

# Protozoonların Tanısında İlimiğe Dayalı İzotermal Çoğaltma Yöntemi (LAMP)

## Diagnosis of Protozoa by Loop-Mediated Isothermal Amplification: (LAMP)

Zeynep KOLÖREN, Cumhur AVŞAR, Zülal Atlı ŞEKEROĞLU

Ordu Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

### ÖZET

Protozoanlardan Apicomplexan şubesinin insan sağlığı yönünden çok önemli parazit cinsleri *Plasmodium*, *Isospora*, *Toxoplasma*, *Babesia* ve *Cryptosporidium*'dur. Protozoer hastalıkların tanısında kullanılan genel yöntemler, protozoonun vücutta yerleştiği yere, konağı terk etme yoluna ve klinikten gönderilen örneğe dayanır. Bazı protozoanların tanımlanmasında tek başına klasik yöntemler yeterli olmayıp türler arasındaki farklılığı belirlemek için moleküler metotlar kullanılmak zorundadır. Son yıllarda protozoanların tanımlanmasında sıklıkla kullanılan moleküler yöntemlerden biri de LAMP tekniğidir. Çok fazla teknik beceri ve profesyonel ekipmanlara gerek olmayan ancak güvenilir sonuçların elde edildiği lamp tekniğiyle sabit sıcaklıkta hedef DNA'dan kısa bir sürede çok fazla sayıda kopya elde etmek mümkündür. Bu çalışmanın amacı insan sağlığı yönünden önemli olan protozoanların tanımlanmasında lamp tekniğinin kullanılması ve diğer moleküler tekniklerle kıyaslanması hakkında bilgi vermektir. (*Türkiye Parazit Derg* 2010; 34: 207-11)

**Anahtar Sözcükler:** LAMP (İlimiğe Dayalı İzotermal Çoğaltma Yöntemi), Protozoon, Apicomplexan, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

**Geliş Tarihi:** 01.06.2010

**Kabul Tarihi:** 03.09.2010

### ABSTRACT

*Plasmodium*, *Isospora*, *Toxoplasma*, *Babesia* and *Cryptosporidium* are parasites which have a significant role in human health. The location in which the protozoon settles in the body, the way that it leaves the host, and the sample which is send from the clinic are the elements of the general methods used in the diagnosis of the ailments caused from protozoon. Classical methods are not adequate for the identification of some protozoon; also, molecular methods have to be used in designating the distinctions between the species. In recent years, one of the molecular methods which has been used frequently in the identification of protozoon is the technique of LAMP. With the aid of the LAMP technique, from which it is possible to obtain reliable outcomes without the contribution of technical skills and professional equipment, in constant temperature it is possible to have a great number of copies from the targeted DNA in a short period. The aim of this collation is to give information about the usage of the technique of LAMP in the identification of the protozoa which are important for human health and the comparison between the technique of LAMP and other molecular methods. (*Türkiye Parazit Derg* 2010; 34: 207-11)

**Key Words:** LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), Protozoa, Apicomplexa, Polymerase Change Reaction (PCR)

**Received:** 01.06.2010

**Accepted:** 03.09.2010

### GİRİŞ

İlimiğe Dayalı İzotermal Çoğaltma Yöntemi (LAMP) enfeksiyonları teşhis etmede uygulanan nükleik asit çoğaltma testlerinden biridir. Lamp son yıllarda kullanılan yeni bir teknik olup, 10 yıldan daha az bir zamanda bu teknikle 250 nin üzerinde çalışmanın yapıldığı belirtilmiştir (1).

