

Minireview**METODE LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) DAN APLIKASINYA UNTUK DETEKSI PENYAKIT IKAN****LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) METHOD AND IT'S APPLICATION FOR FISH PATHOGEN DETECTION**Murwantoko^{*)}**Abstract**

Polymerase chain reaction (PCR) is a method that amplifies DNA which have been widely used in molecular biology technique. Based on the PCR, many methods have been developed on isothermal condition and the useful one is loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP). LAMP reaction employs a *Bst* DNA polymerase and a set of four specific primers that recognizes a total of six distinct sequences of the target DNA and produces amount of different size of DNA. Many advantages have been achieved in LAMP such as the simple equipment for reaction and observation, short time, highly specific and sensitive procedure. LAMP has been used as a tools for detection many pathogens for human, animals and plants. Some fish pathogens as parasites, bacteria and viruses have been detected by LAMP. The principles and application of LAMP method are discussed in this paper.

Key words: Detection, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), Pathogen, PCR

Pengantar

Penemuan struktur asam deoksiribonucleat (DNA) sebagai benang rantai ganda oleh Watson dan Crick pada tahun 1953 telah memberikan landasan pengembangan bioteknologi modern. Teknik *polymerase chain reaction* (PCR) merupakan teknik amplifikasi atau perbanyakkan rantai DNA telah berkembang pesat terutama setelah ditemukannya enzim polimerase DNA yang tahan panas dari bakteri *Thermus aquaticus* oleh Saiki dkk. pada tahun 1988. PCR merupakan pengulangan dari siklus reaksi denaturasi atau pemisahan rantai ganda DNA, *annealing* atau penempelan primer pada sekuen DNA yang sesuai dan polimerisasi atau pemanjangan rantai DNA dari primer untuk membentuk komplemen DNAny. Pengaturan siklus tersebut dilakukan dengan mengatur suhu reaksi dalam suatu *thermocycler* (Sambrook & Russell, 2001).

Metode PCR telah digunakan untuk berbagai kepentingan diantaranya untuk deteksi suatu gen, diagnosis suatu penyakit, kloning, dan mutagenesis suatu gen. Dalam bidang perikanan teknik PCR telah digunakan untuk deteksi penyakit ikan yang tergolong dalam parasit seperti *Mycrosporidium serioale* (Microspora) (Bell *et al.*, 1999), *Myxobolus cerebralis* (Kelley *et al.*, 2004); berbagai bakteri patogen antara lain *Renibacterium salmoninarum* (Leon *et al.*, 1994), *Flavobacterium psychrophylum* (Urdaci *et al.*, 1998), *Piscirickettsia salmonis* (Heath *et al.*, 2000), *Yersinia ruckeri* (Altinok *et al.*, 2001), *Flexibacter columnaris* (Bader *et al.*, 2003), dan *Listonella anguillarum* (Gonzalez *et al.*, 2003) baik menggunakan PCR biasa maupun dengan nested PCR. Metode PCR juga digunakan untuk deteksi penyakit virus dengan genom DNA seperti white spot syndrome virus (WSSV) pada udang, channel catfish virus (CCV) (Boyle & Blackwell, 1991),

^{*)} Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian UGM, Jl. Flora Bulaksumur, Yogyakarta, Telp/Fax: (0274) 551218, E-mail: murwantoko@faperta.ugm.ac.id

iridovirus (Oshima *et al.*, 1998), koi herpesvirus (KHV) (Gilad *et al.*, 2002), dan metode reverse transkriptase PCR (RT-PCR) untuk deteksi taura syndrome virus (TSV), yellow head virus (YHV), nervous necrosis virus (NNV) (Thiery *et al.*, 1999), birnavirus (Blake *et al.*, 1995), haemorrhagic septicaemia virus (VHSV), infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) (Miller *et al.*, 1998), spring viremia of carp virus (SVCV) (Oreskhova *et al.*, 1999), infectious salmon anemia virus (ISAV), haemorrhagic kidney syndrome virus (Kibenge *et al.*, 2000), aquareovirus (Seng *et al.*, 2004).

