

< Original Article >

구제역바이러스 혈청형 A 검출을 위한 peptide nucleic acid (PNA) 기반 multiplex real-time RT-PCR 개발

이진우 · 이수미 · 나진주 · 유소윤 · 신문균 · 김태성 · 하병석 · 이현지 · 박혜진 · 이정원 · 정세민 · 위성환 · 구복경*
농림축산검역본부 구제역진단과

Developing peptide nucleic acid based multiplex real time RT-PCR to detect Foot-and-Mouth-Disease virus Serotype A

Jin-Woo Lee, Sumelee Lee, Jin-Ju Nah, Soyoon Ryoo, Moon-Kyun Shin, Taeseong Kim, Byeong-Suk Ha, Hyun-Ji Lee, Hye-Jin Park, Jeong-Won Lee, Semin Jung, Sung-Hwan Wee, Bok-Kyung Ku*

Foot and Mouth Disease Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

(Received 11 December 2018; revised 26 December 2018; accepted 26 December 2018)

Abstract

There have been a total tenth FMD outbreaks in Korea and for the first time, type O and A were detected simultaneously in 2017, which led to difficulties in FMD control. For the effective prevention of FMD, the importance of discrimination of serotypes became greater. Therefore, the most urgent requirement in case of FMD outbreak is differential diagnosis of serotypes. In this study, we developed a PNA probe-mediated multiplex real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (rRT-PCR) assay using the peptide nucleic acid (PNA) probe, which is known to be stable to nucleotide mutation and that could specifically detect the all FMDV serotype A, FMDVA Yeoncheon strain which was occurred in Korea in 2017, and FMDV A viruses shown 96% similarity with FMDVA/Yeoncheon strain, at the same time. Therefore, It is believed that the newly introduced FMDVA will be effectively diagnosed using the PNA probe multiplex RT-PCR developed in this study, and ultimately contribute to the prevention of FMD.

Key words : FMD, FMDVA, PNA, rRT-PCR

서 론

구제역 바이러스(FMDV)는 Picornaviridae과의 Aphthovirus속에 속하며 약 8.4 kb 크기의 positive sense RNA로 알려져 있다(Rweyemamu et al, 2008; Jamal et al, 2013). 구제역은 바이러스 유전자의 VP1 (캡시드 단백질을 코딩하는 영역의 유전적 다양성(30%~50%)에 기초하여 O, A, Asia1, C, Southern Africa Territories (SAT) 1, SAT2 및 SAT3의 7가지 혈청형으로 구분된다(Alexandersen and Mowat, 2005). 이러한

혈청형은 VP1 영역에서 15%의 유전적 다양성에 기초하여 80개 이상의 지역형(Topotype)으로 나뉜다(Knowles et al, 2003; Abeyratne et al, 2018). VP1부위는 구제역 유전자 중에서 가장 변이가 심한 것으로 알려져 있으며 혈청형 및 유전형 확인을 위한 VP1 염기서열 분석법은 결과를 얻는 데 24시간 이상 소요된다(Abeyratne et al, 2018). 그 외 OIE 매뉴얼에서 권고하는 표준 진단법인 항원 ELISA는 변이가 가장 많이 관찰되는 VP1 부위를 단백질 수준에서 안정적으로 감별 진단할 수 있는 장점은 있으나 민감도가 다소 낮은 것으로 알려져 있다(Reid et al, 2000).

2000년에서 2018년까지 한국에서 총 10건의 구제

*Corresponding author: Bok-Kyung Ku, Tel. +82-54-912-0774, Fax. +82-54-912-0888, E-mail. kubk@korea.kr

