

Loop-mediated isothermal amplification for diagnosing marine pathogens in tissues of *Crassostrea* spp. and white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, farmed in Mexico

Amplificación isotérmica mediada por bucle para diagnosticar patógenos marinos en tejidos de *Crassostrea* spp. y camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, cultivados en México

Ismael Mendoza-Avilés¹, Carla A Muñoz-Rojas², Mario Rojas², Norma Estrada^{3*}

¹ Departamento Académico de Ciencias Marinas y Costeras, Universidad Autónoma de Baja California Sur, Carretera al Sur km 5.5 s/n, 23080, La Paz, Baja California Sur, Mexico.

² Programa de Acuicultura, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Av. IPN 195, 23096, La Paz, Baja California Sur, Mexico.

³ Programa Cátedras Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Av. IPN 195, 23096, La Paz, Baja California Sur, Mexico.

* Corresponding author. E-mail: nestrada@cibnor.mx

ABSTRACT. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is an accurate, sensitive, rapid, and easy-to-perform method for gene amplification under isothermal conditions, and it has served as a powerful diagnostic tool. In this study, we used LAMP to develop a diagnostic protocol for detecting *Vibrio parahaemolyticus* and white spot syndrome virus in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), and *Perkinsus* spp. in *Crassostrea* spp. in Mexico. These pathogens are associated with different diseases and are considered a threat in the aquaculture industry. Infected and uninfected oysters and shrimp were obtained from farms in the northwest coast of Mexico to standardize the LAMP assay. We determined the candidate target genes in the first-round analysis of many sets of primers, and then we chose a set of primers that successfully amplified with Mexican samples. We optimized the LAMP reactions for each pathogen with the chosen primer sets using temperature gradients from 61 to 65 °C, DNA concentrations from 2.5 pg to 250.0 ng, and reaction times from 10 to 60 min. This study established a diagnostic procedure for detecting pathogens in oysters and shrimp from Mexico. Early diagnosis and treatment of pathogens can immensely reduce disease transmission in aquaculture farms.

Key words: *Crassostrea* spp., *Litopenaeus vannamei*, loop-mediated isothermal amplification, aquaculture, pathogens.

RESUMEN. La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés) es un método preciso, sensible, rápido y fácil de realizar para la amplificación de genes en condiciones isotérmicas, y ha servido como una herramienta de diagnóstico poderosa. En este estudio, desarrollamos un protocolo de diagnóstico con LAMP para la detección de *Vibrio parahaemolyticus* y el virus de la mancha blanca en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) y de *Perkinsus* spp. en *Crassostrea* spp. en México. Estos patógenos están asociados a distintas enfermedades y se consideran una amenaza en la industria de la acuicultura. Se obtuvieron ostiones y camarones infectados y no infectados de granjas acuícolas en la costa noroeste de México para estandarizar la técnica de LAMP. Determinamos los genes candidatos a través de un primer análisis de muchos conjuntos de cebadores, y luego elegimos un conjunto de cebadores que amplificaron exitosamente con muestras mexicanas. Optimizamos las reacciones de LAMP para cada patógeno con los cebadores seleccionados usando gradientes de temperatura de 61 a 65 °C, concentraciones de ADN de 2.5 pg a 250.0 ng y tiempos de reacción de 10 a 60 min. Este estudio estableció un procedimiento diagnóstico para la detección de patógenos de ostiones y camarones de México. El diagnóstico y el tratamiento temprano de patógenos pueden reducir enormemente la transmisión de enfermedades en granjas acuícolas.

Palabras clave: *Crassostrea* spp., *Litopenaeus vannamei*, amplificación isotérmica mediada por bucle, acuicultura, patógenos.

INTRODUCTION

Given the deterioration of fisheries worldwide, aquaculture has been the alternative with the highest economic viability to solve the demand for food (FAO 2019). In Mexico, aquaculture has made significant progress in recent decades, particularly in the northwest region, where biological productivity, which includes fish, mollusks, and crustaceans, is

INTRODUCCIÓN

Ante el deterioro de las pesquerías a nivel mundial, la acuicultura ha sido la alternativa con mayor viabilidad económica para resolver la demanda de alimentos (FAO 2019). En México, la acuicultura ha experimentado avances significativos en las últimas décadas, particularmente en la región noroeste, donde la productividad biológica, que

the highest in the country. Oysters of the genus *Crassostrea* and the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), represent one of the highest marine aquaculture values in Mexico (SAGARPA 2017). Increased national and export marketing of products of aquaculture origin has favored the introduction, spread, and transmission of diseases (OIE 2019). In oyster farms *Perkinsus* spp. have threatened oyster productions (Cáceres-Martínez et al. 2008, Enríquez-Espinoza et al. 2010). Shrimp farms have been severely affected by mortality episodes associated with diseases caused by bacteria belonging to the genus *Vibrio* (Soto-Rodríguez et al. 2010) and the white spot syndrome virus (WSSV) (Hasson et al. 2006). Adequate disease control in aquatic farming systems is needed to stop the spread of infectious pathogens. Disease monitoring in terms of surveillance and rapid diagnosis is an integral part of the aquaculture process. It allows for appropriate action to be readily taken when pathogens are detected and diseases are diagnosed before they become a significant problem for the farmer.

The design and development of methods for identifying pathogens in farmed aquatic organisms has progressed. Molecular detection techniques have been developed over the last decade, and identification of microorganisms is chiefly based on the analysis of nucleic acids. The advantages of these techniques include specificity, sensitivity, speed, and automation (Palomino-Camargo et al. 2014). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a molecular technique that amplifies DNA with high specificity, efficiency, and rapidity under isothermal conditions without requiring expensive specialized equipment (Notomi et al. 2000). The amplification requires 2 outer primers (F3 and B3), 2 inner primers (forward inner primer, FIP, and backward inner primer, BIP), and 2 loop primers (forward loop, LF, and backward loop, LB) (Notomi et al. 2000). These primers are complementary to 6 regions of the DNA sequence, ensuring very high specificity (Notomi et al. 2000, Nagamine et al. 2002). The primers bind laterally to different sites using strand-displacing *Bst* DNA polymerase, providing high amplification efficiency, with DNA being amplified to 10^9 – 10^{10} copies in 15–60 min (Notomi et al. 2000, Nagamine et al. 2002, Tomita et al. 2008, Mori and Notomi 2009, Li and Macdonald 2015). This method does not require a denatured DNA template (Nagamine et al. 2001), which allows users to avoid complicated DNA refinement protocols, and has shown high tolerance to inhibitory substances present in biological samples (Boehme et al. 2007, Kaneko et al. 2007, Mori and Notomi 2009, Francois et al. 2011). The amplified products can be detected by gel electrophoresis, a turbidimeter, lateral flow dipstick, or color or fluorescent indicators (Mori et al. 2001, Iwamoto et al. 2003, Mori et al. 2004, Tomita et al. 2008, Goto et al. 2009).

LAMP has been used to detect shellfish pathogens in many countries (Kono et al. 2004, Mekata et al. 2006, Yamazaki et al. 2008, Jaroenram et al. 2009, Mekata et al. 2009, Chen

incluye peces, moluscos y crustáceos, es la más alta del país. Los ostiones del género *Crassostrea* y el camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), representan uno de los valores de acuicultura marina más altos en México (SAGARPA 2017). El aumento de la comercialización nacional y de exportación de productos de origen acuícola ha favorecido la introducción, la propagación y la transmisión de enfermedades (OIE 2019). En las granjas de ostiones, *Perkinsus* spp. han amenazado la producción de estos (Cáceres-Martínez et al. 2008, Enríquez-Espinoza et al. 2010). Las granjas camaronerías han sido afectadas severamente por episodios de mortalidad debido a enfermedades provocadas por bacterias pertenecientes al género *Vibrio* (Soto-Rodríguez et al. 2010) y el virus del síndrome de la mancha blanca (VSMB) (Hasson et al. 2006). Es necesario un control adecuado de enfermedades dentro de los sistemas de cultivo acuícola para detener la propagación de patógenos infecciosos. El monitoreo de enfermedades en términos de vigilancia y diagnóstico rápido es una parte integral del proceso de acuicultura. Permite tomar las medidas adecuadas cuando se detectan patógenos y se diagnostican enfermedades antes de convertirse en un problema importante para el acuicultor.

