

KOMPARASI ANTARA POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) DAN LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) DALAM DIAGNOSIS MOLEKULER

Anggun Feranisa*

Keywords:

PCR, LAMP, molecular diagnostic

ABSTRACT

Background: Molecular diagnostic is an emerging diagnostic method in personalized medicine/dentistry era. Usually, it uses nucleic acid amplification method to detect various diseases. PCR is conventional nucleic acid amplification method. However, due to an urgency in infectious diseases' diagnostic method, scientists developed LAMP as new nucleic acid amplification method.

Discussion: There are various experiments used to develop LAMP as infectious diseases diagnostic method compared to PCR. The results are LAMP more sensitive, specific, rapid, and inexpensive than PCR.

Conclusion: Both PCR and LAMP can be used as molecular diagnostic tools. LAMP prefer to used as infectious disease diagnostic method in poor and developing countries.

PENDAHULUAN

Asam Deoksiribonukleat (DNA) merupakan materi genetik yang membawa informasi genetik bagi seluruh makhluk hidup. DNA terdiri atas bagian yang mengkode genetik (ekson), bagian yang tidak mengkode genetik (intron) dan bagian yang mengatur regulasi genetik¹. Karena fungsinya yang membawa informasi genetik, DNA sangat berguna dalam identifikasi penyakit infeksius, kanker, kelainan genetik², bahkan forensik³. Setelah tiga belas tahun lalu, Human Genome Project berhasil mencatat peranan gen-gen pada genom manusia, kini dunia medis memasuki era farmakogenomik^{4,5} untuk tercapainya personalized medicine⁶. Pengobatan akan lebih tepat sasaran jika mengacu pada diagnosis molekuler⁷.

Diagnosis molekuler merupakan metode diagnosis yang bertujuan untuk memahami mekanisme molekuler suatu penyakit pada setiap individu pasien (personalized medicine/dentistry). Metode ini akan sangat menguntungkan dalam peningkatan keamanan

pengantaran obat dan keefektifan terapi pada berbagai penyakit di masa mendatang⁸.

Peranan diagnostik molekuler dalam personalized medicine mencakup aspek-aspek berikut ini⁸:

1. Deteksi dini dan pemilihan metode pengobatan yang aman dan efektif berdasarkan diagnosis molekuler
2. Integrasi antara diagnostik molekuler dengan terapi
3. Pemantauan terapi serta penentuan prognosis

Salah satu teknik identifikasi molekuler yang dapat digunakan sebagai sarana diagnosis penyakit adalah teknik amplifikasi DNA. Teknik ini mampu melipatngandakan untai DNA sampel sehingga dapat dianalisis dengan lebih jelas. Sejak awal ditemukannya, teknik amplifikasi DNA yang digunakan adalah Polymerase Chain Reaction (PCR)⁹. Teknik PCR dinilai memiliki cukup banyak keunggulan dalam mendiagnosis penyakit, namun teknik ini juga memiliki beberapa kekurangan. Oleh

*Departemen Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung

Korespondensi: aferanisa@gmail.com

karena itu, beberapa peneliti mengeksplorasi teknik amplifikasi DNA lebih lanjut, sehingga mereka menemukan metode amplifikasi yang disebut Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)⁷. Baik PCR maupun LAMP, masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan dalam penggunaannya. Artikel ini akan mengulas mengenai perbedaan prinsip kerja, kelebihan, kekurangan, dan aplikasi teknik PCR dan LAMP sebagai metode diagnostik molekuler.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR dikembangkan pada tahun 1984 oleh seorang biokimiawan bernama Kary Mullis². PCR atau reaksi berantai polimerase adalah suatu metode enzimatik dalam bidang biologi molekuler yang bertujuan untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu dengan jumlah kelipatan ribuan hingga jutaan salinan secara *in vitro*^{2,10}. Ketika awal perkembangannya, metode ini hanya digunakan sebagai metode untuk melipatgandakan DNA. Kemudian, metode ini dikembangkan untuk melipatgandakan dan melakukan kuantitasi molekul mRNA¹⁰.