역이 발생하였고 혈청형은 O (7건)와 A (3건)로 확인되었다. 그리고 2017년에는 국내 처음으로 O형과 A형이 동시에 검출되어 방역에 많은 어려움이 발생하여 신속한 혈청형 감별의 중요성이 대두되기 시작하였다. 우리나라는 2011년 이후 구제역 방역정책으로 전국적 백신접종을 수행하고 있어 구제역의 신속하고 정확한 혈청형 감별은 백신수급 정책과 연계되어 구제역 피해를 최소화하는 초동방역에 아주 중요하다(Grubman et al, 2004; Park et al, 2013). 그러나 구제역 백신접종으로 인해 수포형성 등 전형적인 임상증상 관찰이 어려울 뿐만 아니라 타액으로 분비되는 바이러스의 양도 극히 낮은 경향을 보이고 있어(Alexandersen et al, 2005) VP1 염기서열 분석과 ELISA 방법을 통한 혈청형 감별이 어려울 수 있다. 구제역 발생 시 혈청형이 감별되지 않을 경우 백신정책 수행에 큰 문제가 발생할 수 있어 이에 대한 대책이 필요한 실정이다. 따라서 혈청형을 신속하고 정확하게 확인할 수 있는 민감도 높은 감별법이 필요하나(Reid et al, 2014) 기존의 TaqMan probe 기반의 real-time RT-PCR 진단법으로 유전자 변이가 잦은 VP1 부위 이용 혈청형 감별법에 사용하기에는 한계가 있다. 따라서 본 연구에서는 TaqMan probe 단점을 보완할 수 있는 감도와 특이도가 높은 PNA (Peptide Nucleic acid)물질을 Probe로 이용하는 진단법을 개발하고자 하였다. PNA는 단백질 형태의 핵산으로서 기본 backbone은 폴리펩티드(polypeptide) 구조를 형성하고 있으며 화학구조의 특징은 sugar backbone이 polyamide N-(2-aminoethyl)glycine으로 대체 된 것으로 이런 backbone 구조 덕분에 세포내에서도 아주 높은 안정성을 가지게 되는 것으로 알려져 있다(Pooga et al, 2001; Vilaivan, 2018). 또한 DNA-DNA 결합력보다 PNA-DNA 결합력이 매우 우수하여 1개의 nucleotide miss match에 10~

15°C 가량의 Tm차이를 보이게 된다. 따라서 PNA probe의 nucleotide와 이에 상보적으로 결합하는 DNA의 nucleotide의 차이에 따른 Tm값의 변화를 진단에 활용하여 사용할 수 있다(Pooga et al, 2001; Jeong et al, 2009). 본 연구는 PNA로 알려져 있는 민감도 높으면서 안정성이 높은 신물질을 이용해서 구제역 혈청형 A를 감별하고 동시에 2017년 연천 발생주와 유사 연천주(96%)를 감별할 수 있는 다중 rRT-PCR을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

PNA primers 및 Probes 제작

구제역바이러스 A혈청형의 판별을 위하여 primer 및 probe를 디자인하였으며 해당 primer 및 probe의 염기서열 정보는 Table 1과 같다. 미국국립생물정보센터(NCBI)의 데이터베이스를 이용하여 구제역바이러스의 7가지 혈청형의 VP1 유전자 부위의 염기서열을 분석하고 비교하였으며 구제역바이러스 A혈청형(HEX), 2017년 국내 연천 발생 바이러스(A/연천/2017, FAM) 그리고 연천 주와 96% 유사한 바이러스(TxR)의 판별을 위한 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 부위를 찾아 probe를 제작하였다.

공시 시료

본 연구에서 사용된 구제역바이러스는 국내 분리주, 구제역 상재국 분리주 및 백신주를 포함하여 31종의 바이러스를 실험 공시하였다(Table 2). O 혈청형은 SEA (South-East Asia) 지역형에 속하는 5주,

Table 1. Sequence of primers and probes used in rRT-PCR

Classification	Size	Sequence (5' to 3')	Fluorescence	Details
Primer	278~296 bp	CACC-----GCA	-	Forward
	360~380 bp	GCGC-----TGGC		Forward
	616~632 bp	CACC-----GTG		Reverse
	562~582 bp	AGYT-----RAT		Reverse
Probe	546~560 bp	CTCT-----AG	HEX ^a	For the All FMDVA
	458~472 bp	TCGC-----TCC	FAM ^b	For the only FMDVA/Yeoncheon/2017
	342~359 bp	CTTG-----CAC	TxR ^c	For the FMDVA/Yeoncheon/2017 96% similarity

^aHEX, Hexachloro fluorescein.

^bFAM, Fluorescein amidite.

^cTxR, Texas Red.

