

# БЪРЗА ДИАГНОСТИКА НА ИНФЕКЦИОЗНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ ЧРЕЗ МИНИАТЮРНИ PCR УСТРОЙСТВА

<sup>1</sup>Емилия Георгиева, <sup>2</sup>Николай Коларов, <sup>1</sup>Мерлин Хюсеин, <sup>1</sup>Ремзие Зинелова,  
<sup>1</sup>Румяна Расимова

<sup>1</sup>УС „Медицински лаборант”, Медицински колеж – Варна,  
Медицински университет – Варна

<sup>2</sup>Катедра по ортопедия и травматология, Факултет по медицина,  
Медицински университет – Варна

## RAPID DIAGNOSIS OF INFECTIOUS DISEASES THROUGH MINIATURE PCR DEVICES

<sup>1</sup>Emilia Georgieva, <sup>2</sup>Nikolay Kolarov, <sup>1</sup>Merlin Hussein, <sup>1</sup>Remzie Zinelova,  
<sup>1</sup>Rumyana Rasimova

<sup>1</sup>TS Medical Laboratory Assistant, Medical College, Medical University of Varna

<sup>2</sup>Department of Orthopedics and Traumatology, Faculty of Medicine,  
Medical University of Varna

### РЕЗЮМЕ

Правилната диагноза и проследяването на всички заболявания изискват лабораторна диагностика, основана на принципи и стандарти за добра практика. Изследването на нуклеинова киселина близо до пациента изигра важна роля при избухването на инфекциозното заболяване от COVID-19. Бързите тестове имат за цел да реализират бързо, просто и автоматично откриване на нуклеинова киселина. Вместо нормалните методи за откриването ѝ, използвани в лабораторната диагностика, сега навлизат миниатюрни PCR устройства. Тази статия се фокусира върху микрофлуидиката в комбинация с технологията за микроелектромеханични системи (MEMS), позволяващо миниатюризирането на PCR процесите в устройство с чип, с потенциални предимства на ултра бърза скорост, ниска цена и ниска консумация на проба, преносимост, висока производителност и възможност за интеграция и автоматизация.

**Ключови думи:** бърза диагностика, инфекциозни заболявания, миниатюрни PCR устройства

### ABSTRACT

Proper diagnosis and follow-up of all diseases require laboratory diagnosis based on principles and standards of good practice. Nucleic acid testing near the patient played an important role in the outbreak of the infectious disease COVID-19. Rapid tests aim to achieve fast, simple, and automatic detection of nucleic acids. Instead of the normal detection methods used in laboratory diagnostics, miniature PCR devices are now available. This article focuses on microfluidics in combination with microelectromechanical systems (MEMS) technology, which allows miniaturization of PCR processes in a chip device with the potential advantages of ultra-fast speed, low cost, low sample consumption, portability, high performance, and the ability to integrate and automate.

**Keywords:** rapid diagnosis, infectious diseases, miniature PCR devices

## УВОД

POC NATs (point-of-care nucleic acid tests) тестват се основава на техника за амплификация на нуклеинова киселина (NAT) и има за цел да реализира бързо, просто и автоматично откриването ѝ. Благодарение на развитието на производствените технологии, електронните информационни технологии, технологиите за изкуствен интелект и биологичните информационни технологии през последните години развитието на устройството POC NATs доведе до значителен напредък. Вместо нормалните методи за откриване на нуклеинови киселини, използвани в лабораторната диагностика, бяха приложени някои нови експериментални носители. Прилагането на тези експериментални носители е реализирало автоматизацията и интегрирането на откриването на нуклеинова киселина. Целият процес на откриване на нуклеинова киселина обикновено се разделя на три стъпки (екстракция на нуклеинова киселина, усилване на целта и откриване на сигнала). Всички реагенти, необходими за процеса, могат да бъдат предварително съхранени върху тези експериментални носители без ненужна ръчна работа. Освен това всички процеси се извършват в този експериментален носител с помощта на специфично устройство за управление. Въпреки че са сложни за производство и са прецизни като дизайн, тяхното приложение осигурява значителна стъпка напред в откриването на нуклеинова киселина и реализира интегрирането на откриването на нуклеинова киселина. Тази технология има голям потенциал в областта на молекулярната диагностика в бъдеще.