Proses PCR merupakan proses siklus yang berulang meliputi tahap denaturasi, pemisahan kedua untai DNA pada temperatur tinggi. DNA akan terdenaturasi pada temperatur 90 hingga 97 °C². Pada teknik PCR, denaturasi optimum terjadi pada temperatur 95°C selama 30 detik; annealing, tahap penempelan primer pada pita DNA yang sesuai, pada suhu 55 hingga 60°C selama 30 detik; dan ekstensi oleh enzim DNA polimerase pada suhu 72°C dalam waktu yang disesuaikan dengan panjang atau pendeknya ukuran DNA yang diharapkan sebagai produk amplifikasi¹¹. Umumnya, waktu yang digunakan untuk ekstensi DNA pada PCR yaitu 2 – 3

menit².

Enzim DNA polimerase yang digunakan dalam tahap ekstensi adalah Taq DNA polimerase. Enzim ini diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* BM (Taq) dan dikembangkan pada tahun 1988. *Thermus aquaticus* BM merupakan strain yang tidak memiliki endonuklease restriksi Taq1. Taq DNA polimerase tersusun dari satu rantai polipeptida yang memiliki berat molekul kurang lebih 95 kD. Enzim ini memiliki kemampuan polimerisasi DNA yang sangat tinggi, namun tidak memiliki aktivitas eksonuklease 3' ke 5'. Taq polimerase paling aktif pada pH 9¹⁰. Enzim Taq DNA polimerase mampu tahan sampai suhu mendidih 100°C, dan aktivitas optimalnya dapat berlangsung pada suhu 92-95°C^{10,11}. Seperti halnya pada replikasi DNA, enzim DNA polimerase mensintesis DNA dengan arah dari ujung 5' ke ujung 3'¹²

Terdapat beberapa faktor yang dapat menentukan tingkat keberhasilan teknik amplifikasi DNA menggunakan PCR. Faktor-faktor itu antara lain deoksiribonukleotida triphosphat (dNTP); oligonukleotida primer; DNA cetakan (template); komposisi larutan buffer; jumlah siklus reaksi; enzim yang digunakan; dan faktor teknis dan non-teknis lainnya, seperti kontaminasi. PCR memiliki keunggulan yaitu mampu melipatgandakan suatu fragmen DNA sehingga mencapai 109 kali lipat. Oleh karena itu, adanya kontaminasi dalam jumlah sangat sedikit sekalipun dapat mengakibatkan terjadinya kesalahan dengan menghasilkan produk amplifikasi yang tidak diharapkan¹⁰. Amplikon, atau hasil amplifikasi DNA dengan PCR dapat dilihat setelah melalui teknik elektroforesis. DNA amplikon diberi pewarnaan dengan ethidium bromida yang akan berfluoresens ketika dipaparkan pada sinar UV level medium dengan panjang

gelombang 300nm dari UV transilluminator¹².

Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) adalah metode amplifikasi asam nukleat yang baru dan efektif berdasarkan pada prinsip aktivitas pemindahan untai asam nukleat yang mengamplifikasi beberapa salinan DNA target dengan spesifisitas, efisiensi, dan kecepatan tinggi dalam kondisi isothermal. Reaksi siklus pada LAMP dapat menghasilkan akumulasi salinan DNA target sebanyak 109 hingga 1010 kali lipat dalam kurang dari satu jam¹³. Teknik LAMP dikembangkan pertama kali oleh Notomi et al. pada tahun 2000 menggunakan suatu DNA polimerase dan 4 macam primer (2 inner dan 2 outer)^{7,14}. Primer-primer inner terdiri dari forward inner primer (FIB) dan backward inner primer (BIP). Keduanya mengandung sekuens berbeda yang sesuai dengan sekuens sense dan antisense DNA target (template). FIP berperan sebagai primer pada tahap awal, sedangkan BIP berperan sebagai self-primer pada tahap selanjutnya. Sementara itu, yang disebut primer-primer outer adalah primer F3 dan B3^{13,14}. Pengembangan teknik ini didasarkan pada urgensi metode amplifikasi yang cepat, sensitif, spesifik, dan murah untuk diagnosis patogen penyakit infeksius¹³.

