, Türkiye

³ Veteriner Kontrol Merkezi Araştırma Enstitüsü, Ankara, Türkiye

⁴ Harran Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Sanlıurfa, Türkiye

⁵ Kırklareli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırklareli, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 19.07.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 10.11.2022

Özet: Gıda ve çevresel kaynaklarda Salmonella'nın hızlı, güvenilir ve hassas tespiti, halk sağlığını korumak için çok önemlidir. LAMP yöntemi özel cihazlara ve deneyimli personele ihtiyaç duymaksızın uygulanabilecek bir yöntem olduğu için son yıllarda sıklıkla tercih edilmektedir. LAMP'in, mikroakışkan cihazlarla kombine edilmesi sınırlı kaynakların olduğu durumlarda, hızlı tanı testleri için bir alternatiftir. *Salmonella spp.* tespiti için, üç boyutlu yazıcıda biyoyoumlu PLA filament kullanılarak mikroakışkan çip oluşturularak, ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon yöntemi ile kombine edilmesi amaçlanmıştır. Mikroakışkan çipler CATIA V5 programı kullanılarak tasarlandı (Çip boyutları 15x12.5x2.4 mm, kanal çapı 850 µm) ve PLA filament kullanılarak 3B yazıcıda üretildi. Salmonella spesifik LAMP reaksiyonları için *InvA* geni seçildi. Mikroakışkan çipler için kuru ısı bloğu kullanıldı ve LAMP protokolü 65°da 30 dak.ydı. Testin duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD ölçümleri gerçekleştirildi. Kültür yöntemi ile *Salmonella* pozitif saptanan 25 pozitif numune arasında, mikrosantrifüj tüpünde uygulanan LAMP reaksiyonu ile sadece bir numunede yalancı negatif sonuç saptanmışken, mikroakışkan çip üstünde uygulanan LAMP reaksiyonunda ise iki numune yalancı negatif olarak tespit edildi. Sonuç olarak; verilerimiz LAMP reaksiyonları ile mikroakışkan çip teknolojisinin birleştirilebileceğini, üç boyutlu yazıcıların bu mikroakışkan çiplerin üretimi sırasında kullanılabileceğini bize göstermiştir.

Anahtar kelimeler: LAMP, mikroakışkan, Salmonella, 3D.

Microfluidic chip fabrication in three-dimensional (3D) printer combined with loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Salmonella spp.*

Abstract: Rapid, reliable and sensitive detection of Salmonella in food and environmental sources is essential to protect public health. LAMP method has been preferred frequently in recent years because it is a method that can be applied without the need for special devices and experienced personnel. Combining LAMP with microfluidic devices is an alternative for rapid diagnostic testing where resources are limited. Aim of this study was to create a microfluidic chip using a biocompatible PLA filament in a three-dimensional printer and to be combined with the loop-mediated isothermal amplification method for the detection of *Salmonella spp.* Microfluidic chips were designed using the CATIA V5 program (chip dimensions 15x12.5x2.4 mm, channel diameter 850 µm) and fabricated on a 3D printer using PLA filament. *InvA* gene was selected for *Salmonella* specific LAMP reactions. Dry heat block was used for microfluidic chips and LAMP protocol was 30 min. at 65°. Sensitivity, specificity, PPV and NPV measurements of the test were performed. Among the 25 positive samples that were found to be Salmonella positive by the culture method, only one sample showed a false negative result with the LAMP reaction applied in the microcentrifuge tube, while two samples were detected as false negative in the LAMP reaction applied on the microfluidic chip. As a conclusion, Our data has shown us that LAMP reactions and microfluidic chip technology can be combined, and that three-dimensional printers can be used during the production of these microfluidic chips.

Keywords: LAMP, Salmonella, Microfluidic, 3D

Giriş

Akut ishal, dünya sağlık örgütü raporlarına göre her yıl 2 milyar insanı etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. Bu vakaların üçte birinde enfeksiyon kaynağı olarak, gıda ön plandadır (Popa ve Papa, 2021).

