УДК 619:616.98:578.835.2:616-076

DOI 10.29326/2304-196X-2019-1-28-22-25

ПРИМЕНЕНИЕ ОТ-ПЦР
В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ЯЩУРА В МОЛОКЕ КРС

А. М. Тимина[1], С. Н. Фомина[2], Т. К. Майорова[3]

[1] Старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail: timina@arriah.ru*

[2] Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail: fomina@arriah.ru*

[3] Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail: mayorova@arriah.ru*

РЕЗЮМЕ

Вирус ящура способен выделяться с молоком инфицированных животных и таким образом заражать восприимчивых особей. Оценивали возможность применения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени для обнаружения вируса ящура в молоке крупного рогатого скота. Для приготовления образцов молока, инфицированных вирусом ящура, использовали штаммы А № 2177/Амурский/2013, О № 2123/Южная Осетия/2011, Азия-1 № 1987/Амурский/2005, С № 564, SAT-1 № 2033/Ботсвана, SAT-2/Саудовская Аравия, SAT-3/Bech 1/65. Для проверки специфичности ОТ-ПЦР-РВ использовали штаммы из коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ»: вируса везикулярной болезни свиней – О-72, вируса везикулярной экзантемы свиней – А-48, вируса везикулярного стоматита – Индиана. Полученные данные показали, что ОТ-ПЦР в реальном времени может успешно применяться для обнаружения вируса ящура в молоке инфицированных коров так же, как в эпителиальных тканях и культурах клеток. Аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР-РВ в образцах молока составляет 1–10 ТЦД$_{50}$/мл, специфичность метода – 100%. При определении основных валидационных характеристик метода доказано, что ОТ-ПЦР-РВ обладает высокой прецизионностью, специфичностью и чувствительностью и способна обнаруживать вирус ящура во всем его генетическом разнооообразии. Таким образом, полученные данные показали, что ОТ-ПЦР-РВ является ценным методом для контроля молока и молочной продукции.

Ключевые слова: вирус ящура, молоко, ОТ-ПЦР в реальном времени, валидация.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур – высококонтагиозное вирусное заболевание домашних и диких парнокопытных животных, способное наносить экономический ущерб в национальных масштабах. Свободные от ящура страны постоянно подвержены риску заноса заболевания из эндемичных регионов, таких как Азия, Африка и Южная Америка.

Возбудителем болезни является безоболочечный РНК-содержащий вирус ящура, представитель рода *Aphthovirus* семейства *Picornaviridae*. Различают семь серотипов вируса: О, А, С, Азия-1, SAT-1, SAT-2, SAT-3. В пределах каждого типа существует множество генетических и антигенных вариантов вируса.

В России ящур не эндемичен, однако существует постоянная угроза заноса болезни из соседних азиатских стран, прежде всего из Китая и Монголии. Вспышки ящура, вызванные заносом инфекции извне, регистрировались в современной России в 1995, 2000, 2004–2006 и 2010–2018 гг. [3].

Быстрая и точная диагностика является важным элементом контроля этой болезни, обладающей высокой контагиозностью и тяжелыми социально-экономическими последствиями.

У молочных коров заболевание характеризуется везикулярными поражениями в ротовой полости, на вымени, венчике копыт, в межкопытной щели, повышением температуры и потерей молочной продуктивности. Вирус ящура выделяется с молоком инфицированных животных, участвуя таким образом в передаче инфекции [9].

Молоко является идеальной средой для лабораторной диагностики, поскольку оно доступно в любом количестве и его пробы легко собрать. Ряд исследователей применяли различные диагностические подходы при использовании образцов молока для контроля инфекций крупного рогатого скота и идентификации статуса отдельных животных по заболеванию [5, 8].

Как показали исследования S. M. Reid и соавт., вирус ящура появляется в молоке коров на 2-е–3-и сут после инфицирования до возникновения клинических признаков у экспериментально зараженных животных. Также было установлено, что вирус способен реплицироваться в тканях молочной железы и выделяться с молоком до 23 сут. Данными авторами показаны преимущества исследования молока коров методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в качестве инструмента доклинической диагностики ящура [9].

Исследования P. M. Tomasula и R. P. Konstance показали, что вирус ящура обнаруживается в молоке после инкубации проб при 37 °С, после хранения при комнат-

ной температуре и при 4 °С в течение 2 нед. Кроме того, вирус ящура можно обнаружить в пастеризованных продуктах. Такой метод, как вирусовыделение, не позволяет выявлять жизнеспособный вирус в термически обработанных образцах [7].

Как показывают предыдущие исследования специалистов, ОТ-ПЦР-РВ является ценным методом для лабораторного обнаружения вируса ящура в везикулах эпителиальной ткани, назальных смывах и пищеводно-глоточных образцах [3, 6, 8].