Dua tahun kemudian, Nagamine et al. mengembangkan teknik LAMP menjadi lebih cepat dibandingkan sebelumnya. Teknik ini sebagian besar masih sama dengan LAMP konvensional, dengan penambahan primer-primer loop yang dapat berikatan pada sisi stem-loops. Stem-loops tidak dapat diakses oleh primer-primer inner. Aplikasi dari primer-primer loop tersebut mampu mereduksi waktu reaksi LAMP hingga separuh dari waktu reaksi teknik LAMP konvensional⁷.

Mekanisme reaksi amplifikasi LAMP antara lain produksi material awal, siklus amplifikasi, dan resiklus^{13,15}. Berbeda dengan metode PCR, enzim polimerase DNA pada LAMP menggunakan Bst polimerase. Enzim ini diproduksi dari bakteri *Bacillus stearothermophilus*. *B. stearothermophilus* merupakan bakteri termofilik. Enzim Bst DNA polimerase dapat mencapai aktivitas optimal pada suhu 65°C¹⁶. Oleh karena itu, ukuran dan sekuens primer-primer yang digunakan telah diseleksi sehingga nilai melting temperature (T_m) yang digunakan antara 60 hingga 65°C. Suhu ini disesuaikan dengan suhu optimal enzim Bst polimerase¹³.

Sampel pada metode LAMP ini dapat diperoleh dari sampel asal tanpa tahapan isolasi dan purifikasi DNA terlebih dulu⁷. Sampel-sampel yang berasal dari pasien, sampel makanan terinfeksi termasuk jus buah dan berbagai tipe minuman lainnya, sampel sputum, urin, serta sampel lapangan yang diperoleh dari Pusat Kesehatan Masyarakat (Puskesmas) dapat langsung digunakan untuk mendeteksi patogen. Beberapa metode dapat digunakan untuk memperoleh ekstrak template DNA dalam proses LAMP. Metode-metode tersebut bervariasi tergantung pada sumber sampel dan pilihan antara DNA atau RNA yang diperlukan dalam prosedur selanjutnya.

Perangkat kit komersial dengan kolom khusus merupakan perangkat yang paling sering digunakan untuk ekstraksi template dari kultur sel mikrobia, kultur jaringan hewan, dan tumbuhan inang secara langsung¹³. Qiao et al.¹⁶ telah berhasil mengekstrak DNA *Bacillus anthracis* dengan merebus bakteri pada suhu antara 95°C hingga 100°C selama 30 menit di dalam air steril. Mereka menemukan bahwa sampel yang diperoleh telah cukup untuk reaksi LAMP. Sebaliknya, Hatano et al.¹⁷

mengaplikasikan metode fenol dan kloroform untuk ekstraksi DNA dari *Bacillus anthracis*. Grab et al.¹⁸ menambahkan deterjen pada sampel klinis seperti darah dan cairan serebrospinal untuk meningkatkan sensitivitas deteksi infeksi tripanosomiasis dengan metode LAMP. Mikita et al.¹⁹ mengembangkan metode boil-LAMP langsung untuk deteksi infeksi cutaneous leishmaniasis. Sriworarat et al.²⁰ juga menggunakan metode boil-LAMP langsung untuk mendeteksi infeksi *Leishmania* dari sampel klinis seperti darah, saliva, atau jaringan biopsi yang dikoleksi dari pasien dengan kutaneus dan visceral leishmaniasis. Sampel direbus selama 10 menit, kemudian secara langsung direaksikan dengan LAMP tanpa purifikasi DNA. Metode yang digunakan oleh Mikita et al. dan Sriworarat et al. menggunakan DNA kasar, namun terbukti tidak mempengaruhi hasil⁷.

