

УДК 619:616.98:578:835.22:616

DOI: 10.31073/vet_biotech38-05

ДРОЖЖЕ Ж.М., канд. вет. наук, ст. досл., e-mail: dr.zhanna173@gmail.com,

ДЗЮБА Я.М.*, e-mail: dzuba@ukr.net,

КИЇВСЬКА Г.В., канд. вет. наук, e-mail: vcheny.secretar@gmail.com

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

СУЧАСНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ЯЩУРУ (ОГЛЯДОВА СТАТТЯ)

Огляд присвячено використанню сучасних методів діагностики ящуру, що рекомендовані як міжнародні стандартні лабораторні методики. В статті представлена схема діагностичних кроків та лабораторних тестів для встановлення діагнозу на ящур, чутливість діагностичних методів та критерії їхнього застосування.

Шляхом аналізу літературних джерел, що присвячені розробці, удосконаленню та застосуванню молекулярно-генетичних методів (ПЛР) та імуноферментного аналізу (ІФА) показано механізми підвищення діагностичного значення цих методів порівнянно з іншими методами детекції вірусу ящуру. Окрему увагу приділено методам виявлення захворювання в польових умовах: ізотермічній ампліфікації нуклеїнових кислот (RT-LAMP) та імунохроматографічними тест-смужками (LFD), а також практичному застосуванню цих методів поза межами лабораторії.

Ключові слова: *ящур, молекулярно-генетичні методи, ПЛР, імуноферментний аналіз (ІФА), ізотермічна ампліфікація (RT-LAMP).*

Вступ. Ящур (Foot and mouth disease) – висококонтагіозний зооноз, що викликається представником вірусів сімейства *Picornaviridae*. Розрізняють сім серотипів вірусу ящуру, а саме: О, А, С, SAT 1, SAT 2, SAT 3 та Asia 1. Інфікування одним серотипом не утворює імунітету проти іншого [1].

Вірус ящуру вражає свійських і диких парнокопитних тварин, головним чином велику рогату худобу, кіз і свиней. Перебіг захворювання гострий та характеризується короткочасною лихоманкою, розвитком афтозно-ерозійних уражень на слизовій оболонці ротової порожнини, безшерстих ділянках шкіри вінчика, міжратицевої щілини й вимені. Найбільш схильні до захворювання молоді тварини, у яких ящур протікає важко, з масовою загибеллю, у дорослих – зниження молочної продуктивності.

Ящур є найбільш заразною хворобою ссавців серед сприйнятливих парнокопитних тварин і має великий потенціал для спричинення серйозних

* Аспірант, науковий керівник – д-р вет. наук С.А. Ничик

економічних втрат, що обумовлені проведенням суворих карантинних та ветеринарно-санітарних заходів, тривалим обмеженням економічних зв'язків з країнами-партнерами та сусідніми країнами.

Захворювання реєструється в багатьох країнах Європи, Азії, Африки та Південної Америки. Україна близько 30 років є благополучною щодо ящуру.

Ящур неможливо клінічно диференціювати від інших везикулярних захворювань, таких як везикулярна хвороба свиней, везикулярний стоматит та везикулярна екзантема, тому лабораторна діагностика має вирішальне значення для ефективного контролю захворювання.

Мета роботи. Огляд сучасних методів лабораторної діагностики ящуру та схем їхнього ефективного застосування.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження було проведено шляхом аналізу міжнародних рекомендацій щодо стандартних тестів щодо діагностики ящуру та іноземних літературних джерел, присвячених розробці, удосконаленню та застосуванню сучасних методів діагностики ящуру.

Результати досліджень та їх обговорення. Діагноз на ящур, як правило, залежить від лабораторних досліджень, які включають виділення вірусу в культурі клітин у поєднанні з ідентифікацією вірусного антигену методом ІФА або виявленням вірусної нуклеїнової кислоти методом ПЛР. Виявлення підвищених специфічних до ящуру антитіл за допомогою ІФА або реакції віруснейтралізації (ВНТ) також може вказати на вірусну інфекцію. Клінічні обстеження та збір анамнезу підозрюваних тварин проводяться для епідеміологічних досліджень та вивчення поширеності захворювання.