LAMP prosedürü hızlıdır ve sabit sıcaklıkta (60-70°C) 1 saatte tek bir kopyadan 10 (2) kopya çoğaltılabilir. LAMP tekniğini uygulamak oldukça basit olup yüksek teknik becerilere gerek yoktur (3). Bu teknikte altı adet primer kullanılır, duyarlılık ve özgüllük PCR'dan daha yüksektir bu yüzden birkaç DNA kopyası, bir saat içinde milyarlarca kopya halinde çoğaltılabilir. Kapalı bir sistem olduğu için kontaminasyon

**Yazışma Adresi/Address for Correspondence:** Dr. Zeynep Koloren, Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

Tel: +90 452 251 14 04 E-posta: zeynep.koloren@yahoo.com

doi:10.5152/tpd.2010.16

riski azdır. Farklı miktarlardaki yabancı DNA, yöntemin duyarlılığını etkilemez. Altı primerle sekiz farklı bölgenin tanınması gerektiği için, özgülük ve duyarlılık yüksektir. Uygulanması kolay, Sıcaklık değişiklikleri için zaman kaybı olmadığından, daha hızlı sonuç alınan bir yöntemdir (1, 2).

Lamp tekniğinde 6 adet primer hedef DNA'nın 8 farklı noktasını tanımaktadır. Dış forward primer (F3), dış revers primer (B3), iç forward primer (FIP): 3' ucunda F<sub>2</sub> ve 5' ucunda F1c bölgelerinden; iç revers primer (BIP): 3' ucunda B<sub>2</sub> ve 5' ucunda B1c bölgelerinden oluşmaktadır (Şekil 1 ve 2) (4).

Protozoonlar içinde önemli bir yere sahip *Cryptosporidium* türleri için basit ookist ve kist morfolojisi, konakçı spesifitesi, gibi özellikler moleküler taksonomiye desteklemek amaçlı kullanılmaktadır. Fenotipik olarak aynı olan *Cryptosporidium* türlerinin kesin tanısı, ancak moleküler yöntemler kullanılarak gerçekleştirilebilir.

Bu çalışmada, toplum sağlığının korunması, iyileştirilmesi ve yaşam kalitesinin artırılması için insan sağlığını tehdit eden protozoonların teşhisinde daha güvenilir sonuçların alınacağı, uluslararası kabul edilmiş güncel standart bir metod olan LAMP tekniğinin kullanılması hakkında bilgi vermek amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### Lamp Tekniğinin Uygulanması

Loopamp DNA amplification kit (Eiken Chemical Co. Ltd) kullanılarak bu teknik uygulanır (Resim 1).

Lamp tekniği için;

Distile su,

Primer mix (FIP, BIP, F3, B3),

2X Reaksiyon Tamponu,

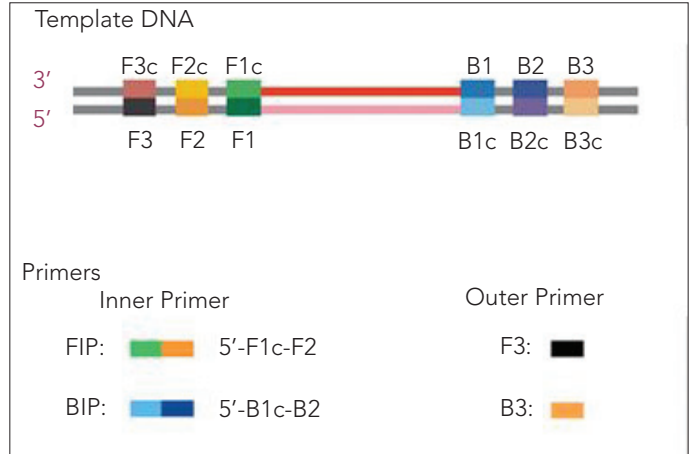
Bst DNA polimeraz enzimi,

DNA örneği gerekmektedir.