Berbeda dengan PCR, LAMP tidak harus menggunakan proses elektroforesis atau proses tertentu untuk mengamati reaksi positif hasil identifikasinya. Selain menggunakan gel elektroforesis dan UV-transilluminator, hasil amplifikasi LAMP dapat diamati menggunakan mata telanjang. Teknisnya, hasil amplifikasi LAMP diberi penambahan pewarna SYBR Green I ke dalam tabung reaksi LAMP. Selain itu, hasil amplifikasi yang telah diberi penambahan warna dengan SYBR Green maupun picogreen dapat diamati menggunakan Real Time PCR atau alat fluorometer sejenis. Cara terakhir adalah penambahan hydroxyl-naphthol blue, sebagai chelating agent yang menghasilkan warna dikarenakan adanya perubahan pada konsentrasi Mg⁺. Metode ini menghasilkan ampikon yang dapat diamati menggunakan spektrofotometer¹³.

DISKUSI

Hasil komparasi PCR dan LAMP pada Beberapa Penelitian

LAMP merupakan metode diagnostik yang dikembangkan untuk penyakit-penyakit infeksius. Oleh karena itu, materi asam nukleat yang sering dipergunakan adalah DNA dan RNA. Seperti pada RT-PCR, LAMP memiliki metode khusus untuk menganalisis RNA, yaitu RT-LAMP (Reverse Transcriptase LAMP)^{6,21}. LAMP juga dapat menganalisis asam nukleat secara kuantitatif seperti Real Time PCR (ReT-PCR), menggunakan Real Time LAMP (ReT-LAMP)^{6,22}.

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk menguji efektifitas antara metode PCR dan LAMP. Beberapa penelitian tersebut, antara lain:

1. Wang et al.¹⁷ telah menguji metode LAMP untuk mendeteksi berbagai spesies *Arcobacter* dan *Campylobacter* menggunakan sampel DNA. Penelitian ini menunjukkan bahwa LAMP mampu 10 hingga 1000 kali lipat lebih sensitif dibandingkan multiplex PCR. Sementara itu, hasil deteksi menggunakan PCR menunjukkan adanya reaksi silang antara spesies *Campylobacter*.
2. Moslemi et al.¹⁸ membandingkan diagnostik PCR dan LAMP menggunakan virus Hepatitis B (HBV) dari sampel serum pasien. Dari sejumlah 104 HBV yang dianalisis, PCR mendeteksi 95 kasus positif HBV, sedangkan LAMP mendeteksi 101 kasus positif HBV. PCR mendeteksi bahwa 9 kasus negatif, namun pada LAMP 6 kasus tersebut positif. PCR dan LAMP mendeteksi 3 kasus yang sama sebagai kasus negatif HBV.
3. Dinzouna-Boutamba et al.¹⁹ meneliti

