شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۵، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱
صفحات ۵۹۷-۵۸۳

تشخیص سریع کوی هرپس ویروس (CyHV-3) به روش تکثیر همدما به واسطه حلقه (LAMP) و مقایسه با PCR

میثم باورصاد[۱]، امیررضا عابد علم دوست[۲*]، محمدرضا تابنده[۳]، حمید فرحمند[۴]، علیرضا میرواقفی[۴]، مجتبی علیشاهی[۵]

۱.دانشجوی دکتری گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۲.استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۳. استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۴. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۵. استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۰۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۲۵

DOR: 20.1001.1.20085729.1401.75.4.7.2

چکیده

هرپس ویروس نوع ۳ کپورماهیان (CyHV-3) یا کوی هرپس‌ویروس (KHV)، یک ویروس نوظهور به شدت مسری و با حدت بالا است که سبب ایجاد تلفات سنگین و ناگهانی در ماهی کپور معمولی و کوی و هیبریدهای آنها می‌شود. روش LAMP یک تکنیک مولکولی مبتنی بر تکثیر بسیار اختصاصی اسید نوکلئیک اجرام پاتوژن در شرایط همدما و بدون نیاز به تجهیزات گران‌قیمت می‌باشد که در سال‌های اخیر به منظور تشخیص پاتوژن‌های انسان و حیوانات توسعه یافته است. با توجه به اهمیت تشخیص سریع بیماری کوی هرپس‌ویروس در مزارع مشکوک به آلودگی و پایش دایمی مزارع پرورش کپورماهیان کشور، این مطالعه با هدف ارزیابی روش تلفیقی LAMP با پروب‌های نانوطلا در تشخیص سریع این ویروس صورت گرفت. در این مطالعه با استفاده از ۶ آغازگر اختصاصی، بخشی از ژن تیمیدین کیناز (TK) کوی هرپس‌ویروس با روش بهینه شده LAMP، تکثیر و برای تشخیص رقت‌های مختلف DNA ژنومیک و DNA در نمونه‌های بافتی کپور معمولی، آزمایش اختصاصیت و حساسیت مورد بررسی قرار گرفت و آزمایش سرعت و حساسیت نسبت به روش PCR معمولی نیز مقایسه گردید. نتایج بیانگر اختصاصی بودن صد درصدی و حساسیت تشخیص بر اساس رقت استوک 10^{-8} معادل ۱/۲۵ فمتوگرم در میکرولیتر برای DNA ژنومیک ویروس و 10^{-7} معادل ۸/۲ فمتوگرم در میکرولیتر برای DNA ویروسی آمیخته شده در نمونه بافتی بود. همچنین بر اساس نتایج حاصله، روش LAMP پیشنهادی در مقایسه با PCR معمولی سه برابر سریعتر و ۸۰۰۰ برابر دقیق‌تر بود. با توجه به کارایی بالا، روش LAMP می‌تواند به عنوان یک ابزار قدرتمند و دقیق و سریع جهت شناسایی مولکولی کوی هرپس‌ویروس در آزمایشگاه‌های تشخیصی با تجهیزات اندک مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: هرپس ویروس نوع ۳ کپورماهیان، LAMP، PCR، تشخیص سریع، تکثیر هم‌دما، تیمیدین کیناز.

* نویسنده مسئول: امیررضا عابد علم دوست
Email: amirabed@ut.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 75, No. 4, Winter 2022
pp. 583-597

Development of Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of Cyprinid Herpesvirus-3 (CyHV-3) and its comparison to PCR

Meisam Bavarsad[1], Amirreza Abed-Elmdoust[2*], Mohammad Reza Tabandeh[3], Hamid Farahmand[4], Alireza Mirvaghefi[4], Mojtaba Alishahi[5]

1. Ph.D student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Iran
3. Department of biochemistry and molecular biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
4.Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Iran
5. Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

Received: 04-Jun-2022 **Accepted: 16-Aug-2022**

Abstract

Koi Herpes Virus (KHV or Cyprinid Herpesvirus 3, CyHV-3) is an etiological agent of an emerging and notifiable disease and one of the mostrisky factors affecting common carp and koi worldwide production with high mortality rates. Molecular methods have been developed and routinely used for the detection of KHV infections. These diagnostic tools are sensitive but still have some drawbacks: they require expensive and bulky apparatus, a large sample volume, and long sample preparation/detection times. Therefore, it is desirable to develop simpler, faster, cheaper and more portable detection methods. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique is a novel and next-generation tool which can amplify nucleic acids with high specificity, sensitivity and rapidity under isothermal conditions. In this study, a fragment of the CyHV-3 TK gene was amplified at 65°C in the presence of *Bst* DNA polymerase and a set of six specially designed primer mixture. The reliability, sensitivity and specificity of this assay for rapid detection of CyHV-3 was investigated and compared to conventional PCR. LAMP assay was successfully developed with the detection of KHV-generated product, and showed 100% specificity and sensitivity of 1.25 fg/µL, that is comparable to the most sensitive method reported to date. The assay was 8000 fold more sensitive and three times faster than conventional PCR. The LAMP assay described in this study revealed a highly sensitive, rapid and reliable diagnostic protocol for detection of CyHV-3.

Keywords: KHV, CyHV-3, LAMP, PCR, Rapid detection, Isothermal amplification, Thymidine kinase.

Corresponding author: Amirreza Abed-Elmdoust Email: amirabed@ut.ac.ir

۱. مقدمه

هرپس ویروس نوع ۳ کپورماهیان (CyHV-3[1]) که به طور غیر رسمی، کوی هرپس ویروس (KHV[2]) هم خوانده می شود، یک ویروس نوظهور به شدت مسری و با حدت بالا است که سبب ایجاد تلفات سنگین و ناگهانی در ماهی کپور معمولی[3] و کوی[4] می‌شود (Costes *et al*., 2008) و علاوه بر این گونه ها، قادر ند ایجاد آلودگی در ماهی طلایی[5] و کاراس[6] و هیبریدهای آنها کنند (Sadler *et al*., 2008). موارد متعددی از بیماری تقریبا از تمام کشور های پرورش‌دهنده کپور معمولی و کوی گزارش شده (Bergmann *et al*., 2020) و سبب ایجاد زیان اقتصادی بالایی به صنعت پرورش ماهی کپور معمولی و کوی در سراسر جهان شده است (Haenen *et al*., 2016) . بیماری ناشی از این ویروس، در کنار ویرمی بهاره کپور (SVC[7])، جزو دو بیماری اختصاصی ماهیان گرمابی است که سازمان بهداشت جهانی دام (OIE[8])، گزارش شیوع آنها را الزامی اعلام کرده است. این بیماری اخیرا در خاورمیانه و کشورهای مجاور ایران مانند عراق گسترش یافته (Toffan *et al*., 2020) و در ایران نیز در برخی مراکز نگهداری و تکثیر پرورش کوی و نیز مزارع پرورش ماهیان گرمابی ردیابی و شیوع آن به صورت رسمی اعلام گردیده است (Rahmati-Holasoo *et al*., 2016; Ahmadivand *et al*., 2020).