Table 2. The list of Foot-and-mouth disease virus (FMDV) and Seneca valley virus (SVV) used in this experiment

Serotype	Strain	Year	Topotype/Sublineage	
O (15)	YangJu	2010	SEA/Mya-98	
	Jincheon	2014	SEA/Mya-98	
	Vietnam (VN6)	2014	SEA/Mya-98	
	Gimjae	2016	SEA/Mya-98	
	Chung-Ju	2000	ME-SA/PanAsia	
	O1/SKR/2002	2002	ME-SA/PanAsia	
	Vietnam (Sonla/VN/2013)	2013	ME-SA/PanAsia	
	Boeun	2017	ME-SA/ind-2001d	
	Jeongeup	2017	ME-SA/ind-2001d	
	O1manisa	-	ME-SA	
	O1/BFS/860/UK/67	1860	Euro-SA	
	Yunlin/Taiwan/97	1997	Cathay	
	O3039	-	Cathay	
	Primorsky	-	SEA/Mya-98	
	Campos	-	Euro-SA	
	A (9)	Pocheon	2010	Asia / Sea-97
		Zabaykalsky	2013	Asia / Sea-97
Vietnam(VN18)		2013	Asia / Sea-97	
Yeoncheon		2015	Asia / Sea-97	
Malaysia97		2017	Asia / Sea-97	
Vietnam (Bac/Ninh/VN/2013)		1997	Asia / Sea-97	
Vietnam (VN15)		2014	Asia / Sea-97	
Iran05		2005	Asia / Iran-05	
A22Iraq		2006		
Asia1 (3)		MOG/05	-	Asia G-V
	CAM9/80/2006	2006		
	Shamir	-	Asia G-VII	
C (1)	C3/Resende/BRA/55	-	EURO-SA	
SAT1 (1)	SAT1/BOT/1/68	-	WZ (III)	
SAT2 (1)	SAT2/ZIM/5/81	-	II	
SAT3 (1)	SAT3/ZIM/4/81	-		
Seneca valley virus	SVV	-	-	

ME-SA (Middle East-South Asia) 지역형에 속하는 6주, Euro-Sa 지역형에 속하는 2주 및 Cathay 지역형에 속하는 2주 포함하여 총 11주를 공시하였다. A 혈청형은 Asia 지역형에 속하는 9주를 공시하였다. Asia1 혈청형은 3주, 그리고 C 혈청형 분리주 1주를 공시하였다. SAT1 혈청형은 3개주를 사용하였으며 SAT1/BOT/1/68은 topotype III-WZ (western Zimbabwe, Botswana and Namibia)에 속하고, SAT2 혈청형은 II-WZ에 속하는 SAT2/ZIM/5/81, 그리고 SAT3 혈청형은 SAT3/ZIM/4/81 바이러스 주를 사용하였다. 또한 돼지에서 구제역과 유사한 증상을 유발하는 것으로 알려져 있는 Seneca valley virus (SVV) 1주를 추가로 공시하여 총 32종의 바이러스를 이 실험에서 사용하였다.

RNA 추출

공시 바이러스를 이용한 모든 실험은 biosafety level 3급의 차폐실험실에서 실시하였고, 검증시험에 필요한 바이러스 핵산은 해당 바이러스 배양액으로부터 시판 RNA추출키트(Qiagen RNeasy mini kit, Germany)를 이용하여 매뉴얼에 따라 RNA를 추출한 다음 -70°C에서 보관하면서 시험에 사용하였다.

PNA를 기반으로 한 multiplex real-time PCR 조건

TaqMan probe를 사용하는 rRT-PCR과는 달리, PNA probe를 사용한 rRT-PCR은 melting과정을 포함한다. 50°C에서 30분간 역전사반응 및 95°C에서 10분간 denaturation과정을 거친 후, 45 회전의 PCR 과정(denaturation 95°C 20초, annealing 55°C 30초, elongation 74°C