Salmonelloz, insanlarda yaygın olarak bildirilen bir gastrointestinal enfeksiyondur ve gıda kaynaklı salgınların önemli bir nedenidir (Gambino ve ark., 2022). Salmonella türü bakteriler Salmonelloz enfeksiyonlarının etkenidir ve potansiyel olarak çok farklı

Yazışma adresi / Correspondence: Seda Ekici, Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No: 23-1 06200, Keçiören-Ankara
e-posta: seda.ergen@hotmail.com

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0002-2683-560X • ²0000-0003-0354-6378 • ³0000-0002-7982-5261 • ⁴0000-0001-9758-1697
⁵0000-0001-9670-2426

konakları enfekte edebilen Gram negatif, basil şekilli, fakültatif hücre içi bakterilerdir. *Salmonella* cinsi, *Salmonella bongori* ve *Salmonella enterica* olmak üzere iki türden oluşur. *Salmonella enterica subsp. enterica*, insan ve hayvanlarda farklı salmonelloz formlarına neden olan en yaygın patojenik ve zoonotik bakterilerdir (Gebeyehu ve ark., 2022). Enfeksiyon tipik olarak kontamine yiyecek veya suyun tüketilmesi sonrasında ortaya çıkar. *Salmonella* enfeksiyonlarının %95'inin kontamine gıda maddelerinin tüketiminden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle gıda ve çevresel kaynaklarda *Salmonella'nun* hızlı, güvenilir ve hassas tespiti, halk sağlığını korumak için çok önemlidir (Bell ve ark., 2016). Ayrıca gıda ürünlerinin yerinde ve ekonomik olarak izlenmesine olanak sağlayacak taşınabilir ufak cihazların geliştirilmesi de bu nedenle ilgi çekmektedir.

Kültür yöntemlerine göre moleküler yöntemler arasında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), uzun süredir, yaygın olarak kullanılan ve kabul edilen bir yöntem olarak görülmektedir fakat PCR reaksiyonlarının güvenilirliği amplifikasyon süresi, termal homojeniteye bağımlıdır. Bu ısı döngüsünün ve sürenin değişmemesi minyatür cihazların oluşmasını sınırlamaktadır (Garrido-Maestu ve ark., 2017). Basitliği ve düşük bütçeleri nedeniyle izotermal amplifikasyon ve bunlar arasında özellikle ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP: Loop-mediated isothermal amplification) ilgi odağı olmuştur (Garrido-Maestu ve ark., 2017, Notomi ve ark., 2000). LAMP yöntemi 2000 yılında geliştirilen, PCR, real-time PCR ve dizileme yöntemleri gibi özel cihazlara ve deneyimli personele ihtiyaç duymaksızın güvenilir kullanılabilir ve bu yöntemlerden daha hızlı bir hedef nükleik asit çoğaltma yöntemidir (Notomi ve ark., 2000). Bu özelliklerinden dolayı özellikle LAMP yöntemi hasta başı tanı (POC: Point of Care diagnostic) kiti sistemlerinin temelini oluşturabilmekte ve pek çok patojen için özgün tasarımlarla kullanılabilir (Njiru, 2012). Mikroakışkan cihazlar, küçük hacimli sıvıların akışını kontrol edebilmek için ölçek boyutları 1 mm veya daha küçük olan kanallar ve bölmeler içeren minyatürize cihazlar ve üretimi için kullanılan teknolojiye verilen isimdir. Özellikle moleküler tekniklerin, bu cihazlarla birleştirilmesi, sağlık hizmetlerine erişimin sınırlı olduğu noktalarda veya sınırlı kaynakların olduğu durumlarda, hızlı tanı testinin gerçekleştirilebilmesi için önemli bir seçenek sunabilecektir (Mejía-Salazar ve ark., 2020). Yumuşak litografi, mikro işleme, kabartma ve enjeksiyonlu kalıplama gibi geleneksel mikroakışkan üretim yöntemleri moleküler tanı uygulamaları için başarılı ve güvenilir olduğunu kanıtlanmış olmal-

rına karşın, bu yöntemlerde kalıplama gereksinimi, hızlı prototipleme yapılamaması, büyük miktarlarda üretim gerektirmesi, ciddi uzmanlık gereksinimi ve yüksek maliyetleri gibi nedenlerle kullanımları sınırlı kalmaktadır (Kadimisetty ve ark., 2018; Sun ve ark., 2015; Jiang ve ark., 2016). Son yıllarda oldukça popüler olan eriyik yığıma modelleme (FDM-Fused deposition modeling) ve SLA (Stereolitografi) yöntemleri gibi masaüstü üç boyutlu (3B veya 3D) yazıcı sistemleri erişilebilir, düşük maliyetli, kullanımı kolay, uzmanlık gereksinimi daha az olan cihazlardır, bu nedenlerle teşhis ve araştırma için mikroakışkan veya minyatür cihazların prototiplendirilmesinde, özelleştirilmesinde ve üretiminde giderek daha fazla kullanılmaktadır (Ruiz ve ark., 2020). İlmige dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) yöntemlerinin, mikroakışkan cihazlar ile birleştirilmesi, hızlı tanı amaçlı önemli bir adım sağlayacaktır (Coelho ve ark., 2020).