Целью работы было оценить возможность применения метода ОТ-ПЦР-РВ для обнаружения вируса ящура в молоке, а также определить его основные валидационные характеристики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы. В работе использовали: вирусы ящура А № 2177/Амурский/2013, О № 2123/Южная Осетия/2011, Азия-1 № 1987/Амурский/2005, С № 564, SAT-1 № 2033/Ботсвана, SAT-2/Саудовская Аравия, SAT-3/Bech 1/65, а также штаммы из коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ»: вируса везикулярной болезни свиней (ВБС) – О-72, вируса везикулярной экзантемы свиней (ВЭС) – А-48, вируса везикулярного стоматита (ВС) – Индиана.

Образцы молока, инфицированные вирусом ящура. На молоке здоровых дойных коров были приготовлены 10-кратные последовательные разведения вируса ящура трех актуальных серотипов (А, О, Азия-1) с концентрацией от 10^{-1} до 10^{-10} lg ТЦД$_{50}$/мл.

Выделение РНК из молока КРС проводили с использованием 6 М гуанидинизотиоцианата и стекловолокнистых фильтров GF/F, как описано A. Sherbakov и соавт. [4].

Постановка ОТ-ПЦР в реальном времени. В 25 мкл реакционной смеси содержалось: 5 пМ прямого и 5 пМ обратного праймеров; 5 пМ зондаTaqMan; 5 мкл РНК; 20 мкл смеси реактивов для проведения ПЦР-РВ (Синтол, Москва), состоящей из 2,5 мкл ПЦР-буфера 10-кратной концентрации; 2,5 мкл 25 мМ $MgCl_2$; 2,5 мкл 2,5 мМ dNTP; 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы; 10 ед. MMLV-ревертазы; 12 мкл воды. Компоненты смешивали в 96-луночных оптических планшетах (Axygen). ПЦР проводили на амплификаторе C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad) при следующем температурном режиме: 15 мин – обратной транскрипции, 5 мин – предварительной денатурации при 95 °С и 40 циклов реакции (денатурация при 95 °С – 15 с, отжиг при 55 °С – 15 с, элонгация при 60 °С – 20 с). Сигналы флюоресценции регистрировала система CFX96 Real-Time System мультиканальной детекции ПЦР-продуктов в режиме реального времени. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager и Microsoft Excel. Для установления порогового цикла C_t использовали два основных параметра: базовую линию, определяемую для каждой индивидуальной кривой, и пороговую линию, рассчитанную для данного флюорофора. Величина порогового цикла обратно пропорциональна log количества матрицы в реакционной смеси – чем ниже величина C_t, тем выше концентрация матрицы [3].

Статистическая обработка данных. Прецизионность в условиях сходимости (повторяемости) и воспроизводимости определяли как степень согласованности результатов множественных анализов одного образца [1, 2]. Коэффициент вариации (С) рассчитывали по формуле [1]:

$$C = \frac{\sigma}{X_{ср.}} \times 100\%,$$

где $X_{ср.}$ – средняя величина порогового цикла, определяемого в ПЦР-РВ;

σ – среднее квадратичное отклонение, которое определяется по формуле:

$$\sigma = \frac{X_{max} - X_{min}}{K}.$$

Таблица 1
Определение концентрации вируса ящура методом ОТ-ПЦР-РВ в образцах молока

Концентрация вируса ящура в образцах, lg ТЦД$_{50}$/мл	Среднее значение порогового цикла (C_t), полученное в трех повторностях		
	А № 2177/Амурский/2013	О № 2123/Южная Осетия/2011	Азия-1 № 1987/Амурский/2005
6,0	16,09	16,76	18,36
5,0	17,74	20,30	21,00
4,0	21,58	23,81	24,09
3,0	23,73	27,67	27,66
2,0	26,69	30,80	29,84
1,0	29,40	**36,83**	32,48
0,1	**32,38**	н/о	**34,71**
0,01	н/о	н/о	н/о
0,001	н/о	н/о	н/о
0,0001	н/о	н/о	н/о

н/о – C_t не определен, что означает отрицательный результат ОТ-ПЦР-РВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Работа по оценке использования ОТ-ПЦР-РВ при обнаружении вируса ящура в молоке КРС проводилась в соответствии с планом НИР. Для реализации этой задачи были приготовлены образцы молока КРС, инфицированные вирусом ящура. Пробы готовили методом последовательных разведений с 10-кратным шагом. Каждая проба молока содержала 10% вирусной суспензии таким образом, чтобы конечная концентрация вируса в образце составляла от 10^{-1} до 10^{-10} lg ТЦД$_{50}$/мл. Исходя из эпизоотической ситуации были выбраны три актуальных штамма вируса ящура: А № 2177/Амурский/2013, О № 2123/Южная Осетия/2011, Азия-1 № 1987/Амурский/2005 – и приготовлены по 10 разведений вируса в молоке.

