

Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.15421/nvlvet8343
<http://nvlvet.com.ua/>

UDC 619:616.98:578.842:636.4

Approbation of RT-qPCR test kit for differential diagnosis of African and Classical swine fever

S.S. Mandyhra, L.M. Muzykina, L.M. Ishchenko, G.A. Kovalenko, I.V. Halka, V.G. Spirydonov,
S.A. Nychyk

Institute of Veterinary Medicine of NAAS, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 29.01.2018
Received in revised form
05.03.2018
Accepted 09.03.2018

*Institute of Veterinary Medicine of
the National Academy of Agrarian
Sciences of Ukraine (IVM NAAS),
Donetska str, 30, Kyiv,
03151, Ukraine.
Tel.: +38-098-293-99-66
E-mail: mandygra@ukr.net*

Mandyhra, S.S., Muzykina, L.M., Ishchenko, L.M., Kovalenko, G.A., Halka, I.V., Spirydonov, V.G., & Nychyk, S.A. (2018). Approbation of RT-qPCR test kit for differential diagnosis of African and Classical swine fever. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. 20(83), 221–225. doi: 10.15421/nvlvet8343

The first Ukrainian real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR) based test kit for the differential diagnosis of African (ASF) and Classical swine fever (CSF) has been developed in the Institute of Veterinary Medicine of NAAS. The proposed test kit allows simultaneous detection of three targets: ASFV DNA, CSFV cDNA and an internal control sample. The goal of this work was to provide an expert evaluation of the RT-qPCR kit for differential diagnosis of ASF and CSF according to appearance, analytical sensitivity, specificity and repeatability. Interdepartmental evaluation of the kit was conducted in the State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise (DNDILDEVSE) in accordance with the approved methodology. The RT-qPCR kit sensitivity was determined by testing 10-fold serial dilutions of the ASFV DNA and CSFV cDNA (concentration range was 10^3 – 10^6 copies/ μ l). For specificity determination reference samples of ASFV DNA different genotypes, ASF and CSF positive and negative field samples, as well as pathogens which cause similar to ASF and CSF clinical syndromes were used. Sample preparation and amplification were performed according to the test kit instructions. The amplification was accomplished on QuantStudio™ 5 System (Applied Biosystems). As a result of accomplished interdepartmental evaluation high sensitivity, specificity and repeatability of RT-qPCR kit were confirmed. In particular, it was determined that the limit of detection of the RT-qPCR kit was 5 copies of the ASFV and CSFV genomes per one reaction. The high specificity of the assay to ASFV (I, II, V, VIII, IX and X genotypes) and CSFV was confirmed. It was shown no cross-reactions with closely related pigs viruses (porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and virus of Aujeszky's disease). The high enough repeatability of results was also confirmed. In conclusion, the obtained results are in compliance with the requirements of the RT-qPCR kit normative and technical documentation. This RT-qPCR kit will be recommended for use in veterinary medicine laboratories after its registration would be done.

Key words: African swine fever, ASF, Classical swine fever, CSF, RT-qPCR.

Апробація ЗТ-ПЛР тест-системи для диференційної діагностики африканської та класичної чуми свиней

С.С. Мандигра, Л.М. Музикіна, Л.М. Іщенко, Г.А. Коваленко, І.В. Галка, В.Г. Спиридонов,
С.А. Ничик

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ, Україна

В Інституті ветеринарної медицини НААН уперше в Україні розроблено діагностичний набір для диференційної діагностики африканської (АЧС) та класичної чуми свиней (КЧС) методом зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) у режимі реального часу. Розроблений діагностичний набір дозволяє одночасно детектувати три мішені: ДНК вірусу АЧС, кДНК вірусу КЧС і внутрішній контрольний зразок. Метою роботи було провести експертну оцінку діагностичного набору для диференційної діагностики АЧС та КЧС методом ПЛР у режимі реального часу за показниками: зовнішній вигляд, чутливість, специфічність і збіжність результатів. Міжвідомчі випробування діагностичного набору було проведено на базі Державного НДІ з лабораторної

діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ) згідно з розробленою і затвердженою методикою. Для визначення чутливості діагностичному досліджували серію 10-кратних розведень ДНК вірусу АЧС і кДНК КЧС (в концентрації 10^3 – 10^0 копій/мкл). Для визначення специфічності досліджували референтні зразки ДНК вірусу АЧС різних генотипів, польові зразки позитивні та негативні щодо АЧС, КЧС, а також сторонні збудники. Підготовку зразків та проведення ампліфікації проводили згідно з листівкою-вкладкою до діагностичному. Ампліфікацію здійснювали на приладі QuantStudio™ 5 System, виробник «Applied Biosystems». У результаті роботи підтверджено високу чутливість, специфічність та збіжність діагностичному. Зокрема визначено, що чутливість тест-системи становить близько 5 копій ДНК вірусу АЧС та 5 копій кДНК вірусу КЧС на одну реакцію. Підтверджено специфічність діагностичному до вірусів АЧС (I, II, V, VIII, IX, X генотипів) та КЧС. При цьому не спостерігалось неспецифічних реакцій зі сторонніми вірусами (цирковірус свиней 2-го типу, вірус репродуктивно-респіраторного синдрому свиней, вірус хвороби Ауескі). Підтверджено також достатньо високу збіжність результатів. Загалом, отримані результати відповідають вимогам нормативно-технічної документації діагностичному. Протестований діагностичним після проведення реєстрації буде рекомендований для використання у лабораторіях ветеринарної медицини.

Ключові слова: африканська чума свиней, АЧС, класична чума свиней, КЧС, ЗТ-ПЛР у режимі реального часу.

Вступ

В Україні зростання економічної ефективності виробництва свинини завжди було пріоритетним завданням аграрної політики (Nesterenko, 2015; Beltran-Alcrudo et al., 2017). Але в останні роки галузь свинарства в нашій державі перебуває у кризовому стані, що є наслідком епізоотії африканської чуми свиней (АЧС). Тільки за останні чотири роки кількість свиней в Україні скоротилась на 23,4% і станом на 1 березня 2018 р. склало 6,07 млн голів (ukrstat.gov.ua; Hryshchenko, 2017).

Складна епізоотична ситуація щодо АЧС в Україні, де спалахи хвороби реєструються практично у всіх областях (з 2012 р. зареєстровано 356 випадків АЧС), потребує оперативного й ефективного виконання комплексу профілактичних і протиепізоотичних заходів (asf.vet). Оскільки засобів специфічної профілактики і лікування АЧС не існує, діагностика є ключовою ланкою ветеринарно-санітарних заходів у боротьбі з епізоотією (Costard et al., 2009; Gallardo et al., 2015).

Своєчасна (рання) і достовірна діагностика АЧС має першочергове значення, оскільки дозволяє визначити наявність інфекційного агента на початкових етапах розвитку хвороби і виробити оптимальну стратегію боротьби. Подібність клінічних і патологоанатомічних ознак за африканської й класичної чуми свиней (КЧС) ускладнює встановлення діагнозу (Moennig et al., 2003; Maksimovich and Semenov, 2016; Schulz et al., 2017). Найбільш ефективним методом диференційної діагностики АЧС і КЧС є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) (King et al., 2003; Hoffmann et al., 2005; Oura et al., 2013). В Україні для підтвердження діагнозу користуються переважно моноплексними комерційними тест-системами, які не дозволяють одночасно виявляти обидва збудника в одній пробі. У зв'язку з цим в Інституті ветеринарної медицини НААН розроблено та успішно провалідовано перший в Україні діагностичний набір для диференційної діагностики АЧС та КЧС методом ЗТ-ПЛР у реальному часі (Mandygra et al., 2017). Розроблений діагностичним дає можливість одночасно виявляти три мішені: ДНК вірусу АЧС, кДНК вірусу КЧС і внутрішній контрольний зразок (ВКЗ), що сприяє економії часу та коштів на проведення досліджень.