- Plasmodium vivax, penyebab malaria, menggunakan sampel darah 177 orang anggota militer Republik Korea. Target analisis adalah gen α -tubulin. Metode LAMP dibandingkan dengan nested PCR, mikroskopi, dan rapid diagnostic test (RDTs) dengan prinsip imunokromatografi. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa LAMP mampu mendeteksi 100 salinan gen α -tubulin per reaksi dalam waktu 50 menit. Hasil ini lebih sensitif dibandingkan metode lainnya.
4. Dong et al.²⁰ meneliti metode diagnostik untuk *Klebsiella pneumoniae* menggunakan LAMP. Penelitian ini membandingkan LAMP dengan PCR dan metode-metode diagnostik lainnya. Target deteksi yang digunakan adalah gen *rcaA* dari *K. pneumoniae* dengan sampel berasal dari ICU tiga rumah sakit yang berbeda di Beijing. Hasil analisis yang diperoleh, LAMP 100 kali lebih sensitif dibandingkan PCR. Selain itu, dari 30 sampel non-*K. pneumoniae* yang ikut diujikan seluruhnya terdeteksi negatif menggunakan LAMP.
 5. Jaianand et al.²¹ meneliti metode deteksi virus Chikungunya (CHIKV) menggunakan metode RT-LAMP. Gen yang menjadi target adalah gen E1. Hasil deteksi telah dapat diamati dalam waktu kurang dari 1 jam. RT-LAMP menunjukkan hasil 10 kali lipat lebih sensitif dibandingkan RT-PCR dengan limit deteksi 0,1 PFU virus.
 6. Raele et al.²² membandingkan metode diagnosis menggunakan ReT-PCR dan ReT-LAMP untuk mendeteksi *Dirofilaria immitis*. Hasil yang diperoleh adalah ReT-LAMP mampu mendeteksi 50 salinan gen COI per μ l yang lebih spesifik dibandingkan ReT-PCR.
 7. Rivera et al.²³ menguji metode LAMP untuk mendeteksi *Entamoeba histolytica* agen penyebab amebiasis dengan gen target yaitu gen hemolisin HLY6. Hasil LAMP yang dibandingkan dengan nested PCR yaitu LAMP tidak mendeteksi gen pada seluruh kontrol negatif menggunakan spesies parasit berbeda yang memiliki morfologi serupa.
 8. Saito et al.²⁴ mengembangkan dan mengevaluasi metode LAMP untuk deteksi cepat *Mycoplasma pneumoniae* menggunakan nasofaringeal swab dari pasien atau individu sehat dibandingkan dengan ReT-PCR. Pada LAMP, tidak terdapat reaksi silang dan spesifik mendeteksi sekuens *M. pneumoniae*. Keakuratan reaksi LAMP tersebut dikonfirmasi menggunakan analisis endonuklease restriksi.
 9. Meng et al.²⁵ menguji metode LAMP untuk mendeteksi giant salamander (*Andrias davidianus*) iridovirus (GSIV) yang merupakan patogen infeksius penyebab penyakit severe hemorrhagic dan penyebab angka kematian yang tinggi pada *A. davidianus*. Hasil yang diperoleh adalah LAMP 10 kali lipat lebih sensitif dan spesifik dibandingkan nested PCR. Metode LAMP mampu mendeteksi virus tersebut dalam konsentrasi sampel 0,01 pg/ μ L.
 10. Wang et al.²⁶ menunjukkan bahwa sensitivitas LAMP dapat menghasilkan positif palsu ketika dibandingkan dengan metode kit komersial.
- Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut, metode LAMP terbukti lebih spesifik dan sensitif dibandingkan dengan metode PCR. Selain itu, karena LAMP menggunakan suhu isothermal, maka metode ini tidak membutuhkan mesin thermocycler yang mahal. LAMP juga

tidak memerlukan tahap isolasi dan purifikasi DNA seperti pada PCR, sehingga metode ini dapat lebih praktis dan efisien waktu. Metode LAMP sangat menjanjikan untuk diaplikasikan sebagai metode diagnosis penyakit infeksius di negara miskin dan berkembang.