**Целта** на статията е да представи тенденцията при диагностика на инфекциозни заболявания чрез миниатюрни PCR устройства.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Използван е документален метод, като е осъществен справка с 52 научни публикации от медицински издания от Европа и други страни по изследваната тематика.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### *Миниатюрни PCR устройства*

Полимеразната верижна реакция (PCR) е един от най-популярните методи за откриване и златен стандарт в молекулярната диагностика на инфекциозни заболявания, която позволява експоненциално усилване на едно или няколко копия на определена последователност от ДНК или РНК, което я прави много мощна, специфична и

чувствителна (10,32,36). Типичните PCR процеси ползват малък обем не повече от 100  $\mu$ L и реакцията се извършва при температури, циклични между 60°C, 72°C и 95°C. Въпреки това обичайните PCR апарати обикновено са сложни, обемисти и скъпи и се използват само в диагностични лаборатории, като по този начин изключват употребата им в домашни условия близо до пациента. Появата на микрофлуидиката в комбинация с технологията за микроелектромеханични системи (MEMS) позволи миниатюризирането на PCR процесите в устройство с чип, с потенциални предимства на ултра бърза скорост, ниска цена и ниска консумация на проба, преносимост, висока производителност и възможност за интеграция и автоматизация (30,49), което ще даде възможност на PCR-базираната диагностика да се използва за изследвания в бедни на ресурси региони. Въпреки това конвенционалните PCR процеси интегрират прецизни модули за управление на нагряване и охлаждане за извършване на термичен цикъл, увеличават предизвикателствата и разходите за миниатюризация, което изисква по-сложен и внимателен дизайн за оптимизиране на топлинните свойства (48,50). Появата на qPCR реализира амплификация на нуклеинова киселина и количествено откриване в реално време в една стъпка без етапи на електрофореза или хибридизация, което е пионерът на PCR-базираната интегрирана NAT въпреки нейния сложен и прецизен контрол на нагряване и охлаждане (6,25,35). За реализиране на бърз или свръхбърз NAT опростяването и съкращаването на конвенционалните PCR процеси са двете ключови предизвикателства, на които трябва да се обърне внимание. Поради факта, че скоростите на нагряване/охлаждане на конвенционалните PCR системи са само няколко градуса по целзий в секунда и е необходимо дълго време от 1-2 часа за завършване на целия PCR процес. Това показва необходимостта от подобрене, за да се постигне бързо диагностициране. Новите разработки, включващи увеличаване на скоростта на топлопреминаване, чрез използване на по-ефективни нагреватели и намаление обема на пробата, са най-често използваните подходи (25,37,47), сред които малък обем проба е най-добрият вариант поради своята рентабилност и лесна промяна в скоростта на нагряване или охлаждане при прилагането на микрофлуидиката.

### *Откриване на паразити*

В типичен пример базирано на чип Truelab Uno<sup>®</sup> microPCR устройство е разработено от bigtec Labs за диференциална идентификация на

паразити *Plasmodium falciparum* и *Plasmodium vivax*. Устройството е разработено въз основа на qPCR метод, който е в състояние да открие *Plasmodium falciparum* и *Plasmodium vivax* с подобна чувствителност и специфичност към вложения PCR протокол на СЗО (24). В друго проучване Zaky et al разработват нова PCR методология за молекулярно откриване на *Brugia malayi*, която интегрира методология за бързото извличане на ДНК, базирана на NaOH, преносима PCR платформа за откриване на ДНК на базата на тест ленти (14). Тази диагностична платформа за PCR елиминира зависимостта от скъпи и обемисти инструменти, без да компрометира чувствителността или специфичността на откриването, осигурявайки алтернатива на скъпоструващите колонозависими ДНК екстракции, които обикновено са съчетани с методологии за откриване, изискващи усъвършенствана лабораторна инфраструктура, и по този начин притежаващи голям потенциал за ПОС откриване на различни патогенни паразити.