El diseño y el desarrollo de métodos para la identificación de patógenos en organismos acuáticos cultivados ha progresado. En la última década se han desarrollado técnicas de detección molecular, y la identificación de microorganismos se basa principalmente en el análisis de los ácidos nucleicos. Las ventajas de estas técnicas incluyen la especificidad, la sensibilidad, la rapidez y la automatización (Palomino-Camargo et al. 2014). La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés) es una técnica molecular que amplifica el ADN con alta especificidad, eficiencia y rapidez en condiciones isotérmicas sin requerir equipo especializado costoso (Notomi et al. 2000). La amplificación requiere 2 cebadores externos (F3 y B3), 2 cebadores internos (cebador interno directo, FIP, y cebador interno inverso, BIP) y 2 cebadores de bucle (cebador de bucle directo, LF, y cebador de bucle inverso, LB) (Notomi et al. 2000). Estos cebadores son complementarios a 6 regiones de la secuencia de ADN, lo que asegura una alta especificidad (Notomi et al. 2000, Nagamine et al. 2002). Los cebadores se unen lateralmente a diferentes sitios utilizando la ADN polimerasa *Bst* de desplazamiento de cadena, lo que proporciona una alta eficiencia de amplificación, y el ADN se amplifica a 10^9 – 10^{10} copias en 15–60 min (Notomi et al. 2000, Nagamine et al. 2002, Tomita et al. 2008, Mori y Notomi 2009, Li y Macdonald 2015). Este método no requiere un molde de ADN desnaturado (Nagamine et al. 2001), lo que permite a los usuarios evitar complicados protocolos para procesar el ADN, y también ha demostrado una alta tolerancia a las sustancias inhibitorias presentes en muestras biológicas (Boehme et al. 2007, Kaneko et al. 2007, Mori y Notomi 2009, Francois et al. 2011). Los productos amplificados pueden detectarse por medio de electroforesis

and Ge 2010, Arunrut et al. 2011, Maralit et al. 2012, Xu et al. 2012, Feng et al. 2013, Kongrueng et al. 2015). Many reports show inconsistencies with LAMP protocols for detecting pathogens from different geographic locations. Gene sequences of infectious agents may vary depending on the geographic region as a result of a set of variables that favor dispersion and potential modifications in their genotype. It is necessary to choose specific primers and probes for genomes from each location to avoid incorrect diagnoses. Here, we propose identifying potentially dangerous pathogens specific to Mexico in *L. vannamei* and *Crassostrea* spp. using LAMP. LAMP technology has great potential as a technique for the rapid, sensitive, and specific detection of pathogens that can be used regularly in farms or laboratories because it does not need expensive machines or highly trained personnel.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection and DNA extraction

Tissue of *L. vannamei* infected with WSSV and *Vibrio parahaemolyticus*, and tissues of the Cortez oyster (*Crassostrea corteziensis*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) infected with *Perkinsus* spp. were obtained from farms in northwest Mexico. We selected tissues following the manual of the World Organization for Animal Health (OIE 2019). We also used uninfected organisms as negative controls. DNA was extracted from tissues using the organic extraction method, as described in Sambrook et al. (1989), and it was resuspended by adding TE Buffer (10 mM, pH 8.0). DNA purity and concentration were estimated using the Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific; MA, USA). DNA integrity was visualized by agarose gel electrophoresis (1.5%) using the UVP Biodoc-It 2 imaging system (Analytik Jena; Jena, Germany) and the fluorescent dye GelRed (Biotium; Fremont, CA).

Positive samples

DNA from infected and uninfected specimens was extracted and used as a template for end-point PCR amplification to obtain positive and negative control tissues using the LAMP outer primers (F3 and B3). PCR amplicon sizes were 208 bp for the internal transcribed spacer 2 (ITS-2) (*Perkinsus* spp.), 213 bp for *orf191* (WSSV), 231 bp for *orf36* (WSSV), 229 bp for thermolabile hemolysin (*tlh*) (*V. parahaemolyticus*), and 183 for *tox-R* (*V. parahaemolyticus*). We cleaned up the PCR products for sequencing with Genewiz (South Plainfield, NJ). The obtained sequence fragments were analyzed using the NCBI BLAST Sequence Analysis Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 20 November 2021) to corroborate the identity of the pathogen.

en gel, turbidímetro, dispositivo de flujo lateral o indicadores de color o fluorescentes (Mori et al. 2001, Iwamoto et al. 2003, Mori et al. 2004, Tomita et al. 2008, Goto et al. 2009).

El método LAMP se ha utilizado para la detección de patógenos de mariscos en muchos países (Kono et al. 2004, Mekata et al. 2006, Yamazaki et al. 2008, Jaroenram et al. 2009, Mekata et al. 2009, Chen y Ge 2010, Arunrut et al. 2011, Maralit et al. 2012, Xu et al. 2012, Feng et al. 2013, Kongrueng et al. 2015). Diversos informes muestran inconsistencias en los protocolos LAMP para detectar patógenos de diferentes ubicaciones geográficas. Las secuencias de genes de agentes infecciosos pueden variar según la región geográfica, como resultado de un conjunto de variables que favorecen la dispersión y las posibles modificaciones en su genotipo. Es necesario elegir cebadores y sondas específicos de los genomas de cada región para evitar diagnósticos incorrectos. En el presente estudio, nosotros proponemos identificar patógenos potencialmente peligrosos específicos de México en *L. vannamei* y *Crassostrea* spp. con LAMP. La tecnología LAMP tiene un gran potencial como técnica para la detección rápida, sensible y específica de patógenos que se puede usar regularmente en granjas o laboratorios porque no necesita equipos costosos o personal altamente capacitado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras y extracción del ADN

Tejidos de *L. vannamei* infectado con el VSMB y *Vibrio parahaemolyticus*, y tejidos del ostión de Cortéz (*Crassostrea corteziensis*) y el ostión del Pacífico (*Crassostrea gigas*) infectados con *Perkinsus* spp. se obtuvieron de granjas en el noroeste de México. Seleccionamos los tejidos de acuerdo con el manual de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE 2019). También utilizamos organismos no infectados como controles negativos. El ADN se extrajo de los tejidos mediante el método de extracción orgánica, como lo describen Sambrook et al. (1989), y se resuspendió mediante la adición de tampón TE (10 mM, pH 8.0). La pureza y la concentración del ADN se estimaron utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific; MA, EUA). La integridad del ADN se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% utilizando el sistema de documentación de imágenes UVP Biodoc-It 2 (Analytik Jena; Jena, Alemania) y el colorante fluorescente GelRed (Biotium; Fremont, CA).

Muestras positivas

El ADN de los organismos infectados y no infectados fue extraído y utilizado como molde para la amplificación por PCR de punto final para obtener tejidos de control positivos y negativos con los cebadores externos de LAMP (F3 y B3). Los tamaños de los amplicones de la PCR fueron 208 pb para el espaciador transcrito interno

LAMP reaction conditions

For LAMP, we determined the candidate target genes in the first-round analysis of many sets of primers. We then chose those that successfully amplified with Mexican samples (Table 1) with high repeatability, efficiency, and specificity. Primers were synthesized by T4 Oligo (Irapuato, Mexico). The LAMP assay was carried out in a total of 25- μ L volume containing 1 μ L (40 μ M) of each of the inner primers (FIP and BIP), 1 μ L (5 μ M) of each of the outer primers (F3 and B3), 1 μ L (20 μ M) of each of the loop primers (LF and LB), 4 μ L (0.6 mM of each nucleotide) dNTP mix (Thermo Fisher Scientific), 1 μ L (5 M) Betaine (Sigma-Aldrich), 1.5 μ L (100 mM) $MgSO_4$ (New England Biolabs), 1 μ L (8 U· μ L⁻¹) of *Bst* DNA polymerase large fragment (New England Biolabs), 2.5 μ L of ThermoPol buffer 10 \times (New England Biolabs), 1.0 μ L of target DNA, and 8 μ L of Milli-Q water. The *tox-R* primers (Chen and Ge 2010) have only one loop primer, and they were added as described for the concentration above, adding 1 μ L more of Milli-Q water. Incubation was then carried out at 61, 62, 63, 64, and 65 °C for 60 min, and the reaction was terminated by heating at 90 °C for 2 min. LAMP reactions were performed using the BioRad T100 Thermal Cycler (CA, USA). The products (10 μ L) were electrophoresed on 2% agarose gels to determine the optimal conditions. When the LAMP products are visualized using agarose gel electrophoresis, many bands of different sizes, up to the loading well, are documented. The resulting amplicon mixtures were confirmed with 10 μ L of the products by fluorescence, using 1 μ L of SYBR safe (Thermo Fisher Scientific; 1:500 dilution in Milli-Q water), and they were added to the solution after the reaction was completed. Gel and fluorescent tubes were documented using the UVP Biodoc-It 2 imaging system (Analytik Jena). DNA extracts from the uninfected shrimp and oyster samples were included as negative controls.