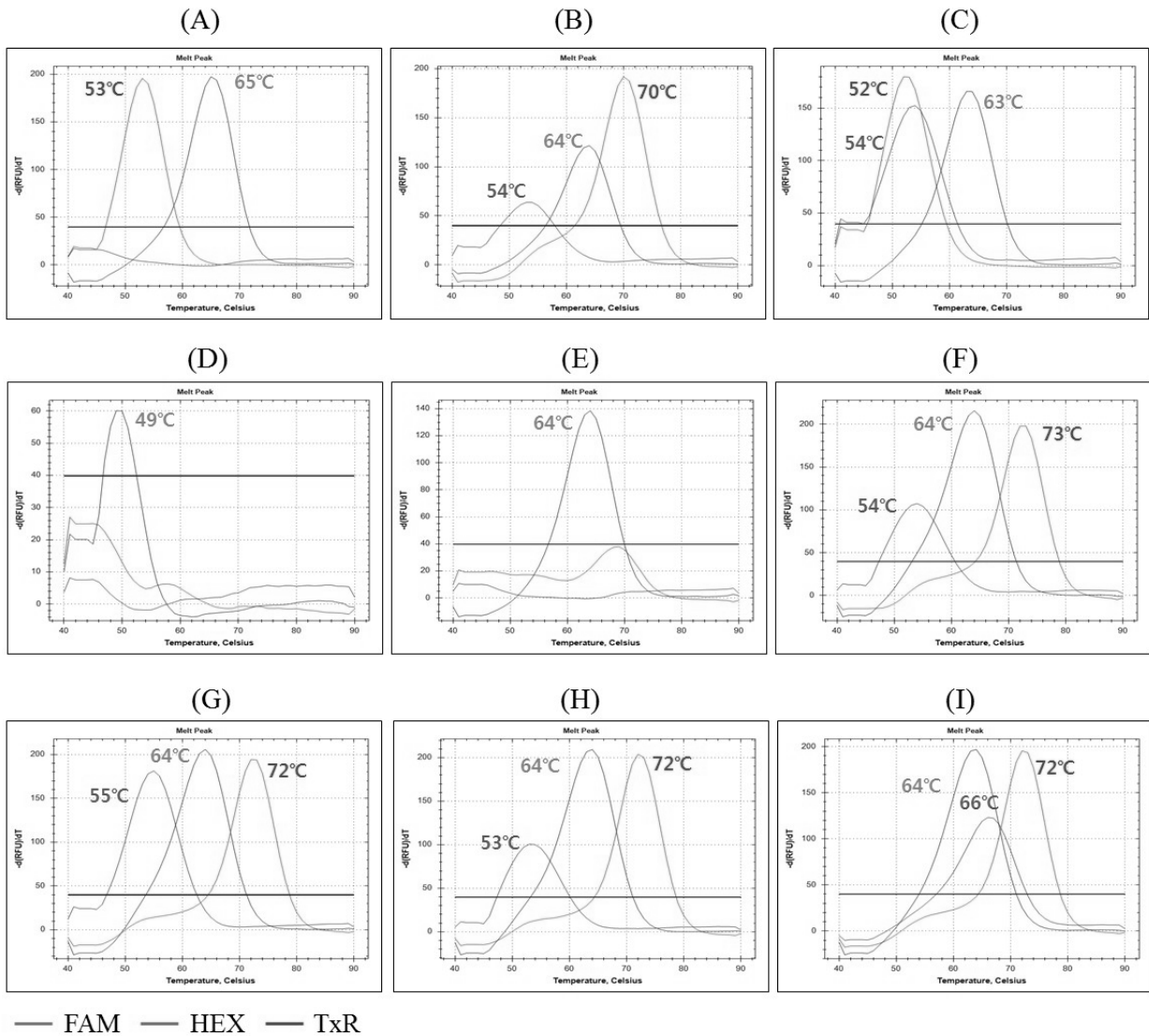


Fig. 1. Results of PNA probe mediated real-time reverse transcription-polymerase chain reaction(rRT-PCR) using 9 FMDV A strains. All strains (n=9) of FMDV A were identified in the hexachloro fluorescein (HEX) channel at 49~66°C. The Yeoncheon strain (I) was identified in the FAM channel at 66°C. The A/Yeoncheon 96% similarity strains (A, B, C, F, G, H and I) were identified in the TxR channel at 60~73°C. Moreover, FMDV A/Iran-05 and FMDV A/A22Iraq which were different genotype with FMDVA/ASIA/SEA97 were only identified in HEX channel at 49°C and 64°C respectively. (A) FMDVA/Pocheon, (B) FMDV A/Vietnam (VN15), (C) FMDVA/Malaysia97, (D) FMDVA/Iran05, (E) FMDVA/A22 Iraq, (F) FMDVA/zabaykalsky, (G) FMDVA/Vietnam(VN/2013), (H) FMDVA/Vietnam (VN18), (I) FMDV A/Yeoncheon.