Метою роботи було проведення експертної оцінки тест-системи для диференційної діагностики африканської та класичної чуми свиней методом ПЛР у

режимі реального часу за показниками: зовнішній вигляд, чутливість, специфічність та збіжність результатів.

Матеріал і методи досліджень

Міжвідомче випробування діагностичного набору проводили згідно з наказом Держпродспоживслужби України № 602-113-13/7278 від 4 грудня 2017 р. на базі Науково-дослідного відділу молекулярно-генетичних досліджень Державного НДІ з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ), м. Київ.

Дослідну серію діагностичного набору «АЧС/КЧС дуо ПЛР-РЧ» для диференційної діагностики африканської та класичної чуми свиней методом ПЛР у режимі реального часу оцінювали за показниками: зовнішній вигляд, чутливість, специфічність та збіжність результатів, згідно з розробленою і затвердженою методикою випробувань.

Для комісійного випробування було підготовлено панель зразків, що включала: 10-кратні розведення ДНК вірусу АЧС (початкова концентрація 1×10^3 копій/мкл) та кДНК вірусу КЧС (початкова концентрація 1×10^3 копій/мкл); референс-зразки ДНК вірусу АЧС I, V, VIII, IX, X генотипів; три польові зразки, позитивні щодо вірусу АЧС (№ 1–3); один зразок біологічного матеріалу, позитивного щодо вірусу КЧС (штам «Вашингтон»); два польові зразки, негативні щодо АЧС та КЧС (№ 1–2); а також вірусомісні суспензії культур клітин із збудником репродуктивно-респіраторного синдрому свиней (PPCS) – штам «Lelystad», цирковірусом свиней 2-го типу (ЦВС-2) – штам «Stoon 1010» і вірусом хвороби Ауескі – штам «Петрівський-2006». Усі зразки досліджували у трьох повторях.

Підготовку дослідних зразків, постановку реакції ампліфікації та облік результатів проводили згідно з листівкою-вкладкою до діагностичного набору.

Реакційну суміш готували, змішуючи 17,0 мкл реактиву «ПЛР-суміш» та 3,0 мкл реактиву «Праймер-суміш» (у розрахунку на одну пробу). Виділену ДНК/РНК дослідних і контрольних зразків додавали в об'ємі 5,0 мкл.

Ампліфікацію здійснювали в режимі реального часу за допомогою приладу QuantStudio™ 5 System, виробник «Applied Biosystems». Умови ампліфікації були такими: I) 50 °C – 30 хв, зворотна транскрипція; II) 95 °C – 10 хв, початкова денатурація ДНК;

III) 45 циклів (95 °C – 20 с, денатурація ДНК; 58 °C – 20 с, відпал праймерів; 72 °C – 30 с, елонгація). Флуоресценцію вимірюють при температурі 58 °C за барвниками FAM (ДНК АЧС), ROX (РНК КЧС) та JOE (ВКЗ).

Результати аналізу вважали достовірними, якщо значення Ct за барвниками FAM та ROX позитивного контролю ≤ 35 , значення Ct негативного контролю відсутнє, значення Ct по JOE всіх досліджуваних зразків (ампліфікація ВКЗ) ≤ 35 . При цьому досліджуваний зразок вважається позитивним щодо АЧС, якщо значення Ct по FAM ≤ 40 , позитивним щодо КЧС – якщо Ct по ROX ≤ 40 .

Результати та їх обговорення

На початку роботи комісією було перевірено якість маркування, пакування та комплектність ПЛР тест-системи. Усі необхідні для роботи компоненти (ПЛР суміш, Праймер-суміш, позитивний, негативний та внутрішній контрольні зразки) та листівка-вкладка

були в наявності. Сторонніх домішок, тріщин пробірок не спостерігалось.