Dari dasar metode PCR telah dikembangkan metode amplifikasi DNA diantaranya dengan menghilangkan tahap denaturasi dan reaksi dilakukan dalam kondisi isothermal sehingga tidak memerlukan *thermocycler*. Metode tersebut antara lain *self-sustained sequence replication* (3SR) (Guatelli *et al.*, 1990), *nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA) (Compton, 1991), *strand displacement amplification* (SDA) (Walker *et al.*, 1992) dan *loop-mediated isothermal amplification of DNA* (LAMP) (Notomi *et al.*, 2000).

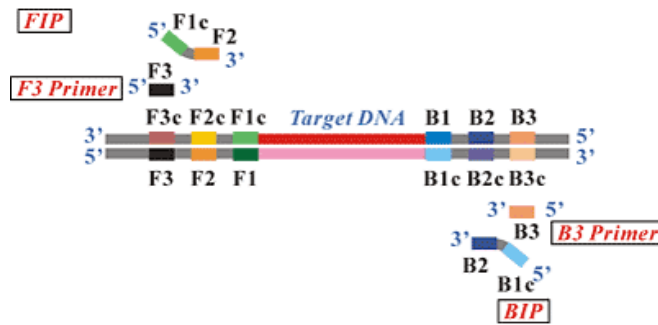
Metode LAMP telah banyak mengatasi kekurangan metode sebelumnya, sehingga telah berkembang luas dalam aplikasinya. Metode LAMP telah digunakan secara luas untuk deteksi suatu gen atau suatu organisme melalui sekuen spesifik bahan genetiknya. Pelacakan publikasi melalui pubmed (www.pubmed.nih.gov) dengan memasukkan kata kunci "loop-mediated isothermal amplification" pada tanggal 27 September 2005 didapat 50 judul publikasi tentang metode LAMP dengan 21 judul yang terbit pada tahun 2004 dan 18 judul terbit pada tahun 2005.

Prinsip Kerja LAMP

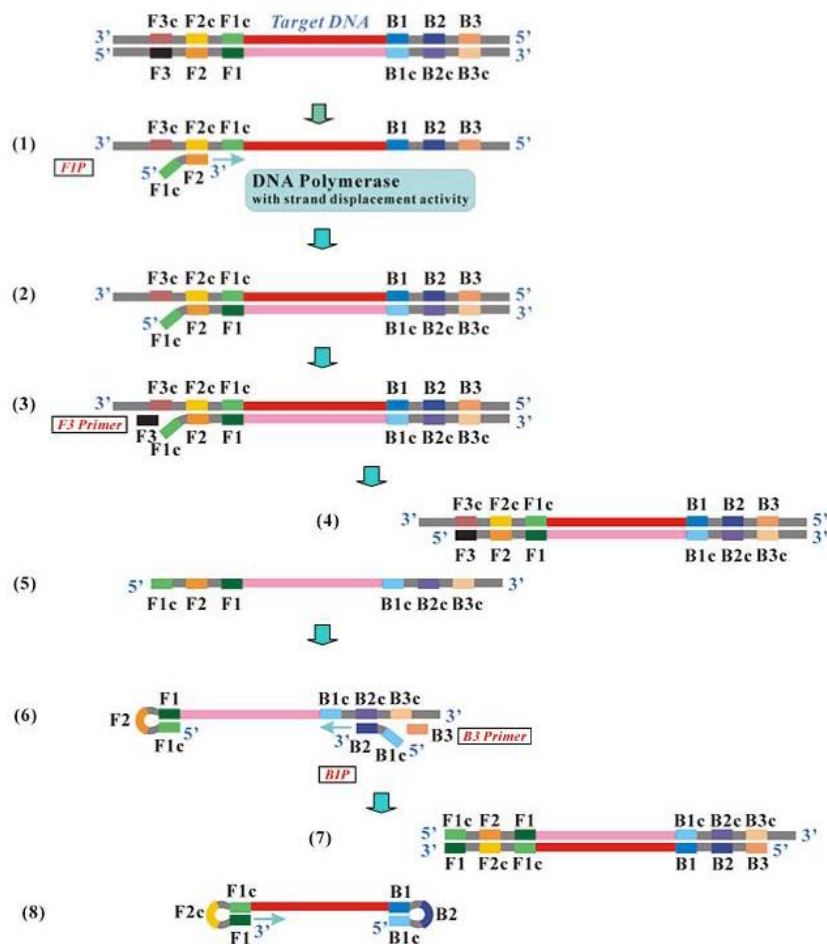
Metode ini mengamplifikasi fragmen DNA melalui mekanisme sintesis dan pemisahan rantai DNA secara otomatis yang dilakukan oleh enzim DNA polimerase dan 4 buah primer yang mengenal 6