Таблица 2
Значения порогового цикла и коэффициенты вариации ОТ-ПЦР-РВ для образца молока, содержащего вирус ящура А № 2177/Амурский/2013

Внутри одного прогона		На другом приборе		Другим оператором	
№ повтора	C_t	№ повтора	C_t	№ повтора	C_t
1	16,12	1	16,24	1	16,32
2	16,30	2	17,02	2	16,74
3	16,14	3	16,66	3	**16,08***
4	16,17	4	16,06	4	16,16
5	16,21	5	16,14	5	16,81
6	16,27	6	17,01	6	16,27
7	16,31	7	16,83	7	16,98
8	16,30	8	16,41	8	16,22
9	16,28	9	16,29	9	17,11
10	16,27	10	17,04	10	16,17
11	16,23	11	16,21	11	17,01
12	16,23	12	16,47	12	16,37
13	16,18	13	16,32	13	16,49
14	16,17	14	16,94	14	16,47
15	16,19	15	16,83	15	16,29
16	16,21	16	16,81	16	16,64
17	16,27	17	16,19	17	16,36
18	16,12	18	16,71	18	16,18
19	16,32	19	16,29	19	16,41
20	16,26	20	16,28	20	**17,19****
C = 1,23					
C = 5,6					
		C = 6,72			

* минимальное значение C_t; ** максимальное значение C_t.

Для определения специфичности метода использовали образцы молока, содержащие 10% вирусной суспензии семи серотипов вируса ящура и гетерологичных вирусов с везикулярным синдромом. Все анализы проводили в трех повторностях.

В ходе исследования были определены такие показатели, как аналитическая чувствительность реакции, прецизионность и аналитическая специфичность.

Определение аналитической чувствительности реакции. Аналитическую чувствительность ОТ-ПЦР-РВ определяли на серии последовательных 10-кратных разведений в образцах молока трех культуральных препаратов вируса ящура (штаммы А № 2177/Амурский/2013, О № 2123/Южная Осетия/2011, Азия-1 № 1987/Амурский/2005) с известной первоначальной концентрацией. Концентрацию вируса в полученных образцах молока определяли исходя из значений порогового цикла (C_t). ОТ-ПЦР-РВ обнаруживала штаммы вируса ящура А № 2177/Амурский/2013 и Азия-1 № 1987/Амурский/2005 в концентрации до 0,1 lg ТЦД$_{50}$/мл (т. е. 1 ТЦД$_{50}$/мл), а О № 2123/Южная Осетия/2011 – в концентрации до 1 lg ТЦД$_{50}$/мл (т. е. 10 ТЦД$_{50}$/мл) (табл. 1).

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР-РВ при выявлении вируса ящура в молоке составляет 1–10 ТЦД$_{50}$/мл. Различие в аналитической чувствительности реакции для разных штаммов, вероятно, объясняется выбранным 10-кратным шагом разведения образцов, а также возможной неточностью при определении титра вируса в культуре клеток.

Полученные результаты подтверждают, что метод ОТ-ПЦР-РВ способен выявлять вирус ящура в молоке с такой же чувствительностью, как в эпителиальных тканях и клеточных культурах [3].

Оценка прецизионности реакции. Прецизионность реакции определяли в условиях сходимости и воспроизводимости. Прецизионность в условиях сходимости оценивали, измеряя вариабельность результатов реакции внутри одного прогона. Для этого один и тот же образец молока, содержащий 6 lg ТЦД$_{50}$/мл вируса ящура А № 2177/Амурский/2013, тестировался одновременно в 20 повторностях одним оператором на одном приборе.

Прецизионность в условиях воспроизводимости оценивали, измеряя вариабельность результатов реакции между прогонами. Для этого один и тот же образец тестировался в 20 повторностях одним оператором на двух приборах в разное время, а также двумя операторами на разных приборах.

Значение коэффициента вариации составляло 1,23% при проведении ОТ-ПЦР-РВ в 20 повторах одним оператором, 5,6% – при проведении реакции одним оператором на двух приборах в разное время и 6,72% при проведении реакции двумя операторами на двух приборах. Суммарный коэффициент вариации составлял 6,76% (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о высокой прецизионности ОТ-ПЦР-РВ.

Определение аналитической специфичности реакции. Аналитическую специфичность ОТ-ПЦР-РВ проверяли на РНК, полученной из образцов молока КРС, содержащих вирусы ящура семи серотипов. Также использовали другие вирусы (ВБС, ВЭС, ВС), разведенные в молоке, и цельное молоко от здоровых коров.