Çalışmamızda bu nedenle *Salmonella* spp. tespiti için, üç boyutlu yazıcıda biyoyumlu polilaktik asit (PLA) filament kullanılarak mikroakışkan çip oluşturulmuş ve ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon yöntemi ile bu çipin kombine edilmesi için ön çalışmaların gerçekleştirilmesi ve analitik verilerinin saptanması amaçlanmıştır.

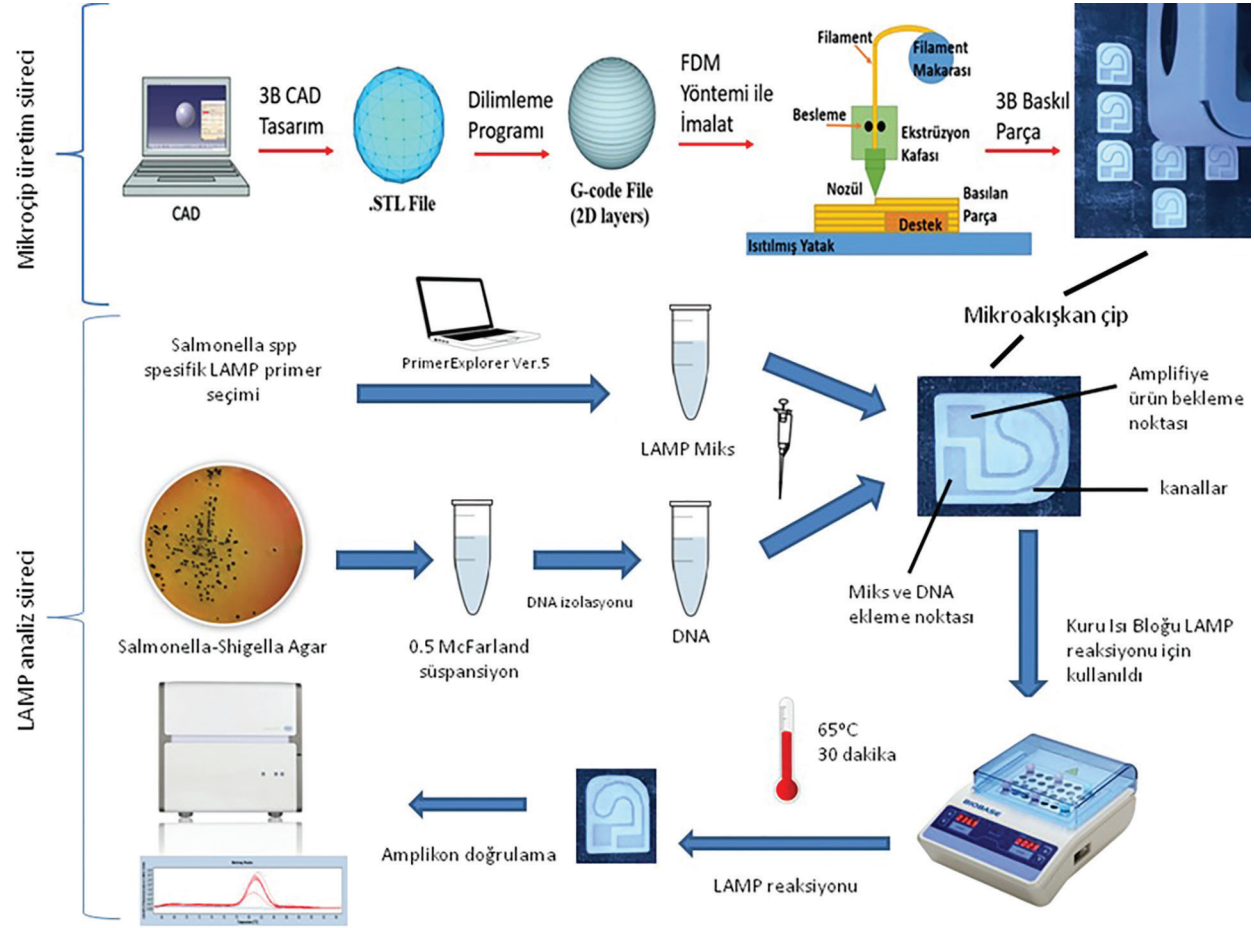
Gereç ve Yöntem

Mikroakışkan çip üretimi

Mikroakışkan çip üretiminde eriyik yığıma modelleme (FDM) yöntemi seçildi. Bu yöntem ile kolay ve hızlı bir imalat sağlandı. Ayrıca enjeksiyon kalıplama ve yumuşak litografi yöntemlerinde olduğu gibi ekstra bir kalıp imal edilmesi gerekmedi, mikroakışkan çipler CATIA V5 programı kullanılarak tasarlandı (Çip boyutları 15x12.5x2.4 mm, kanal çapı 850 µm, kanal uzunluğu 41750 µm). Tasarımı tamamlanan mikroakışkan çipler, xDesktop 2.1.6 programında dilimlenerek G-kodlarına dönüştürüldü ve Zaxe marka, Z1 Plus model (Türkiye, İstanbul) FDM üç boyutlu yazıcıda imal edildi (Şekil 1). Mikroakışkan çip imalatında malzeme olarak son yıllarda doku mühendisliğinde ve mikroakışkan tek kullanımlık çiplerin üretiminde sıklıkla tercih edilen, biyoyumlu polilaktik asit (PLA) filament kullanıldı. Mısır ve nişasta gibi yenilenebilir kaynaklardan elde edilen polilaktik asit (PLA) petrol bağımlılığını azaltan, biyobazlı ve biyoyumlu bir alifatik bir polyesterdir (Ongaro ve ark., 2020) 1.75 mm çapında polilaktik asit (PLA) filament mikroakışkan çiplerin imalatı için Zaxe, Türkiye'den temin edilmiştir. Tablo 1'de, mikroakışkan çip imalatında uygulanan yazdırma parametreleri listelendi.

Tablo 1. Mikroakışkan çip imalatı için 3 boyutlu baskı parametreleri

Nozül çapı	Katman Kalınlığı	Dolgu Oranı	Nozül Sıcaklığı	Isıtılmış Yatak Sıcaklığı	Baskı Hızı
0.4 mm	0.2 mm	100 %	190°C	60°C	50 mm/s