Впродовж останніх десяти років кардинально змінилися методи лабораторної діагностики ящуру. На відміну від класичних методів (реакції зв'язування комплементу (РЗК), виділення вірусу в культурі клітин, сучасні методи діагностики ящуру, що ґрунтуються на молекулярно-генетичних реакціях (ПЛР) та імуноферментному аналізі (ІФА) вийшли на передній план як найбільш чутливі методи та ті, що дають можливість встановлення діагнозу в найкоротші терміни.

Схематичне представлення діагностичних заходів та лабораторних тестів для встановлення діагнозу на ящур включає: виявлення та ідентифікацію вірусного збудника у патологічних матеріалах від тварин та/або наявність специфічних антитіл у сироватках крові проти структурних білків (SP, наявність як у вакцинованих, так і у заражених тварин) та специфічних антитіл проти неструктурних білків (NSP; наявність лише у заражених тварин) (рис.1).

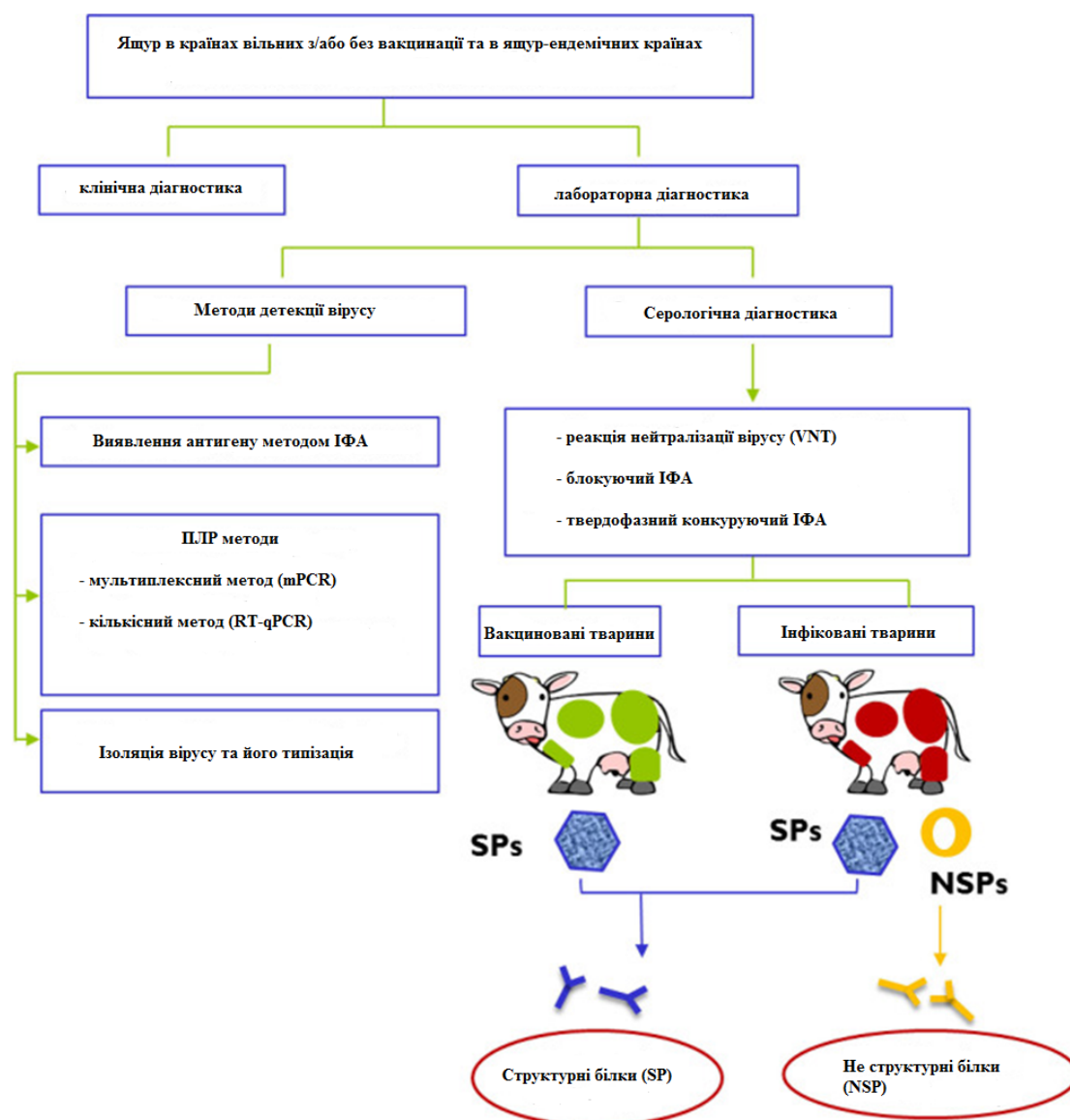


Рис. 1. Схема діагностичних тестів для встановлення діагнозу на ящур [1].