The LAMP temperature, sensitivity, reaction time, and specificity were optimized for each pathogen sample. To evaluate sensitivity, 10-fold serial dilutions of the total genomic DNA, which was extracted from infected tissues and isolates, were used as templates to select the best dilution to work with, and LAMP was carried out for a predetermined time (63 min). To determine optimal amplification time, LAMP reactions were carried out at the temperature and DNA concentration previously chosen for each pathogen for 10, 20, 30, 40, 50, and 60 min; the time in the negative control was performed at 60 min. LAMP specificity was examined using the template DNA for other pathogens and uninfected samples. For identifying cross-reactivity with the ITS2 gene for *Perkinsus* spp., we used the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium tamiyavanichii*, and *Alexandrium catenella*. For diagnosis of specificity for *tlh* and *tox-R* for *V. parahaemolyticus*, we used *Vibrio campbelli*, *Photobacterium damsela*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia rettgeri*, and *Acinetobacter baumannii*. For

2 (ITS2) (*Perkinsus* spp.), 213 pb para *orf191* (VSMB), 231 pb para *orf36* (VSMB), 229 pb para hemolisina termoestable (*tlh*) (*V. parahaemolyticus*) y 183 pb para *tox-R* (*V. parahaemolyticus*). Se limpiaron los productos de la PCR para su secuenciación con la empresa Genewiz (South Plainfield, NJ). Los fragmentos de secuencias obtenidos se analizaron utilizando la herramienta de análisis de secuencias NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 20 de noviembre de 2021) para corroborar la identidad del patógeno.

Condiciones de reacción de LAMP

Para LAMP, determinamos los genes diana candidatos en una primera ronda de análisis de varios conjuntos de cebadores. Luego elegimos aquellos que se amplificaron exitosamente con muestras mexicanas (Tabla 1) con alta repetibilidad, eficiencia y especificidad. Los cebadores fueron sintetizados por T4 Oligo (Irapuato, México). El ensayo de LAMP se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ L que contenía 1 μ L (40 μ M) de cada uno de los cebadores internos (FIP y BIP), 1 μ L (5 μ M) de cada uno de los cebadores externos (F3 y B3), 1 μ L (20 μ M) de cada uno de los cebadores de bucle (LF y LB), 4 μ L (0.6 mM de cada nucleótido) de mezcla de dNTP (Thermo Fisher Scientific), 1 μ L (5 M) de betaína (Sigma-Aldrich), 1.5 μ L (100 mM) de $MgSO_4$ (New England Biolabs), 1 μ L (8 U· μ L⁻¹) de ADN polimerasa *Bst* fragmento largo (New England Biolabs), 2.5 μ L de tampón ThermoPol 10 \times (New England Biolabs), 1.0 μ L de ADN diana y 8 μ L de agua Milli-Q. Los cebadores de *tox-R* (Chen y Ge 2010) tienen solo un cebador de bucle, y se agregaron como se describió anteriormente para la concentración, con la adición de 1 μ L más de agua Milli-Q. Posteriormente, se llevó a cabo la incubación a 61, 62, 63, 64 y 65 °C durante 60 min, y se terminó la reacción calentando a 90 °C durante 2 min. Las reacciones de LAMP se realizaron utilizando el termociclador T100 BioRad (CA, EUA). Los productos (10 μ L) se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% para determinar las condiciones óptimas. Cuando los productos de LAMP se visualizan usando electroforesis en gel de agarosa, se documentan bandas de diferentes tamaños, hasta el pozo de carga. Las mezclas de amplicones resultantes se confirmaron con 10 μ L de los productos por fluorescencia, con 1 μ L de SYBR safe (Thermo Fisher Scientific; dilución 1:500 en agua Milli-Q), y se añadieron a la solución una vez completada la reacción. Los geles y los tubos fluorescentes se documentaron utilizando el sistema de imágenes UVP Biodoc-It 2 (Analytik Jena). Los extractos de ADN de las muestras de ostiones y camarones no infectados se incluyeron como controles negativos.

La temperatura, la sensibilidad, el tiempo de reacción y la especificidad de LAMP se optimizaron para cada patógeno. Para evaluar la sensibilidad, diluciones seriadas con un factor de dilución de 10 del ADN genómico total, que fue extraído de tejidos infectados, fueron utilizadas como

Table 1. Sequences of LAMP primers.**Tabla 1.** Secuencias de cebadores de LAMP.

Pathogen	Genes	Primer	Sequence (5'3')	Source
<i>Perkinsus</i> spp.	ITS2 (FJ841985)	F3	TGGATTTTGGTATTTCAAACGA	Feng et al. (2013)
		B3	ATGTTTGTATCGGGAAGAAGAG	
		FIP	AGTGCTTATCGCACTTCGCTCAAACCTCAACGATGGATGC	
		BIP	GATTTGCAGAATTCCGTGAACCAGCACTGATATGTATGTACAAA-GAGG	
		LF	TCCTTCATCGATTCTCGAGC	
		LB	TCAACGCATACTGCACAAAAG	
WSSV	<i>orf191</i> (AF332093)	F3	AAAGTCTCATTTTAACAAGAGGA	Jaroenram et al. (2009)
		B3	ATTGGTCCAGTCTCAGCC	
		FIP	CCATCTCTCTGAAGCGAGGAAAATTTAATTTCTTTGCTCGAGGCC	
		BIP	TGCTCTAGAGAATGCAGTACCTCTTTTGCCTAGTTCTTGCACGATT	
		LF	TCTCCAGCCGGAGCCAAGT	
		LB	ACAGAACCATAACAATGGTGAATGG	
WSSV	<i>orf36</i> (AF369029)	F3	AAACACCGGATGGGCTAA	Mekata et al. (2009)
		B3	CAAGGCAATACAGAATGCG	
		FIP	TCCTGTCTTCAGGGAATACATATGCTCAGGGAAGAAATAGACCATG	
		BIP	GGACCCAAATCGAAATATAAGGCCTATGTTGCCAAGATCCAC	
		LF	GTTAAGAATGATGCATCTAGTGCGA	
		LB	TGGAACAAAAGATGCTGCTCA	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tlh</i> (M36437)	F3	AGCTACTCGAAAGATGATCC	Yamazaki et al. (2008)
		B3	GGTTGTATGAGAAGCGATTG	
		FIP	ATGTTTTTAAATGAAACGGAGCTCCGGCAAAAAACGAAGATGGT	
		BIP	ACGTCGCAAAACGTTATCCGGCGAAGAACGTAATGTCTG	
		LF	ACCAGTAGCCGTCAATG	
		LB	TTAGATTTGGCGAACGAGA	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tox-R</i> (L11929)	F3	TTGGATTCCACGCGTTAT	Chen and Ge. (2010)
		B3	CGTTCAATGCACTGCTCA	
		FIP	TGAGATTCCGCAGGGTTTGTAAATATTTTTGGCACTATTACTACCG	
		BIP	GTTCCGTCAGATTGGTGAGTATCTAGAAGGCAACCAGTTGTT	
		Loop	AGAACGTACCAGTGATGACACC	

WSSV, white spot syndrome virus; FIP, forward inner primer; BIP, backward inner primer; LF, forward loop primer; LB, backward loop primer.

the diagnosis of specificity for *orf36* and *orf191* to evaluate WSSV, we used the shrimp hypodermal and hematopoietic necrosis virus, oyster herpes virus, and squash leaf curl virus. DNA extraction was done as previously mentioned, and LAMP was carried out with the optimal conditions obtained above.