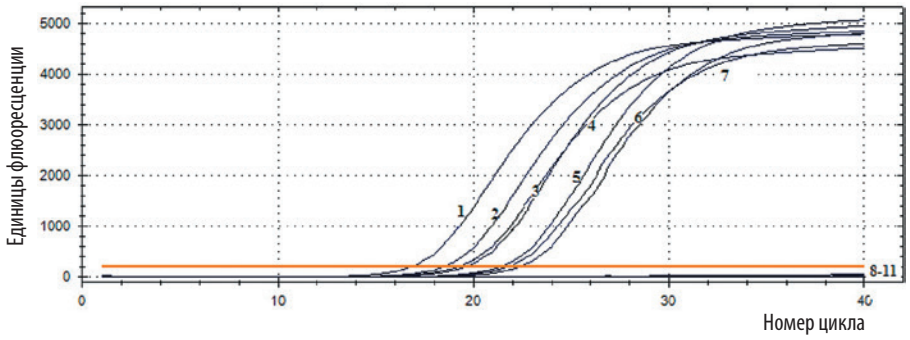

Рис. Аналитическая специфичность ОТ-ПЦР-РВ для обнаружения РНК вируса ящура в молоке

1–7 – образцы молока, содержащие вирус ящура семи серотипов;
8–11 – молоко здоровых коров и образцы молока, содержащие вирусы ВБС, ВЭС, ВС.

Положительный результат был получен при исследовании образцов молока, содержащих вирус ящура семи серотипов (см. рис.). Пробы, содержащие РНК других вирусов, а также молоко здоровых животных дали отрицательные результаты, что свидетельствует о специфичности метода.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее проведенные исследования показали, что ОТ-ПЦР в реальном времени является современным методом для выявления генома вируса ящура в тканях эпителия инфицированных животных и культурах клеток [3]. Результаты, полученные в рамках данной работы, показывают, что ОТ-ПЦР-РВ может успешно применяться также для обнаружения вируса ящура в молоке инфицированных коров.

В результате эксперимента определены некоторые валидационные характеристики ОТ-ПЦР-РВ: прецизионность в условиях сходимости и воспроизводимости, аналитическая специфичность и чувствительность, показана возможность использования метода для выявления вируса ящура в молоке коров дойного стада.

Проведенные исследования показали, что ОТ-ПЦР-РВ обеспечивает высокую прецизионность, специфичность и чувствительность анализа. Коэффициент вариации составлял 6,72%.

Чувствительность метода в экспериментах составляла от 1 до 10 ТЦД$_{50}$/мл в зависимости от штамма вируса ящура. ОТ-ПЦР-РВ позволяет обнаружить вирус ящура, разведенный в молоке в 1 000 000 раз. По данным S. M. Reid и соавт. [9], такая чувствительность позволяет обнаружить наличие инфицированного животного в стаде, следовательно, метод пригоден для исследования сборных проб молока. Существует возможность выявления инфекции даже после того, как молоко от нескольких стад объединят в общий танкер.

Вирус ящура отличается чрезвычайно высоким уровнем генетического разнообразия. Проведенные исследования показывают, что все семь серотипов вируса успешно обнаруживаются в молоке так же, как и в эпителии больных животных [3], что подтверждает способность метода обнаруживать широкий генетический спектр вируса ящура.

ВЫВОДЫ

Показана возможность применения ОТ-ПЦР в реальном времени как современного метода для обнаружения вируса ящура в молоке КРС. Определены основные валидационные характеристики метода, предназначенного для обнаружения РНК вируса ящура всех серотипов.

Результаты экспериментальных исследований доказывают, что метод обладает высокой прецизионностью, специфичностью и чувствительностью и способен обнаруживать вирус ящура во всем его генетическом разнообразии даже при значительном разведении.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поляков И. В., Соколова Н. С. Практическое пособие по медицинской статистике. – Л.: Медицина, 1975. – С. 26–30.

2. Практикум по GMP. Валидация аналитических методик: теория / П. Носырев, М. Носырева, Т. Рассказова, Н. Корнеева. – URL: http://www.nedug.ru/news/фармацевтика/2004/2/12/Практикум-по-GMP--Валидация-аналитических-методик--теория (дата обращения: 02.12.18).

3. Тимина А. М., Щербаков А. В. Определение основных характеристик ОТ-ПЦР в реальном времени, предназначенной для обнаружения вируса ящура всех серотипов // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2016. – Т. 14. – С. 7–19.

4. Application of RT-PCR and nucleotide sequencing in foot-and-mouth disease diagnosis / A. Sherbakov, N. Lomakina, V. Drygin, A. Gusev // Vet. Quart. – 1998. – V. 20 (Suppl. 2). – P. 32–34; DOI: 10.1080/01652176.1998.9694962.