Чутливість діагностичних методів щодо ящуру та критерії їхнього застосування визначені та зазначені в Посібнику з діагностичних тестів та вакцин для наземних тварин (табл. 1) [2].

Вперше про виявлення ящуру за допомогою ланцюгової реакції зворотної полімеразної транскрипції (РТ-ПЛР) повідомляли Meuer та співавтор. [3]. Ними була ампліфікована та проаналізована за допомогою електрофорезу в агарозному гелі та додатково підтверджена рестрикційним аналізом консервативна ділянка геному вірусу ящура, що кодує РНК-полімеразу [3].

Чутливість та критерії застосування діагностичних методів ящуру [2].

Методи	Підтвердження статусу вільного від інфекції	Моніторинг від зараження до поширення	Застосування в період політики використання	Підтвердження клінічних випадків	Нагляд при поширенні інфекції	Підтвердження імунного статусу після вакцинацій
Ідентифікація агента						
Ізоляція вірусу (ВНТ)	–	+	+++	+++	–	–
Виявлення антигену методом ІФА	–	–	+++	+++	–	–
РЗК	–	–	+	+	–	–
LFD	–	–	+++	+++	–	–
РТ-ПЛР в режимі реального часу	+	+	+++	+++	+	–
РТ-ПЛР	+	+	+++	+++	+	–
Визначення імунної відповіді						
NSP ab ELISA (ІФА)	+++	++	+++	+++	+++	–
SP ab ELISA (ІФА)	++	++	+++	+++	++	+++
Вірус нейтралізація (ВНТ)	++	++	+++	+++	++	+++
РДП	+	+	+	+	+	–

Примітки: +++ рекомендований метод; ++ відповідний метод, але потребує подальшої перевірки; + може використовуватися в деяких ситуаціях, але вартість, надійність чи інші фактори суттєво обмежують його застосування; – не підходить для цієї мети.

В своїх дослідженнях Laog та співавт. показали, що праймери, підібрані до ділянки кодування РНК-полімерази, можуть виявляти збудник ящуру різних ізолятів, тоді як інший набір праймерів, націлений на змінну ділянку VP1, здатний виявляти варіабельні фрагменти геному [4]. Нуклеотидне секвенування ампліфікованої ділянки має велике значення для вивчення епідеміології ящуру.

Dill та співавт. розробили універсальну РТ-ПЛР, яка є швидкою та економічно ефективною для генерування послідовностей геномів усіх серотипів ящуру, дозволяючи генотипувати віруси, проводити філогенетичний аналіз та визначати епідеміологічне походження ящуру [5].

На сьогоднішній день для виявлення ящуру використовується багато вдосконалених версій РТ-ПЛР. Для одночасного скринінгу наявних численних вірусів розроблено мультиплексну РТ-ПЛР, яка використовує кілька наборів праймерів в одній реакції.

Lung та співавт. продемонстрували використання мультиплексного РТ-ПЛР для одночасного виявлення та диференціації серотипів ящуру та інших вірусів везикулярних хвороб, включаючи вірус везикулярного стоматиту (VSV), вірус везикулярної хвороби свиней (SVDV) та вірус везикулярної екзантеми свиней (VESV) [6].

Подібним чином Erickson та співавт. також використовували мультиплекс РТ-ПЛР у поєднанні з більш досконалим, автоматизованим електронним аналізом мікрочипів для одночасного виявлення та диференціації кількох вірусів свиней, включаючи ящур та інші віруси, такі як SVDV, вірус африканської чуми свиней, цирковірус свиней 2, вірус респіраторно-репродуктивного синдрому свиней, VESV та вірус класичної чуми свиней [7].

Кількісні аналізи на основі ПЛР в режимі реального часу в поєднанні з флуоресцентно-випромінюючими сполуками використовують для вимірювання кількості ампліконів під час процесу ампліфікації в режимі реального часу [8].