#### **Откриване на бактерии**

През последните години мултиплексното откриване на патогени с нуклеинови киселини привлече специално внимание поради предимствата на бързото идентифициране на патогени с високата клинична чувствителност (2,23). Manage et al. разработиха мултиплексно касетно PCR устройство за откриване на ентерохеморагична *E. coli* (20). Касетата PCR съдържа капилари с микро обеми, заредени с багрило, акриламидни гелове за предварително съхраняване на всички реагенти, необходими за PCR. Устройството е в състояние да открие едновременно до 8 проби в рамките на 75 минути (28). Освен това Salman et al. разработиха шунтиращо PCR микрофлуидно устройство за откриване на нуклеинова киселина на *E. coli* (34). Устройството включва поликарбонатен микрофлуиден PCR чип, маневриращ термичен цикъл и високочувствителен блокиращ флуоресцентен детектор, който позволява бързо амплифициране на нуклеинова киселина със скорости на нагряване и охлаждане съответно от 1,8°C/s и 2°C/s. Разработеното шунтиращо PCR микрофлуидно устройство позволява извършване на евтина PCR амплификация с температури диапазони от 54°C до 68°C и границата на откриване е 700 ng mL<sup>-1</sup>, което показва голям потенциал за количествено определяне на PCR продукти в реално време, без да се извършва с гел или капилярна електрофореза (30,34). Към днешна дата диагнозата на туберкулозата все още е предизвикателство в клиничната ме-

дицина чрез използване на наличните конвенционални методи и е по-трудно да се открие белодробната туберкулоза поради ниското съдържание на бацили в клиничните проби. За целите за справянето с това предизвикателство е въвеждането на базирано чип устройство TrueNAT, използващо RT-PCR за диагностика на туберкулоза (ТВ) (21). Извършена е систематична оценка на устройството и всички резултати показват, че чувствителността и специфичността на устройството TrueNAT е съответно 96,7% за диагностициране на ТВ. Освен това устройството успява да постигне бързо откриване на ТВ, както и резистентност към рифампицин в рамките на 2 часа, което е преносимо и съвместимо за ПОС откриване на *Mycobacterium tuberculosis* (19,21). Резултатите показват, че амплификацията на целевата ДНК може да бъде завършена за 2' 31'' с минималния брой бактерии, които трябва да бъдат амплифицирани до 1,25 × 10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, което показва големия му потенциал за ПОС NAT на патогени (17,19).

#### **Откриване на вируси**

Zhou et al. разработиха микрофлуидна чип система за чувствително откриване на SARS коронавирус. Тази система е съставена от лазерно индуциран флуоресцентен микрофлуиден чип анализатор, стъклен микрочип както за PCR, така и за капилярна електрофореза, термичен цикъл на чип, базиран на двойни термоелектрични елементи, RT-PCR диагностичен комплект за SARS и комплект за оразмеряване на ДНК електрофоретика. Тази система може да позволи ефективно амплифициране на с ДНК на SARS-CoV и последвана електрофореза върху същия стъклен микрочип. Впоследствие резултатите от електрофорезата върху микрочипа са събрани и анализирани чрез лазерно индуциран флуоресцентен микрофлуиден чип анализатор. Резултатите от теста на тази система показват, че 17 положителни проби са получени от 18 проби назофарингеални тампони от клинично диагностицирани пациенти, в сравнение само с 12 положителни резултата от същите 18 проби от конвенционалната RT-PCR с откриване на електрофореза в агарозен гел, което показва висока положителна честота, прецизност и бързина на системата с микрофлуидни чипове за диагностика на SARS (45;52). Освен това поради значителните предимства на qPCR и неговия златен стандарт за молекулярно откриване миниатюризирането на qPCR устройства ще допринесе много за откриването на ПОС на инфекциозни заболявания. Ahrberg et al. разработи ръч-

но qPCR устройство с приблизителен размер от 100 mm × 60 mm × 33 mm за откриване на място на вируса H7N9 (1). Устройството е в състояние едновременно да извършва четири реакции във форма на виртуална реакционна камера върху стъклено покривно стъкло с обем на пробата ≈ 200 nL. Устройството qPCR е в състояние да открие едно копие на ДНК на вируса H7N9, което предполага потенциалът му за бърза диагностика на инфекциозни заболявания (2). Също така е разработено ПОС устройство, базирано на qPCR, съчетано с екстракция на нуклеинова киселина с магнитни наночастици за автоматизирано откриване на аденовирус (7). Устройството се състои от 3D отпечатана затворена касета и автоматизиран инструмент, комуникиран с компютър чрез Bluetooth, който тежи 6,5 кг. Екстракцията на нуклеинова киселина на базата на магнитно разделяне и откриването на qPCR са поставени в патрон, за да се избегне замърсяване. След систематична оценка устройството показва подобна производителност на комерсиализираното qPCR устройство и ръчния метод, което показва, че е обещаващо за откриване на патогенни на място до пациента (9,46).