Чутливість діагностичного набору визначали шляхом тестування серії 10-кратних розведень ДНК вірусу АЧС та кДНК вірусу КЧС. Межею виявлення (limit of detection, LOD) вважалось останнє розведення ДНК вірусу АЧС та кДНК вірусу КЧС, за яким спостерігалось збільшення росту кривої флуоресценції, а значення Ct по FAM та ROX становило ≤ 40 .

На рисунку 1 і таблиці 1 видно, що довірчий інтервал аналітичної чутливості до вірусів АЧС за концентрацій $1,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^0$ копій/мкл становив 100%, відповідно межа виявлення складала 1 копію/мкл ДНК вірусу АЧС, або 5 копій на реакцію.

Ідентичні результати отримані за визначення чутливості діагностичному й до вірусу КЧС: 100 % довірчий інтервал аналітичної чутливості за концентрацій $1,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^0$ копій/мкл, межа виявлення – 1 копія/мкл кДНК вірусу КЧС, або 5 копій на реакцію (рис. 2).

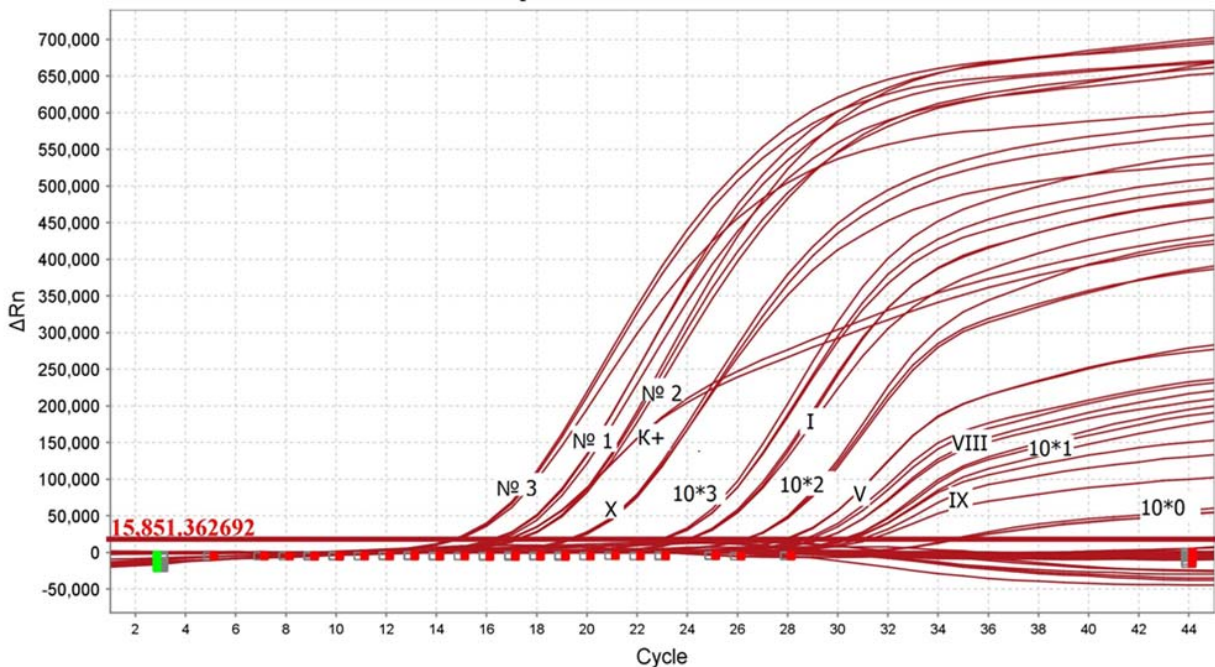


Рис. 1. Криві ампліфікації цільової послідовності вірусу АЧС за FAM K+ – позитивний контроль; № 1–3 – польові зразки позитивні на АЧС; референс зразки ДНК вірусу АЧС I, V, VIII, IX та X генотипів; 10*3, 10*2, 10*1, 10*0 – 10-кратні розведення кДНК вірусу КЧС

Специфічність діагностичному визначали за наявністю флуоресцентного сигналу по FAM (детекція ДНК вірусу АЧС) та ROX (кДНК вірусу КЧС) за використання явно позитивних зразків і відсутності вищезгаданого специфічного флуоресцентного сигналу щодо FAM та ROX за перевірки негативних зразків, включаючи сторонні збудники.