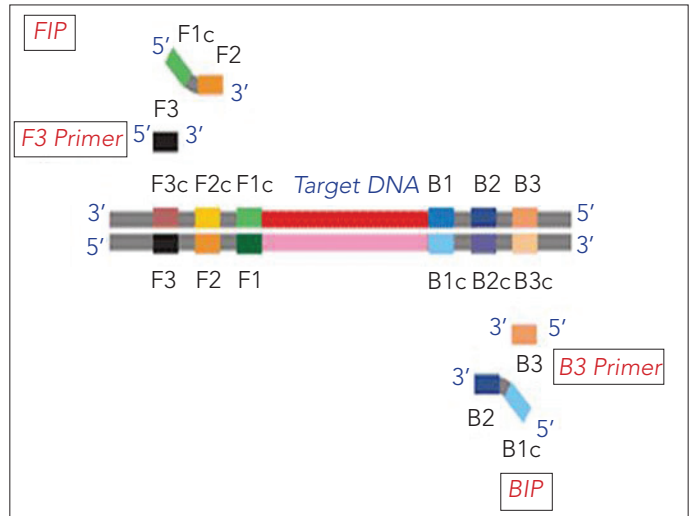
LAMP reaksiyonu 25 µl son hacimde hazırlanır. Bu karışımın 2 µl sini çoğaltılacak DNA örneği oluşturur. 12.5 µl LAMP Tamponu [(40 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM KCl, 16 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, %0.2 Tween 20, 1.6 M betaine ve 2.8mM dNTP ler)]; 0.9 µl primer karışımı (FIB ve BIP primerlerinin her biri 40 pmol, F3 ve B3 primerlerinin her biri 5 pmol, (LF ve LB primerlerinin her biri 20 pmol)), Bst DNA polimeraz'ın 8U (Eiken Chemicals Co, Japan) veya (New England Biolabs, M0275L) 1 µl ve 8.6'sıda distile sudur. LAMP ürünleri ethidium bromide ile boyandıktan sonra %1.5 agarose jel de yürütülür (5).

### Lamp Tekniğinde Primer Dizaynı ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Bu primerler PrimerExplorer V4 software (<http://primerexplorer.jp>) programı kullanılarak çalışılacak protozoonun hedef gen bölgesine göre dizayn edilir. Lamp tekniği uygulandıktan sonra elde edilen sonuçların gözlenmesi %1.5 agaroz jel elektroforezi kullanılıp etidium bromid ile boyanarak sağlanır (Resim 2). Bunun yanı sıra floresan boya yöntemiyle örneklerin çıplak gözle gözlenmesi de mümkündür. Örnekleri tespit etmek için floresan boya konulmuş örnek tüpleri siyah arkaplanda günışığı altında gözleme bırakılır ve pozitif örneklerin bulunduğu tüp yeşil floresan renk verir (Resim 3). LAMP yönteminde görsel olarak bir başka belirleme yöntemi türbidite yöntemidir bu yöntemin esası örnek tüplerine konulan magnezyum fosfat'ın oluşturduğu beyaz çökeltiliye dayanır (Resim 4) (6, 7).