Red та співавт. розробили мультиплексний аналіз РТ-ПЛР з використанням наборів праймерів/зондів, націлених на область кодування FMDV VP1 для виявлення та диференціації серотипів O, A та Asia 1, що циркулюють на Близькому Сході [9].

Останнім часом все більше уваги зосереджено на молекулярно-генетичних методах, які визначають вірусні нуклеїнові кислоти на основі РТ-ПЛР та ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот (RT-LAMP) в «польових умовах». На відміну від ПЛР, яка вимагає циклів різних температур для ампліфікації ДНК, LAMP – це метод, здатний ампліфікувати ДНК при одній температурі. Вперше його винайшли Notomi T. та співавт., метод продемонстрував високу чутливість та специфічність [10].

Поки ПЛР генерує велику кількість копій однакових продуктів, LAMP генерує суміш ДНК-стовбурової петлі, яку можна спостерігати шляхом візуального виявлення помутніння внаслідок утворення нерозчинного пірофосфату магнію в пробірці [11].

RT-LAMP вперше був застосований для діагностики ящуру Duker та співавт.: націлений на ген РНК-полімерази FMDV 3D, де продукти ампліфікації можна візуально перевірити на помутніння, проаналізувати за допомогою електрофорезу в агарозному гелі або відстежити в режимі реального часу за допомогою додавання флуоресцентних барвників [12]. На сьогоднішній день RT-LAMP у режимі реального часу (qRT-LAMP) доступний для виявлення та диференціації серотипів ящуру O, A та Asia 1 [13].

Окрім РТ-ПЦР та RT-LAMP, іншим діагностичним тестом, спеціально розробленим для діагностики в польових умовах, є імунохроматографічні тест-смужки (LFD) (рис. 2).



Рис. 2. Постановка LFD-тесту для виявлення антигену вірусу ящура.

Ці тести мають певні переваги серед інших методів діагностики: для аналізу не потрібне обладнання, що значно знижує вартість одного тесту; LFD-тест може бути легко проведений непідготовленим персоналом у будь-яких умовах; результати можуть бути отримані за кілька хвилин. Відомо, що комерційно доступні імунохроматографічні тест-смужки, такі як Svanodip FMDV-Ag LFD виробництва Boehringer Ingelheim Svanova (Швеція), демонстрували результати тестів, подібні до лабораторних Ag-ІФА результатів, коли їх застосовували в польових умовах під час спалахів ящура у Великобританії 2007 р. [14]. Використання LFD тестів залишається вигідним в ендемічних по ящуру країнах.

Діагноз на ящур також може бути підтверджений серологічними методами шляхом виявлення вірусних антигенів або антитіл у сироватках крові або інших рідинах організму. Виявлення антитіл може свідчити про наявність

поточної або минулої інфекції, імунної відповіді після вакцинації. На даний час ІФА є одним із найпоширеніших підходів до виявлення ящуру на додаток до методів ізоляції вірусу (ВНТ та ПЛР) [15]. На відміну від РЗК, на специфічне виявлення ящуру за допомогою сендвіч-ІФА не впливає наявність 12S антигену [16] та прокомплементарних або антикомплементарних факторів у зразках [15]. Більше того, сендвіч-ІФА дозволяє дослідити зразки без ізоляції вірусу, і це, як правило, економічно вигідніше, ніж РЗК, через меншу кількість сироватки, необхідної для реакції. Крім того, на ІФА не впливають зміни чутливості культури тканин [15].

Порівняльні дослідження за допомогою багаторазового тестування сироватки також показали, що ІФА має більший рівень відтворюваності, ніж ВНТ, і результати можуть бути отримані впродовж дня порівнянно з ВНТ, що зазвичай триває більше 3 діб [17].

Для поліпшення ефективності ІФА в діагностиці ящуру було зроблено багато модифікацій, в першу чергу, зосереджених на розробці нових антигенів покриття для твердофазного ІФА та нових моноклональних антитіл (mAbs). Більшість аналізів, заснованих на ІФА, включають інактивовані антигени ящуру. Методи, засновані на ІФА, використовуються для виявлення антитіл як проти структурних білків (SP), так і проти неструктурних білків (NSP), за використання ІФА можна диференціювати інфікованих тварин від вакцинованих.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Застосування діагностичних методів для швидкого виявлення та підтвердження клінічних симптомів ящуру є обов'язковою умовою будь-якої стратегії боротьби з епідемічними захворюваннями.