#### **Устройства за изотермична амплификация на нуклеинова киселина INAA**

За да се заобиколи сложното управление на нагряване и охлаждане в конвенционалните PCR устройства и да се увеличи скоростта на откриване са разработени серия от изотермични методи за амплификация на нуклеинова киселина за ПОС диагностични приложения като амплификация с въртящ се кръг (RCA) (8;43;44), LAMP INAA (11,26,27,33), RPA (17,39), усилване на изместване на веригата (SDA) (9;51), хеликазно зависимо усилване (HDA) (5), NASBA (39,40), усилване с множество кръстосани измествания (29,41,42) и др. Тези изотермични методи за амплификация на нуклеинова киселина бяха проведени при фиксирана температура без сложно термично циклично оборудване, което ги прави по-приложими за диагностика на ПОС (3,16,31,50). За да се постигне ПОС диагностика, тези LAMP INAA устройства трябва да интегрират подготовката на пробата, амплификацията на нуклеинова киселина, откриването и дори анализа на резултатите в едно до реализирано откриване от проба до резултат, които са преносими и могат да бъдат използвани лесно от всеки неквалифициран персонал. До момента има редица доклади за INAA устройства, предназначени за откриване на ПОС нуклеинова киселина при инфекциозни заболявания, а някои INAA

устройства вече са станали търговски достъпни (4,12,13,14,15,22).

#### **Откриване на паразити**

В момента откриването на нуклеинова киселина на паразитите е един от най-прецизните и точни методи за диагностика. Въпреки това, за да се постигне откриване на ПОС, различни INAA методи са съчетани с микрофлуидни техники за разработване на INAA устройства поради техните изключителни преимущества. Като новост Wan et al. разработи базирано на LAMP ръчно, автоматизирано и без система за откриване термично DMF устройство, наречено LampPort, за ДНК откриване на *Trypanosoma brucei* (38). Софтуерът за управление е инсталиран на външна контролна система, за да комуникира с устройството чрез Bluetooth. Пробите се зареждат в сандвич-структурирани DMF чипове за реакция на LAMP върху чип, последвано от добавяне на силно концентрирана SYBR Green I за визуално откриване. По-специално устройството успя да предотврати аерозолно замърсяване поради отсъствието на въздух вътре в реакционната камера в DMF чипа. Това евтино и компактно устройство може да постигне чувствително откриване на ДНК на *Trypanosoma brucei* без обемна оптична система и е постигната подобна граница на откриване от  $4 \times 10^3$  копия  $\text{mL}^{-1}$  (35,38).

#### **Откриване на бактерии**

При бактериите екстракцията и амплификацията на нуклеинова киселина са много важни, но не са интегрирани безпроблемно в устройствата INAA. Могат да се интегрират безпроблемно двете процедури и да се постигне автоматизирано, преносимо, високочувствително, бързо и лесно ПОС. През последните години появата на микрофлуидни патрони представи ефективно решение. Liu et al. разработиха базиран на LAMP самонагряващ се патрон за визуално флуоресцентно откриване на ДНК на *E. coli* (18). Устройството е напълно автономно без външни инструменти, което интегрира водно активирано екзотермично нагряване с регулиране на температурата, улеснено с материал за фазова промяна (PCM) и LAMP. Температура се поддържа от PCM материала в диапазона от 20°C до 40°C, доставяйки мощността за LAMP. И накрая визуалното флуоресцентно откриване е постигнато чрез използване на UV светлина за многократна употреба.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

ПОС NATs устройствата позволяват интегрирането на многоетапен NAT в специфични носители