Şekil 1. Lamp tekniğinde kullanılan primerlerin özellikleri

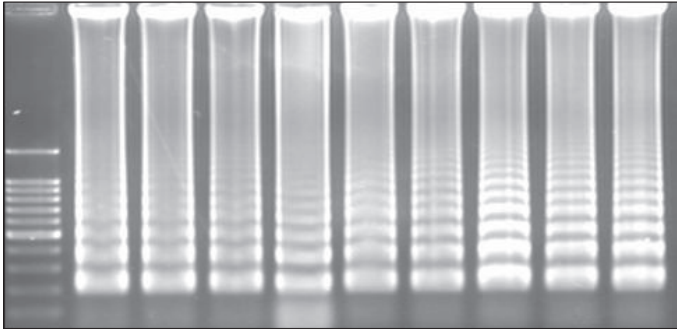


Şekil 2. Lamp tekniğinde kullanılan primerlerin yapısı

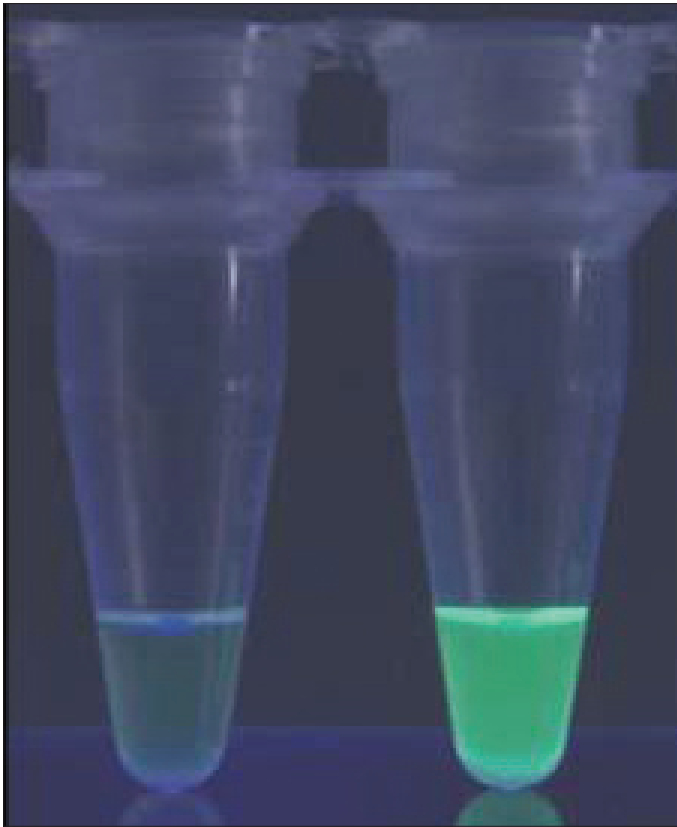


Resim 1. Lamp tekniğinde kullanılan kit

Dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* türlerini ayırtmak için üç farklı Lamp tekniği kullanıldı. SAM geni *C. Parvum*, *C. Hominis* ve *C. Meleagridis* için, gp60 geni *C. Parvum*'u, HSP-70 geni *C. andersoni*'yi tespit etmek için kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan primerler ve uzunlukları Tablo 1'de ki gibidir (8).



**Resim 2.** Lamp tekniğiyle elde edilen bandların agaroz jeldeki görüntüsü

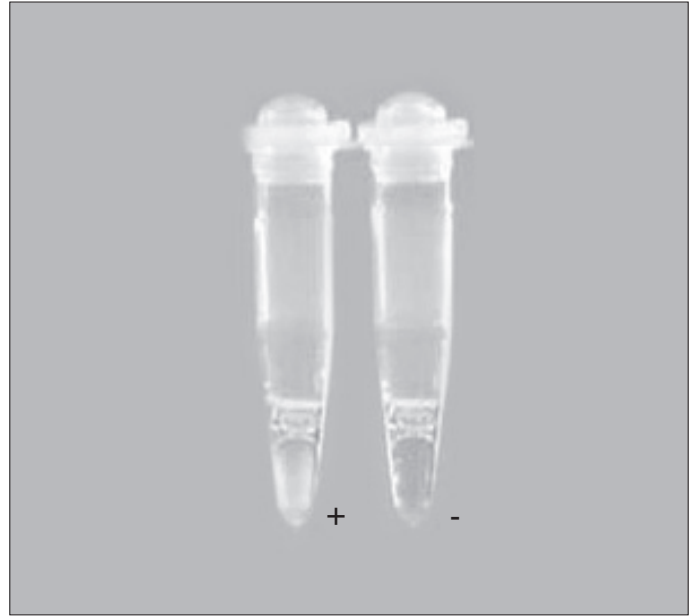


**Resim 3.** SYBR Green I floresan boya ile lamp sonucunun belirlenmesi

#### Protozoonlarda Lamp Tekniği Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Cryptosporidium türlerinin oksitlerini belirlemek için araştırmacıların yaptığı 5 yıl üzerindeki bir çalışmada, aralarında yakın ilişkili türlerin belirlenmesi için farklı yaklaşımlar kullanıldı. Bu farklı yaklaşımlardan biri olan LAMP tekniğinde Cryptosporidium türleri arasında hedef tür olarak *C.parvum* seçildi ve teşhislerde bu türün hedef genleri kullanılmıştır (Şekil 3) (9).