KESIMPULAN

PCR dan LAMP merupakan teknik amplifikasi DNA yang dapat digunakan sebagai metode identifikasi dalam diagnosis molekuler. Baik PCR maupun LAMP, masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan. LAMP dapat digunakan sebagai alternatif diagnosis molekuler yang lebih sensitif, efisien, dan murah untuk mengidentifikasi penyakit infeksius dan patogennya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Yuwono, T. 2008. *Biologi Molekuler*. Erlangga. Jakarta. Hal. 49-74
2. Joshi M, Deshpande JD. Polymerase Chain Reaction : Methods , Pr. Int J Biomed Res [Internet]. 2010;1(5):81-97. Available from: www.ssjournals.com
3. Malik R, Misra D, Srivastava PC, Misra A. Review Research Paper Application of Genetics and Molecular Biology In Forensic Odontology Introduction : Corresponding Author : Molecular Biology Studies : Teeth as Genetic Material Source : Human Identification Using DNA : 2012;34(1):55-7.
4. Maheshwari S, Verma SK, Tariq M, Kc P, Kumar S. Emerging trends in oral health profession : The molecular dentistry. 2010;2(4):56-63.
5. Dua J, Gupta A, Pachauri K, Dewangan S. Pharmacogenomics- a boon for chronic diseases. Int J Pharma Bio Sci. 2011;2(2):423-30.
6. Rodríguez-Antona C, Taron M. Pharmacogenomic biomarkers for personalized cancer treatment. J Intern Med. 2015;277(2):201-17.
7. Biswal D. Advances in Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Technology and its Necessity to Detect Helminth Infections: An Overview. Biomarkers J. 2016;2(2):1-6.
8. Jain KK. Textbook of personalized medicine. Textbook of Personalized Medicine. 2009. 1-430 p.
9. Hoff M. DNA amplification and detection made simple (relatively). PLoS Biol. 2006;4(7):e222.
10. Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Penerbit Andi. Yogyakarta. Hal. 1-24
11. Fatchiyah, E.L. Arumningtyas, S. Widyarti, S. Rahayu. 2011. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga. Jakarta. Hal. 48-57
12. Watson, J.D., T.A. Baker, S.P. Bell, A. Gann, M. Levine, & R. Losick. 2004. *Molecular Biology of The Gene*. 5th edition. Benjamin Cumming. Pp. 681-683
13. Pooja S, Sudesh D, Poonam K, Joginder SD, Suresh KG. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of bacteria: A Review. African J Biotechnol [Internet]. 2014;13(19):1920-8. Available from: <http://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/F056E4B44513>
14. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res [Internet]. 2000;28(12):E63. Available from: <http://nar.oxfordjournals.org/content/28/12/e63.abstract> \n<http://nar.oxfordjournals.org/content/28/12/e63.full.pdf>\n<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871386>
15. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nat. Protocol. 3:877-882.
16. Chander Y, Koelbl J, Puckett J, Moser MJ, Klingele AJ, Liles MR, et al. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Front Microbiol. 2014;5(AUG):1-11.
17. Wang X, Seo DJ, Lee MH, Choi C. Comparison of conventional PCR, multiplex PCR, and loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection of *Arcobacter* species. J Clin Microbiol. 2014;52(2):557-63.
18. Moslemi E. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of HBV in Iran. African J ... [Internet]. 2009;3(8):439-45. Available from: <http://www.academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/E70925B13699>
19. Sylvatrie-Danne D-B, Yang H-W, Joo S-Y, Jeong S, Na B-K, Inoue N, et al. The development of loop-mediated isothermal amplification targeting alpha-tubulin DNA for the rapid detection of *Plasmodium vivax*. Malar J [Internet]. 2014;13(1):248. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24981710>
20. Dong D, Liu W, Li H, Wang Y, Li X, Zou D, et al. Survey and rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* in clinical samples targeting the *rcaA* gene in Beijing, China. Front Microbiol. 2015;6(MAY):1-6.
21. Jaianand K, Ramesh M, Gunasekaran P, Sheriff AK. Molecular detection of chikungunya virus targeting the immunodominant envelope (E1) gene: Current status and future applications. Int J Pharma Bio Sci. 2010;1(4).
22. Raele DA, Pugliese N, Galante D, Latorre LM, Cafiero MA. Development and Application of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

-
- Approach for the Rapid Detection of *Dirofilaria repens* from Biological Samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(6):1–13.
23. Rivera WL, Ong VA. Development of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Entamoeba histolytica*. *Asian Pac J Trop Med* [Internet]. 2013;6(6):457–61. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60074-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60074-7)
 24. Saito R, Misawa Y, Moriya K, Koike K, Ubukata K, Okamura N. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 2005;54(11):1037–41.
 25. Meng Y, Zhang H, Liang H, Zeng L, Xiao H, Xie C. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of iridovirus in the Chinese giant salamander. *J Virol Methods* [Internet]. 2013;194(1–2):211–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.024>
 26. Wang D, Wang Y, Xiao F, Guo W, Zhang Y, Wang A, et al. A comparison of in-house real-time LAMP assays with a commercial assay for the detection of pathogenic bacteria. *Molecules*. 2015;20(6):9487–95.