**Şekil 1.** Üç Boyutlu yazıcıda mikroakışkan çip imalat ve LAMP reaksiyon süreci şeması**LAMP reaksiyonu primer seçimi**

Salmonella spesifik LAMP reaksiyonları için "*Salmonella typhimurium InvA (invA)* geni (NCBI genbank erişim numarası: M90846.1)" seçildi. Bu veritabanının-

dan fasta dizileri indirilerek Primer Explorer Ver.5 yazılımı ile (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>) spesifik primer seçimleri gerçekleştirildi. Tablo 2'de LAMP primer dizileri ve bilgileri verilmiştir.

Tablo 2. *Salmonella invA* geni spesifik LAMP primer seti

Primer Adı	5' pos	3' pos	bp	Tm	Oligonukleotid Dizi
F3	484	501	18	59.98	GAACGTGTGCGGAAGTC
B3	665	682	18	59.26	CGGCAATAGCGTCACCTT
FIP (F2 ve F1c)			38		GCGCGGCATCCGCATCAATA-TCTGGATGGTATGCCCGG
BIP (B2 ve B1c)			39		GAACGGCGAAGCGTACTGGA-CATCGCACCGTCAAAGGAA
F2	516	533	18	60.28	TCTGGATGGTATGCCCGG
F1c	573	592	20	65.71	GCGCGGCATCCGCATCAATA
B2	636	654	19	59.93	CATCGCACCGTCAAAGGAA
B1c	595	614	20	64.27	GAACGGCGAAGCGTACTGGA

LAMP reaksiyonları

LAMP reaksiyonu mikroakışkan çip üstünde ve mikrosantrifüj tüp üstünde iki ayrı amplifikasyon şeklinde yapıldı. Her reaksiyonun toplam hacmi 25 µL (21 µL LAMP PCR karışımına 4 µL nükleik asit dahil), üreticinin talimatlarına göre Bsm DNA Polimeraz (Thermo Scientific, ABD) (8 U/µL) kullanıldı. Final konsantrasyon her reaksiyondaki primer FIP ve BIP için 1,6 µM, F3 ve B3 için 0,2 µM olacak şekilde kullanıldı. LAMP protokolleri, T1 PCR Sistemi (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) kullanılarak her mikrosantrifüj tüpü için gerçekleştirildi. Mikroakışkan çipler için kuru ısı bloğu kullanıldı ve protokol; 65°da 30 dakika olacak şekilde uygulandı. Amplifikasyon ürünleri erime eğrisi protokolü ile LightCycler 480 (Roche Diagnostik, Mannheim, Almanya) qPCR sisteminde kontrol edildi.