Güney Afrikada sığır, koyun ve atlardan alınan 270 dışkı örneğinden Cryptosporidium türlerinin DNA'sını belirlemek için 3 LAMP (floresan, türbidite ve elektroforez) tekniği kullanıldı. Cryptosporidium 18S rRNA hedef geni ile yapılan nested PCR ve LAMP tekniği sonuçları kıyaslandı. Nested PCR ile tüm örnekler negatif çıkarken, örneklerin 3'te 1'i LAMP tekniği ile pozitif çıktı. Bu çalışmada *C. Parvum*'un gp60 geninin belirlenmesi için LAMP tekniği kullanılmıştır (6).



**Resim 4.** Türbidite ile lamp sonucunun belirlenmesi

*Toxoplazma gondii* Lamp deneyinin özgüllüğünü göstermek için yapılan çalışmada, hedef DNA olarak seçilen *T. gondii*'nin yanı sıra hedef DNA olarak seçilmeyen *N. caninum*, *B. gibsoni*, *B. Bovis*, *C. parvum*, *T. Brucei* ve *T. Parva* protozoonları kullanıldı. Sonuç olarak 60 dakika süren Lamp reaksiyonuyla *T. Gondii* çoğalırken diğer protozoonlarda herhangi bir çoğalma gözlenmemiştir. Sonuçlar real time türbidimetre ile gösterilmiştir (Şekil 4) (5).

*Toxoplazma gondii* ile lamp tekniğinin duyarlılığı ve spesifikliğinin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada LAMP tekniği ve klasik PCR tekniği kıyaslandı. Çalışmada kullanılan Lamp primerlerini dizayn etmek için *T. gondii*'nin 529 bp hedef geni kullanılmış ve elde edilen sonuçlarda çalışılan örneklerin %76.9'u klasik PCR ile, %85.7'si LAMP tekniğiyle pozitif bulunmuştur. Tüm örnekler üzerinde yapılan mikroskopik çalışmalar ve klasik PCR ile pozitif sonuçlanan örneklerin hepsi LAMP tekniğiyle de pozitif çıkmıştır. *T.gondii* üzerinde yapılan çalışmada LAMP ve klasik PCR tekniğinin kıyaslanması sonrasında elde edilen sonuçlar göstermiştir ki hem in vitro şartlarda kültür edilmiş örneklerde hem de belirli bir alanda enfekte olmuş örneklerde *T.gondii*'nin belirlenmesi için LAMP metodu spesifik, duyarlı, hızlı ve kolay bir şekilde uygulanabilir bir metodur. Bu nedenle LAMP metodu *T.gondii* enfeksiyonun tespit edilmesi için güçlü bir araç olarak kullanılabilir gibi araştırmacılar bu tekniği klinik teşhislere uygulamak için de geliştirmelidir (5).

Çin'in kuzeyinde yaygın bir parazit olan koyun ve keçi gibi hayvanlar üzerinde enfeksiyonel hastalıklar bırakan *Babesia spp.* türleri 18S rRNA genleri kullanılarak LAMP tekniğiyle belirlenmiştir. 18S rRNA genlerinin dizisine dayanarak *Babesia spp.* türleri 2 guruba ayrılmıştır. Birinci gurupta *Babesia sp.* BQ1 (linton), *Babesia sp.* (Mingxian), *Babesia sp.* (Tianzhu), *Babesia sp.* (Hebei), *Babesia sp.* (Madang), *Babesia sp.* (Lioning) ve diğer gurupta sadece *Babesia sp.* Xinjiang -2005 olarak belirlenmiştir (10).