Оскільки інфекція ящуру клінічно не відрізняється від інфекцій, спричинених іншими подібними вірусами везикулярних захворювань, рання діагностика має вирішальне значення для ефективного контролю захворювання.

Впродовж багатьох років були розроблені різні діагностичні методи, починаючи від звичайних, таких як ізоляція вірусу та ELISA з конкурентним та блокуючим антигеном, до молекулярних методів, таких як РТ-ПЛР та РТ-LAMP. Хоча методи, засновані на ІФА, мають хорошу діагностичну чутливість і специфічність, методи молекулярної детекції мають перевагу у вищій аналітичній чутливості для виявлення мінімальної вірусної РНК.

Незважаючи на ці точні та надійні лабораторні тести, дослідники розробляють альтернативні методи, які дозволяють проводити тестування в польових умовах, намагаючись подолати деякі практичні виклики, такі як рутинні процедури та наявність оснащених лабораторій з навченим персоналом. Тим не менш, практичне застосування цих методів поза

лабораторіями залишаються обмеженими, а для розробки більш гнучких та доступних діагностичних інструментів, які можна широко використовувати для виявлення ящуру, необхідно вирішувати різні технічні та витратні питання.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Advances in the Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease / C.L. Wong, C.Y. Yong, H.K. Ong [et al.] // *Front. Vet. Sci.* – 2020. – №. 7. – Mode of access: <http://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2020.00477/full>. – Title from the screen.
2. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Electronic resource] // OIE. – 2018. – Mode of access: http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/Foot-and-mouth-disease/3.1.8_FMD.pdf. – Title from the screen.
3. Rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus in tissues by enzymatic RNA amplification of the polymerase gene / R.F. Meyer, C.C. Brown, C. House [et al.] // *J Virol Methods.* – 1991. – №. 34. – P. 161–172. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(91\)90096-i](https://doi.org/10.1016/0166-0934(91)90096-i).
4. Detection of FMDV RNA amplified by the polymerase chain reaction (PCR) / O. Laor, H. Torgersen, H. Yadin [et al.] // *J Virol Methods.* – 1992. – №. 36. – P. 197–207. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(92\)90051-e](https://doi.org/10.1016/0166-0934(92)90051-e).
5. Dill V. Simple, quick and cost-efficient: a universal RT-PCR and sequencing strategy for genomic characterisation of foot-and-mouth disease viruses / V. Dill, M. Beer, B. Hoffmann // *J Virol Methods.* – 2017. – №. 246. – P. 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.04.007>.
6. Multiplex RT-PCR detection and microarray typing of vesicular disease viruses / O. Lung, M. Fisher, A. Beeston [et al.] // *J Virol Methods.* – 2011. – №. 175. – P. 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.05.023>.
7. A multiplex reverse transcription PCR and automated electronic microarray assay for detection and differentiation of seven viruses affecting swine / A. Erickson, M. Fisher, T. Furukawa-Stoffer [et al.] // *Transbound Emerg Dis.* – 2018. – №. 65. – P. 272–283. <https://doi.org/10.1111/tbed.12749>.
8. Smith C.J. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology / C.J. Smith, A.M. Osborn // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2009. – №. 67. – P. 6–20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>.
9. Development of tailored real-time RT-PCR assays for the detection and differentiation of serotype O, A and Asia-1 foot-and-mouth disease virus lineages circulating in the Middle East / S.M. Reid, V. Mioulet, N.J. Knowles [et al.] // *J Virol Methods.* – 2014. – №. 207. – P. 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.07.002>.
10. Loop-mediated isothermal amplification of DNA / T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – №. 28. – P. 63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
11. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation / Y. Mori, K. Nagamine, N. Tomita, T. Notomi // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2001. – №. 289. – P. 150–154. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921>.
12. Dukes J.P. Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus / J.P. Dukes, D.P. King, S. Alexandersen // *Arch Virol.* – 2006. – №. 151. – P. 1093–1106. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0708-5>.
13. One-step real-time loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP): evaluation and its application for the detection of foot-and-mouth-disease virus and its serotypes / S. Maryam, T. Rashid, A. Latif [et al.] // *Turk J Vet. Anim. Sci.* – 2017. – №. 41. – P. 435–443. <https://doi.org/10.3906/vet-1611-10>.