Salmonella spp.'nin kültür yöntemi ile tanımlanması

Salmonella spp.'nin kültür yöntemi ile üretimi için ISO 6579:2002 standart kültür yöntemi kullanıldı. Ayrıca, şüpheli kolonilerin tanımlanması için biyokimyasal testler üreticinin talimatlarına göre API 20 E (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Fransa) kullanılarak gerçekleştirildi. Kökenler pozitifliği önceki çalışmamızda saptanmış ve saklanmış olan kökenlerdi (Demirci ve ark., 2019).

Değerlendirmede kullanılan bakteriler

LAMP reaksiyonlarında sonuçların analizinde pozitif kontrol amaçlı olarak önceki çalışmamızda tespit ettiğimiz beş *Salmonella* spp kökeni kullanıldı, her bir

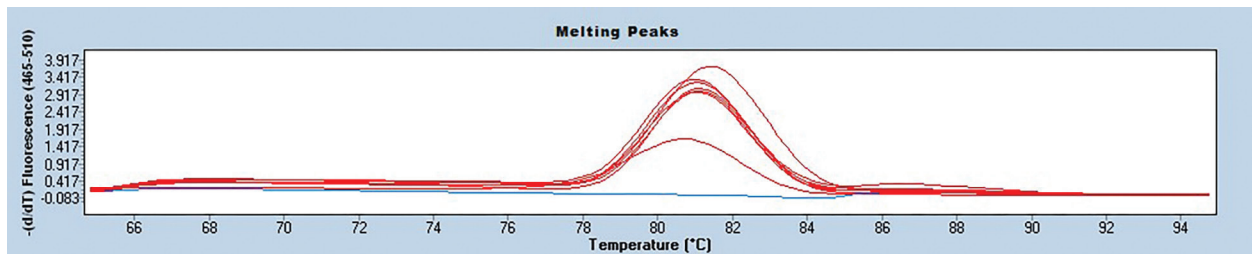
köken için LAMP çalışmasının 5 tekrarı gerçekleştirildi. Negatif kontrol amaçlı olarak; önceki çalışmamızda tespit ettiğimiz *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* kökenleri (Demirci ve ark., 2019) ile *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 standart kökenleri kullanıldı. Her bir köken için LAMP çalışmasının 5 tekrarı gerçekleştirildi.

Sonuçların analizi ve verilerin değerlendirilmesi

Salmonella spp. LAMP sonuçları için klasik kültür yöntemi sonuçları ele alınarak hesaplamalar gerçekleştirildi. Duyarlılık (sensitivite) ölçümü için; Gerçek Pozitif/(Gerçek Pozitif+Yalancı Negatif) formülü, Özgüllük (spesifite) ölçümü için; Gerçek Negatif/(Gerçek Negatif+Yalancı Pozitif) formülü, Pozitif prediktif değer ölçümü için; Gerçek pozitif/(Gerçek pozitif+Yalancı Pozitif) formülü ve Negatif prediktif değer ölçümü için; Gerçek negatif/(Gerçek negatif+Yalancı Negatif) formülü kullanıldı.

Bulgular

Çalışmamızda beş pozitif kontrol ve beş negatif kontrol mikroakışkan çip üstünde ve ayrı bir tüpte LAMP reaksiyonuna alınmıştır. Her iki sonuçta, kültür yöntemi standart yöntem olarak düşünülerek analiz edilmişlerdir. Mikrosantrifüj tüpünde ve mikroakışkan çip üstünde uygulanan LAMP reaksiyonlarının amplikonlarının LightCycler 480 (Roche Diagnostik, Mannheim, Almanya) sisteminde yapılan erime eğrisi analizi sonucunda pozitif numunelerde Şekil 2'deki erime eğrisi profili saptandı.