Çin'in kuzeyinde Gansu eyaletinden 365 örnek, Xinjiang eyaletinden 145 örnek toplanmış ve bu örnekler hem LAMP tekniği hemde Nested PCR ile çalışıp sonuçları kıyaslanmıştır. 365 örneğin 52 (%14.5) 'si LAMP tekniği ile pozitif çıkarken, Nested PCR

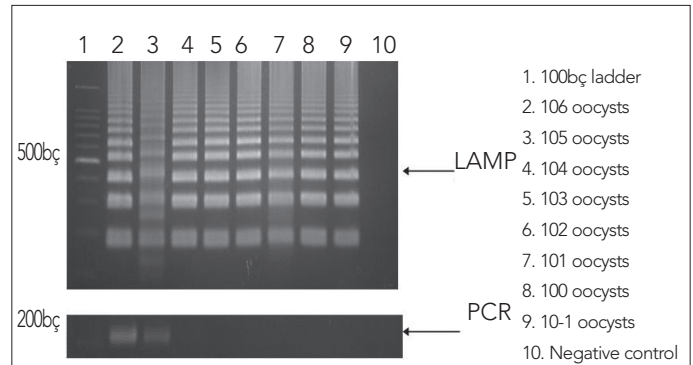
**Tablo 1.** *Cryptosporidium* türleri için kullanılan Lamp primerleri

LAMP assay	Primer type	Sequence (5'→3')	Length	Amplicon size <sup>a</sup>	Target
SAM-1 <sup>b</sup>	F3	ATTTGATRGACAAAGAACTAG	22	145	<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>C. hominis</i> and <i>C. meleagridis</i> S-adenosylmethionine synthetase (SAM) gene
	B3	CGATTGACTTTGCAACAAG	19		
	FIP (F1c-F2)	TTGCGCCCTGTTAATCCAGCAT- TAATTAATCCATCTGGCAGR <sup>TTT</sup>	45		
	BIP (B1-B2c)	TTGTAGATACATACGGAGGATGGG- TCTACTTTAGTTGCATCTTTCC	46		
	LF	CTGCTGGCCCMCCAATTG	18		
	LB	CATGGRGGTGGTGCATTTAG	20		
gp60	F3	TCGCACCAGCAAATAAGGC	19	157	<i>Cryptosporidium parvum</i> , (genotype II) 60-kDa glycoprotein (gp60) gene
	B3	GCCGCATTCTTCTTTGGAG	20		
	FIP (F1c-F2)	ACCCTGGCTACCAGAAGCTTCA- GAACTGGAGAAGACGCAGAA	39		
	BIP (B1-B2c)	GGCCAACTAGTGCTGCTTCCC- GTTTCGGTAGTTGCGCCTT	41		
	LF	GTACCACTAGAATCTTGACTGCC	23		
	LB	AACCCACTACTCCAGCTCAAAGT	23		
HSP-70 <sup>b</sup>	F3	CGTGCAAAGAGAACAACCTTTC	20	115	<i>Cryptosporidium andersoni</i> heat shock protein (HSP)-70 gene
	B3	CCTACTAATACAACATCATGTACT	24		
	FIP (F1c-F2)	TCCTCAAATCTTGACGACTTATWGA- TTCATCTACWCAAGCAACAAT	47		
	BIP (B1-B2c)	GTTCTGATTATTTCCGTGGCACA- CTCTTATCCATTCCAGAATC	43		
	LF	CAAAGTAGTCAATACCTTCGAAC	23		
	LB	TAGCTCCAGTAGAGAAGGTATT	22		

ile 365 örneğin 8'i pozitif çıkmıştır. Xinjiang eyaletinden alınan 145 örnekten 5 (%3.5)'i LAMP tekniği ile pozitif çıkarırken, Nested PCR ile hiç pozitif bulgu elde edilmemiştir (11).

Bulgaristan'da yapılan bir çalışmada 7 ırmak suyundan alınan su örneklerinde *Cryptosporidium* türlerini belirlemek için LAMP tekniği ve PCR çalışmaları kıyaslanmıştır. Alınan su örneklerinin 7'sinde de LAMP tekniği ile *Cryptosporidium* DNA'sı çoğaltılırken, PCR tekniğiyle hiçbir örnekte *Cryptosporidium* DNA'sı belirlenemedi. Su örneklerinde bulunan muhtemel DNA polimeraz inhibitörlerinin varlığından dolayı PCR sonuçlarının negatif olduğunu araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (12), Buna karşın PCR inhibitörlerinin LAMP üzerine etki yapmadığı da vurgulanmıştır (13).