تجارت بین‌المللی ماهی زنده و حمل و نقل بی‌ضابطه داخلی و بین‌المللی ماهی کوی به عنوان یک ماهی زینتی با ارزش و مهم، از دلایل پخش سریع جهانی این ویروس شمرده می شوند (Radosavljević *et al*., 2017). ویروس قادر به آلوده کردن ماهیان در تمام سنین بوده و خصوصا در زمانی که دمای آب به ۲۵-۱۶ درجه سانتی‌گراد می‌رسد، منجر به بروز ۸۰ تا ۱۰۰ درصد تلفات در جمعیت‌های حساس می‌شود (Haenen *et al*., 2004). مشابه سایر آلودگی‌های هرپس ویروسی، این ویروس می‌تواند در ماهیان آلوده به صورت نهفته باقی بماند. بنابراین حتی ماهیانی که از همه‌گیری این بیماری نجات می‌یابند، تا آخر عمر خود به عنوان حامل و ناقل ویروس محسوب می‌شوند (Eide *et al*., 2011).

عامل بیماری، یک ویروس DNA دار از خانواده Alloherpesviridae بوده (Haramoto *et al*., 2007; Waltzek *et al*., 2009) که با ژنومی به طول ۲۹۵ kbs، دارای بزرگ‌ترین ژنوم در راسته خود است (Davison, 2010). نوکلئوکپسید این ویروس، ۱۱۰-۱۰۰ نانومتر قطر دارد و با یک غلاف[9] پوشیده شده است (Ilouze *et al*., 2011).

علائم کلینیکی بیماری ناشی از این ویروس، عموما غیر اختصاصی بوده و رنگ‌پریدگی و نکروز شدید آبششی، از مهمترین این علایم محسوب می شود (OIE, 2018). با توجه به عدم وجود درمان موثر، توسعه یک روش تشخیص حساس، سریع و اختصاصی جهت شناسایی این ویروس و جلوگیری از شیوع گسترده آن، حیاتی است. روش‌های تشخیص مختلفی اعم از مستقیم و غیرمستقیم، برای شناسایی این ویروس مورد استفاده قرار گرفته‌اند که از آن جمله می‌توان به روش هایی مثل جداسازی[10] و شناسایی ویروس با استفاده از تیره سلولی حساس

[1] Cyprinid herpesvirus-3
[2] Koi Herpesvirus
[3] *Cyprinus carpio*
[4] *Cyprinus carpio koi*
[5] *Carassius auratus*
[6] *Carassius carassius*
[7] Spring viraemia of carp
[8] World organization for animal health
[9] Envelope
[10] Isolation

(Hedrick *et al*., 2000)، تکنیک‌های هیستوپاتولوژی، بررسی‌های میکروسکوپی و روش‌های سرولوژیک مبتنی بر تشخیص بروز واکنش ایمنی در برابر بیماری پس از مواجهه ماهی با ویروس و سطوح آنتی‌بادی‌های تولید شده در بدن ماهی (الایزا)، اشاره نمود (Ronen *et al*., 2003; Adkison *et al*., 2005; St-Hilaire *et al*., 2005). این روش‌ها، عموما زمان‌بر و پرزحمت بوده و معمولا فقط در زمان فاز مرگ و میر، مؤثر هستند و در مراحل اولیه بیماری قابلیت کاربردی نداشته و زمان نسبتا زیادی بعد از آلودگی، قادر به تشخیص عامل بیماری‌زا هستند (El-Matbouli *et al*., 2007). همچنین این روش‌ها عموماً برای شناسایی ماهیان ناقل، نامناسب می‌باشند (Monaghan *et al*., 2014). در این راستا، روش های مولکولی به دلیل سادگی و سرعت و دقت بالا، جایگزین قدرتمندی در تشخیص پاتوژن‌ها محسوب می‌شوند. از مؤثرترین این روش‌ها، تکنیک‌های مبتنی بر تکثیر اسیدهای نوکلئیک[1] است که از با ارزش‌ترین ابزارها در تمام زمینه‌های علوم زیستی محسوب می‌شوند. گروهی از این تکنیک‌ها، بر اساس تکثیر ژن هدف عمل می‌کنند که خود شامل روش‌های مبتنی بر استفاده از چرخه‌های دمایی و روش‌های تکثیر در شرایط هم‌دما (Bergmann *et al*., 2020). از گروه اول، آزمون‌های مختلف PCR، nPCR و qPCR جهت شناسایی DNA کوی هرپس ویروس طراحی شده‌اند (Gray *et al*., 2002; Gilad *et al*., 2004; Bercovier *et al*., 2005) که با وجود سرعت و دقت مناسب و کارایی نسبتا بالا، وابستگی آنها به دستگاه گران‌قیمت ترموسایکلر و مواد مصرفی پرهزینه و همچنین نیاز به استفاده از روش‌های وقت‌گیر و هزینه‌بر جهت آشکارسازی و تشخیص محصولات (Wong *et al*., 2017)، کاربرد آنها را در مناطق کم‌امکانات و دورافتاده و شرایط میدانی (مانند سر مزرعه)، با محدودیت مواجه می‌کند. برای غلبه بر این مشکلات، در سال‌های اخیر روش تکثیر هم‌دما به واسطه حلقه (LAMP) ابداع و توسعه یافته (Notomi *et al*., 2000) که مبتنی بر فعالیت سنتز خودکار DNA با استفاده از خاصیت جایگزین‌سازی رشته توسط آنزیم *Bst* DNA Polymerase تحت شرایط هم‌دما (۶۵-۶۰ °C درجه سانتی‌گراد) است و منجر به تولید مقادیر زیادی از DNA هدف طی مدت زمان ۶۰-۳۰ دقیقه می شود (Mori *et al*., 2001). با توجه به استفاده از ۴ تا ۶ آغازگر که در مجموع ۶ تا ۸ ناحیه مختلف DNA را مورد شناسایی قرار می‌دهند، این روش یک فناوری بسیار انتخابی و با حساسیت و اختصاصیت بالا محسوب می‌شود. در بین روش‌های تکثیر هم‌دما، علاوه بر فناوری LAMP، از تکثیر پلیمراز نوترکیب (RPA) نیز برای شناسایی ویروس CyHV-3 استفاده شده است (Prescott *et al*., 2016) که همانند LAMP، برای تولید محصول از آنزیم DNA پلی‌مراز استفاده می‌کند (Bai *et al*., 2022). هدف از این مطالعه، ارزیابی روش LAMP به عنوان یک روش مولکولی بهینه شده به عنوان ابزار آزمایش نقطه مراقبت (POCT[2]) جهت شناسایی ویروس CyHV-3 بدون نیاز به مواد و تجهیزات هزینه‌بر و مقایسه بین مزایا و معایب این روش با PCR است که در نهایت منجر به ارائه یک روش تشخیصی دقیق و قابل انجام در آزمایشگاه‌های کم‌امکانات جهت شناسایی سریع و زودهنگام این ویروس می‌گردد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. نمونه کنترل مثبت

در این پژوهش از DNA ژنومی کوی هرپس‌ویروس، استخراج شده در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده گردید.

۲.۲. انتخاب ژن هدف و طراحی آغازگرها

[1] Nucleic acid amplification-based method

[2] Point-of-care testing

ژن تیمیدین کیناز (TK) به طول ۶۵۱ جفت باز (شماره دسترسی بانک ژن AJ535112) به عنوان نشانگر ژنتیکی اختصاصی برای شناسایی کوی هرپس ویروس مورد هدف قرار گرفت. جهت انجام واکنش LAMP، مجموعه‌ای از شش آغازگر اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار Primer Explorer نسخه ۵ جهت تکثیر یک توالی منحصر به فرد ۲۱۲ جفت بازی از ژن TK، طراحی و ساخته شد. برای واکنش PCR نیز از دو آغازگر اختصاصی بر اساس توالی ژن TK کوی هرپس ویروس جهت تولید محصول ۴۱۰ جفت بازی استفاده گردید (جدول ۱).