Şekil 2: Mikrosantrifüj tüpünde ve mikroakışkan çip üstünde uygulanan LAMP reaksiyonlarının erime eğrisi analizi

Kültür yöntemi ile *Salmonella* pozitif saptanan 25 pozitif numune arasında, mikrosantrifüj tüpünde uygulanan LAMP reaksiyonu ile sadece bir numunede yalancı negatif sonuc saptanmışken, mikroakışkan çip üstünde uygulanan LAMP reaksiyonunda ise iki numune yalancı negatif olarak tespit edildi. Mikro-

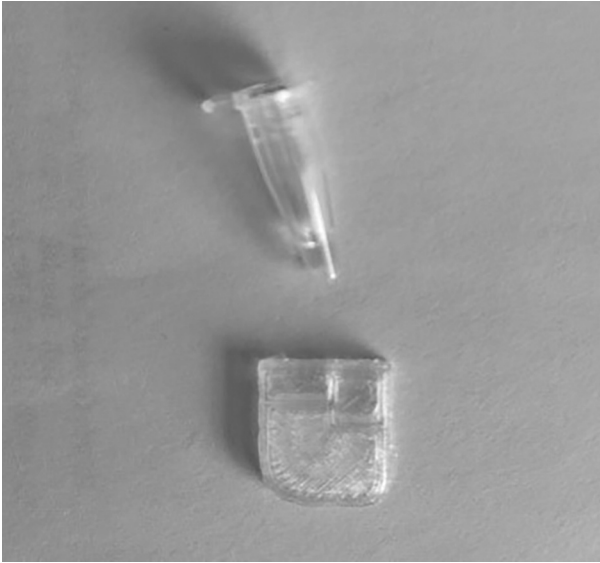
santrifüj tüpünde uygulanan LAMP reaksiyonu ile dört numunede yalancı pozitif sonuc saptanmışken, mikroakışkan çip üstünde uygulanan LAMP reaksiyonunda ise yine aynı dört numune yalancı pozitif olarak bulundu. Sonuçlar Tablo 3'de sunuldu.

Tablo 3. Mikrosantrifüj tüpünde ve mikroakışkan çip üstünde uygulanan LAMP reaksiyonlarının analitik verilerinin dağılımı

Hedef	Test Performans göstergesi	Mikroakışkan çip üstünde uygulanan LAMP reaksiyonu	Mikrosantrifüj tüpünde uygulanan LAMP reaksiyonu
Salmonella spp.	Duyarlılık (sensitivite)	92,00%	96,00%
	Özgüllük (spesifite)	94,67%	94,67%
	Pozitif prediktif değer	85,19%	85,71%
	Negatif prediktif değer	97,26%	98,61%

Mikroakışkan çip üstünde yapılan uygulama sonunda LAMP reaksiyon duyarlılığının düşüş gösterdiği ama yine de verilerin kullanım için uygun olduğu görüldü.

Mikrosantrifüj tüpünde ve mikroakışkan çip üstünde uygulanan LAMP reaksiyonları şekil 3'de gösterildi.

**Şekil 3.** Mikrosantrifüj tüpünde ve mikroakışkan çip üstünde uygulanan LAMP reaksiyonları

Tartışma ve Sonuç

Gıda ve çevresel kaynaklarda *Salmonella*'nın hızlı, güvenilir ve hassas tespiti, halk sağlığını korumak için çok önemlidir (Bell ve ark., 2016; Özge ve ark., 2021). İlimiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP), özel cihazlara ve deneyimli personele ihtiyaç duymaksızın güvenilir kullanılabilir olması nedeniyle son yıllarda hızlı moleküler testlerin temelini oluşturmaktadır (Notomi ve ark., 2000; Nijiru 2012). Bu moleküler tekniklerin, mikroakışkan cihazlarla birleştirilmesi, olanakların sınırlı olduğu noktalarda hızlı tanı testinin gerçekleştirilebilmesi için önemli bir seçenek sunabilecektir (Mejía-Salazar ve ark., 2020). Bizde bu nedenle çalışmamızda, üç boyutlu yazıcı ile

mikroakışkan çip üretimine ve bu çip üstünde LAMP reaksiyonu gerçekleştirilmeye odaklandık.

LAMP reaksiyonlarında DNA oldukça verimli şekilde çoğaltılabilir. PCR veya gerçek zamanlı PCR yönteminde genellikle bu işlem 1-2 saat sürmekteyken, amplifiye edilen DNA miktarı neredeyse LAMP'a göre 20 kat daha azdır. Bu nedenle LAMP reaksiyonları, hem klinik, hem de gıda uygulamalarında hedef tespiti amaçlı sıklıkla kullanılabilir (Yang ve ark., 2018). *invA* geni, *Salmonella* spp. için LAMP primerleri tasarlamak için en sık hedeflenen genidir (Yang ve ark., 2018). Bizde çalışmamızda mikroakışkan çip ile kombine LAMP reaksiyonları için *invA* genini kullandık.