daerah spesifik, dengan 3 daerah di masing-masing ujung fragmen DNA-nya. *Forward inner primer* (FIP) terdiri atas sekuen komplementer F1 di ujung 5', linker TTTT dan sekuen F2 di ujung 3'. *Forward outer primer* (F3) merupakan sekuen F3. *Backward inner primer* (BIP) terdiri atas sekuen komplementer B1 di ujung 5', linker TTTT dan sekuen B2 di ujung 3'. *Backward outer primer* (B3) merupakan sekuen B3 (Gambar 1).

Reaksi LAMP terdiri atas tahapan produksi material awal berupa struktur *dumb-bell* (*starting material producing step*), tahapan amplifikasi siklus (*cycling amplification step*) dan tahapan perpanjangan dan siklus berulang (*elongation and recycling step*). Reaksi pada produksi material awal merupakan tahapan yang kritis untuk keberhasilan reaksi LAMP (Gambar 2). Bagian F2 dari FIP akan menempel pada bagian F2c dari DNA template (1) dan akan dilanjutkan dengan perpanjangan DNA ke arah 3' (2). Selanjutnya *Forward outer primer* (F3) akan menempel pada sekuen F3c dari template DNA dan dilanjutkan perpanjangan DNA (3). Perpanjangan ini akan menyebabkan terlepasnya rantai DNA hasil perpanjangan dari primer FIP (5). Rantai DNA yang lepas akan membentuk loop pada ujung 5' yaitu dengan hibridisasi bagian F1 hasil polimerasi dengan F1c dari primer FIP (6). Sementara perpanjangan dari primer BIP dan pelepasannya oleh reaksi polimerasi dari primer B3. Utas rantai yang terlepas akan menghasilkan loop karena hibridisasi B1 pada B1c dan pada ujung yang lain terbentuk loop karena hibridisasi F1 pada F1c, sehingga membentuk struktur *dumb bell* (8). Struktur terakhir ini akan digunakan sebagai bahan utama pada tahapan amplifikasi berikutnya dengan primer FIP dan BIP. Reaksi ini akan menghasilkan beberapa bentuk struktur DNA dengan ukuran yang berbeda-beda. Keterangan lebih lanjut tentang bentuk-bentuk tersebut bisa dibaca pada Notomi *et al.* (2000) atau di website (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>).



Gambar 1. Jenis primer yang digunakan pada LAMP (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>).



Gambar 2. Prinsip kerja LAMP (keterangan rinci di teks) (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>).

Campuran reaksi yang digunakan dalam LAMP mirip dengan campuran reaksi pada PCR kecuali beberapa komponen. Enzim yang digunakan adalah *Bst* (*Bacillus steatothermophilus*) DNA polimerase yang bekerja optimum pada suhu 60-65°C. Primer yang digunakan sejumlah 4 buah dengan perbandingan *inner primer* (FIP, BIP) dan *outer primer* (F3, B3) sebesar 8:1 dan pada umumnya sejumlah 40 dan 5 pmol. Betaine digunakan untuk destablisasi struktur rantai ganda DNA sehingga mudah untuk memisahkan 2 utas rantai DNA dan digunakan pada konsentrasi 0,8 M (Thai *et al.*, 2004), 1 M (Notomi *et al.*, 2000) dan 1,6 M (Gunimaladevi *et al.*, 2004, 2005; Savan *et al.*, 2004).