جدول ۱- توالی و مشخصات آغازگرهای طراحی شده جهت انجام واکنش LAMP و PCR

آغازگر	طول	توالی (3′–5′)
F3	۱۶	ACAGCGGCGCGACCTA
B3	۱۸	CGCCGTCACCTGCTTGAA
FIP	۳۷	CCACGGCGTCGTATTCCTCC AGCCATCTCCGCGGGTT
BIP	۴۱	CTACGAGGGAGTCGTGCAGCT GGGGCTGCTGCATAAAGTCC
LF	۲۰	CGCTGCATCACCTCGTACAG
LB	۲۰	CGCGGGCAAGTACGTGATCG
PCR-TKR	۲۰	ATCTTGCACTTCATGCACAC
PCR-TKF	۲۰	GCTATGCTGGAACTGGTCAT

۳.۲. استخراج DNA

به منظور آماده‌سازی نمونه جهت استخراج DNA، یک گرم بافت کلیه ماهی کپور معمولی سالم جداسازی و با استفاده از نیتروژن مایع و هاون، به طور کامل آسیاب شد. سپس با توجه به اختلاف حجم نهایی در واکنش PCR و LAMP، ۵۰ میلی‌گرم از بافت پودر شده با ۵۰ میکرولیتر از هر کدام از رقت‌های سریالی ده برابری از DNA کوی هرپس‌ویروس برای آزمون PCR و ۶۲/۵ میکرولیتر از این رقت‌ها برای آزمون LAMP به صورت جداگانه مخلوط و به همراه ۱۰۰ میکرولیتر بافر Prelysis و ۵ میکرولیتر ریبونوکلئاز A در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ورتکس شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس ۳۰ میکرولیتر پروتئیناز K به میکروتیوب اضافه و مخلوط و به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری و مطابق دستورالعمل سازنده کیت (شرکت سیناکلون، ایران) صورت گرفت و تخلیص نهایی DNA در ۵۰ میکرولیتر بافر Dilution انجام شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

۴.۲. بهینه‌سازی واکنش LAMP و PCR

جهت حصول واضح‌ترین و اختصاصی‌ترین باند در واکنش PCR، دمای اتصال آغازگرها بهینه گردید. بدین منظور، شیب دمایی دستگاه ترموسایکلر برای دماهای ۴۲، ۴۴، ۴۶، ۶۰، ۶۲ و ۶۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و پس از انجام الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد، بهترین دما انتخاب گردید. همچنین شاخص های اصلی واکنش LAMP شامل غلظت $MgSO_4$، غلظت DNA الگو و مدت زمان انجام واکنش، برای به دست آوردن مقادیر بهینه این عامل، مورد آزمایش قرار گرفتند. برای بهینه‌سازی غلظت سولفات منیزیوم سه واکنش تکثیر با سه غلظت مختلف MgSO4 (شامل ۴، ۶ و ۸ میلی‌مولار)، برای بهینه‌سازی DNA الگو سه واکنش تکثیر با دو غلظت مختلف DNA نمونه (شامل ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم در واکنش) و جهت بهینه‌سازی زمان واکنش، هفت واکنش تکثیر با زمان‌های متفاوت شامل ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵ و ۶۰ دقیقه با

ثابت نگه داشتن سایر عوامل واکنش انجام گرفت. محصولات این واکنش‌ها توسط الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفت و با توجه به شدت باندهای ایجاد شده، مقادیر بهینه مشاهده و ثبت گردید.

۵.۲. دستورالعمل واکنش LAMP و PCR

مخلوط واکنش با حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس[1] (غلظت $MgCl_2$ معادل ۱/۵ میلی‌مولار)، آغازگرهای TK-R و TK-F با غلظت ۲۵۰ نانومولار و DNA الگو با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در واکنش به عنوان پروتکل PCR در این مطالعه استفاده گردید. واکنش LAMP بر اساس دستورالعمل بهینه معرفی شده توسط Notomi و همکاران (۲۰۰۰) طراحی گردید:

مخلوط واکنش با حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی آغازگرهای F3 و B3 با غلظت ۰/۲ میکرومولار و غلظت‌های آغازگرهای FIP و BIP با غلظت نهایی ۱/۶ میکرو مولار، آغازگرهای LF و LB با غلظت نهایی ۰/۴ میکرو مولار، مخلوط dNTP با غلظت ۱/۴ میلی‌مولار، بافر 1x، سولفات منیزیوم با غلظت ۶ میلی‌مولار، آنزیم *Bst* 2.0 DNA polymerase و ۱/۵ میکرو لیتر نمونه DNA تهیه شد. آماده سازی مخلوط واکنش، روی یخ انجام گرفت و سپس نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه و نهایتا به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد غیر فعال‌سازی آنزیم انجام شد.

۶.۲. ارزیابی اختصاصیت روش LAMP

جهت بررسی اختصاصیت روش LAMP نسبت به کوی هرپس‌ویروس، از نمونه DNA ژنومیک ویروس CyHV-3 به عنوان کنترل مثبت و از نمونه DNA استخراج شده ویروس‌های CyHV-1 و CEV و همچنین DNA استخراج شده از بافت سالم آبشش و کلیه قدامی ماهی کپور معمولی و نمونه بلانک (حاوی آب دیونیزه) به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

۷.۲. ارزیابی حساسیت روش LAMP

به منظور بررسی میزان حساسیت واکنش LAMP و آغازگرهای طراحی شده، رقت‌های سریالی از DNA ژنومی کوی هرپس‌ویروس از 10^{-1} تا 10^{-10} تهیه و حساسیت واکنش بر اساس توانایی آن در تشخیص کمترین تعداد کپی DNA، تعیین گردید.

۸.۲. ارزیابی و آشکارسازی محصولات تکثیر

به منظور ارزیابی محصولات تکثیر واکنش LAMP و PCR، از روش الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد در بافر TAE استفاده گردید.

۳. نتایج

۳،۱. نتایج حاصل از بهینه سازی پروتکل PCR و LAMP

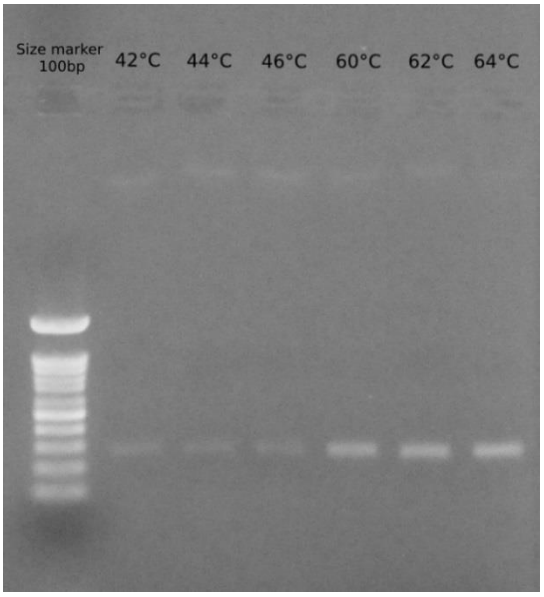
نتایج تعیین دمای بهینه اتصال[2] آغازگرها در واکنش PCR، نشان‌دهنده این است که اگرچه در تمام دماهای مورد آزمایش، باند اختصاصی ایجاد شد، ولی باند ایجاد شده در دماهای ۶۰، ۶۲ و ۶۴ درجه سانتی‌گراد، دارای شدت بیشتری نسبت به سایر دماها ست (شکل ۱). با توجه به اینکه شدت باندهای تشکیل شده در این دماها فرق چندانی با هم نداشتند، در این پژوهش از دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد برای پروتکل PCR استفاده گردید.