RESULTS

Representative PCR products for the positive samples of tissues infected with the pathogens under study can be observed in Figure 1. These results were obtained with primers F3 and B3. Figures 2–6 show the gel electrophoresis and fluorescent tubes from the LAMP assays for the tested pathogens. The LAMP assay for detecting *Perkinsus* spp. in *Crassostrea* spp. tissues using the primers from the ITS2 gene region showed optimal amplification conditions at every probed temperature (61 to 65 °C). Results were confirmed by the tubes with fluorescence (Fig. 2a). The assay for examining LAMP sensitivity showed that optimal DNA concentrations were 3.6 to 36.0 ng (Fig. 2b). The LAMP assay for determining optimal time started at 30 min and was kept on for 60 min (Fig. 2c). To detect *V. parahaemolyticus* in *L. vannamei*, we used the *tlh* (Fig. 3) and *tox-R* (Fig. 4) genes. With the *tlh* primers, the temperature optimization probe showed that amplification was performed at every

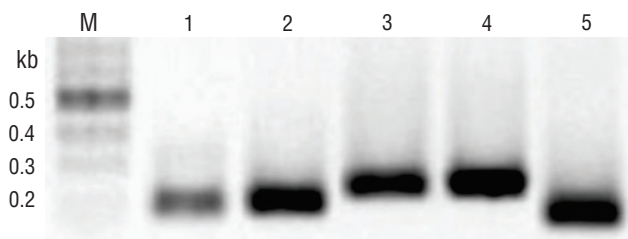


Figure 1. Pathogens identified in tissues of infected *Crassostrea* spp. and *Litopenaeus vannamei* using end-point PCR amplification of DNA with the particular external primers for loop-mediated isothermal amplification (F3 and B3). Lane M, marker (2 log DNA ladder; kb, kilobases); lane 1, *Perkinsus* spp. (ITS2); lane 2, white spot syndrome virus (WSSV) (*orf191*); lane 3, WSSV (*orf36*); lane 4, *Vibrio parahaemolyticus* (thermolabile hemolysin [*tlh*]); lane 5, *V. parahaemolyticus* (*tox-R*). PCR products were visualized on 2% agarose gel electrophoresis.

Figura 1. Patógenos identificados en tejidos de *Crassostrea* spp. y *Litopenaeus vannamei* infectados, mediante la amplificación de ADN por PCR de punto final con los cebadores externos para la amplificación isotérmica mediada por bucle (F3 y B3). Carril M, marcador (escalera 2 log ADN; kb, kilobases); carril 1 *Perkinsus* spp. (ITS2); carril 2, virus del síndrome de la mancha blanca (VSMB) (*orf191*); carril 3, VSMB (*orf36*); carril 4, *Vibrio parahaemolyticus* (hemolisina termoestable [*tlh*]); carril 5, *V. parahaemolyticus* (*tox-R*). Los productos de la PCR se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa al 2%.

moldes para seleccionar la mejor dilución con la cual trabajar, y la reacción de LAMP se llevó a cabo en un tiempo predeterminado (63 min). Para determinar el tiempo óptimo de amplificación, las reacciones de LAMP se llevaron a cabo a la temperatura y concentración de ADN previamente elegidas para cada patógeno durante 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min; el tiempo en el control negativo se realizó a los 60 min. La especificidad de LAMP se examinó utilizando el ADN molde de otros patógenos y muestras no infectadas: para identificar la reactividad cruzada con el gen ITS2 para *Perkinsus* spp., utilizamos los dinoflagelados tóxicos *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium tamiyavanichii* y *Alexandrium catenella*. Para el diagnóstico de especificidad para *tlh* y *tox-R* con *V. parahaemolyticus*, usamos *Vibrio campbelli*, *Photobacterium damsela*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia rettgeri* y *Acinetobacter baumannii*. Para el diagnóstico de especificidad para *orf36* y *orf191* para evaluar VSMB, usamos el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética del camarón, el herpes virus de ostión y el virus del rizado de la hoja de la calabaza. La extracción del ADN se realizó como se mencionó anteriormente, y la reacción de LAMP se realizó con las condiciones óptimas obtenidas anteriormente.

RESULTADOS

Los productos de PCR representativos de muestras positivas de tejidos infectados con los patógenos estudiados se pueden observar en la Figura 1. Estos resultados se obtuvieron con los cebadores F3 y B3. Las Figuras 2–6 muestran la electroforesis en gel y los tubos fluorescentes de los ensayos de LAMP de los patógenos probados. El ensayo de LAMP para detectar *Perkinsus* spp. en tejidos de *Crassostrea* spp. utilizando cebadores de la región del gen ITS2 mostraron condiciones óptimas de amplificación en cada temperatura probada (61 a 65 °C). Los resultados fueron confirmados por los tubos con fluorescencia (Fig. 2a). El ensayo para examinar la sensibilidad de LAMP mostró que las concentraciones óptimas de ADN fueron 3.6 a 36.0 ng (Fig. 2b). El ensayo de LAMP para determinar el tiempo óptimo comenzó a los 30 min y se mantuvo hasta los 60 min (Fig. 2c). Para detectar *V. parahaemolyticus* en *L. vannamei*, utilizamos los genes *tlh* (Fig. 3) y *tox-R* (Fig. 4). Con los cebadores *tlh*, la optimización de temperatura mostró que la amplificación se realizó en todas las temperaturas probadas de 61 a 65 °C (Fig. 3a). La Figura 3b muestra los resultados del ensayo de sensibilidad de LAMP, y la amplificación se realizó en todas las diluciones analizadas desde 2.5 pg a 250.0 ng de ADN total. La optimización del tiempo de la reacción LAMP mostró que la amplificación comenzó a los 40 min y continuó hasta los 60 min (Fig. 3c). La optimización de la temperatura de la reacción de LAMP con los cebadores *tox-R* mostró que la amplificación se realizó con éxito de 61 a 64 °C (Fig. 4a). La sensibilidad de LAMP mostró amplificación a 25.0 a 250.0 ng de ADN (Fig. 4b), y la optimización

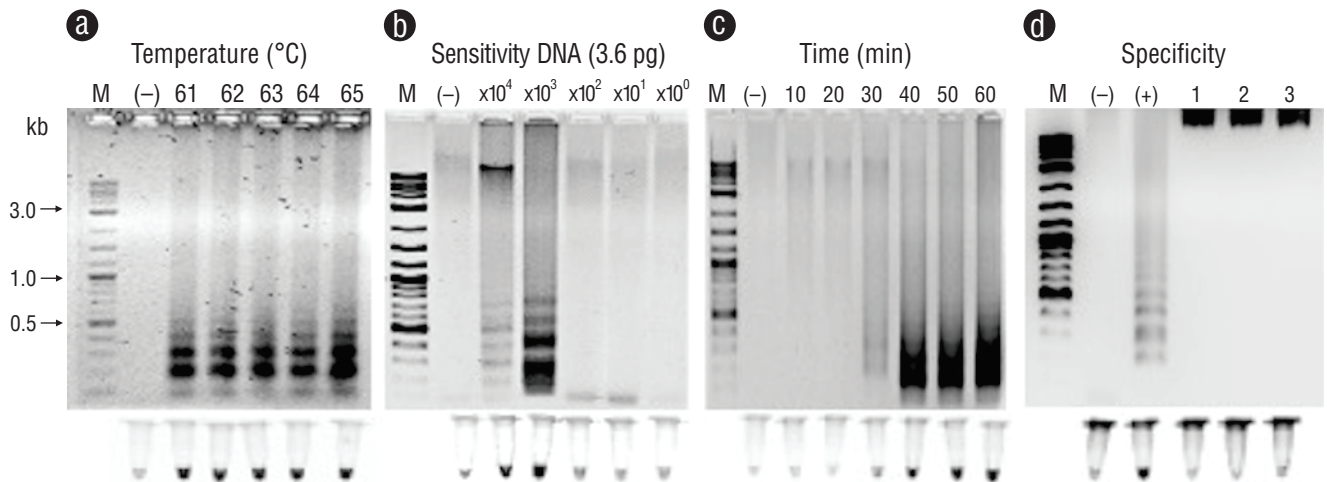


Figure 2. Optimization for the ITS2 gene with loop-mediated isothermal amplification optimization for detecting *Perkinsus* spp. in tissues of *Crassostrea* spp. (a) Temperature (°C). (b) Sensitivity (pg). (c) Time of reaction (min). (d) Specificity: lane (+), *Perkinsus marinus*; lane 1, *Gymnodinium catenatum*; lane 2, *Alexandrium tamiyavanichii*; lane 3, *Alexandrium catenella*. Lane M, marker (2 log DNA ladder; kb, kilobases); lane (-), negative control (DNA from uninfected tissue). Products were visualized on 2% agarose gel electrophoresis and fluorescent tubes.