45초)을 진행한 다음, post denaturation 과정을 95°C에서 3분간 처리하였다. 또한, melting 과정에서 온도를 40°C에서 90°C로 1초당 5°C씩 rkath하여 측정하였다. 이러한 과정을 CFX96 (Bio-Rad, USA)으로 수행했고, RNA 샘플 5 μL, 2X qRT-PCR PreMix (Seasun Biomaterials, Korea) 10 μL, primer (0.5 μL) 및 PNA probe (0.5 μL) 혼합물과 RNase free water을 첨가하여 총 20 μL를 실험에 사용하였다. 각 형광신호 (FAM, HEX, TxR)가 melting range 안에 검출되며 해당

cut-off line이상인 경우 양성으로 판정하고 cut-off line 이하 및 melting range 안에 속하지 않을 경우 음성으로 판정하였다.

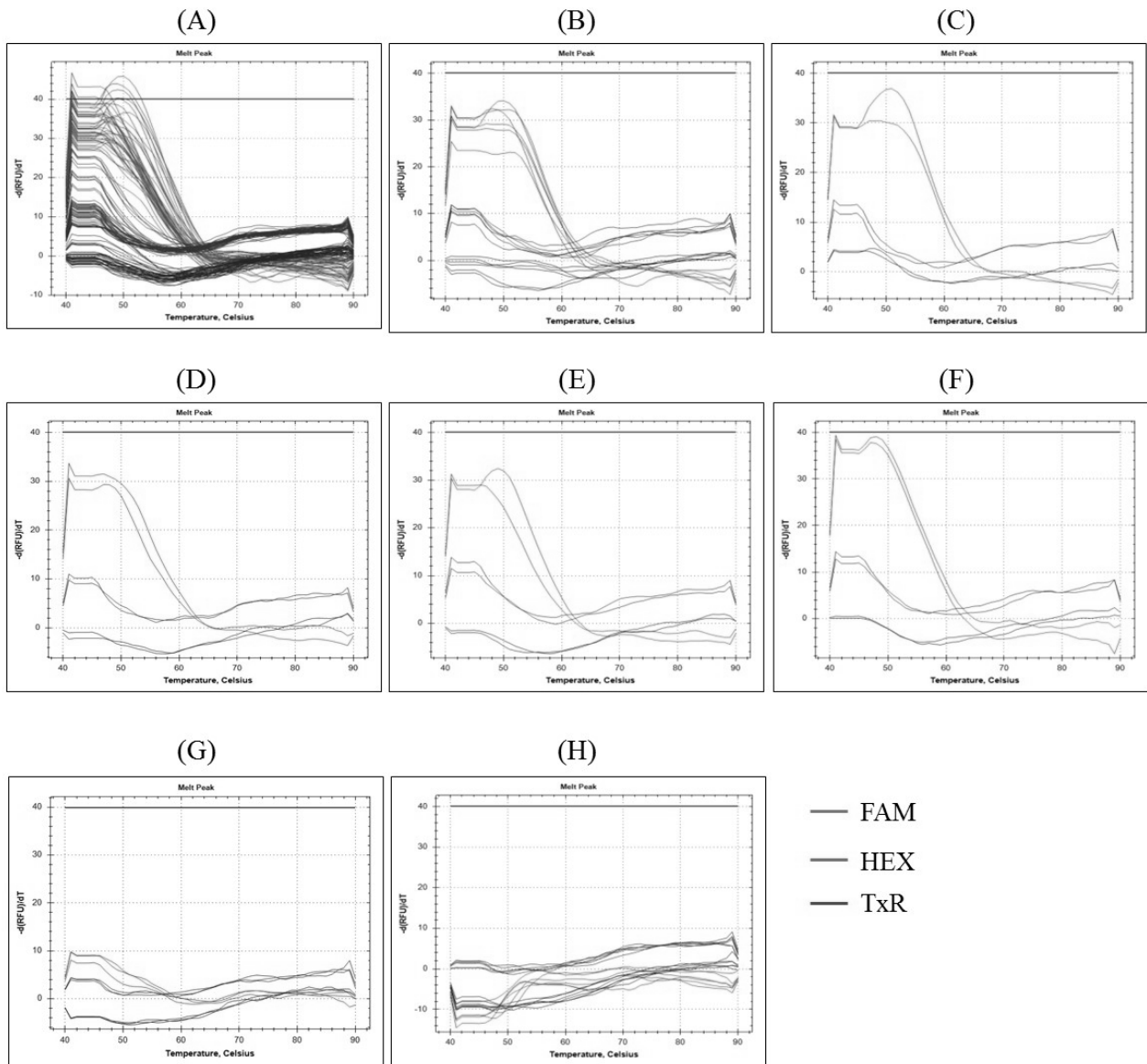


Fig. 2. Results of PNA probe mediated rRT-PCR using the total of 32 strains (FMDV (n=31) and SVV (n=1)). The six FMDV serotypes (FMDVO (n=15), FMDVAsia1 (n=3), FMDVC (n=1), FMDVSAT1 (n=1), FMDVSAT2 (n=1), FMDVSAT3 (n=1)) and Seneca Valley virus (n=1) were used to assess the specificity of the PNA mediated rRT-PCR. There were no melting curve peaks in all 32 viruses. (A) FMDVO(n=15), (B) FMDV Asia1 (n=3), (C) FMDVC (n=1), (D) SAT1 (n=1), (E) SAT2 (n=1), (F) SAT3 (n=1), (G) Seneca valley virus (SVV) (n=1) and (H) Non-template control (NTC).

결 과