در خصوص واکنش LAMP، بر اساس نتیجه ارزیابی واکنش‌های انجام شده، در تمام غلظت‌های مورد آزمایش یون منیزیوم (Mg^{2+}) و مقدار DNA الگو، باند اختصاصی ایجاد شد، ولی با توجه به شدت باند، غلظت بهینه برای MgSO4 و نمونه DNA به ترتیب ۴ میلی‌مولار و ۵۰ نانوگرم در واکنش تعیین گردید (شکل ۲ الف). همچنین

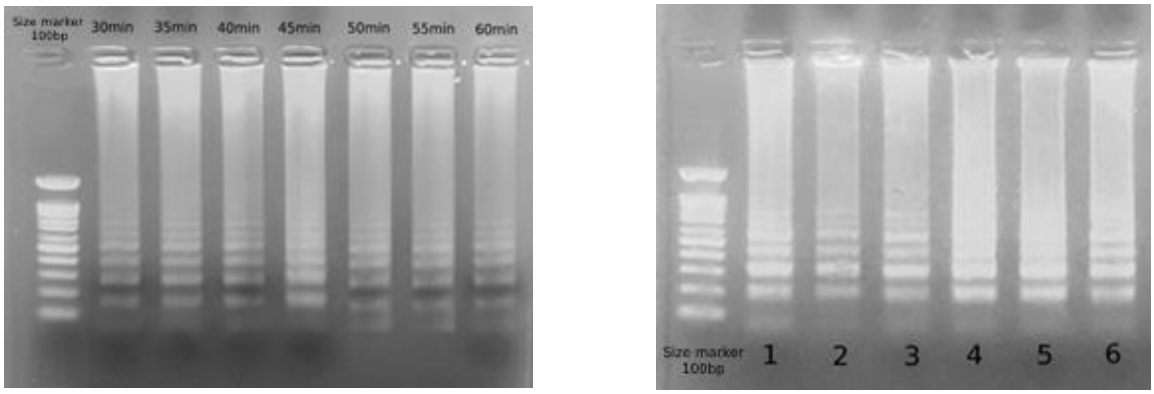
[1] 0.08 Units/µL Taq DNA Polymerase in reaction buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP, 0.4 mM dTTP

[2] Annealing

نتایج حاصل از بهینه‌سازی مدت زمان واکنش، بیانگر زمان بهینه ۴۵ دقیقه بر اساس ایجاد باند قوی‌تر در الکتروفورز روی ژل آگارز بود، هر چند در تمام زمان‌های مورد آزمایش (از ۳۰ دقیقه تا ۶۰ دقیقه) برای LAMP، باند اختصاصی ایجاد شد (شکل ۲ ب).



شکل۱-تصویر نتایج حاصل از تعیین دمای بهینه Annealing



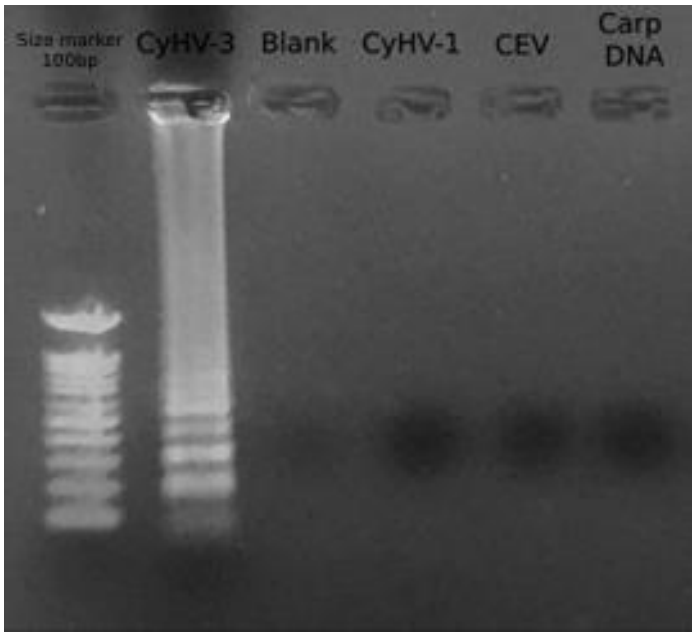
(ب) **(الف)**

شکل ۲- الکتروفورز روی ژل آگارز محصول واکنش‌های بهینه‌سازی LAMP (الف) غلظت MgSO4 و DNA نمونه (1: MgSO4 2 mM, DNA 100 ng/RX، 2: MgSO4 4 mM, DNA 100 ng/RX، 3: MgSO4 6 mM, DNA 100 ng/RX، 4: MgSO4 2 mM, DNA 50 ng/RX، 5: MgSO4 4 mM, DNA 50 ng/RX، 6: MgSO4 6 mM, DNA 50 ng/RX). (ب) زمان واکنش LAMP

۲,۳. نتایج حاصل از ارزیابی اختصاصیت روش LAMP

به منظور بررسی میزان اختصاصیت تکنیک LAMP و ژن هدف، واکنش LAMP برای نمونه‌های کنترل منفی و کنترل مثبت با شرایط بهینه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. مطابق شکل ۳، تکثیر تنها در ژن هدف ویروس CyHV-3 صورت گرفت و در سایر DNAهای ویروسی کنترل منفی، نمونه کنترل منفی حاوی آب دیونیزه (بلانک) و نمونه کنترل منفی حاوی DNA

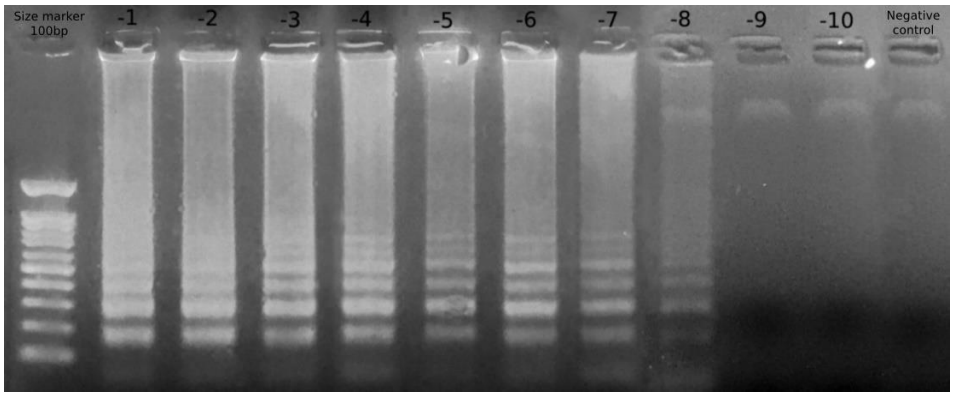
ژنومیک ماهی کپور معمولی، هیچ گونه باندی دیده نشد.