Figura 2. Optimización del gen ITS2 con la amplificación isotérmica mediada por bucle para detectar *Perkinsus* spp. en tejidos de *Crassostrea* spp. (a) Temperatura (°C). (b) Sensibilidad (pg). (c) Tiempo de reacción (min). (d) Especificidad: carril (+), *Perkinsus marinus*; carril 1, *Gymnodinium catenatum*; carril 2, *Alexandrium tamiyavanichii*; carril 3, *Alexandrium catenella*. Carril M, marcador (escala 2 logADN; kb, kilobases); carril (-), control negativo (ADN de tejido no infectado). Los productos se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa al 2% y tubos fluorescentes.

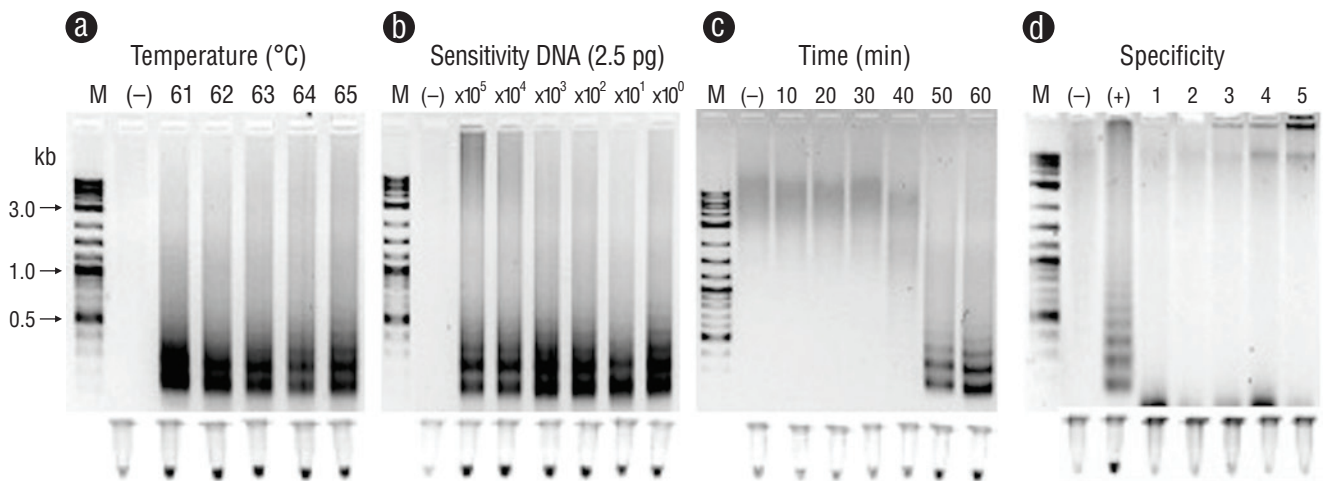


Figure 3. Optimization for the thermolabile hemolysin (*tlh*) gene with loop-mediated isothermal amplification for detecting *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of *Litopenaeus vannamei*. (a) Temperature (°C). (b) Sensitivity (pg). (c) Time of reaction (min). (d) Specificity: lane (+), *V. parahaemolyticus*; lane 1, *Vibrio campbelli*; lane 2, *Photobacterium damsela*; lane 3, *Pseudomonas aeruginosa*; lane 4, *Providencia rettgeri*; lane 5, *Acinetobacter baumannii*. Lane M, marker (2 log DNA ladder; kb, kilobases); lane (-), negative control (DNA from uninfected tissue). Products were visualized on 2% agarose gel electrophoresis and fluorescent tubes.

Figura 3. Optimización del gen hemolisina termoestable (*tlh*) con la amplificación isotérmica mediada por bucle para detectar *Vibrio parahaemolyticus* en tejidos de *Litopenaeus vannamei*. (a) Temperatura (°C). (b) Sensibilidad (pg). (c) Tiempo de reacción (min). (d) Especificidad: carril (+), *V. parahaemolyticus*; carril 1, *Vibrio campbelli*; carril 2, *Photobacterium damsela*; carril 3, *Pseudomonas aeruginosa*; carril 4, *Providencia rettgeri*; carril 5, *Acinetobacter baumannii*. Carril M, marcador (escala 2 log ADN; kb, kilobases); carril (-), control negativo (ADN de tejido no infectado). Los productos se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa al 2% y tubos fluorescentes.

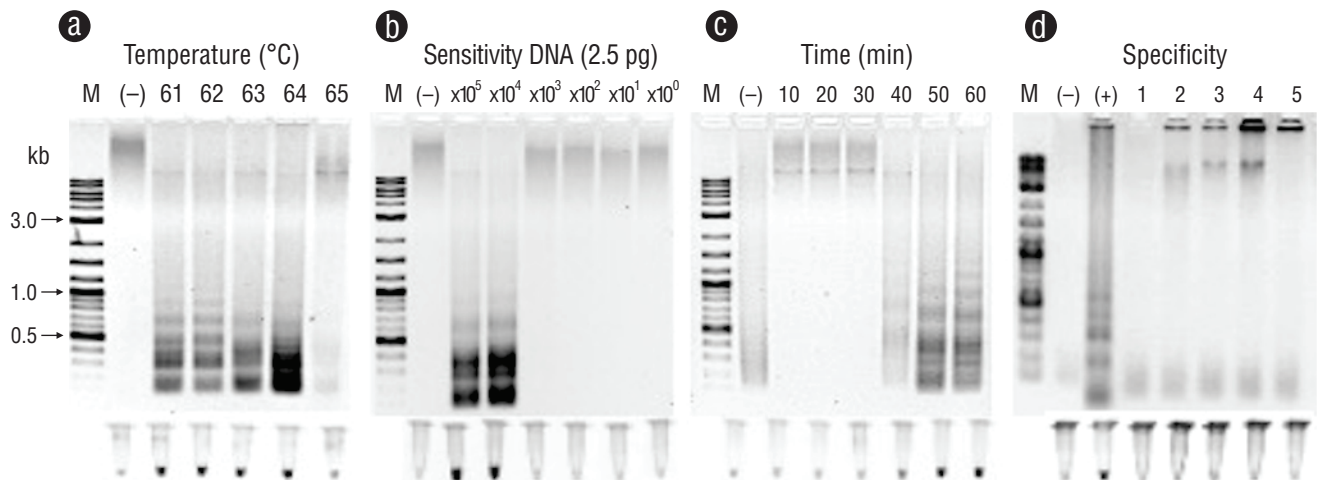


Figure 4. Optimization for the *tox-R* gene with loop-mediated isothermal amplification for detecting *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of *Litopenaeus vannamei*. **(a)** Temperature (°C). **(b)** Sensitivity (pg). **(c)** Time of reaction (min). **(d)** Specificity: lane (+), *V. parahaemolyticus*; lane 1, *Vibrio campbelli*; lane 2, *Photobacterium damsela*; lane 3, *Pseudomonas aeruginosa*; lane 4, *Providencia rettgeri*; lane 5, *Acinetobacter baumannii*. Lane M, marker (2 log DNA ladder; kb, kilobases); lane (-), negative control (DNA from uninfected tissue). Products were visualized on 2% agarose gel electrophoresis and fluorescent tubes.

Figura 4. Optimización del gen *tox-R* con la amplificación isotérmica mediada por bucle para detectar *Vibrio parahaemolyticus* en tejidos de *Litopenaeus vannamei*. **(a)** Temperatura (°C). **(b)** Sensibilidad (pg). **(c)** Tiempo de reacción (min). **(d)** Especificidad: carril (+), *V. parahaemolyticus*; carril 1, *Vibrio campbelli*; carril 2, *Photobacterium damsela*; carril 3, *Pseudomonas aeruginosa*; carril 4, *Providencia rettgeri*; carril 5, *Acinetobacter baumannii*. Carril M, marcador (escala de ADN de 2 log; kb, kilobases); carril (-), control negativo (ADN de tejido no infectado). Los productos se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa al 2% y tubos fluorescentes.