тели. Резултатите се получават за много кратък период от време, като по този начин се опростява традиционният NAT. Устройствата POC NAT се отдалечават от диагностичните лаборатории, те са лесно приложими в полеви условия или в близост до пациента. Това е революционна промяна за NAT и има широки перспективи за приложение. Съществуващата търговска диагностика се фокусира върху еднопосочен анализ, тъй като този тип системи е лесен за употреба, лесен за анализ и подходящ за масово производство. Въпреки това мултиплексните устройства могат да подобрят точността, чувствителността и мащабируемостта на изследователските и диагностичните устройства, приложими в полеви условия. Разработването на POC NAT устройства за първична медицинска помощ значително ще повиши потенциала на диагностичния процес. По-нататъшни подобрения в NAT и POCТ технологията ще доведат до значително разширяване на потенциалните им приложения.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Ahrberg C.D., Ilic B.R., Manz A., Neuzil P., Handheld real-time PCR device, *Lab Chip* 16 (2016) 586–592.
- Ali Z.S., Wang J.H., Mou X.B., Tang Y.J., Li T.T., Liang W.B., Shah M.A.A., Ahmad R., Li Z.Y., N.Y. He, Integration of nucleic acid extraction protocol with automated extractor for multiplex viral detection, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 17 (2017) 862–870.
- Auroux P.A., Koc Y., deMello A., Manz A., Day P.J.R., Miniaturised nucleic acid analysis, *Lab Chip* 4 (2004) 534–546.
- Bae N.H., Lim S.Y., Song Y., Jeong S.W., Shin S.Y., Y.T. Kim, T.J. Lee, K.G. Lee, S.J. Lee, Y.J. Oh, Y.M. Park, A disposable and multi-chamber film-based PCR chip for detection of foodborne pathogen, *Sensors* 18 (2018) 3158.
- Barreda-Garcia S., R. Miranda-Castro, N. de los-Santos-Alvarez, A. Miranda-Ordieres, M. Lobo-Castanon, Comparison of isothermal helicase-dependent amplification and PCR for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* by an electrochemical genomagnetic assay, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 8603–8610.
- Broeders S., Huber I., Grohmann L., Berben G., Taverniers I., Mazzara M., Roosens N., Morisset D., Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods, *Trends Food Sci. Technol.* 37 (2014) 115–126.
- Chen H., Wu Y.Q., Chen Z., Hu Z.L., Fang Y.L., Liao P., Deng Y., He N.Y., Performance evaluation of a novel sample in–answer out (SIAO) system based on magnetic nanoparticles, *J. Biomed. Nanotechnol.* 13 (2017) 1619–1630.
- Davari M., van Diepeningen A.D., Babai-Ahari A., Arzanlou M., Najafzadeh M.J., van der Lee T.A.J., de Hoog G.S., Rapid identification of *Fusarium graminearum* species complex using rolling circle amplification (RCA), *J. Microbiol. Methods* 89 (2012) 63–70.
- Dai Y.F., Furst A., Liu C.C., Strand displacement strategies for biosensor applications, *Trends Biotechnol.* 37 (2019) 1367–1382.
- Furst A.L., Francis M.B., Impedance-based detection of bacteria, *Chem. Rev.* 119 (2019) 700–726.
- Gansen A., Herrick A.M., Dimov I.K., Lee L.P., Chiu D.T., Digital LAMP in a sample self-digitization (SD) chip, *Lab Chip* 12 (2012) 2247–2254.
- Gonzalez-Gonzalez E., Mendoza-Ramos J.L., Pedroza S.C., Cuellar- Monterrubio A.A., Marquez-Ipina A.R., Lira-Serhan D., Trujillo-de Santiago G., Alvarez M.M., Validation of use of the miniPCR thermocycler for Ebola and Zika virus detection, *Plos One* 14 (2019) e0215642.
- Guevara E.E., Frankel D.C., Ranaivonasy J., Richard A.F., Ratsirarson J., Lawler R.R., Bradley B.J., A simple, economical protocol for DNA extraction and amplification where there is no lab, *Conserv. Genet. Resour.* 10 (2018) 119–125.
- Kaprou G.D., Papadopoulos V., Loukas C.M., Kokkoris G., Tserepi A., Towards PCB-based miniaturized thermocyclers for DNA amplification, *Micromachines* 11 (2020) 258.
- Kwon H.S., Park H.C., Lee K., An S., Oh Y.L., Ahn E.R., Jung J.Y., Lim S.K., Performance of MiniPCRTMmini8, a portable thermal cycler, *Anal. Sci. Technol.* 29 (2016) 79–84.
- Lee S.H., Park S.M., Kim B.N., Kwon O.S., Rho W.Y., Jun B.H., Emerging ultrafast nucleic acid amplification technologies for next-generation molecular diagnostics, *Biosens. Bioelectron.* 141 (2019) 111448.
- Lillis L., Lehman D.A., Siverson J.B., Weis J., Cantera J., Parker M., Piepenburg O., Overbaugh J., Boyle D.S., Cross-subtype detection of HIV-1 using reverse transcription and recombinase polymerase amplification, *J. Virol. Methods* 230 (2016) 28–35.
- Liu C.C., Mauk M.G., Hart R., Qiu X.B., Bau H.H., A self-heating cartridge for molecular diagnostics, *Lab Chip* 11 (2011) 2686–2692.
- Li Z.Q., Ju R.X., Sekine S., Zhang D.W., Zhuang S.L., Yamaguchi Y., All-in-one microfluidic device for on-site diagnosis of pathogens based on an integrated continuous flow PCR and electrophoresis biochip, *Lab Chip* 19 (2019) 2663–2668.