شکل ۳- تصویر واکنش LAMP جهت تعیین اختصاصیت

۳,۳. نتایج حاصل از ارزیابی حساسیت روش LAMP

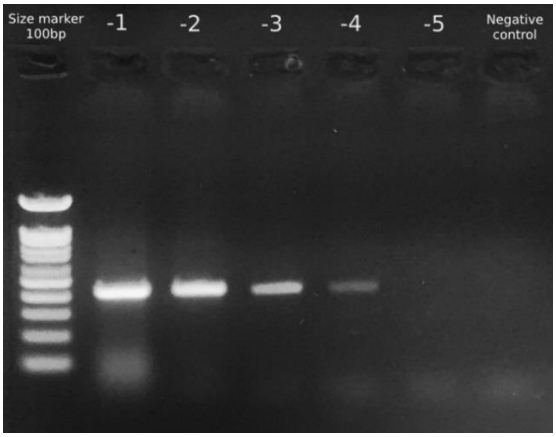
نتایج ارزیابی محصولات LAMP با استفاده از رقت‌های سریالی ده برابری تهیه شده روی الکتروفورز روی ژل آگارز، بیانگر مشاهده باند اختصاصی تا رقت استوک $۱۰^{-۸}$ است که نشان‌دهنده کمترین حد تشخیص معادل ۱/۲۵ فمتوگرم DNA در میکرولیتر است (شکل ۴).



شکل۴ - تصویرنتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگارز محصولات تکثیر شده رقت سریالی ده برابری DNA الگو توسط LAMP

۴,۳. نتایج حاصل از ارزیابی حساسیت روش PCR

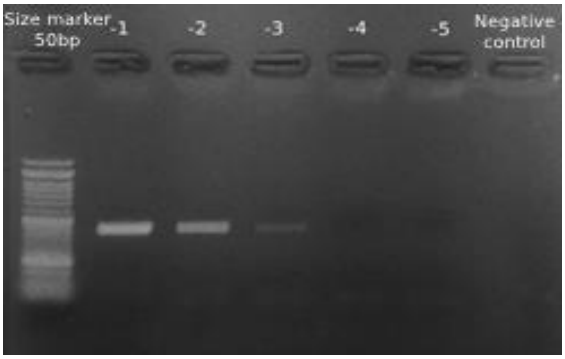
به منظور مقایسه حساسیت روش LAMP با PCR متعارف، رقت‌های سریالی تهیه شده، با استفاده از دو آغازگر اختصاصی تکثیر شدند که نتایج ارزیابی محصولات با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز، بیانگر تشکیل باند ۴۱۰ جفت‌بازی تا رقت استوک $۱۰^{-۴}$ و در نتیجه کمترین حد تشخیص PCR معادل ۱۰ پیکوگرم DNA در میکرولیتر است (شکل ۵).



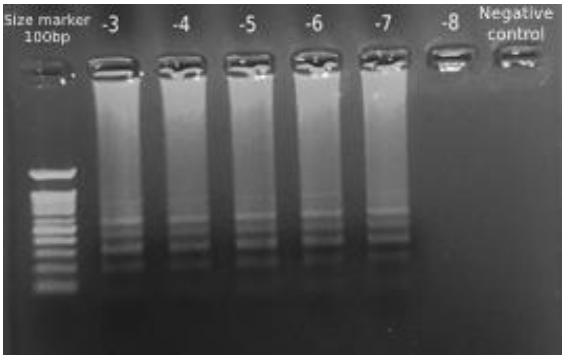
شکل ۵- تصویر نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگارز محصولات تکثیر شده رقت سریالی ده برابری DNA الگو توسط PCR

۵،۳. نتایج حاصل از ارزیابی حساسیت روش LAMP و PCR متعارف در شناسایی DNA کوی هرپس‌ویروس پس از آمیختگی در نمونه بافت سالم کلیه کپور معمولی

نتایج حاصل از PCR رقت‌های سریالی DNA ویروسی ممزوج شـــده با بافت ســـالم، نشـــان‌دهنده کمترین حد تشخیص PCR به میزان رقت استوک 10^{-3}، معادل ۱۰۳ پیکوگرم در میکرولیتر می‌باشـد (شـکل ۶ الف). همچنین نتایج ارزیابی حساسیت روش LAMP در شناسایی حداقل رقت DNA ویروســـی اســـتخراج شـــده از بافت، بیانگر کمترین حد تشخیص به میزان رقت استوک 10^{-7}، معادل ۸/۲ فمتوگرم در میکرولیتر است (شکل ۶ ب).



(الف)



(ب)

شکل ۶- تصویرنتایج بررسی حساسیت آزمون‌های PCR (الف) و LAMP (ب) در شناسایی حداقل رقت DNA ویروسی استخراج شده از بافت

۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

تشخیص سریع CyHV-3 جهت اتخاذ اقدامات مناسب در جلوگیری از انتشـــار این بیماری مســـری، امری حیاتی ا ست. هرچند طیف و سیعی از آزمون‌های مبتنی بر تکثیر ا سیدهای نوکلئیک برای شنا سایی زودهنگام این ویروس در نمونه‌های بالینی توســـعه یافته‌اند، ولی توانایی این آزمون‌ها در برآورده کردن الزاماتی مثل سادگی، حساسیت و اخت صا صیت بالا به طور همزمان، همچنان نیاز به اثبات دارد، به طوری که بیشتر روش‌های مولکولی رایج به دلیل اســـتفاده از تجهیزات پیچیده و دســـت‌ورزی پس از تکثیر که نیازمند صرف زمان بی شتر برای ر سیدن به خوانش و ارزیابی نهایی نتایج هســـتند، به چنین تمایزی دســـت