5. Drew T. W., Yapp F., Paton D. J. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR / Vet. Microbiol. – 1999. – Vol. 64 (2–3). – P. 145–154; DOI: 10.1016/S0378-1135(98)00266-1.

6. Enhanced laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease by real-time polymerase chain reaction / A. E. Shaw, S. M. Reid, D. P. King [et al.] // Rev. Sci. Tech. OIE. – 2004. – Vol. 23 (3). – P. 1003–1009. – URL: http://wahis2-devt.oie.int/doc/ged/D1339.PDF.

7. Tomasula P. M., Konstance R. P. The survival of foot-and-mouth disease virus in raw and pasteurized milk and milk products // J. Dairy Sci. – 2004. – Vol. 87 (4). – P. 1115–1121; DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73258-0.

8. Use of an internal standard in a TaqMan® nested reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of bovine viral diarrhoea virus / G. S. Heath, D. P. King, J. L. E. Turner [et al.] // Vet. Microbiol. – 2003. – Vol. 96 (4). – P. 357–366; DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.09.006.

9. Utility of automated real-time RT-PCR for the detection of foot-and-mouth disease virus excreted in milk / S. M. Reid, S. Parida, D. P. King [et al.] // Vet. Res. – 2006. – Vol. 37 (1). – P. 121–132; DOI: 10.1051/vetres:2005040.

Поступила 13.12.18
Принята в печать 01.02.19

UDC 619:616.98:578.835.2:616-076

DOI 10.29326/2304-196X-2019-1-28-22-25

USE OF REAL-TIME qRT-PCR
FOR FMD VIRUS DETECTION IN CATTLE MILK

A. M. Timina[1], S. N. Fomina[2], T. K. Mayorova[3]

[1] Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine) FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, *e-mail: timina@arriah.ru*

[2] Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, *e-mail: fomina@arriah.ru*

[3] Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, *e-mail: mayorova@arriah.ru*

SUMMARY

FMDV can be shed with milk of infected animals and infect susceptible animals. The possibility of using real-time qRT-PCR for FMD virus detection in cattle milk was assessed. To prepare samples of FMDV infected milk the following strains were used: A No. 2177/Amursky/2013, O No. 2123/South Ossetia/2011, Asia-1 No. 1987/Amursky/2005, C No. 564, SAT-1 No. 2033/Botswana, SAT-2/Saudi Arabia, SAT-3/Bech 1/65. For specificity test swine vesicular disease O-72 strain, Vesicular Exanthema of Swine A-48 strain and vesicular stomatitis virus Indiana strain from FGBI "ARRIAH" collection were used. The obtained data showed that real time qRT-PCR can be successfully used for the virus detection in milk of infected cows as well as in epithelium and cell cultures. Analytical sensitivity of real-time qRT-PCR in milk samples is 1–10 TCD_{50}/ml, the method specificity is 100%. When identifying basic validation characteristics of the method it was proven that real-time qRT-PCR demonstrates precision and sensitivity and can detect FMDV in its genetic diversity. So, the detected data showed that the real-time qRT-PCR is a precious method of milk and dairy product control.

Key words: FMD virus, milk, real-time qRT-PCR, validation.

INTRODUCTION

FMD is a highly contagious disease of domestic and wild cloven hoofed animals capable of causing great economic damage nationwide. FMD free countries are under constant risk of the disease introduction from endemic regions, such as Asia, Africa and South America.

The disease agent is non-enveloped RNA-containing FMDV, *Aphthovirus* Genus, *Picornaviridae* family. There are seven types of the virus: O, A, C, Asia-1, SAT-1, SAT-2, SAT-3. Within each type there are many genetic and antigenic variants of the virus.

FMD is not endemic in Russia, however there is a constant threat of the virus introduction from the neighboring Asian countries, primarily from China and Mongolia. FMD outbreaks caused by the infection introduction from other countries were reported in Russia in 1995, 2000, 2004–2006 and 2010–2018 [3].

Rapid and precise diagnosis is a key element of the control of the disease having high contagiousness and hard social and economic consequences.

In milk cows the disease is characterized by vesicular lesions in the mouth, on the udder, on the coronary band, in the interdigital cleft, by fever and decreased milk yield. FMDV is shed with milk of infected animals facilitating the infection transmission [9].

Milk is a perfect medium for laboratory diagnosis as it is available in any quantity and its samples are easily collected. Several researchers applied different diagnostic approaches when using milk samples for cattle infection control and identification of the disease status of individual animals [5, 8].