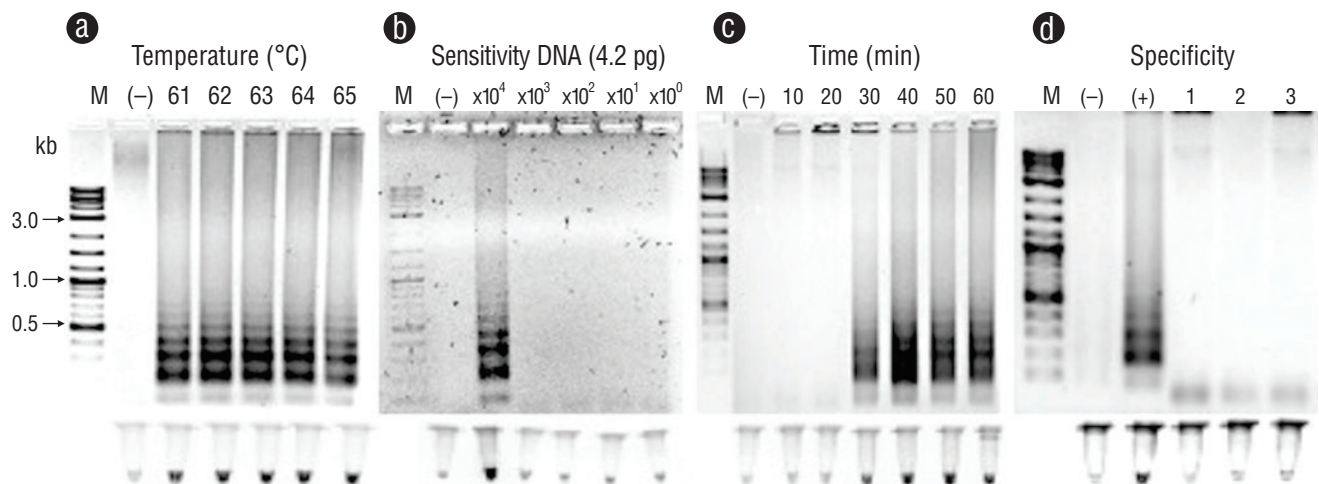


Figure 5. Optimization for the *orf36* gene with loop-mediated isothermal amplification for detecting white spot syndrome virus (WSSV) in tissues of *Litopenaeus vannamei*. **(a)** Temperature (°C). **(b)** Sensitivity (pg). **(c)** Time of reaction (min). **(d)** Specificity: lane (+), WSSV; lane 1, shrimp hypodermal and hematopoietic necrosis virus; lane 2, oyster herpes virus; lane 3, squash leaf curl virus. Lane M, marker (2 log DNA ladder; kb, kilobases); lane (-), negative control (DNA from uninfected tissue). Products were visualized on 2% agarose gel electrophoresis and fluorescent tubes.

Figura 5. Optimización del gen *orf36* con la amplificación isotérmica mediada por bucle para detectar el virus del síndrome de la mancha blanca (VSMB) en tejidos de *Litopenaeus vannamei*. **(a)** Temperatura (°C). **(b)** Sensibilidad (pg). **(c)** Tiempo de reacción (min). **(d)** Especificidad: carril (+), VSMB; carril 1, virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética del camarón; carril 2, herpes virus de ostión; carril 3, virus del rizado de la hoja de la calabaza. Carril M, marcador (escala de ADN de 2 log; kb, kilobases); carril (-), control negativo (ADN de tejido no infectado). Los productos se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa al 2% y tubos fluorescentes.

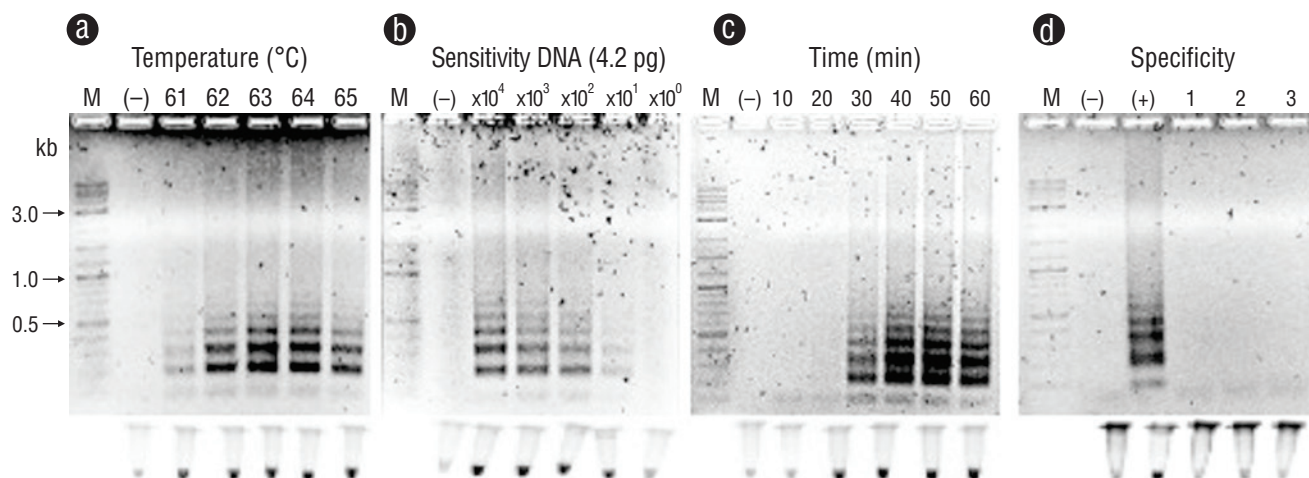


Figure 6. Optimization for the *orf191* gene with loop-mediated isothermal amplification for detecting white spot syndrome virus (WSSV) in tissues of *Litopenaeus vannamei*. (a) Temperature (°C). (b) Sensitivity (pg). (c) Time of reaction (min). (d) Specificity: lane (+), WSSV; lane 1, shrimp hypodermal and hematopoietic necrosis virus; lane 2, oyster herpes virus; lane 3, squash leaf curl virus. Lane M, marker (2 log DNA ladder; kb, kilobases); lane (-), negative control (DNA from uninfected tissue). Products were visualized on 2% agarose gel electrophoresis and fluorescent tubes.

Figura 6. Optimización del gen *orf191* con la amplificación isotérmica mediada por bucle para detectar el virus del síndrome de la mancha blanca (VSMB) en tejidos de *Litopenaeus vannamei*. (a) Temperatura (°C). (b) Sensibilidad (pg). (c) Tiempo de reacción (min). (d) Especificidad: carril (+), VSMB; carril 1, virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética del camarón; carril 2, herpes virus de ostión; carril 3, virus del rizado de la hoja de la calabaza. Carril M, marcador (escala de ADN de 2 log; kb, kilobases); carril (-), control negativo (ADN de tejido no infectado). Los productos se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa al 2% y tubos fluorescentes.

temperature tested from 61 to 65 °C (Fig. 3a). Figure 3b shows results from the LAMP sensitivity assay, and amplification was performed in all dilutions tested from 2.5 pg to 250.0 ng of total DNA. Optimization of the LAMP reaction time showed that amplification started at 40 min and continued for up to 60 min (Fig. 3c). The temperature optimization of the LAMP reaction with the *tox-R* primers showed that amplification was performed successfully from 61 to 64 °C (Fig. 4a). LAMP sensitivity showed amplification at 25.0 to 250.0 ng of DNA (Fig. 4b), and time optimization started at 40 min and continued for up to 60 min (Fig. 4c). To detect WSSV in *L. vannamei*, we chose 2 sets of primers, *orf36* (Fig. 5) and *orf191* (Fig. 6). With the *orf36* primer, optimization of LAMP assay temperature showed that amplification was performed at 61 to 65 °C (Fig. 5a), sensitivity showed that the DNA amplified only at a concentration of 42.0 ng (Fig. 5b), and optimal amplification time was 30 to 60 min (Fig. 5c). With *orf191*, the optimal temperature showed that amplification occurred at all temperatures probed from 61 to 65 °C (Fig. 6a), sensitivity showed that LAMP amplification was performed from 42.0 pg to 42.0 ng of DNA (Fig. 6b), and optimization of the LAMP reaction time showed that amplification started at 30 min and it kept on for up to 60 min (Fig. 6c).