نمی‌یابند. هدف از انجام این پژوهش، ارزیابی و سنجش تکنیک LAMP به عنوان یک روش مولکولی بهینه شده و سریع جهت شناسایی کوی هرپس‌ویروس و مقایسه آن با روش متداول PCR بود. در این پژوهش، ژن تیمیدین کیناز (TK) یا ORF55 به عنوان نشانگر ژنتیکی اختصاصی برای شناسایی کوی هرپس‌ویروس مورد هدف قرار گرفت که از مهمترین ژنهای دخیل در سنتز DNA ویروس CyHV-3 و نیز از عوامل مهم موثر در حدت ویروس، بروز علایم کلینیکی و مرگ و میر محسوب می‌شود (Fuchs et al., 2011). نتایج آنالیزها یا تجزیه ژنومیک مقایسه‌ای، بیانگر این است که توالی ژن TK کاملا اختصاصی و منحصر به کوی هرپس ویروس (CyHV-3) است و بر همین اساس، از بهترین کاندیداها جهت انتخاب ژن هدف برای تشخیص این ویروس محسوب می‌شود. نتایج سایر تحقیقات انجام شده نیز نشان می‌دهند که استفاده از آغازگرهایی که بر اساس ژن TK کوی هرپس ویروس طراحی می‌شوند، کارایی بالایی در تشخیص این ویروس به روش LAMP دارند (Gunimaladevi *et al*., 2004; Soliman and El-Matbouli, 2010). به طور کلی LAMP دارای پیچیده ترین استراتژی طراحی پرایمر در بین تمام فناوری‌های مبتنی بر تکثیر همدمای اسیدهای نوکلئیک است (Bechere *et al*., 2020). در این پژوهش جهت آزمون LAMP، از ۶ آغازگر اختصاصی طراحی شده ویژه ژن TK کوی هرپس‌ویروس، شامل ۴ آغازگر اصلی (دو آغازگر داخلی و دو آغازگر خارجی) و همچنین دو آغازگر لوپ استفاده شد که با آغازگرهای طراحی شده در مطالعات قبلی، متفاوتند. این ۶ آغازگر، ۸ ناحیه متفاوت در توالی هدف را مورد شناسایی قرار می‌دهند و بنابراین نه تنها اختصاصیت روش را افزایش می‌دهند، بلکه احتمال ایجاد نتایج مثبت یا منفی کاذب را به حداقل می‌رسانند (Notomi *et al*., 2000; Nagamine *et al*., 2002). استفاده از آغازگرهای لوپ که به آغازگرهای شتاب دهنده هم معروف هستند، باعث کوتاهتر شدن زمان واکنش LAMP از ۶۰ دقیقه به ۳۰ دقیقه و همچنین افزایش حساسیت و میزان تولید محصول گردید. همچنین برای آزمون PCR، از دو آغازگر اختصاصی بر اساس ژن TK این ویروس استفاده شد. مهمترین آغازگرهای PCR برای ژن‌های TK، DNA پلی‌مراز، پروتئین اصلی کپسید[1] و پروتئین اصلی پوشش ویروس CyHV-3 طراحی شده‌اند که متد PCR مبتنی بر تکثیر ژن TK، دارای حساسیت بیشتری نسبت به سایر آزمون‌های PCR گزارش شده است (Dixon *et al*., 2009). در این پژوهش جهت تولید بیشترین میزان محصول از آمپلیکون موردنظر در تکثیر PCR، دمای اتصال آغازگرها (T_a) بهینه‌سازی شد. T_a فوق یا تحت اپتیمال، می‌تواند منجر به تولید محصولات غیراختصاصی و کاهش بازده تکثیر شود (Rychlik *et al*., 1990). بر اساس نتایج پژوهش حاضر، واکنش LAMP به تغییرات غلظت Mg^{2+} در بازه بین ۲ تا ۶ میلی‌مولار مقاوم است. اما با ارزیابی واکنش با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز، باندهای ایجاد شده در غلظت ۴ میلی‌مولار دارای شدت بیشتری بود. به طور کلی مطالعات متعددی نشان داده‌اند که غلظت یون منیزیوم، اصلی‌ترین و مهمترین عامل در بهینه‌سازی آزمون LAMP است که برای هر دسته آغازگر، نیاز به بهینه‌سازی دارد و به شدت روی حساسیت آزمون اثرگذار است (Fukuta *et al*., 2004; Nemeto *et al*., 2009; Guan *et al*., 2010). تثبیت DNA دو رشته‌ای و در نتیجه جلوگیری از دناتوره شدن کامل DNA هنگام واکنش LAMP و کاهش محصول تکثیر و همچنین ایجاد نتایج مثبت کاذب از دیگر نتایج گزارش شده از اثر غلظت‌های بیش از اندازه یون Mg^{2+} بر بازده واکنش‌اند (Soliman *et al*., 2015). از سوی دیگر، مقادیر ناکافی این یون می‌تواند باعث تشکیل گرادیان‌های غلظتی و شکست آزمایش (Nie, 2005) و همچنین ایجاد نتایج منفی کاذب شود (Liu *et al*., 2013). در مطالعه حاضر،

[1] Major Capsid Protein (MCP)

تشـــکیل باندهای نردبانی‌شـــکل روی ژل آگارز بعد از الکتروفورز محصـــول LAMP نمونه کنترل مثبت (که به دلیل حضـــور ســـاختارهای گل‌کلمی و دمبل‌مانند با اندازه‌های متفاوت در محصـول واکنش LAMP اسـت) و عدم مشـــاهده باند در تمام نمونه‌های کنترل منفی، نشان‌دهنده اختصاصیت صد درصدی آزمون طراحی شده LAMP در تشخیص کوی هرپس‌ویروس است. همچنین کمترین حد تشخیص این آزمون برای کوی هرپس‌ویروس، رقت استوک 10^{-8} معادل ۱/۲۵ فمتوگرم در میکرولیتر به دســـت آمد. با توجه به اندازه ژنوم حدود ۲۹۰ کیلوجفت بازی این ویروس (Davison, 2010) و با در نظر گرفتن میانگین جرم هر جفت باز در DNA دورشـــته‌ای معادل ۶۶۰ g/mole گرم/مول، در نتیجه ۱/۲۵ فمتوگرم DNA ژنومیک ویروســـی تقریبا معادل ۴ ویریون تخمین زده می‌شـود. Gunimaladevi و همکاران (۲۰۰۴)، در آزمون LAMP خود برای تشـــخیص کوی هرپس ویروس با استفاده از ۴ آغازگر طراحی شده جهت ژن TK، کمترین حد تشـــخیص را رقت اســـتوک 10^{-6} گزارش نمودند. در مطالعه دیگری که از روش LAMP با ۶ آغازگر برای شناسایی این ویروس استفاده شد، کمترین حد تشخیص را رقت استوک 10^{-7} (معادل ۶ کپی DNA ویروسی) طی مدت ۶۰ دقیقه ثبت کردند (Yoshino *et al*., 2009). در مطالعه مذکور، ژن‌های دیگری به جای TK مورد هدف قرار گرفتند. کمترین حد تشخیص معادل ۳۰ کپی DNA نیز با اســـتفاده از LAMP چهار آغازگری نیز برای کوی هرپس ویروس گزارش شـــده اســـت (Soliman and El-Matbouli, 2010). نهایتا Cano و همکاران (۲۰۲۱) با انتخاب ORF43 به عنوان ژن هدف، حد تشـــخیص ۱۰۰ کپی را برای آزمون LAMP شـــش آغازگری خود ثبت نمود ند. بنابراین، می‌توان این گونه بیان نمود که در پژوهش حاضر، تکنیک LAMP قادر به شناسایی کمترین لود DNA ویروس در بین ســـایر مطالعات بود. در تمام مطالعات فوق، تکنیک LAMP مورد اســـتفاده محققان، هیچ گونه واکنش متقابلی با سایر هرپس‌ویروس‌های ماهی ایجاد نکرد که این موضوع با نتایج حاصل از این پژوهش، مطابقت دارد. با توجه به اینکه کلیه مراحل مذکور روی DNA ژنومی کوی هرپس‌ویروس صورت گرفت، حساسیت واکنش LAMP برای شناسایی DNA کوی هرپس‌ویروس استخراج شده از نمونه‌های زیستی که به صورت مصنوعی آلوده شده‌اند نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و با حساسیت PCR مقایسه گردید. نتایج بیانگر کاهش حساسیت هر دو آزمون به ترتیب به رقت استوک 10^{-7} (معادل معادل ۸/۲ فمتوگرم در میکرولیتر) برای LAMP و 10^{-3} (معـادل ۱۰۳ پیکوگرم در میکرولیتر) برای PCR بود. به طور کلی روش استخراج DNA بر روی حساسیت تشخیصی اثرگذار است، به طوری که بازدهی واکنش تکثیر، علاوه بر بازدهی آغازگرهای مورد استفاده، به کیفیت DNA استخراج شده نیز وابسـته اسـت. در این پژوهش، نتایج حاصـل از برنامه پیشـــنهادی PCR معمولی جهت تشـــخیص ژن TK کوی هرپس ویروس، بیانگر میزان حســـاســـیت ۱۰ پیکوگرم در میکرولیتر طی مدت زمان ۱۳۵ دقیقه بود و در رقت‌های پایین‌تر، محصولی تکثیر نگردید. بنابراین، نتایج حاصل از شناسایی کوی هرپس‌ویروس با استفاده از روش LAMP در این مطالعه، بیانگر تشخیص سه برابر سریع‌تر و ۸۰۰۰ برابر حساس‌تر نسبت به PCR بود. مطالعات بسیاری در مورد مقایسه سرعت و حساسیت این دو روش تشخیصی مولکولی جهت شناسایی پاتوژن‌های مختلف انجام شده است و در تمام این مطالعات، سرعت و دقت روش LAMP بسیار بیشتر از PCR گزارش شده است که نتایج حاصل از این پژوهش، با این یافته‌ها مطابقت دارد. به عنوان مثال Caipang و همکـاران (۲۰۰۴)، این روش را ۱۰ برابر حســـاســـتر از PCR در شـــناســـایی ایریدو ویروس ماهی رد سی‌بریم گزارش کردند. همین میزان حساسیت بیشتر توســـط Saleh و همکاران (۲۰۰۸) در شـــناســـایی رنی‌باکتریوم سـالمونیناروم[1] ثبت شـده اسـت. حسـاسـیت ۱۰۰ برابری این روش نســـبـت بـه PCR معمولی، در