Salah satu faktor penting dalam LAMP adalah sekuen dari primer. Hibridisasi keempat primer pada DNA target pada tahap *initial* (awal) merupakan titik kritis untuk efisiensi LAMP, sehingga sekuens dan ukuran primer-primer perlu ditentukan agar *temperature melting*-nya (*Tm*) berada pada kisaran tertentu yang optimum. *Tm* sekuen F2 dan B2 pada primer FIP dan BIP dibuat pada kisaran 60-65°C, temperatur yang optimum untuk *Bst* DNA polimerase. *Tm* untuk F1c dan B1c dipilih yang sedikit lebih tinggi dibandingkan F2 dan B2 sehingga akan segera membentuk struktur loop setelah terlepas dari DNA templatnya. Sedangkan *Tm* untuk F2 dan B2 pada *outer primer* (F3 dan B3) dipilih lebih rendah dari F2 dan B2 untuk meyakinkan bahwa sintesis dimulai dari *inner primer*. Di samping itu konsentrasi *outer primer* sekitar 1/8 dari konsentrasi *inner primer* (Notomi *et al.*, 2000). Reaksi LAMP dilakukan pada kisaran temperatur yang optimum untuk *Bst* DNA polimerase diantaranya pada 63°C (Iwamoto *et al.*, 2003, Thai *et al.*, 2004, Gunimaladevi *et al.*, 2005) atau 65°C (Gunimaladevi *et al.*, 2004, Savan *et al.*, 2004, Yeh *et al.*, 2005a).

Pembentukan struktur *dumb-bell* merupakan titik kritis pada tahapan *cycling*. Jarak loop sangat menentukan terbentuknya struktur ini dan ukuran loop antara F2c

(B2c) dan F1c (B1c) sebesar 40 basa atau lebih memberikan hasil yang lebih baik. Tahapan pelepasan rantai DNA merupakan tahap yang penting, oleh karena itu ukuran target DNA tidak bisa sangat besar. Ukuran target DNA termasuk F2 dan B2 hendaknya kurang dari 300 bp, dan ukuran sejumlah 130 dan 200 bp memberikan hasil yang baik. (Notomi *et al.*, 2000).

Penjelasan prinsip kerja LAMP di atas menggunakan DNA sebagai targetnya. Teknik LAMP juga dapat digunakan untuk mendeteksi RNA sebagai bahan genomnya dengan melakukan reverse transkripsi yang dilanjutkan dengan LAMP (RT-LAMP). Notomi *et al.* (2000) berhasil mendeteksi mRNA dari 1 sel K562 yang mengekspresikan antigen spesifik prostate dalam campuran dengan 1.000.000 sel yang tidak menghasilkan antigen.

Aplikasi LAMP

LAMP dan RT-LAMP telah dimanfaatkan untuk melakukan deteksi terhadap berbagai patogen pada tanaman, manusia, dan ikan. Metode LAMP telah berhasil untuk mendeteksi penyakit pada manusia, misalnya *Trypanosoma* (Kuboki *et al.*, 2003), *Mycobacterium tuberculosis* (Iwamoto *et al.*, 2003), *severe acute respiratory syndrome* (SARS) coronavirus (Thai *et al.*, 2004), herpesvirus (Yoshikawa *et al.*, 2004). Pemanfaatan dalam bidang perikanan diantaranya telah digunakan untuk deteksi penyakit ikan baik parasit, bakteri maupun virus. Deteksi penyakit parasit *Tetracapsuloides bryosalmonae* penyebab *proliferative kidney disease* (PKD) pada salmon dengan target *small sub-unit ribosomal RNA gene* (SSU rDNA) telah dilakukan oleh El-Matbouli & Soliman (2005a), *Myxobolus cerebralis* (El-Matbouli & Soliman, 2005b). Deteksi penyakit bakteri dengan teknik LAMP telah dilakukan pada *Edwardsiella tarda* dengan target gen hemolisin (Savan *et al.*, 2004), *E. ictaluri* dengan target gene *eip18* (Yeh *et al.*, 2005a), *Flavobacterium columnare* dengan target gen 16S ribosomal DNA

(Yeh *et al.*, 2005b). Penyakit virus pada ikan yang telah dideteksi dengan LAMP antara lain white spot syndrome virus pada udang (Kono *et al.*, 2004), koi herpes virus pada karper dengan target gen thymidine kinase (Gunimaladevi *et al.*, 2004), infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) pada rainbow trout dengan target gen G-protein (Gunimaladevi *et al.*, 2005), iridovirus pada red seabream (Caipang *et al.*, 2005).