According to the researches of S. M. Reid and et al., FMDV can be observed in cow milk on day 2–3 after infection until the experimentally infected animals demonstrate clinical signs. It was also established that the virus can replicate in the mammary gland and shed with milk for up to 23 days. The authors showed benefits of real-time qRT-PCR tests of cow milk as an instrument of preclinical FMD diagnosis [9].

P. M. Tomasula and R. P. Konstance's investigations demonstrated that FMDV is detected in milk after sample incubation at 37 °C, after storage at room temperature and at 4 °C for two weeks. Besides, FMDV can be detected in pasteurized products. Such method as virus isolation can not detect the viable virus in heat treated samples [7].

According to the previous researches real-time qRT-PCR is a valuable method for laboratory FMDV detection in epithelium vesicules, nasal swabs and esophageal samples [3, 6, 8].

The purpose of the research was to assess the possibility of real-time qRT-PCR use for FMDV detection in milk and to identify its basic validation characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Viruses. The following viruses were used in the research: FMD viruses: A No. 2177/Amursky/2013, O No. 2123/South Ossetia/2011, Asia-1 No. 1987/Amursky/2005, C No. 564, SAT-1 No. 2033/Botsvana, SAT-2/Saudi Arabia, SAT-3/Bech 1/65, as well as swine vesicular disease virus strain O-72, VESV A-48 strain and vesicular stomatitis virus Indiana strain from FGBI "ARRIAH" collection.

FMDV infected milk samples. 10-fold FMDV serial dilutions of three circulating serotypes (A, O, Asia-1) with the concentration of 10^{-1}–10^{-10} lg TCD_{50}/ml were prepared using milk of normal milk cows.

RNA isolation from cattle was performed using 6 M guanidine isothiocyanate and fibrous glass filter GF/F as described by A. Sherbakov et al. [4].

Real-time qRT-PCR. 25 µl of reaction mixture contained 5 pm direct and reverse primers, 5 pm TaqMan probe, 5 µl of RNA, 20 µl of the reaction mixture for real time PCR (Sintol, Moscow), containing 2.5 µl of PCR buffer (10-fold concentration); 2.5 µl of 25 mM $MgCl_2$; 2.5 µl of 2.5 mM dNTP; 1 unit. Taq-DNA-polimerase; 10 units MMLV-reverse transcriptase and 12 µl of water. The components were mixed in 96-well optical plates (Axygen). PCR was

performed using amplifier C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad) at the following temperature conditions: 15 minutes – reverse transcription, 15 minutes – preliminary denaturation at 95° C and 40 cycles of reaction (denaturation at 95 C°– 15 s, annealing at 55 °C – 15 s, elongation at 60 °C – 20 s). CFX96 Real-Time PCR Detection System was used for recording fluorescence signals. The obtained data were analyzed using Bio-Rad CFX Manager software and Microsoft Excel. To establish C_t threshold cycle two basic parameters were used: basic line determined for each individual curve; threshold line, calculated for this phluorophore. The threshold cycle value is inversely proportional to log of a matrix in the reaction mixture – the less C_t value the higher the matrix concentration [3].

Statistical data processing. Precision in repeatability and reproducibility was determined as the level of consistency of results of multiple analyses of one sample [1, 2]. Coefficient of variation (C) was calculated basing on the following formula [1]:

$$C = \frac{\sigma}{\overline{X}} \times 100\%,$$

where $\overline{X}$ – mean value of the threshold cycle determined by real-time PCR;

σ – mean square deviation, calculated using the following formula:

$$\sigma = \frac{X_{max} - X_{min}}{K}.$$

RESULTS

The research aimed at assessment of real-time qRT-PCR use for FMDV detection in cattle milk was performed according to the Research Plan. To implement this task FMDV infected cattle milk samples were prepared. The samples were prepared using 10-fold serial dilutions. Each sample contained 10% virus suspension so that the virus final concentration in the sample was 10^{-1}–10^{-10} lg TCD_{50}/ml. Basing on the epidemic situation three relevant FMD strains were selected: A No. 2177/Amursky/2013, O No. 2123/South Ossetia/2011, Asia-1 No. 1987/Amursky/2005 – and 10 virus dilutions in milk were prepared.

To determine the method specificity milk samples containing 10% virus suspension of seven virus serotypes and heterologous vesicular viruses were used. All analyses were performed in triplicates.

During the investigation such parameters as analytical sensitivity of the reaction, precision and analytical specificity were determined.