Rostov ve Sofya'da çevre sularında *T. gondii*'yi belirlemek için yapılan bir çalışmada Nested PCR ve LAMP kullanıldı. Alınan su örneklerinde *T. gondii*'yi belirlemek için uygulanan tekniklerde, LAMP tekniği için *T.gondii* B1 geni hedef gen olarak kullanılmış, Nested PCR için ise 18S rRNA geni hedef olarak kullanılmıştır. Rostov bölgesinden 16, Sofya'dan ise 36 su örneği toplanmış ve çalışmalar yapıldıktan sonra sonuçlar kıyaslanmıştır. Rostov'dan alınan 16 su örneğinden Nested PCR ile 2 su örneğinde *T. gondii* belirlenirken LAMP tekniğiyle incelenen 16 su örneğinin 9'unda *T. gondii* tespit edilmiştir. Sofya bölgesinden alınan 36 su örneğinden Nested PCR ile 5 su örneğinde *T. gondii* belirlenirken 16'ında *T. gondii* tespit edilmiştir (14).Σ



**Şekil 3.** Farklı dilusyonlardaki *Cryptosporidium parvum* oocistlerden elde edilen DNA örneklerinde LAMP ve PCR duyarlılık testi

*Giardia duodenalis*' den izole edilmiş A ve B alt gruplarının seri sulandırılmaları yapılmıştır. *G. duodenalis* B alt grubu için 4 sulandırma, *G. duodenalis* A alt grubu için 5 sulandırma yapılarak ve LAMP tekniğiyle bütün sulandırılmalarda *Giardia* DNA'sı çoğaltılmıştır. LAMP tekniği ile bu çalışmada *G. duodenalis* B alt grubu için 0.548 pg DNA çoğaltılmış, *G. duodenalis* A alt grubu için 0.8 pg DNA çoğaltılmıştır. Yine aynı çalışma da *Giardia duodenalis*'i teşhis etmek için dışkı örneklerinden, yüzey sularından ve kanalizasyon sularından toplam 35 örnek alınmıştır. Bu örnekler İmmüno floresan test (IFT), *G. duodenalis*' in 18S rRNA gen dizisini tanıyan PCR, *G.*

*duodenalis*' in glutame dehidrogenase (GDH) gen dizisini tanıyan PCR tekniği, yine *G. duodenalis*' in B alt grubu için triosephosphate isomerase (TPI) genini tanıyan Real-time PCR ve *G. duodenalis*' in uzama faktörü 1/alfa (EF1 $\alpha$ ) genini hedef alan LAMP tekniğiyle 35 örnek çalışılmış ve sonuçlar kıyaslanmıştır. Yapılan çalışmada IFT ile 35 örneğin hepsi pozitif çıkmış, 18S rRNA PCR tekniği ile 35 örneğin 23'ü pozitif çıkmış, GDH PCR ile 35 örneğin 15' i pozitif çıkmış, TPI Real-time PCR ile tüm örnekler negatif çıkmış, EF1 $\alpha$  LAMP tekniği ile 35 örneğin 24'ü pozitif çıkmıştır (15).

## SONUÇ

LAMP tekniğiyle, karmaşık ve profesyonel aletlere gerek olmaksızın reaksiyon karışımının türbidite veya floresan boya ile görsel denetiminin kolay bir şekilde değerlendirilmesi sağlanır. PCR ve diğer moleküler biyolojik teknikler sadece iyi donatılmış laboratuarlarda en iyi uygulanabilir (1).

LAMP tekniğinin en önemli özelliğinden biri pozitif reaksiyonların kolayca belirlenmesine izin veren magnezyum fosfat'ın beyaz çöktelisini büyük miktarda üretebilme yeteneğidir. Bu yöntemle çiplak gözle de pozitif örnekler teşhis edilebilir (2).