Keunggulan LAMP

Deteksi dengan LAMP dilakukan secara isothermal, sehingga tidak memerlukan mesin *thermocycler* sebagai tempat reaksinya, tetapi cukup dengan menggunakan inkubator waterbath saja. Dengan tidak adanya tahap denaturasi dan *annealing* sebagaimana di PCR, maka metode LAMP menjadi lebih cepat di banding PCR. Reaksi PCR biasanya dilakukan selama 3 jam, sedangkan reaksi LAMP pada umumnya dilakukan selama 1 jam, bahkan reaksi positifnya bisa terlihat pada menit ke-40 (El-Matbouli & Soliman, 2005a) atau ke-45 (Gunimaladevi *et al.*, 2005) yang diamati dengan agarose elektroforesis; dan pada menit ke-11 ketika menggunakan pengamatan *real time* terhadap turbiditasnya (Thai *et al.*, 2004). Reaksi positifnya bisa dilihat secara langsung dari tube dan tidak memerlukan elektroforesis pada agarose. Pemeriksaan visual dilakukan dengan melihat kekeruhan karena presipitasi magnesium pyrophosphat (Mori *et al.*, 2001) atau dengan pewarna intercalating seperti SYBR Green I yang mampu berikatan dengan DNA rantai ganda dan menghasilkan warna hijau (Iwamoto *et al.*, 2003; El-Mathouli & Soliman, 2005a).

Teknik LAMP mempunyai kelebihan dapat mendeteksi keberadaan DNA atau RNA target dalam jumlah sangat rendah. Teknik LAMP mampu mendeteksi sekitar 6 kopi plasmid M12mp18 (Notomi *et al.*, 2000), 10 cfu *E. tarda* (Savan *et al.*, 2004), 20 cfu *E. ictaluri* (Yeh *et al.*, 2005) atau 1 fg genom white spot syndrome

virus (Kono *et al.*, 2004). Dibandingkan dengan nested PCR, teknik LAMP lebih sensitif 10 kali lebih peka dengan nested PCR (Kono *et al.*, 2004, Gunimaladevi *et al.*, 2005).

Teknik LAMP mempunyai keunggulan tingkat spesifitas tinggi, hal ini disebabkan dalam reaksinya ditentukan oleh 4 buah primer yang mengenal 6 daerah spesifik. Spesifitas ini tidak banyak terpengaruh oleh jumlah genom pengkontaminan. Keberadaan 100 ng DNA genom bakteri tidak berpengaruh pada efisiensi amplifikasi ataupun mengakibatkan *background* muncul dalam mendeteksi 6 kopi plasmid target (Notomi *et al.*, 2000).

Selain untuk deteksi penyakit yang ada pada ikan, teknik LAMP telah digunakan untuk mendeteksi keberadaan jasad patogen di perairan. Diantaranya untuk deteksi *E. tarda* di air (Savan *et al.*, 2004). Teknik LAMP juga telah dikombinasikan dengan teknik lain dalam aplikasinya. Fukuta *et al.* (2004) telah mengkombinasikan teknik imunologi dengan LAMP menggunakan metode yang disebut *immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification* untuk deteksi *tomato spotted wilt virus*. Antibodi anti virus dilapiskan dalam mikrotube yang dilanjutkan dengan inkubasi sususpensi jaringan tanaman. Virus yang tertangkap oleh antibodi digunakan untuk reaksi LAMP.

Dibandingkan dengan PCR, LAMP mempunyai keunggulan dalam hal sensitivitas untuk mendeteksi suatu gen. Meskipun demikian sampai saat ini teknik LAMP hanya digunakan pada deteksi suatu gen, dan belum bisa menggantikan pekerjaan-pekerjaan yang lain yang biasa digunakan dengan PCR, misalnya kloning atau mutagenesis.