14. Development and laboratory validation of a lateral flow device for the detection of foot-and-mouth disease virus in clinical samples / N.P. Ferris, A. Nordengrahn, G.H. Hutchings [et al.] // J Virol Methods. – 2009. – №. 155. – P. 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.09.009>.

15. Ferris N.P. Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular diseases / N.P. Ferris, & M. Dawson // Vet Microbiol. – 1988. – №. 16. – P. 201–209. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90024-7](https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90024-7).

16. Elzein E.M. The specific detection of foot-and-mouth disease virus whole particle antigen (140S) by enzyme labelled immunosorbent assay / E.M. Elzein, & J.R. Crowther // J Hyg. – 1979. – №. 83. – P. 127–134. <https://doi.org/10.1017/s0022172400025894>.

17. Hamblin C.A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA / C. Hamblin, I.T. Barnett, R.S. Hedger // J Immunol Methods. – 1986. – №. 93. – P. 115–121. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90442-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90442-4).

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ЯЩУРА (обзорная статья) /
Дрожже Ж.Н., Дзюба Я.Н., Киевская А.В.

Обзор посвящен использованию современных методов диагностики ящура, рекомендованных как международные стандартные лабораторные методики. В статье представлена схема диагностических шагов и лабораторных тестов для установления диагноза на ящур, чувствительность диагностических методов и критерии их применения.

Путем анализа литературных источников, посвященных разработке, совершенствованию и применению молекулярно-генетических методов (ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА) показано механизмы повышения диагностического значения этих методов по сравнению с другими методами детекции вируса ящура. Особое внимание уделено методам выявления заболевания в полевых условиях: изотермическая амплификация нуклеиновых кислот (RT-LAMP) и иммунохроматографические тесты (LFD), практическому применению этих методов вне лаборатории.

Ключевые слова: ящур, молекулярно-генетические методы, ПЦР, иммуноферментный анализ (ИФА), изотермическая амплификация (RT-LAMP).

MODERN METHODS OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE DIAGNOSIS (review) /
Drozhzhe Zh.M., Dziuba Ia.M., Kyivska G.V.

Introduction. *Foot-and-mouth disease (FMD) is a contagious vesicular disease caused by foot-and-mouth disease virus (FMDV), a member of the Picornaviridae family. The virus infects a wide range of wild and domesticated cloven-footed mammals. An accidental introduction of FMDV in a susceptible population can result in an abrupt outbreak of the disease, leading to a massive economic loss. Immediate actions are usually taken in response to an FMD outbreak to secure a differential and definitive diagnosis and to prevent further spread of the disease.*

The goal of the work was the review of modern methods of laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease and schemes of their effective application.

Materials and methods. *The study was conducted by analyzing international recommendations for standard tests for the FMD diagnosis and foreign literature on the*

development, improvement and application of modern methods for the diagnosis of FMD (PCR, ELISA).

Results of research and discussion. Generally, a suspected case of FMD can be identified based on observations of clinical signs. However, diagnoses based on clinical symptoms are highly unreliable, because several other diseases share similar symptoms as FMD, which include swine vesicular disease (SVD), vesicular stomatitis and vesicular exanthema. Swine are vulnerable to vesicular stomatitis, SVD, and FMD, whereas cattle are vulnerable to vesicular stomatitis and FMD, all of which could not be distinguished based on clinical symptoms. Conventional techniques such as complement fixation test (CFT), virus isolation test, virus neutralization test (VNT), and ELISA are routinely used to detect FMDV in clinical samples. Advancement in molecular techniques accelerates rapid and accurate diagnoses of FMDV through detection of the viral RNA. In this article, the most recent advancements in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and RT-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)-based methods are thoroughly reviewed. Lastly, the roles of lateral flow immunochromatographic (LFI) test strips in FMDV diagnosis are also discussed.

Conclusions and prospects for further research. Various diagnostic methods ranging from conventional such as virus isolation and competitive- and blocking-antigen ELISA to molecular-based methods such as RT-PCR and RT-LAMP have been developed over the years. Although ELISA-based methods have good diagnostic sensitivity and specificity, molecular detection methods have the advantage of higher analytical sensitivity for the detection of minimal viral RNA.