За результатами, наведеними в таблиці 1, специфічність діагностичного набору становила 100% для досліджуваних зразків, при цьому хибних результатів і неспецифічних реакцій не спостерігалось.

Варто зазначити, що результати міжвідомчого випробування підтверджують, що розроблений в ІВМ НААН діагностичним виявляє ДНК вірусу АЧС не тільки II генотипу, який циркулює на території України та Європи, а також I, V, VIII, IX та X генотипів.

Встановлено високу збіжність результатів, отриманих за використання діагностичного набору. При виявленні ДНК вірусу АЧС та кДНК вірусу КЧС в зразках у трьох повторах статистично значущих розбіжностей результатів не спостерігалось (SD було в межах 0,5).

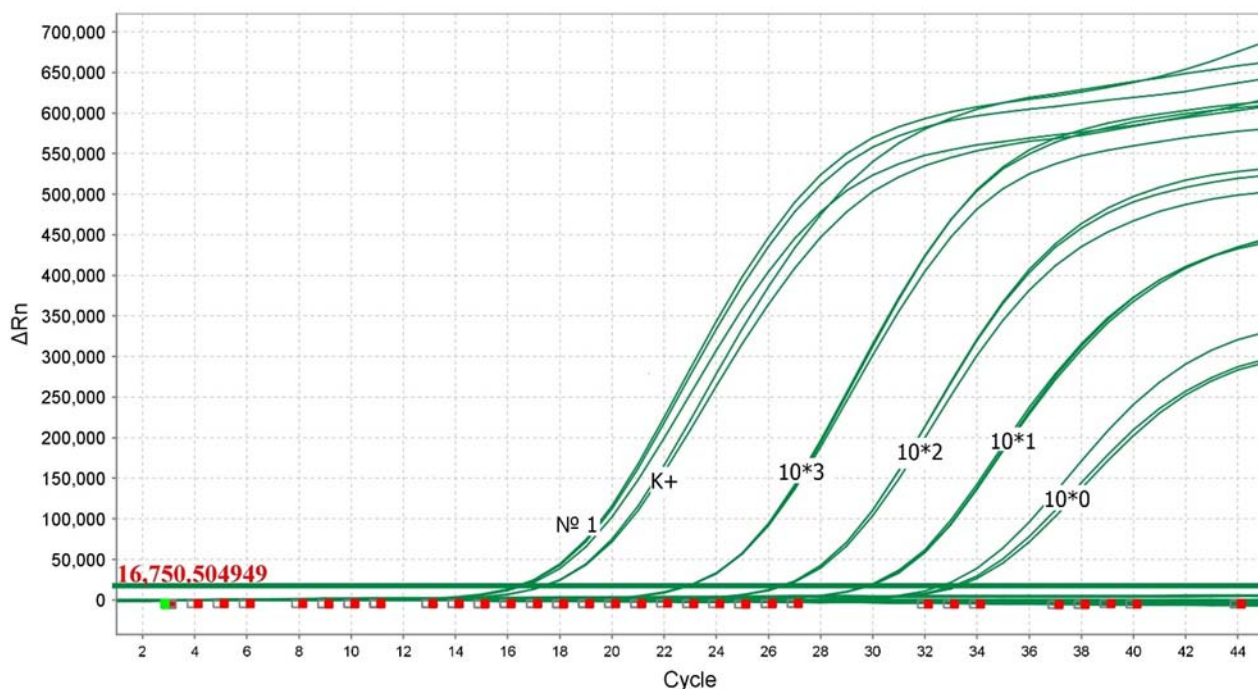


Рис. 2. Криві ампліфікації цільової послідовності вірусу КЧС за ROX: K+ – позитивний контроль; № 1 – РНК вірусу КЧС, штам «Вашингтон»; 10*3, 10*2, 10*1, 10*0 – 10-кратні розведення кДНК вірусу КЧС