Garrido-Maestu ve ark., (2020) çalışmalarında Mikroakışkan çip ile LAMP reaksiyonlarını kombine etmişlerdir. Bu çalışmada mikroakışkan çip dizaynı için CNC tezgahı kullanılmış AutoCAD programı ile kalıp çıkartılmış ve ürün imal edilmiştir. LAMP reaksiyonlarını 60°C'da 1 saat olarak uyguladıkları ve etüv kullandıklarını bildirmişlerdir. Amplifikasyon ürünleri kolorimetrik uygulama ile görsel olarak ve ayrıca jel görüntüleme sisteminde kontrol etmişlerdir. Biz çalışmamızda kalıp imalatına gerek olmadığı için 3 boyutlu yazıcı kullanarak PLA ile mikroakışkan çip üretimini sağladık. Etüv yerine çalışmamızda kuru ısı bloğu kullanılmış ve sonuçlar 30 dakika sürecinde elde edilmiştir. Çalışmamız sonucu oluşan amplikonlar real-time PCR'da 5 dakikalık bir uygulama olan erime eğrisi analizi ile analiz edilmiştir. İlerleyen çalışmalarda bu yöntemin görsel olarak tespiti için dizayn geliştirilecektir. Ferguson ve ark., tek kullanımlık, monolitik bir mikroakışkan çip dizaynı geliştirmişler ve buna elektrokimyasal DNA sensörleri eklemiştir (Ferguson ve ark., 2009). Patterson ve ark., Ferguson ve ark., (2013) dizayn ettikleri mikroakışkan çipi LAMP reaksiyonu ile kombine ederek, farelerin tam kanında *Salmonella* tanısı için kullanılabilirliğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da *Salmonella* tanısı için mikroakışkan çip ve LAMP yönteminin kombine edilebileceği görülmüştür. Zhang ve ark., (2020) LAMP reaksiyonu ile ürettikleri kağıda gömülü mikroakışkan çiplerde *Salmonella* spp. tanısı için kullanılabilirliğini göstermişlerdir. Çoklu kanallı ge-

liştirdikleri mikroakışkan çipe ısı sensörü eklemişler ve kalsein ile UV altında visuel olarak görüntü sağlamışlardır. *Salmonella* spp. için 0.12 CFU/ml tespit limiti saptamışlardır. Bizde çalışmamızda tek kullanımlık mikroakışkan çipler oluşturulmuş ve şu an için amplikonların görselleşmesi için erime eğrisi analizi kullanılmıştır fakat mikroakışkan çip altına konulabilecek bir ısı sensörü ve görsel sensör cihaz geliştirilerek bu mikroakışkan çipin verisinin ilerleyen zamanda direkt tespiti için çalışmanın geliştirilmesi planlanmıştır.

Geliştirdiğimiz mikroakışkan çiple kombine LAMP reaksiyonlarının henüz sadece in-vitro denemelerinin yapılmış olması, rutin numunelerde deneme yapılmaması çalışmamızın limitasyonudur. Mikroakışkan çipde amplikon ürünlerinin kolorimetrik olarak tespiti için henüz optimizasyonun tamamlanmamış olması, ayrıca mikroakışkan çipe ısı uygulamalarını sağlayabilecek ısı sensörünün henüz geliştirilmemiş olması çalışmamızın kısıtlamaları arasındadır.

Sonuç olarak; verilerimiz LAMP reaksiyonları ile mikroakışkan çip teknolojisinin birleştirilebileceğini, üç boyutlu yazıcıların bu mikroakışkan çiplerin üretimi sırasında kullanılabileceğini bize göstermiştir. Kaynakların kısıtlı ve sonucun acil gerektiği noktalar için mikroakışkan çip teknolojisi ve LAMP reaksiyonlarının birleştirilebileceği, düşük maliyetli ve güvenilir moleküler temelli yöntemlerin kullanılabilmesi için bu alanda daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiğini bize düşündürmüştür.