We tested the cross-reaction with other viruses and bacterial templates to determine LAMP method specificity (Figs. 2d, 3d, 4d, 5d, 6d). No positive results for LAMP were found for any of the samples, which indicates that the LAMP method showed high specificity for the probed shellfish pathogens.

del tiempo comenzó a los 40 min y continuó hasta los 60 min (Fig. 4c). Para detectar VSMB en *L. vannamei*, elegimos 2 conjuntos de cebadores, *orf36* (Fig. 5) y *orf191* (Fig. 6). Con el cebador *orf36*, la optimización de la temperatura del ensayo de LAMP mostró que la amplificación se realizó de 61 a 65 °C (Fig. 5a), la sensibilidad mostró que el ADN se amplificó solo a una concentración de 42.0 ng (Fig. 5b) y el tiempo óptimo de amplificación fue de 30 a 60 min (Fig. 5c). Referente al gen *orf191*, la temperatura óptima mostró que hubo amplificación en todas las temperaturas probadas de 61 a 65 °C (Fig. 6a), la sensibilidad mostró que la amplificación de LAMP se realizó desde 42.0 pg a 42.0 ng de ADN (Fig. 6b) y la optimización del tiempo de la reacción de LAMP mostró que la amplificación comenzó a los 30 min y se mantuvo durante 60 min (Fig. 6c).

Probamos la reacción cruzada con otros de virus y bacterias para determinar la especificidad del método de LAMP (Figs. 2d, 3d, 4d, 5d, 6d). No se encontraron resultados positivos para LAMP para ninguna de las muestras, lo que indica que el método LAMP tiene una alta especificidad para los patógenos analizados.

DISCUSIÓN

En este estudio, evaluamos el uso de LAMP para detectar patógenos en tejidos de camarones y ostiones cultivados en México. Describimos un protocolo de diagnóstico de LAMP para *Perkinsus* spp., VSMB y *V. parahaemolyticus*. Estos patógenos provocan graves pérdidas mundiales en

DISCUSSION

In this study, we evaluated the use of LAMP to detect pathogens in tissues of shrimp and oysters cultured in Mexico. We described a LAMP diagnostic protocol for *Perkinsus* spp., WSSV, and *V. parahaemolyticus*. These pathogens cause serious global oyster and shrimp production losses, which result in severe economic injuries. The World Organization for Animal Health considers WSSV to be the most common virus in shrimp cultures; furthermore, another type of pathogen that gravely affects shrimp cultures is the bacterium *V. parahaemolyticus*, which acts as an opportunistic agent, causing massive losses (OIE 2019). The protozoa *Perkinsus marinus* and *Perkinsus olsenii* are organisms that affect oyster cultures, primarily *Crassostrea* spp. (OIE 2019). Diseases caused by these pathogens must be declared to the World Organization for Animal Health as soon as they are detected.

Accurate detection of shellfish pathogens is a crucial step in the process of disease management. Numerous detection methods have been developed to monitor and control these pathogens in cultures. Techniques based on DNA amplification have sensitivity and specificity advantages that make them valuable pathogen detection tools. LAMP is a sensitive method that can amplify a few DNA copies in less than an hour under isothermal conditions (Notomi et al. 2000, Mori et al. 2001, Nagamine et al. 2002, Mori and Notomi 2009). It has been used to detect shellfish pathogens in many countries; however, many reports show inconsistencies in LAMP protocols for detecting pathogens from different geographic locations, as there is a set of variables that favor dispersion and potential modifications in pathogen genotypes. We tested many different sets of primers for each pathogen, and we developed the protocol using the primers and assay conditions for LAMP reactions that were most suitable for pathogens in Mexican aquaculture systems. Our assay could also be used in wild-type organisms, different development stages, and other shellfish species when the pathogen is present.

The LAMP protocol we describe here is a sensitive, specific, and rapid method for detecting shellfish pathogens. Many reports have evaluated LAMP and argue that it has many advantages over other molecular techniques. LAMP is a single-step procedure that requires 4 to 6 primers that bind laterally to different sites using strand-displacement *Bst* DNA polymerase, permitting extremely specific amplification under isothermal conditions (Notomi et al. 2000). It does not require a denatured DNA template, avoiding time-consuming DNA extraction methods, and has low susceptibility to inhibitory compounds; the results can be visualized by the naked eye with color or fluorescent DNA dyes. As a result, it allows the use of simple and cost-effective reaction equipment and simplified protocols (Notomi et al. 2000, Nagamine et al. 2001, Kaneko et al. 2007, Tomita et

la producción de ostiones y camarones, lo que resulta en graves daños económicos. La Organización Mundial de Sanidad Animal considera al VSMB como el virus más frecuente en el cultivo de camarón; además, otro tipo de patógeno que afecta gravemente a los cultivos de camarón es la bacteria *V. parahaemolyticus*, que actúa como agente oportunista y provoca pérdidas masivas (OIE 2019). Los protozoos *Perkinsus marinus* y *Perkinsus olsenii* son organismos que afectan los cultivos de ostiones, principalmente *Crassostrea* spp. (OIE 2019). Las enfermedades causadas por estos patógenos deben ser declaradas obligatoriamente ante la Organización Mundial de Sanidad Animal tan pronto como se detecten.

La detección precisa de patógenos es un paso crucial en el proceso de manejo de enfermedades. Se han desarrollado varios métodos de detección para monitorear y controlar estos patógenos en cultivos. Las técnicas basadas en la amplificación del ADN tienen ventajas de sensibilidad y especificidad que las convierten en valiosas herramientas de detección de patógenos. LAMP es un método sensible que puede amplificar algunas copias de ADN en menos de una hora en condiciones isotérmicas (Notomi et al. 2000, Mori et al. 2001, Nagamine et al. 2002, Mori y Notomi 2009). Es utilizado para detectar patógenos de mariscos en muchos países; sin embargo, muchos reportes muestran inconsistencias en los protocolos con LAMP para la detección de patógenos de diferentes ubicaciones geográficas, consecuencia de un conjunto de variables que favorecen la dispersión y posibles modificaciones en los genotipos de los patógenos. Evaluamos muchos conjuntos diferentes de cebadores para cada patógeno, y desarrollamos el protocolo con los cebadores y las condiciones de ensayo para reacciones de LAMP más adecuados para patógenos en sistemas de acuicultura mexicanos. Nuestro ensayo también podría ser utilizado con organismos de tipo silvestre, diferentes etapas de desarrollo y otras especies de mariscos cuando el patógeno está presente.

El protocolo LAMP que describimos en este estudio representa un método sensible, específico y rápido para detectar patógenos de mariscos. Muchos informes han evaluado el método de LAMP y argumentan que tiene muchas ventajas sobre otras técnicas moleculares. LAMP es un procedimiento de un solo paso que requiere de 4 a 6 cebadores que se unen lateralmente a diferentes sitios utilizando la ADN polimerasa *Bst* de desplazamiento de cadena, lo que permite una amplificación extremadamente específica en condiciones isotérmicas (Notomi et al. 2000). No requiere un molde de ADN desnaturalizado, lo que evita los métodos de extracción de ADN que consumen mucho tiempo, y tiene una baja susceptibilidad a los compuestos inhibidores; los resultados se pueden visualizar a simple vista con tinciones de ADN coloridas o fluorescentes. Como resultado, permite el uso de equipos simples de bajo costo y protocolos simplificados (Notomi et al. 2000, Nagamine et al. 2001, Kaneko et al. 2007, Tomita et al. 2008, Goto et al. 2009, Mori y Notomi

al. 2008, Goto et al. 2009, Mori and Notomi 2009, Francois et al. 2011, Li and Macdonald 2015, Tanner et al. 2015).