Таблиця 1

Результати міжвідомчого випробування діагностичного набору «АЧС/КЧС дуо ПЛР-РЧ» (зразки досліджені у 3-х повторях)

№ п/п	Зразок	Результати FAM (АЧС)		Результати ROX (КЧС)		Ct _{середнє} JOE (BK3)
		Ct _{середнє}	SD	Ct _{середнє}	SD	
1	Позитивний контрольний зразок (K+)	16,64	-	17,38	-	-
2	Негативний контрольний зразок (K-)	-	-	-	-	-
3	ДНК вірусу АЧС (1,0×10 ³ копій/мкл)	22,85	0,06	-	-	28,50
4	ДНК вірусу АЧС (1,0×10 ² копій/мкл)	26,12	0,05	-	-	28,31
5	ДНК вірусу АЧС (1,0×10 ¹ копій/мкл)	30,10	0,12	-	-	28,13
6	ДНК вірусу АЧС (1,0×10 ⁰ копій/мкл)	34,40	0,13	-	-	28,57
7	кДНК вірусу КЧС (1,0×10 ³ копій/мкл)	-	-	22,91	0,04	27,60
8	кДНК вірусу КЧС (1,0×10 ² копій/мкл)	-	-	26,50	0,05	27,96
9	кДНК вірусу КЧС (1,0×10 ¹ копій/мкл)	-	-	29,80	0,08	27,99
10	кДНК вірусу КЧС (1,0×10 ⁰ копій/мкл)	-	-	32,96	0,33	27,09
11	Польовий зразок позитив на АЧС №1	16,25	0,15	-	-	26,47
12	Польовий зразок позитив на АЧС №2	17,10	0,09	-	-	27,49
13	Польовий зразок позитив на АЧС №3	14,60	0,10	-	-	27,12
14	РНК вірусу КЧС, штам «Вашингтон»	-	-	16,47	0,12	28,56
15	Референс зразок ДНК вірусу АЧС генотип I	23,90	0,06	-	-	25,73
16	Референс зразок ДНК вірусу АЧС генотип V	28,25	0,51	-	-	27,71
17	Референс зразок ДНК вірусу АЧС генотип VIII	28,65	0,74	-	-	28,29
18	Референс зразок ДНК вірусу АЧС генотип IX	30,66	0,38	-	-	28,40
19	Референс зразок ДНК вірусу АЧС генотип X	19,22	0,10	-	-	29,06
20	Польовий зразок негативний на АЧС, КЧС №1	-	-	-	-	27,79
21	Польовий зразок негативний на АЧС, КЧС №2	-	-	-	-	28,06
22	ДНК ЦВС-2	-	-	-	-	26,34
23	РНК вірусу РРСС	-	-	-	-	28,10
24	ДНК вірусу хв. Ауескі	-	-	-	-	26,44

Висновки

В ході міжвідомчого випробування діагностичного набору «АЧС/КЧС дуо ПЛР-РЧ», проведеного на базі ДНДІЛДВСЕ, встановлено:

1. Чутливість діагностикому становить близько 5 копій ДНК вірусу АЧС та 5 копій кДНК вірусу КЧС на одну реакцію.
2. Тест-система специфічна до вірусу АЧС (I, II, V, VIII, IX та X генотипів) та КЧС, при цьому не амплі-

фікує ДНК цирковірусу свиней 2-го типу, РНК вірусу РРСС, ДНК вірусу хвороби Ауескі.