[1] *Renibacterium salmoninarum*

شناسایی کرم کبد *Clonorchis sinensis* در ماهی (Cai *et al*., 2010) و باکتری لاکتوکوکوس گارو یه[1] در ماهیان تیلاپیا و کفال خاکستری (Tsai *et al*., 2013) گزارش شده است. مدت زمان برنامه PCR نیز بین ۳ تا ۵ ساعت متغیر بود. Bercovier و همکاران (۲۰۰۵) در روش PCR پیشنهادی خود جهت شناسایی ژن TK کوی هرپس ویروس، مدت زمان ۳/۷ ساعت و کمترین حد تشخیص ۱۰ فمتوگرم (معادل ۳۰ ویریون) را ثبت نمودند. همچنین در پروتکل PCR پیشنهادی توسط Gilad و همکاران (۲۰۰۲) جهت شناسایی این ویروس، زمان تشخیص به ۵ ساعت و کمترین حد تشخیص $۱۰^{۴}$ کپی گزارش گردید. Gray و همکاران (۲۰۰۲) نیز با استفاده از روش PCR متعارف پیشنهادی خود، در زمانی بالغ بر سه ساعت قادر به تشخیص CyHV-3 شدند. همچنین این محققان حساسیت روش خود را ۱۰۰ فمتوگرم (معادل ۶۰۰ کپی DNA) برآورد نمودند.

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به داده‌های حاصله، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که روش LAMP ارائه شده در این پژوهش، دارای اختصاصیت، حساسیت و کارایی بسیار بالایی در تشخیص سریع و زودهنگام هرپس‌ویروس نوع ۳ کپور ماهیان (CyHV-3) یا کوی هرپس‌ویروس دارد و می‌تواند به عنوان یک ابزار قدرتمند و دقیق جهت شناسایی این آلودگی ویروسی در آزمایشگاه‌های تشخیص کلینیکی و پایش بیماری‌ها و پاتوژن‌های آبزیان، خصوصا آزمایشگاه‌های با تجهیزات اندک و آزمایشگاه‌های سیار، مورد استفاده قرار گیرد. همچنین با توجه به مخاطرات ناشی از شیوع کوی هرپس‌ویروس در کشور و عدم وجود واکسیناسیون و درمان موثر، استفاده از تکنیک LAMP به دلیل انجام واکنش در شرایط هم‌دما (دمای بهینه فعالیت آنزیم) و عدم نیاز به دستگاه ترموسایکلر، حساسیت و اختصاصیت بالاتر به علت استفاده از پرایمرهای بیشتر، هزینه کلی پایین‌تر به علت عدم نیاز به دستگاه‌ها و مواد شیمیایی پیچیده و نیروی انسانی متخصص، مراحل آماده‌سازی کمتر و ساده‌تر، کوتاه‌تر بودن زمان انجام فرآیند و کاهش احتمال تکثیر توالی‌های غیر هدف، نسبت به روش PCR معمولی گزینه مناسب‌تری جهت شناسایی زودهنگام این ویروس محسوب می‌گردد.

۵. منابع

References

Adkison, M.A., Gilad, O. Hedrick, R.P., 2005. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the koi herpesvirus (KHV) in the serum of koi *Cyprinus carpio*. *Fish Pathology* 40, 53–62.

Ahmadivand, S., Soltani, M., Shokrpoor, S., Rahmati-Holasoo, H., El-Matbouli, M., Taheri-Mirghaed, A., 2020. Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) transmission and outbreaks in Iran: Detection and characterization in farmed common carp. *Microbial Pathogenesis* 149(-), 104321.

Bai, Y., Ji, J., Ji, F., Wu, S., Tian, Y., Jin, B., Li, Z., 2022. Ricombinase polymerase amplification integrated with microfluidics for nucleic acid testing at point of care. *Talanta* 240(-), 123209.

Becherer, L., Borst, N., Bakheit, M., Frischmann, S., Zengerle, R., von Stetten, F., 2020. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence specific detection. *Analytical Methods* 12, 717-746.

[1] *Lactococcus garvieae*

Bercovier, H., Fishman, Y., Nahary, R., Sinai, S., Zlotkin, A., Eyngor, M., Gilad, O., Eldar, A., Hedrick, R., 2005. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiology* 5, 13.

Bergmann, S.M., Jin, Y., Franzke, K., Grunow, B., Wang, Q., Klafack, S., 2020. Koi herpesvirus (KHV) and KHV disease (KHVD) – a recently updated overview. *Journal of Applied Microbiology* 129, 98-103.

Cai, X.Q., Xu, M.J.,Wang, Y.H., Qiu, D.Y., Liu, G.X., Lin, A., Tang, J.D., Zhang, R.L., Zhu, X.Q., 2010. Sensitive and rapid detection of *Clonorchis sinensis* infection in fish by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Parasitology Research* 106, 1379–1383.

Caipang, C.M.A., Haraguchi, I., Ohira, T., Hirono, I., Aoki, T., 2004. Rapid detection of a fish iridovirus using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Journal of Virolological Methods* 121,155–161.

Cano, I., Worswick, J., Mulhearn, B., Stone, D., Wood, G., Savage, J., Paley, R., 2021. A Seasonal Study of Koi Herpesvirus and Koi Sleepy Disease Outbreaks in the United Kingdom in 2018 Using a Pond-Side Test. *Animals* 11, 459.

Costes, B., Fournier, G., Michel, B., Delforge, C., Raj, V. S., Dewals, B., Gillet, L., Drion, P., Body, A., Schynts, F., Lieffrig, F., Vanderplasschen, A., 2008. Cloning of the koi herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome demonstrates that disruption of the thymidine kinase locus induces partial attenuation in *Cyprinus carpio koi*. *Journal of Virology* 82(10), 4955–4964.

Davison, A.J., 2010. Herpesvirus systematics. *Veterinary Microbiology* 143, 52–69.

Dixon, P.F., Joiner, C.L., Way, K., Reese, R.A., Jeney, G., Jeney, Z., 2009. Comparison of the resistance of selected families of common carp, *Cyprinus carpio* L., to koi herpesvirus: preliminary study. *Journal of Fish Diseases* 32, 1035-1039.