20. Manage D.P., Lauzon J., McMullen L.M., Pilarski L.M., Application of lab-on-a-chip multiplex cassette PCR for the detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *BMC Microbiol.* 19 (2019) 93.
21. Mangayarkarasi V., Sneka P., Sujith R., Jayaprakash, Ergonomic diagnostic tool based on chip mini RT-PCR for diagnosis of pulmonary and extra pulmonary tuberculosis, *J. Pure Appl. Microbiol.* 13 (2019) 1185–1190.
22. Marx V., PCR heads into the field, *Nat. Methods* 12 (2015) 393–397.
23. Mou X.B., Ali Z., Li B., Li T.T., Yi H., Dong H.M., He N.Y., Deng Y., Zeng X., Multiple genotyping based on multiplex PCR and microarray, *Chin. Chem. Lett.* 27 (2016) 1661–1665.
24. Nair C.B., Manjula J., Subramani P.A., Nagendrappa P.B., Manoj M.N., Malpani S., Pallela P.K., Subbarao P.V., Ramamoorthy S., Ghosh S.K., Differential diagnosis of malaria on Truelab Uno®, a portable, real-time, microPCR device for point-of-care applications, *Plos One* 11 (2016) e0146961.
25. Neuzil P., Zhang C.Y., Pipper J., Oh S., Zhuo L., Ultra fast miniaturized real-time PCR: 40 cycles in less than six minutes, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) e77.
26. Njiru Z.K., Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (2012) e1572.
27. Nzelu C.O., Kato H., Peters N.C., Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): an advanced molecular point-of-care technique for the detection of *Leishmania* infection, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13 (2019) e0007698.
28. Njiru Z.K., Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (2012) e1572.
29. Obande G.A., Singh K.K.B., Current and future perspectives on isothermal nucleic acid amplification technologies for diagnosing infections, *Infection and Drug Resistance* 13 (2020) 455–483.
30. Park S., Zhang Y., Lin S., Wang T.H., Yang S., Advances in microfluidic PCR for point-of-care infectious disease diagnostics, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 830–839.
31. Petralia S., Conoci S., PCR technologies for point of care testing: progress and perspectives, *ACS Sens.* 2 (2017) 876–891.
32. Postollec F., Falentin H., Pavan S., Combrisson J., Sohier D., Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology, *Food Microbiol.* 28 (2011) 848–861.
33. Quyen T.L., Ngo T.A., Bang D.D., Madsen M., Wolff A., Classification of multiple DNA dyes based on inhibition effects on real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP): prospect for point of care setting, *Front. Microbiol.* 10 (2019) 2234.
34. Salman A., Carney H., Bateson S., Ali Z., Shunting microfluidic PCR device for rapid bacterial detection, *Talanta* 207 (2020) 120303.
35. Sposito A., Hoang V., DeVoe D.L., Rapid real-time PCR and high resolution melt analysis in a self-filling thermoplastic chip, *Lab Chip* 16 (2016) 3524–3531.
36. Toze S., PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater, *Water Res.* 33 (1999) 3545–3556.
37. Ullerich L., Campbell S., Krieg-Schneider F., Bursgens F., Stehr J., Ultra-fast PCR technologies for point-of-care testing, *LaboratoriumsMedizin* 41 (2017) 239–244.
38. Wan L., Gao J., Chen T.L., Dong C., Li H.R., Wen Y.Z., Lun Z.R., Jia Y.W., Mak P.I., Martins R.P., LampPort: a handheld digital microfluidic device for loop-mediated isothermal amplification (LAMP), *Biomed. Microdevices* 21 (2019) 9.
39. Wang J.C., Liu L.B., Han Q.A., Wang J.F., Yuan W.Z., An exo probe-based recombinase polymerase amplification assay for the rapid detection of porcine parvovirus, *J. Virol. Methods* 248 (2017) 145–147.
40. Wang J.S., J.E. Kreutz, A.M. Thompson, Y.L. Qin, A.M. Sheen, J.G. Wang, L. Wu, S.H. Xu, M. Chang, D.N. Raugi, R.A. Smith, G.S. Gottlieb, D.T. Chiu, SD-chip enabled quantitative detection of HIV RNA using digital nucleic acid sequence-based amplification (dNASBA), *Lab Chip* 18 (2018) 3501–3506.
41. Wang Y., Xu J.G., Ye C.Y., Development of multiple cross displacement amplification label-based gold nanoparticles lateral flow biosensor for detection of shigella spp, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1834.
42. Wang Y., Zhang L., Xu J.G., Ye C.Y., Visual and multiplex detection of nucleic acid sequence by multiple cross displacement amplification coupled with gold nanoparticle-based lateral flow biosensor, *Sens. Actuators B Chem.* 241 (2017) 1283–1293.
43. Yan Y.C., Li J., Li W.H., Wang Y., Song W.L., Bi S., DNA flower-encapsulated horseradish peroxidase with enhanced biocatalytic activity synthesized by an isothermal one-pot method based on rolling circle amplification, *Nanoscale* 10 (2018) 22456–22465.
44. Yao Q., Y.Q. Wang, J. Wang, S.M. Chen, H.Y. Liu, Z.R. Jiang, X.E. Zhang, S.M. Liu, Q. Yuan, X. Zhou, An ultrasensitive diagnostic biochip based on biomimetic periodic nanostructure-assisted rolling circle amplification, *ACS Nano* 12 (2018) 6777–6783.
45. Yeo S.J., Choi K., Cuc B.T., Hong N.N., Bao D.T., Ngoc N.M., Le M.Q., Hang N.L.K., Thach N.C., Mallik S.K., Kim H.S., Chong C.K., Choi