3. За дослідження проб у трьох повторах статистично значущих розбіжностей виявлено не було (SD було в межах 0,5).

Перспективи подальших досліджень. Після завершення реєстрації розробленого в ІВМ НААН діагностичного набору, планується впровадження його у лабораторну практику ветеринарної медицини України.

References

- Vypadky AChS v Ukraini z 2012 roku. Elektronnyi resurs: <http://www.asf.vet.ua/index.php/purpose-project/about-asf/198-vypadky-achs-vukrai-ni-z-2012-roku> (in Ukrainian).
- Hryshchenko, N.P. (2017). Rozvytok svynarstva v Ukraini. Naukovyi visnyk NUBIP Ukrainy. Seriya. Tekhnolohiia vyrobnytstva i pererobky produktsii tvarynnytstva. 271, 16–23. Rezhym dostupu: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Tekhnologiya/article/view/10066> (in Ukrainian).
- Kilkist silskohospodarskykh tvaryn (shchomisiachna informatsiia). Elektronnyi resurs: Derzhavnoi sluzhby statystyky Ukrainy. Rezhym dostupu: www.ukrstat.gov.ua. Nazva z domashnoi storinky Internetu. (in Ukrainian).
- Maksimovich, V.V., & Semenov, S.V. (2016) Differentsial'naja diagnostika afrikanskoj chumy svinej. Uchenye zapiski UO VGAVM. 52(1), 60–67 (in Russian).
- Nesterenko, S.A. (2015). Rozvytok haluzi svynarstva u silskohospodarskykh pidpriemstvakh. Visnyk Berdianskoho universytetu menedzhmentu i biznesu. 1(29), 80–86 (in Ukrainian).
- Mandyhra, S.S. (2017). Rozrobka test-systemy dlia dyferentsiinoi diahnozyky afrykanskoi ta klasychnoi chumy svynei metodom ZT-PLR u rezhymi realnogo chasu. Veterynarna biotekhnolohiia. 31, 103–111 (in Ukrainian).
- Beltran-Alcrudo, D., Arias, M., & Gallardo, C. (2017). African swine fever. detection and diagnosis – A manual for veterinarian. FAO Animal production and health. Rome. 19. ISBN 978-92-5-109752-6.
- Gallardo, C., Reoyo, A.T., Fernández-Pinero, J., Iglesias, I., Muñoz, J., & Arias, L. (2015). African swine fever. a global view of the current challenge. Porcine Health Management. 14. doi: 10.1186/s40813-015-0013-y.
- Costard, S., Wieland, B., & Glanville, W., et al. (2009). de African swine fever. how can global spread be prevented. Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences. 364(1530). 2683–2696. doi: 10.1098/rstb.2009.0098.
- King, D.P., Reid, S.M., Hutchings, G.H., Grierson, S.S., Wilkinson, P.J., Dixon L.K., Bastos, A.D. & Drew, T.W. (2003). Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. Journal of Virological Methods. 107(1), 53–61 doi:10.1016/S0166-0934(02)00189-1.
- Moennig, V., Floegel-Niesmann, G., & Greiser-Wilke, I. (2003). Clinical signs and epidemiology of classical swine fever. A review of new knowledge. Vet. 165, 11–20 doi: 10.1016/S1090-0233(02)00112-0.
- Oura, C.A.L., Edwards, L., Batten, C.A. (2013). Virological diagnosis of African swine fever – Comparative study of available tests. Virus Research. 173, 150–158. doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.022.
- Schulz, K., Staubach, C., & Blome, S. (2017). African and classical swine fever. similarities, differences and epidemiological consequences. Veterinary Research. 48, 84. doi: 10.1186/s13567-017-0490-x.
- Hoffmann, B., Beer, M., Schelp, C., Schirrmeier, H., & Depner, K. (2005). Validation of a real time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. Journal of Virological Methods. 130, 36–44. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.05.030.