Eide, K., Miller-Morgan, T., Heidel, J., Bildfell, R., Jin, L., 2011. Results of total DNA measurement in koi by tissue koi herpesvirus real-time PCR. *Journal of Virology Methods* 172, 81–84.

El-Matbouli, M., Saleh, M., Soliman, H., 2007. Detection of cyprinid herpesvirus type 3 in goldfish cohabiting with CyHV-3-infected koi carp (*Cyprinus carpio koi*). *Veterinary Record* 161, 792- 793.

Fuchs, W., Fichtner, D., Bergmann, S. M., Mettenleiter, T. C., 2011. Generation and characterization of koi herpesvirus recombinants lacking viral enzymes of nucleotide metabolism. *Archives of Virology* 156 (6), 1059–1063.

Fukuta, S., Oshishi, K., Yoshida, K., Mizukami, Y., Ishida, A., Kanbe, M. 2004. Development of immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of tomato spotted wilt virus from chrysanthemum. *Journal of Virolology Methods* 121(1), 49-55.

Gilad, O., Yun, S., Zagmutt-Vergara, F.J., Leutenegger, C.M., Bercovier, H. & Hedrick, R.P., 2004. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally-infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. *Diseases of Aquatic Organisms* 60, 179-187.

Gilad, O., Yun, S., Andree, K.B., Adkison, M.A., Zlotkin, A., Bercovier, H., Eldar, A., Hedrick, R.P., 2002. Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*. *Diseases of Aquatic Organisms* 48(2), 101-108.

Gray, W. L., Mullis, L., LaPatra, S. E., Groff, J. M., Goodwin, A., 2002. Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *Journal of Fish Diseases* 25, 171–178.

Guan, X.Y., Guo, J.C., Shen, P., Yang, L.T., Zhang, D.B., 2010. Visual and rapid detection of two genetically modified soybean events using loop-mediated isothermal amplification method. *Food Analytical Methods* 3(4), 313-320.

Gunimaladevi, I., Kono, T., Venugopal, M.N., Sakai, M., 2004. Detection of koi herpesvirus in common carp, *Cyprinus carpio* L., by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Fish Diseases* 27, 583-589.

Haenen, O., Way, K., Bergmann, S.M. & Ariel, E., 2004. The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 24, 293–307.

Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., Ohgaki, S., 2007. Detection of koi herpesvirus DNA in river water in Japan. *Journal of Fish Diseases* 30, 59–61.

Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J.V., Marty, G.D., Nordhausen, R. W., Kebus, M. J., Bercovier, H., Eldar, A., 2000. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *Journal of Aquatic Animal Health* 12, 44−55.

Ilouze, M., Davidovich, M., Diamant, A., Kotler, M. & Dishon, A., 2011. The outbreak of carp disease caused by CyHV-3 as a model for new emerging viral diseases in aquaculture: a review. *Ecological Research* 26, 885–892.

Liu, J., Xu, L., Guo, J., Chen, R., Grisham, M.P., Que, Y., 2013. Development of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane. *Biomed Research International* 2013, 357692.

Monaghan, S.J., Thompson, K.D., Adams, A., Bergmann, S.M., 2014. Sensitivity of seven PCRs for early detection of koi herpesvirus in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L., by lethal and non-lethal sampling methods. *Journal of Fish Diseases* 38(3), 303-19.

Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., Notomi, T., 2001. Detection of loopmediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289, 150–4.

Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T., 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes* 16(3), 223-229.

Nemoto, J., Sugawara, C., Akahane, K., Hashimoto, K., Kojima, T., Ikedo, M., Konuma, H., Hara-Kudo, Y., 2009. Rapid and specific detection of the thermostable direct hemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Food Protection* 72(4), 748-754.

Nie, X.Z., 2005. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of potato virus Y. *Plant Disease* 89(6), 605-610.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28, E63.

OIE., 2018. Koi herpesvirus disease. In: Manual of diagnostic tests for aquatic animals. World organization for animal health.

Prescott, M.A., Reed, A.N., Jin, L., Pastey, M. K., 2016. Rapid Detection of Cyprinid Herpesvirus 3 in Latently Infected Koi by Recombinase Polymerase Amplification, Journal of Aquatic Animal Health 28, 173–180.

Radosavljević, V., Maksimović-Zorić, J., Veljović, L., Ljubojević, D., Ćirković, M., Marković, Z., Milićević, V., 2017. Cyprinid herpesvirus diseases. *Arhives of veterinary medicine* 10 (1), 51-60.

Rahmati-Holasoo, H., Zargar, A., Ahmadivand, S., Shokrpoor, S., Ezhari, S., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., 2016. First detection of koi herpesvirus from koi, *Cyprinus carpio* L. experiencing mass mortalities in Iran: clinical, histopathological and molecular study. *Journal of Fish Diseases* 39(10), 1153-63.

Ronen, A., Perelberg, A., Abramowitz, J., Hutoran, M., Tinman, S., Bejerano, I., Steinitz, M., Kotler, M., 200). Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine* 21, 4677–4684.

Rychlik, W., Spencer, W.J., Rhoads, R.E., 1990. Optimization of annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Research* 18(21), 6409-6412.

Sadler, J., Marecaux, E., Goodwin, A.E., 2008. Detection of koi herpes virus (CyHV-3) in goldfish, *Carassius auratus* (L.), exposed to infected koi. *Journal of Fish Diseases* 31, 71–72.

Saleh, M., Soliman, H., El-Matbouli, M., 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease. *Diseases of Aquatic Organisms* 81,143–151.

Soliman, H., El-Matbouli, M., 2010. Loop mediated isothermal amplification combined with nucleic acid lateral flow strip for diagnosis of cyprinid herpes virus-3. *Molecullar and Cellular Probes* 24, 38–43.

Soliman, H., Saleh, M., El-Matbouli, M., 2015. Detection of Fish Pathogens by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Technique. In: Mónica V. Cunha and João Inácio (eds.), *Veterinary Infection Biology: Molecular Diagnostics and High-Throughput Strategies, Methods in Molecular Biology*, vol. 1247, Springer, pp. 163-173.

St-Hilaire, S., Beevers, N., Way, K., Le Deuff, R.M., Martin, P., Joiner, C., 2005. Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio. Diseases of Aquatic Organisms* 67, 15–23.

Toffan, A., Marsella, A., Abbadi, M., Abass, S., Al-Adhadh, B., Wood, G., Stone, D.M., 2020. First detection of koi herpesvirus and carp edema virus in Iraq associated with a mass mortality in common carp (*Cyprinus carpio*). *Transboundary and Emerging Diseases* 67(2), 523-528.

Tsai, M-A., Wang, P-C., Yoshida, T., Liaw, L-L., Chen, S-C., 2013. Development of a sensitive and specific LAMP PCR assay for detection of fish pathogen *Lactococcus garvieae*. *Diseases of Aquatic Organisms* 102, 225–235.

Waltzek, T.B., Kelley, G.O., Alfaro, M.E., Kurobe, T., Davison, A.J., Hedrick, R.P., 2009. Phylogenetic relationships in the family Alloherpesviridae. *Diseases of Aquatic Organisms* 84, 179–194.

Wong, Y.P., Othman, S., Lau, Y.L., Radu, S., Chee, H.Y., 2017. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology* 124, 626-643.

Yoshino, M., Watari, H., Kojima, T., Ikedo, M.,Kurita, J., 2009. Rapid, sensitive and simple detection method for koi herpesvirus using loop-mediated isothermal amplification. *Microbiology and Immunology* 53, 375-383.