Determination of the reaction analytical sensitivity. Analytical sensitivity of real-time qRT-PCR was determined using 10-fold serial dilutions of three FMDV cultural FMDV virus preparations in milk samples (A No. 2177/Amursky/2013, O No. 2123/South Ossetia/2011, Asia-1 No. 1987/Amursky/2005 strains) with known original concentration. The virus concentration in the milk samples was determined basing on the threshold cycle values (C_t). Real-time qRT-PCR detected FMDV strains A No. 2177/Amursky/2013 and Asia-1 No. 1987/Amursky/2005 at the concentration of up to 0.1 lg TCD_{50}/ml (i. e. 1 TCD_{50}/ml), and O No. 2123/South Ossetia/2011 – at the concentration of up to 1 lg TCD_{50}/ml (i. e. 10 TCD_{50}/ml) (Table 1).

So, the performed experiments showed that when detecting FMDV in milk analytical sensitivity of real-time qRT-PCR is 1–10 TCD_{50}/ml. Difference in analytical sensitivity of the reaction for different strains is probably explained by the chosen 10-fold sample dilution and possible inaccuracy of the virus titer determination in the cell culture.

Table 1
Determination of FMDV concentration in milk samples using real-time qRT-PCR

FMDV concentration in samples, lg TCD_{50}/ml	Threshold cycle mean value (C_t), in triplicates		
	A No. 2177/ Amursky/2013	O No. 2123/South Ossetia/2011	Asia-1 No. 1987/ Amursky/2005
6.0	16.09	16.76	18.36
5.0	17.74	20.30	21.00
4.0	21.58	23.81	24.09
3.0	23.73	27.67	27.66
2.0	26.69	30.80	29.84
1.0	29.40	**36.83**	32.48
0.1	**32.38**	n/d	**34.71**
0.01	n/d	n/d	n/d
0.001	n/d	n/d	n/d
0.0001	n/d	n/d	n/d

n/d – C_t not determined, which means that real-time qRT-PCR result is negative.

The obtained results confirm that real-time qRT-PCR can detect FMDV in milk and the sensitivity is the same as in epithelium tissues and cell cultures [3].

Assessment of the reaction precision. Precision of the reaction was determined under repeatability and reproducibility conditions. Precision under repeatability conditions was assessed by measuring the variability of the results within one run. For that purpose the same milk sample containing 6 lg TCD_{50}/ml of FMDV A No. 2177/Amursky/2013, was tested simultaneously in 20 replicates by one operator using the same machine.

The coefficient of variation was 1.23% when real-time qRT-PCR as performed by one operator in 20 replicates, 5.6% – when performing reaction by one operator using two machines at a different time, and 6.72% when performing the reaction by two operators using two machines (Table 2).

The obtained results are indicative of high real-time qRT-PCR precision.

Determination of the analytical specificity of the reaction. Analytical specificity of real-time qRT-PCR was determined using RNA from cattle milk samples containing seven serotypes of FMDV. Other viruses (SVD, VES, VS), diluted in milk and unskimmed milk from normal cows were also used. A positive result was obtained when testing milk samples containing seven FMDV serotypes (figure). Samples containing RNA of other viruses as well as milk from normal animals demonstrated negative results which is indicative of the method specificity.

DISCUSSION

The previously performed tests showed that real-time qRT-PCR is a contemporary method for FMDV genome detection in epithelium of infected animals and cell cultures [3]. Results obtained during this research showed that real-time qRT-PCR can be successfully applied for FMDV detection in milk of infected cows.

Table 2
Threshold cycle values and real-time qRT-PCR coefficients of variation for the milk sample containing FMDV A No. 2177/Amursky/2013

Within one run		Different machine		Different operator	
No Run	C_t	No repeat	C_t	No repeat	C_t
1	16.12	1	16.24	1	16.32
2	16.30	2	17.02	2	16.74
3	16.14	3	16.66	3	**16.08***
4	16.17	4	16.06	4	16.16
5	16.21	5	16.14	5	16.81
6	16.27	6	17.01	6	16.27
7	16.31	7	16.83	7	16.98
8	16.30	8	16.41	8	16.22
9	16.28	9	16.29	9	17.11
10	16.27	10	17.04	10	16.17
11	16.23	11	16.21	11	17.01
12	16.23	12	16.47	12	16.37
13	16.18	13	16.32	13	16.49
14	16.17	14	16.94	14	16.47
15	16.19	15	16.83	15	16.29
16	16.21	16	16.81	16	16.64
17	16.27	17	16.19	17	16.36
18	16.12	18	16.71	18	16.18
19	16.32	19	16.29	19	16.41
20	16.26	20	16.28	20	**17.19****
C = 1.23					
C = 5.6					
		C = 6.72			

* minimum C_t; ** maximum C_t.