PNA 기반으로 한 rRT-PCR 진단법의 FMDVA 검출 능

FMDV 혈청형 A의 검출(HEX)은 Cut off line (초록 선) 이상에서 49°C~66°C의 범위 내 Peak이 확인되었으며 A/연천/2017을 특이적으로 검출하는 FAM 파장은 66°C에서 Peak이 확인되었다. 또한 A/연천/2017과 96% 유사한 A/zabaykalsky, A/Vietnam (Bac/Ninh/

VN/2013), A/Vietnam (VN18) 및 A/Vietnam (VN15)를 검출하는 TxR 파장에서는 Peak을 60~73°C 범위 내에서 확인했다. 이 결과를 통해 HEX 파장은 지역형 (topotype)에 관계없이 혈청형 A에 널리 적용 가능함을 확인하였으며 FAM 파장을 통해 2017년 한국에서 발생한 A/연천/2017 바이러스만을 특이적으로 검출함을 알 수 있었다. 또한 TxR의 파장을 이용하여 A/연천/2017 바이러스와 96% 유사한 바이러스 또한 감별할 수 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

PNA 기반으로 한 rRT-PCR 진단법의 다른 혈청형과의 교차반응 조사

개발된 PNA 기반 rRT-PCR을 이용하여 구제역바이러스 혈청형 A를 제외한 6가지 혈청형 20주와 구제역 유사 수포성질병인 SVV 1주 포함하여 총 21주에 대해 그 특이성을 조사하였다. 그 결과는 Fig. 2에 잘 나타나 있듯이 15종의 혈청형 O에 대해 Cut off 라인 (초록색 선) 주위에서 약간의 peak 이 불규칙하게 나타나는 것이 관찰되었지만 Cut off 라인 이상에서의 Melting curve peak이 확인 되지 않아 그 특이성이 인정되었다. 뿐만 아니라 3종의 Asia1 형과 1종의 C형 그리고 각각 1종씩인 SAT1, SAT2, SAT3형에서도 혈청형 O와 마찬가지로 Melting curve peak이 Cut off 라인 이상에서 확인되지 않았다. 또한 SVV도 구제역과 감별되는 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