Penutup

Teknik LAMP merupakan teknik baru yang sangat bermanfaat untuk melakukan deteksi suatu patogen baik dari golongan

parasit, bakteri, virus yang bergenom RNA maupun DNA secara mudah, cepat dan akurat. Perlu dikembangkan deteksi LAMP ini pada patogen-patogen ikan yang lain.

Daftar Pustaka

- Altinok, I., J.M. Grizzle, and Z. Liu. 2001. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. Dis. Aquat. Organ. 44: 29-34.
- Bader, J.A., C.A. Shoemaker, and P.H. Klesius. 2003. Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16-S rRNA gene-based PCR primer for *Flavobacterium columnare*. J. Microbiol. Methods. 52: 209-220.
- Bell, A.S., H. Yokohama, T. Aoki, M. Takahashi, and K. Maruyama. 1999. Single and nested polymerase chain reaction assays for the detection of *Microsporidium seriolae* (Microspora), the causative agent of 'Beko' disease in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Dis. Aquat. Organ. 37: 127-134.
- Blake, S.L., W.B. Schill, P.E. Mc Allister, M.K. Lee, J.T. Singer, and B.L. Nicholson. 1995. Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. J. Clin. Microbiol. 33: 835-839.
- Boyle, J and J. Blackwell. 1991. Use of polymerase chain reaction to detect latent channel catfish virus. Am. J. Vet. Res. 52: 1965-1968
- Caipang, C.M., I. Haraguchi, T Ohira, I. Hirono, and T. Aoki. 2004. Rapid detection of a fish iridovirus using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). J. Virol. Methods. 121: 155-161.
- Compton, I. 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. Nature. 350: 91-92.
- El-Matbouli, M. and H. Soliman. 2005a. Rapid diagnosis of *Tetracapsuloides bryosalmonae*, the causative agent of proliferative kidney disease (PKD) in salmonid fish by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Parasitol. Res. 96: 277-284.
- El-Matbouli, M. and H. Soliman. 2005b. Development of a rapid assay for the diagnosis of *Myxobolus cerebralis* in fish and oligochaetes using loop-mediated isothermal amplification. J. Fish. Disease 28: 549-557.
- Fukuta, S., K. Ohishi, K. Yoshida, Y. Mizukumi, A. Ishida, and M. Kanbe. 2004. Development of immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of tomato spotted wilt virus from chrysanthemum. J. Virol. Methods. 121: 49-55.
- Gilad, O., S. Yun, K.B. Andree, M.A. Adkison, A. Zlotkin, H. Bercovier, A. Eldar, and R.P. Hedrick. 2002. Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi (*Cyprinus carpio*). Dis. Aq. Org, 48: 101-108.
- Gonzalez, S.F., C.R. Osorio, and Y. Santos. 2003. Development of a PCR-based method for the detection of *Listonella anguillarum* in fish tissues and blood samples. Dis. Aquat. Organ. 55:1 09-115.
- Guatelli, J.C., K.M. Whitefield, D.Y. Kwoh, K.J. Barringer, D.D. Richman, and T.R. Gingeras. 1990. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multi enzyme reaction modeled after retroviral replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 7797.