- H.S., Sung H.W., Yu K., Park H., Smartphone-based fluorescent diagnostic system for highly pathogenic H5N1 viruses, *Theranostics* 6 (2016) 231–242.
46. Yeo S.J., Kang H., Dao T.D., Cuc B.T., Nguyen A.T.V., Tien T.T.T., Hang N.L.K., Phuong H.V.M., Thanh L.T., Mai L.Q., Rah Y., Yu K., Shin H.J., Chong C.K., Choi H.S., Park H., Development of a smartphone-based rapid dual fluorescent diagnostic system for the simultaneous detection of influenza A and H5 subtype in avian influenza A-infected patients, *Theranostics* 8 (2018) 6132–6148.
47. You M.L., Cao L., Xu F., Plasmon-driven ultrafast photonic PCR, *Trends Biochem. Sci.* 45 (2020) 174–175.
48. Zhang C.S., Xing D., Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 4223–4237.
49. Zhang C.S., Xu J.L., Ma W.L., Zheng W.L., PCR microfluidic devices for DNA amplification, *Biotechnol. Adv.* 24 (2006) 243–284.
50. Zhang H., Xu Y., Fohlerova Z., Chang H., Iliescu C., Neuzil P., LAMP-on-a-chip: revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification, *TrAC Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 44–53.
51. Zhou W.H., Hu L., Ying L.M., Zhao Z., Chu P.K., Yu X.F., A CRISPR–Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection, *Nat. Commun.* 9 (2018) 5012.
52. Zhou Z.M., Liu D.Y., Zhong R.T., Dai Z.P., Wu D.P., Wang H., Du Y.G., Xia Z.N., Zhang L.P., Mei X.D., Lin B.C., Determination of SARS-coronavirus by a microfluidic chip system, *Electrophoresis* 25 (2004) 3032–3039

**Адрес за кореспонденция:**  
Емилия Георгиева  
Медицински колеж - Варна  
бул. „Цар Освободител“ 68  
Варна, 9000  
e-mail: [Emiliya.Georgieva@tu-varna.bg](mailto:Emiliya.Georgieva@tu-varna.bg)