고 찰

구제역은 전염성이 높으며 전 세계적으로 축산업에 심각한 피해를 주는 주요한 질병으로 국내에서는 전국적 백신 접종 정책을 수행하고 있지만 2014년 이후 매년 구제역이 발생하고 있는 실정이다. 또한, 2017년에 최초로 구제역 혈청형 O와 A가 동시에 발생한 이후 신속한 혈청형 감별은 백신수급 결정 등 국가방역에 매우 중요하기 때문에 혈청형 진단의 중요성이 더 커졌다. 그러나 국내 구제역 발생은 백신 접종으로 인해 수포형성 등 전형적인 임상증상 관찰이 어려울 뿐만 아니라 바이러스가 타액으로 분비되는 양이 낮아 혈청형 감별이 어려울 수 있어 이에 대한 대책이 필요한 실정이다. 본 연구에서는 높은 안정성과 유전자 결합성을 가진 인공 핵산 분자로서 (Pooga et al, 2001; Vilaivan et al, 2018) 민감도가 높으며 변이에 따라 Tm 값만 변해 변이에 안정적인 특징을 가지고 있는 PNA probe를 기반으로 한 rRT-PCR 방법을 고안하였다. PNA 기반 rRT-PCR은 구제역 혈청형 A 모두를 진단함과 동시에 2017년 연천에서 발생한 FMDVA/ASIA/SEA97을 특이적으로 감별하도록 설계되었다. 뿐만 아니라 2017년 연천 주와 96% 유사한 바이러스도 동시에 진단될 수 있도록 개발되었다. 31종의 구제역 바이러스와 세네카벨리바이러스 (SVV) 1종을 포함하여 총 32개의 바이러스를 이용하여 FMDV A형을 검출(HEX파장)할 수 있는지에 대한

평가하였으며 A형(9종) 모두에서 49~66°C의 범위 내에서 Peak가 확인되었으며 다른 혈청형에서는 Peak 이 확인되지 않았다. 또한, A/연천/2017 바이러스를 특이적으로 검출하는 FAM 파장은 67°C에서 Peak가 확인되어 그 특이성이 인정되었다. 그 외 구제역 Pool 1지역인 우리나라 인근지역에서 발생한 FMDVA/ASIA/SEA97형인 A/zabaykalsky, A/Vietnam (Bac/Ninh/VN/2013), A/Vietnam (VN18) 및 A/Vietnam (VN15)의 경우에는 TxR 파장의 60~73°C범위에서 특이적인 Peak이 확인되어 2017년 연천 주와 96% 유사한 바이러스 진단에서도 모두 정상적으로 검출된 것을 확인할 수 있었다. 그러나, FMDVA/Iran05 및 FMDVA22 Iraq 바이러스의 경우는 FMDVA/ASIA/SEA97과 유전자형이 달라 Peak이 확인되지 않아 특이도가 높음을 알 수 있었다. TaqMan probe 방식의 rRT-PCR의 경우는 Primer나 Probe 유전자 서열과 적은 수의 mismatch가 발생하더라도 유전자가 검출 되지 않을 수 있다. 그러나 PNA probe를 기반의 rRT-PCR 은 Primer 및 Probe 내 염기서열의 mismatch가 발생하더라도 음성이 아니라 Tm 값이 이동하는 경향을 나타냄으로서 돌연변이 연구에 유용하게 적용되고 있다(Hur et al, 2015). 본 연구에서 개발된 PNA 기반 rRT-PCR은 높은 민감도로 VP1 염기서열 분석이나 항원 ELISA를 적용할 수 없는 낮은 역가의 항원샘플에도 적용할 수 있으며 약간의 변이가 발생한 경우라도 안정적으로 진단할 수 있는 장점이 있다. 이로써 향후 구제역 혈청형 A 발생 시 신속하게 A형 감별 및 2017년 연천 바이러스가 순환하고 있는지의 여부까지도 확인 가능할 수 있게 되었다. 또한 인근의 구제역 상재국가에서 A/ASIA/SEA97 유전자형이 유입될 경우에도 2017년 연천 주와 96% 유사한 것으로 진단될 가능성이 아주 높아 그 효용성은 아주 높을 것으로 기대된다.