Keywords: foot and mouth disease, molecular techniques, PCR, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), isothermal amplification (RT-LAMP).

REFERENCES

1. Wong, C.L., Yong, C.Y., Ong, H.K., Ho, K.L., & Tan, W.S. (2020). Advances in the Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease. *Frontiers in veterinary science*, 7, 477. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00477>.
2. OIE Foot & Mouth Disease (FMD) [Online] (2018). Retrieved from <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/Foot-and-mouth-disease/>.
3. Meyer, R.F., Brown, C.C., House, C., House, J.A., & Molitor, T.W. (1991). Rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus in tissues by enzymatic RNA amplification of the polymerase gene. *Journal of virological methods*, 34(2), 161-172. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(91\)90096-i](https://doi.org/10.1016/0166-0934(91)90096-i).
4. Laor, O., Torgersen, H., Yadin, H., & Becker, Y. (1992). Detection of FMDV RNA amplified by the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of virological methods*, 36(3), 197-207. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(92\)90051-e](https://doi.org/10.1016/0166-0934(92)90051-e).
5. Dill, V., Beer, M., & Hoffmann, B. (2017). Simple, quick and cost-efficient: A universal RT-PCR and sequencing strategy for genomic characterisation of foot-and-mouth disease viruses. *Journal of virological methods*, 246, 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.04.007>.
6. Lung, O., Fisher, M., Beeston, A., Hughes, K.B., Clavijo, A., Goolia, M., Pasick, J., Mauro, W., & Deregt, D. (2011). Multiplex RT-PCR detection and microarray typing of vesicular disease viruses. *Journal of virological methods*, 175(2), 236-245. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.05.023>.
7. Erickson, A., Fisher, M., Furukawa-Stoffer, T., Ambagala, A., Hodko, D., Pasick, J., King, D.P., Nfon, C., Ortega Polo, R., & Lung, O. (2018). A multiplex reverse transcription PCR and automated electronic microarray assay for detection and differentiation of seven viruses

affecting swine. *Transboundary and emerging diseases*, 65(2), 272-283. <https://doi.org/10.1111/tbed.12749>.

8. Smith, C.J., & Osborn, A.M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology*, 67(1), 6-20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>.

9. Reid, S.M., Mioulet, V., Knowles, N.J., Shirazi, N., Belsham, G.J., & King, D.P. (2014). Development of tailored real-time RT-PCR assays for the detection and differentiation of serotype O, A and Asia-1 foot-and-mouth disease virus lineages circulating in the Middle East. *Journal of virological methods*, 207, 146-153. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.07.002>.

10. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.

11. Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., & Notomi, T. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and biophysical research communications*, 289(1), 150-154. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921>.

12. Dukes, J.P., King, D.P., & Alexandersen, S. (2006). Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *Archives of virology*, 151(6), 1093-1106. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0708-5>.

13. Maryam, S., Rashid, T., Latif, A., Zahra, R., Bin Zahur, A., Ahsan, A., et al. (2017). One-step real-time loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP): evaluation and its application for the detection of foot-and-mouth-disease virus and its serotypes. *Turk J Vet. Anim. Sci.* 41, 435-443. <https://doi.org/10.3906/vet-1611-10>.

14. Ferris, N.P., Nordengrahn, A., Hutchings, G.H., Reid, S.M., King, D.P., Ebert, K., Paton, D.J., Kristersson, T., Brocchi, E., Grazioli, S., & Merza, M. (2009). Development and laboratory validation of a lateral flow device for the detection of foot-and-mouth disease virus in clinical samples. *Journal of virological methods*, 155(1), 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.09.009>.

15. Ferris, N.P., & Dawson, M. (1988). Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular diseases. *Veterinary microbiology*, 16(3), 201-209. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90024-7](https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90024-7).

16. Elzein, E.M., & Crowther, J.R. (1979). The specific detection of foot-and-mouth disease virus whole particle antigen (140S) by enzyme labelled immunosorbent assay. *The Journal of hygiene*, 83(1), 127-134. <https://doi.org/10.1017/s0022172400025894>.

17. Hamblin, C., Barnett, I.T., & Crowther, J.R. (1986). A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. II. Application. *Journal of immunological methods*, 93(1), 123-129. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90442-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90442-4).