The protocol that we show in this work is a basic LAMP method, designed to be carried out mainly in the laboratory. LAMP has proven to be broadly functional for on-site detection of pathogens due to its adaptability to varied detection approaches and settings, including many commercial portable kits, for which the workflow does not require highly qualified personnel (Kiatpathomchai et al. 2008, Jaroenram et al. 2009, Khunthong et al. 2013, Mori et al. 2013, Tomlinson 2013, Dhama et al. 2014, Notomi et al. 2015, Besuschio et al. 2017, Khan et al. 2017, Wong et al. 2018, Nzelu et al. 2019, Becherer 2020). Rapid and accurate detection of latent infections can provide farmers with reliable information on the infection status for early prevention and control of disease outbreaks. As efforts to raise production levels continue and research interest in aquaculture grows, the use of biosurveillance methods is also expanding. Research facilities can then use the technology, universities, government agencies, and shellfish farms to become a staple for detecting pathogens in aquaculture in Mexico and other countries.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the National Council for Science and Technology (CONACYT, Mexico; grant no. 247567 to NE). IMA received a CONACYT scholarship (no. 26089) for the development of this work. We acknowledge the Aquatic Health Committees in Baja California Sur, Nayarit, Sonora, and Sinaloa for notifying us of the presence of pathogens in aquaculture farms and allowing the collection of samples.

REFERENCES

- Arunrut N, Prombun P, Saksmerprome V, Flegel TW, Kiatpathomchai W. 2011. Rapid and sensitive detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J Virol Methods*. 171(1):21–25. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.09.022>
- 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. *Anal Methods*. 12(6):717–746. <https://doi.org/10.1039/c9ay02246e>
- Besuschio SA, Llano-Murcia M, Benatar AF, Monnerat S, Cruz I, Picado A, Curto MA, Kubota Y, Wehrendt DP, Pavia P, et al. 2017. Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 11(7):e0005779. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005779>
- Boehme CC, Nabeta P, Henostroza G, Raqib R, Rahim Z, Gerhardt M, Sanga E, Hoelscher M, Notomi T, Hase T, et al. 2007. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. *J Clin Microbiol*. 45(6):1936–1940. <https://doi.org/10.1128/JCM.02352-06>
- Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R, Padilla-Lardizábal G, del Río Portilla MA. 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. *J Invert Pathol*. 99(1):66–73. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.005>
- Chen S, Ge B. 2010. Development of a *toxR*-based loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol*. 10(1):41. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-41>
- Dhama K, Karthik K, Chakraborty S, Tiwari R, Kapoor S, Kumar A, Thomas P. 2014. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *PJBS*. 17(2):151–166. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2014.151.166>
- Enriquez-Espinoza TL, Grijalva-Chon JM, Castro-Longoria R, Ramos-Paredes J. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Dis Aquat Organ*.

- 89(3):269–273.
<https://doi.org/10.3354/dao02199>
- [FAO] Food and Agriculture Organization of United Nations. 2019. FAO Yearbook of fishery and aquaculture statistics. Rome (Italy): FAO. 84 p. ISBN 978-92-5-131669-6.
- Feng C, Wang C, Lin X, Zhang Y, Lv J, Deng J, Yuan X, Mei L, Wu S. 2013. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Perkinsus* spp. in mollusks. *Dis Aquat Organ*. 104(2):141–148.
<https://doi.org/10.3354/dao02591>
- Francois P, Tangomo M, Hibbs J, Bonetti EJ, Boehme CC, Notomi T, Perkins MD, Schrenzel J. 2011. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol Med Mic*. 62(1):41–48.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2011.00785.x>
- Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki KI. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques*. 46(3):167–172.
<https://doi.org/10.2144/000113072>
- Hasson KW, Fan Y, Reisinger T, Venuti J, Varner PW. 2006. White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas freshwater systems through imported, frozen bait-shrimp. *Dis Aquat Organ*. 71(2):91–100.
<https://doi.org/10.3354/dao071091>
- Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. 2003. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol*. 41(6):2616–2622.
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2616-2622.2003>
- Jaroenram W, Kiatpathomchai W, Flegel TW. 2009. Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Mol Cell Probe*. 23(2):65–70.
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2008.12.003>
- Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods*. 70(3):499–501.
<https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.08.008>
- Khan M, Li B, Jiang Y, Weng Q, Chen Q. 2017. Evaluation of different PCR-based assays and LAMP method for rapid detection of *Phytophthora infestans* by targeting the *ypt1* gene. *Front Microbiol*. 8:1920.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01920>
- Khunthong S, Jaroenram W, Arunrut N, Suebsing R, Mungsantisuk I, Kiatpathomchai W. 2013. Rapid and sensitive detection of shrimp yellow head virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J Virol Methods*. 188(1–2):51–56.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.11.041>
- Kiatpathomchai W, Jaroenram W, Arunrut N, Jitrapakdee S, Flegel TW. 2008. Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J Virol Methods*. 153(2):214–217.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.06.025>
- Kongrueng J, Tansila N, Mitraparp-arhorn P, Nishibuchi M, Vora, GJ, Vuddhakul V. 2015. LAMP assay to detect *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Aquac Int*. 23(5):1179–1188.
<https://doi.org/10.1007/s10499-014-9874-3>
- Kono T, Savan R, Sakai M, Itami T. 2004. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods*. 115(1):59–65.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.09.015>
- Li J, Macdonald J. 2015. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes. *Biosens Bioelectron*. 64:196–211.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.069>
- Maralit BA, Caipang CMA, Santos MD, Calpe AT, Maningas MBB. 2012. Development of primers for loop-mediated isothermal amplification of Philippine white spot syndrome virus isolates. *AAFL Bioflux*. 5(4):274–281.
- Mekata T, Kono T, Savan R, Sakai M, Kasornchandra J, Yoshida T, Itami T. 2006. Detection of yellow head virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J Virol Methods*. 135(2):151–156.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.02.012>
- Mekata T, Sudhakaran R, Kono T, Supamattaya K, Linh NTH, Sakai M, Itami T. 2009. Real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification as a simple method for detecting white spot syndrome virus. *Lett Appl Microbiol*. 48(1):25–32.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2008.02479.x>
- Mori Y, Kanda H, Notomi T. 2013. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *J Infect Chemother*. 19(3):404–411.
<https://doi.org/10.1007/s10156-013-0590-0>
- Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T. 2004. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods*. 59(2):145–157.
<https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2003.12.005>
- Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 289(1):150–154.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921>
- Mori Y, Notomi T. 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother*. 15(2):62–69.
<https://doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>
- Nagamine K, Hase T, Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probe*. 16(3):223–229.
<https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
- Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T. 2001. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. *Clin Chem*. 47(9):1742–1743.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/47.9.1742>
- Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol*. 53(1):1–5.
<https://doi.org/10.1007/s12275-015-4656-9>
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 28(12):e63.
<https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Nzulu CO, Kato H, Peters NC. 2019. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of *Leishmania* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 13(11):e0007698.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007698>
- [OIE] World Organisation for Animal Health. 2019. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals = Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos. [place unknown]: OIE; accessed Nov 2019. <https://www.oie.int/es/normas/manual-acuatico/acceso-en-linea/>
- Palomino-Camargo C, González-Muñoz Y. 2014. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: Ventajas y limitaciones = Molecular techniques for detection and identification of pathogens in food: advantages and limitations. *Rev Peru Med Exp. Salud Publica*. 31(3):535–546.

- [SAGARPA] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. 2017. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2017. México: CONAPESCA; accessed Jan 2019. https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO_ESTADISTICO_2017.pdf
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 1, 2 and 3. 2nd. ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1669 p.
- Soto-Rodriguez SA, Gomez-Gil B, Lozano R, Roque A. 2010. Density of vibrios in hemolymph and hepatopancreas of diseased Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from northwestern Mexico. J World Aquacult Soc. 41(S1):76–83. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00335.x>
- Tanner NA, Zhang Y, Evans TC. 2015. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. BioTechniques. 58(2):59–68. <https://doi.org/10.2144/000114253>
- Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nat Protoc. 3(5):877–882. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>
- Tomlinson J. 2013. In-field diagnostics using loop-mediated isothermal amplification. In: Dickinson M, Hodgetts J (eds.), Phytoplasma. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol. 938. Totowa (NJ): Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_25
- Wong YP, Othman S, Lau YL, Radu S, Chee HY. 2018. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. J Appl Microbiol. 124(3):626–643. <https://doi.org/10.1111/jam.13647>
- Xu H, He L, Lv S, Gong Q, Li S. 2012. Establishment of universal loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for rapid detection of pathogenic *Vibrio* spp. in aquatic organisms. African J Microbiol Res. 6(14):3447–3454. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.1417>
- Yamazaki W, Ishibashi M, Kawahara R, Inoue K. 2008. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. BMC Microbiol. 8(1):163. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-163>

Received 23 January 2020,
accepted 16 March 2021.