결 론

국내 구제역 방역정책은 전국적 예방 접종을 기반으로 하고 있어 백신 미접종 혈청형의 구제역이 발생할 경우에 축산업에 큰 피해를 끼칠 수 있다. 그러므로 구제역의 신속하고 정확한 혈청형 감별은 백신수급 결정 등 방역정책과 연계되어 피해를 최소화 할 수 있어 아주 중요하다. 따라서 본 연구는 민감도와 안정성이 높은 PNA를 이용하여 구제역 혈청형 A를 감별하고 동시에 2017년 연천 발생 바이러스와 연천

유사바이러스(96%)를 감별할 수 있는 다중 rRT-PCR을 개발 하였다. 이에 따라 향후 구제역 혈청형 A 발생 시 신속하게 A형에 대한 감별 뿐만 아니라 2017년 연천발생 바이러스가 순환하고 있는지의 여부까지도 확인 가능하게 되었다. 더 나아가 인근 구제역 상재국가에서 A형 중 가장 많이 발생하고 있는 ASIA/SEA97 유전자형이 유입될 경우에도 대비할 수 있게 되었다. 따라서 PNA 기반의 rRT-PCR은 구제역 초기방역에 크게 기여할 것으로 여겨진다.

감사의 글

본 논문은 농림축산검역본부 연구사업(세부과제명: 구제역바이러스유전자 변이특성 연구, 세부과제번호: B-1543082-2018-19)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Abeyratne SAE, Amarasekera SSC, Ranaweera LT, Salpadoru TB, Thilakarathne, SMNK, Knowles NJ, Wadsworth J, Puvanendiran S, Kothalawala H, Jayathilake BK, Wijithasiri HA, Chandrasena MMPSK, Sooriyapathirana SDSS. 2018. The phylogenetic analysis of VP1 genomic region in foot-and-mouth disease virus serotype O isolates in Sri Lanka reveals the existence of 'Srl-97', a newly named endemic lineage. *PLoS One* 13: e0194077.
- Alexandersen S, Mowat N. 2005. Foot-and-mouth disease: host range and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 288: 9-42.
- Grubman MJ, Baxt B. 2004. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev* 17: 465-93.
- Hur D, Kim MS, Song MS, Jung JW, Park HK. 2015. Detection of genetic variation using dual-labeled peptide nucleic acid (PNA) probe-based melting point analysis. *Biol Proced Online* 17: 14.
- Jamal SM, Belsham GJ. 2013. Foot-and-mouth disease: past, present and future. *VetRes* 44: 116.
- Jeong DJ, Jeong YJ, Wenxia M, Park SY, Choi YJ, Kim CJ. 2009. Applications of Peptide Nucleic Acid (PNA) in the Biomedicine. *Journal of Soonchunhyang Medical Science* 15: 51-58.
- Knowles NJ, Samuel AR. 2003. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* 91: 65-80.
- Park JH, Lee KN, Ko YJ, Kim SM, Lee HS, Shin YK, Sohn HJ, Park JY, Yeh JY, Lee YH, Kim MJ, Joo YS, Yoon HC, Yoon SS, Cho IS, Kim BH. 2013. Control of foot-and-mouth disease during 2010-2011 epidemic, South Korea. *Emerg Infect Dis* 19: 655-659.
- Pooga M, Land T, Bartfai T, Langel U. 2001. PNA oligomers as tools for specific modulation of gene expression. *Biomol Eng* 17: 183-192.
- Reid SM, Ferris NP, Hutchings GH, Samuel AR, Knowles NJ. 2000. Primary diagnosis of Foot-and-mouth disease by reversetranscription polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 89: 167-176.
- Reid SM, Mioulet V, Knowles NJ, Shirazi N, Belsham GJ, King DP. 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 lineage circulating in the Middle East. *J Virol Methods* 207: 146-153.
- Rweyemamu M, Roeder P, Mackay D, Sumption K, Brownlie J, Leforban Y, Valarcher JF, Knowles NJ, Saraiva V. 2008. Epidemiological patterns of foot-and-mouth disease world wide. *Transbound Emerg Dis* 5557-5572.
- Vilaivan T. 2018. Fluorogenic PNA probes. *Beilstein J Org Chem* 14: 253-281.