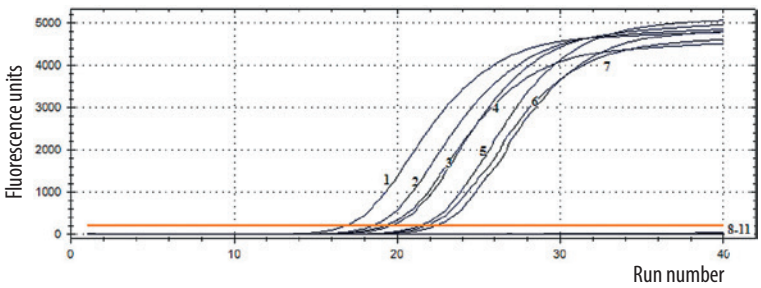

Figure. Analytical specificity of real-time qRT-PCR for detection of FMDV RNA in milk

1–7 – milk samples containing seven FMDV serotypes;
8–11 –milk from normal cows and milk samples containing SVDV, VESV, VSV.

As a result of the performed research several validation characteristics of real-time qRT-PCR were determined: precision under repeatability and reproducibility conditions, analytical specificity and sensitivity. Also the results of the research demonstrate the possibility to apply the method for FMDV detection in milk of a dairy herd.

The performed tests showed that real-time qRT-PCR has high precision, specificity and sensitivity. Coefficient of variation was 6.72%.

Sensitivity of the method was 1–10 TCD_{50}/ml depending on the FMDV strain. Real-time qRT-PCR allows detection of 1:1,000,000 FMDV dilution in milk. According to S. M. Reid et al. [9] such sensitivity allows detecting an infected animal in the herd, so, the method can be used for testing composite milk samples. It is also possible to detect the infection even after the milk from different has been pooled into one tanker.

FMDV is characterized by a high level of genetic diversity. The performed tests show, that all seven FMDV serotypes are successfully detected in milk as well as in epithelium of sick animals [3], which confirms the capability of the method to detect a wide spectrum of the FMD virus.

CONCLUSIONS

The possibility of real-time qRT-PCR use as a contemporary method for FMDV detection in milk was demonstrated.

Major validation characteristics of the method for detection of RNA of all FMDV serotypes were determined.

Results of the experimental tests prove that the method has high precision, specificity and sensitivity and can detect FMDV in its genetic diversity even if it is diluted.

Conflict of interests. The authors claim no conflict of interests.

REFERENCES

1. Polyakov I. V., Sokolova N. S. Practical guide for medical statistics [Prakticheskoe posobie po medicinskoj statistike]. L.: Medicine, 1975 (in Russian).

2. Practical course on GMP. Validation of analytical methods: theory [Praktikum po GMP. Validaciya analiticheskih metodik: teoriya]. P. Nosyrev, M. Nosyreva, T. Rasskazova, N. Korneyeva. URL: http://www.nedug.ru/news/фармацевтика/2004/2/12/Практикум-по-GMP--Валидация-аналитических-методик--теория (access date: 02.12.18) (in Russian).

3. Timina A. M., Scherbakov A. V. Determination of major characteristics of the Real Time qRT PCR for detection of all FMDV serotypes [Opredelenie osnovnyh harakteristik OT-PCR v real'nom vremeni, prednaznachennoj dlya obnaruzheniya virusa yashchura vsekh serotipov]. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2016; 14: 7–19 (in Russian).

4. Application of RT-PCR and nucleotide sequencing in foot-and-mouth disease diagnosis. A. Sherbakov, N. Lomakina, V. Drygin, A. Gusev. *Vet. Quart*. 1998; 20 (Suppl. 2): 32–34; DOI: 10.1080/01652176.1998.9694962.

5. Drew T. W., Yapp F., Paton D. J. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Vet. Microbiol*. 1999; 64 (2–3): 145–154; DOI: 10.1016/S0378-1135(98)00266-1.

6. Enhanced laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease by real-time polymerase chain reaction. A. E. Shaw, S. M. Reid, D. P. King [et al.]. *Rev. Sci. Tech. OIE*. 2004; 23 (3): 1003–1009. URL: http://wahis2-devt.oie.int/doc/ged/D1339.PDF.

7. Tomasula P. M., Konstance R. P. The survival of foot-and-mouth disease virus in raw and pasteurized milk and milk products. *J. Dairy Sci*. 2004; 87 (4): 1115–1121; DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73258-0.

8. Use of an internal standard in a TaqMan® nested reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of bovine viral diarrhoea virus. G. S. Heath, D. P. King, J. L. E. Turner [et al.]. *Vet. Microbiol*. 2003; 96 (4): 357–366; DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.09.006.

9. Utility of automated real-time RT-PCR for the detection of foot-and-mouth disease virus excreted in milk. S. M. Reid, S. Parida, D. P. King [et al.]. *Vet. Res*. 2006; 37 (1): 121–132; DOI: 10.1051/vetres:2005040.

Submitted on 13.12.18
Approved for publication on 01.02.19