Kaynaklar

- Bell RL, Jarvis KG, Ottesen AR, McFarland MA, Brown EW (2016) Recent and emerging innovations in Salmonella detection: a food and environmental perspective. *Microb Biotechnol.* 9(3), 279-292.
- Celho BJ, Veigas B, Águas H, et al., (2017) A Digital Microfluidics Platform for Loop-Mediated Isothermal Amplification Detection. *Sensors (Basel).* 17(11),2616-2627. doi.org/10.3390/s17112616
- Demirci M, Yigin A, Altun SK, Uysal HK, Saribas S, Kocazeybek BS (2019) Salmonella Spp. and Shigella Spp. detection via multiplex real-time PCR and discrimination via MALDI-TOF MS in different animal raw milk samples. *Niger J Clin Pract.* 22(8),1083-1090.
- Ferguson BS, Buchsbaum SF, Swensen JS, Hsieh K, Lou X, Soh HT. (2009). Integrated microfluidic electrochemical DNA sensor. *Anal Chem.* 81(15), 6503-6508.
- Gambino D, Gargano V, Butera G, Sciortino S, Pizzo M, Oliveri G, Cardamone C, Piraino C, Cassata G, Vicari D, Costa A (2022) Food Is Reservoir of MDR Salmonella: Prevalence of ESBL Profiles and Resistance Genes in Strains Isolated from Food. *Microorganisms.* 10(4), 780-788
- Garrido-Maestu A, Azinheiro S, Carvalho J, Abalde-Cela S, Carbó-Argibay E, Diéguez L, Piotrowski M, Kolen'ko YV, Prado M. (2017). Combination of Microfluidic Loop-Mediated Isothermal Amplification with Gold Nanoparticles for Rapid Detection of Salmonella spp. in Food Samples. *Front Microbiol.* 8, 2159-2167.
- Gebeyehu A, Taye M, Abebe R. (2022) Isolation, molecular detection and antimicrobial susceptibility profile of Salmonella from raw cow milk collected from dairy farms and households in southern Ethiopia. *BMC Microbiol.* 22(1), 1-10.
- Jiang, X., Jing, W., Sun, X., Liu, Q., Yang, C., Liu, S., et al. (2016). High-throughput microfluidic device for LAMP analysis of airborne bacteria. *ACS Sensors* 1, 958-962.
- Kadimisetty K, Song J, Doto AM, et al. (2018). Fully 3D printed integrated reactor array for point-of-care molecular diagnostics. *Biosens Bioelectron.* 109, 156-163.
- Mejía-Salazar JR, Rodrigues Cruz K, Materón Vásques EM, Novais de Oliveira O Jr. (2020). Microfluidic Point-of-Care Devices: New Trends and Future Prospects for eHealth Diagnostics. *Sensors (Basel).* 20(7), 1951.
- Njiru ZK. (2012). Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(6), e1572.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28(12), E63.
- Ongaro AE, Di Giuseppe D, Kermanizadeh A, et al. (2020). Polylactic is a Sustainable, Low Absorption, Low Autofluorescence Alternative to Other Plastics for Microfluidic and Organ-on-Chip Applications. *Anal Chem.* 92(9), 6693-6701.
- Ozge Ü, Demirci M, Yigin A, Ekici S. (2021). Farklı Salmonella Typhimurium kökenlerinin taşıdıkları patojenite adası ve direnç genlerinin in silico analizi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi,* 32(2), 151-156.
- Patterson AS, Heithoff DM, Ferguson BS, Soh HT, Mahan MJ, Placco KW. (2013). Microfluidic chip-based detection and intraspecies strain discrimination of Salmonella serovars derived from whole blood of septic mice. *Appl Environ Microbiol.* 79(7), 2302-2311.
- Popa GL, Papa MI. (2021). Salmonella spp. infection - a continuous threat worldwide. *Germs.* 11(1), 88-96.
- Ruiz C, Kadimisetty K, Yin K, Mauk MG, Zhao H, Liu C. (2020). Fabrication of Hard-Soft Microfluidic Devices Using Hybrid 3D Printing. *Micromachines (Basel).* 11(6), 567.
- Sun Y, Quyen TL, Hung TQ, Chin WH, Wolff A, Bang DD. (2015). A lab-on-a-chip system with integrated sample preparation and loop-mediated isothermal amplification for rapid and quantitative detection of Salmonella spp. in food samples. *Lab Chip.* 15(8), 1898-904.
- Yang Q, Domesle KJ, Ge B. (2018). Loop-Mediated Isothermal Amplification for Salmonella Detection in Food and Feed: Current Applications and Future Directions. *Foodborne Pathog Dis.* 15(6), 309-331.
- Zhang M, Liu J, Shen Z, Liu Y, Song Y, Liang Y, Li Z, Nie L, Fang Y, Zhao Y. (2021). A newly developed paper embedded microchip based on LAMP for rapid multiple detections of foodborne pathogens. *BMC Microbiol.* 2021, 21(1):197.