- Gunimaladevi, I., T. Kono, M.N. Venugopal, and M. Sakai. 2004. Detection of koi herpesvirus in common carp, *Cyprinus carpio* L., by loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish. Disease* 27: 583-589.
- Gunimaladevi, I., T. Kono, S.E. Lapatra, and M. Sakai. 2005. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Virol.* 50: 899-909.
- Heath, S., S. Pak, S. Marshall, E.M. Prager, and C. Orrego, 2000. Monitoring *Piscirickettsia salmonis* by denaturant gel electrophoresis and competitive PCR. *Dis. Aquat. Organ.* 41: 19-29.
- Iwamoto, T., T. Sonobe, and K. Hayashi. 2003. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium* and *M. intracellulare* in sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2616-2622.
- Kelley, G.O., F.J. Zagnutt-Vergara, C.M. Leutenegger, K.A. Myklebust, M.A. Adkison, T.S. McDowell, G.D. Marty, A.L. Kahler, A.I. Bush, I.A. Gardner, and R.P. Hedrick. 2004. Evaluation of five diagnostic methods for the detection and quantification of *Myxobolus cerebralis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16: 202-11.
- Kibenge, F.S., S.K. Whyte, K.L. Hammell, D. Rainnie, M.T. Kibenge, and C.K. Martin. 2000. A dual infection of infectious salmon anaemia (ISA) virus and a togavirus-like virus in ISA of Atlantic salmon *Salmo salar* in New Brunswick. Canada. *Dis. Aquat. Organ.* 42: 11-15.
- Kibenge, M.T., B. Opazo, A.H. Rojas, and F.S. Kibenge. 2002. Serological evidence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection in farmed fishes, using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Dis. Aquat. Organ.* 51: 1-11.
- Kono, T., R. Savan, M. Sakai, and T. Itami. 2004. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods.* 115: 59-65.
- Kuboki, N., N. Inoue, T. Sakurai, F. Di Cello, D.J. Grab, H. Suzuki, C. Sugimoto, and I. Igarashi. 2003. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5517-5524.
- Leon, G., N. Maulen, J. Figueroa, J. Villaneuva, C. Rodriguez, M.I. Vera, and M. Krauskopf. 1994. A PCR-based assay for the identification of the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 115: 131-136.
- Miller, T.A., J. Rapp, U. Wasthuber, R.W. Hoffmann, and P.J. Enzmann. 1988. Rapid and sensitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. *Dis. Aquat. Organ.* 34: 13-20.
- Mori, Y., M. Kitao, N. Tomita, and T. Notomi. 2004. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 59: 145-157.
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase, 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acid Research* 28:e63.
- Oreshkova, S.F., I.S. Shchelkunov, N.V. Tikunova, T.I. Shchelkunova, A.T. Puzyrev, and A.A. Ilyichev. 1999. Detection of spring viremia of carp virus isolates by hybridization with non-radioactive probes and amplifi-

- cation by polymerase chain reaction. *Virus. Res.* 63: 3-10.
- Oshima, S., J. Hata, N. Hirasawa, T. Ohtaka, I. Hirono, T. Aoki, and S. Yamashita. 1988. Rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using the polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Organ.* 32: 87-90.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual.* Volume 2. 3rd Ed. CSHL Press. New York. p. 8.11-8.53.
- Savan, R., A. Igarashi, S. Matsuoka, and M. Sakai, 2004. Sensitive and rapid detection of Edwardsiellosis in fish by a loop-mediated isothermal amplification method. *App. Environ. Microbiol.* 70: 621-624.
- Seng, E.K, Q. Fang, T.J. Lam, and Y.M. Sin. 2004. Development of a rapid, sensitive and specific diagnostic assay for fish Aquareovirus based on RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 118: 111-122.
- Thai, H.T.C., M.Q. Le, C.D. Vuong, M. Parida, H. Minekawa, F. Hasabe, and K. Morita. 2004. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome corona-virus. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1956-1961.
- Thiery, R., J.C. Raymond, and J. Castric. 1999. Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction *Virus. Res.* 63: 11-17.
- Urdaci, M.C., C. Chakroun, D. Faure, and J.F. Bernardet. 1998. Development of a polymerase chain reaction assay for identification and detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Res. Microbiol.* 149: 519-530.
- Walker, G.T., M.S. Fraiser, J.L. Schram, M.C. Little, J.G. Nadeau, and D.P. Malinowski. 1992. Strand displacement amplification an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res.* 20: 1691-1696.
- Yeh, H.Y., C.A. Shoemaker, and P.H. Klesius. 2005a. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel catfish *Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *J. Microbiol. Methods* 63: 36-44.
- Yeh, H.Y., C.A. Shoemaker, and P.H. Klesius. 2005. Rapid, specific and sensitive detection of *Flavobacterium columnare* by a loop-mediated amplification method. *American Society of Microbiologists Abstract.*
- Yoshikawa, T., M. Ihira, S. Akimoto, C. Usui, F. Miyake, S. Suga, Y. Enomoto, R. Suzuki, Y. Nishiyama, and Y. Asano. 2004. Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1348-1352.