Lamp tekniğiyle *Cryptosporidium parvum* ve *Giardia lamblia* gibi parazitler ve bu parazitlerin alt gruplarını belirlemek mümkündür. Lamp yönteminin yüksek duyarlılığı, ekonomik ve kolay uygulanabilir olması bir çok alandaki tanı laboratuvarlarında bu tekniğin kullanımını sağlamaktadır. PCR tanı testinin aksine Lamp tekiği için etkili bir DNA amplifikasyonunda tamamen saf halde elde edilmiş DNA gereksinimi yoktur. Standart bir PCR için harcanan zamanın üçte biri kadar daha kısa sürede sonuç almak mümkündür. Sınırlı koşulların olduğu laboratuarlarda sabit bir sıcaklık kullanılarak yapılacak lamp tekniği için PCR Cihazı veya real time turbidimetre yerine su banyosu veya kuru blok ısıtıcısı kullanılarak 63-65°C lik izotermal sıcaklık sağlanabilir.

Hem zaman hemde ekonomik anlamda edindiğimiz kazanç göz önüne alındığında uluslar arası standartlarda kabul görmüş duyarlılığı yüksek olan bu tekniği kullanarak fekal, su ve gıda kökenli protozoonları tespit etmemiz daha kolay ve daha kısa sürede olacaktır.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışmasının söz konusu olmadığını bildirmişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Notomi T, Okayama H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000; 28: 63.
2. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by

- Loopmediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*, 2002; 16: 223-9.
3. Paris DH, Blacksell SD, Newton PN, Day NP. Simple, rapid and sensitive detection of *Orientia tsutsugamushi* by loop-isothermal DNA amplification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102: 1239-46.
4. Karanis P. European symposium on waterborne pathogens in surface water, groundwater and drinking water. April, 2007 in Luxemburg.
5. Zhang H, Thekisoe OMM, Aboge GO, Kyan H, Yamagishi J, Inoue J, et al. Sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method of *Toxoplasma gondii*. *Experimental Parasitology*, 2009; 122: 47-50.
6. Mori Y, Hirano T, Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnol*, 2006; 6: 3.
7. Soliman H, El-Matbouli M. An inexpensive and rapid diagnostic method of the koi herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. *Virology*, 2005; 2: 83.
8. Mohammed A, Bakheit DT, Lily AP, Thekisoe OMM, Mbatia PA, Ongerth Jerry, et al. Sensitive and specific detection of *Cryptosporidium* species in PCR-negative samples by loop-mediated isothermal DNA amplification and confirmation of generated LAMP products by sequencing. *Veterinary parasitology*, 2008; 158: 11-22.
9. Karanis P, Thekisoe O, Kiouptsi K, Ongerth J, Igarashi I, Inoue N. Development and preliminary evaluation of a loop-mediated isothermal amplification procedure for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal and water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73: 5660-2.
10. Liu A, Yin H, Guan GQ, Schnittger L, Liu ZJ, Ma ML, et al. At least two genetically distinct large *Babesia* species infective to sheep and goats in China. *Veterinary Parasitology*, 2007; 147: 246-51.
11. Guan G, Chauvin A, Luo J, Inoue N, Moreau E, Liu Z, et al. The development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of *Babesia* spp. infective to sheep and goats in China. *Experimental Parasitology*, 2006; 120: 39-44.
12. Sotiriadou I, Kartashev V, Kourenti C, Tsvetkova N, Stojanova K. Investigations on *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water supplies of Rostov region (Southern Russia) and Sofia (Bulgaria). *Environ Res.* 2006; 102: 475-81.
13. Alhassan A, Thekisoe O.M, Yokoyama N, Inoue N, Motloang MY, Mbatia PA, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmosis. *Vet. Parasitol.* 2007; 143: 155-60.
14. Sotiriadou I, Karanis P. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2008; 62: 357-65.
15. Plutzer J, Karanis P. Rapid identification of *Giardia duodenalis* by loop mediated isothermal amplification (LAMP) from faecal and environmental samples and comparative findings by PCR and real-time PCR methods. *Parasitol Res.* 2009; 104: 1527-33.