



## Шувууны томуугийн тандах судалгаанд туршуул шувуу (*Sentinel bird*) байршуулах арга ашигласан дүнгээс

Д.Баярмагнай, О.Нямсүрэн, Б.Балжидмаа, Н.Даваасүрэн, Ц.Ариунаа, Т.Уянгаа, Б.Чимэдцэрэн,  
Г.Нямдаваа, Ш.Түмэнжаргал, Н.Батсуурь, Ч.Тунгалаг, Ц.Эрдэнэ-Очир\*

Мал эмнэлгийн сургууль, ХААИС

\*Холбоо барих хаяг: [erkavet@muls.edu.mn](mailto:erkavet@muls.edu.mn)

### ХУРААНГУЙ

Бид шувууны томуугийн тандах судалгаанд туршуул шувуу байршуулах арга зүйг ашиглах боломжийг судлах зорилгоор урьдчилсан туршилтыг 2019 оны 7-10 сард Булган аймгийн Сайхан сумын Хунт нууранд хийж гүйцэтгэв. Хунт нуур нь олон тооны нүүдлийн усны шувууд зусах болон дайрч өнгөрдөг ач холбогдолтой цэг бөгөөд 2005-2011 онд өндөр хоруу чанартай шувууны томуугийн (HPAI) A/H5N1 дэд хэвшлийн вирус илэрч байсан. Шувуунаас авсан арчдасны зарим дээжийг insulated isothermal PCR (iiPCR)-р шинжлэхэд 39/104 (37,5%), дээж эерэг, бүх дээжийг PCR (qPCR)-р шинжлэхэд 42/104 (40,38%) нь дээж эерэг дүн үзүүлсэн. Харин ийлдсэнд шувууны томуугийн эсрэг биом илрүүлэх ELISA-ийн шинжилгээгээр 35/104 (33,65%) дээжинд эсрэг биом илэрсэн. Иймд энэ арга зүйг Монгол орны нөхцөлд тохируулан сайжруулж шувууны томуугийн үүсгэгчийг илрүүлэхэд ашиглах нь уг өвчний эпидемиологийн байдлыг танин мэдэхэд чухал ач холбогдолтой юм.

**Түлхүүр үг:** нугас, вирус, дархлаа, эпидемиологи, тархалт, ПГУ (Полимеразан гинжин урвал)

### ОРШИЛ

Томуу (influenza эсвэл flu) нь *Orthomyxoviridae* овгийн influenza virus-ээр үүсдэг амьсгалын замын халдварт өвчин бөгөөд А, В, С болон D гэсэн хэвшилтэй байдаг. Эдгээрээс influenza A virus (IAV) нь гахай, нохой, адуу, сарьсан багваахай зэрэг амьтан, гэрийн тэжээвэр болон зэрлэг шувууд төдийгүй хүнд халдвар үүсгэдэг. IAV-г гадаргуугийн хемаглютинин (HA) болон нейраминидаза (NA) гэсэн 2 уургийн эсрэг төрүүлэх чанараар нь Н болон N дэд хэвшлүүдэд ангилж үздэг бөгөөд H1-18 болон N1-11 дэд хэвшил бүртгэгдээд байна. Эдгээрээс H17N10 болон H18N11 гэсэн 2 дэд хэвшил сарьсан багваахайнаас илэрсэн [1] бол бусад боломжит дэд хэвшлүүд (H1-16 ба N1-9) [2] нь шувуудад халдвар үүсгэдэг. Эдгээр шувууны томуугийн вирус (avian influenza virus, AIV)-ын халдвар нь шувууны аж ахуйд эдийн засгийн асар их хохирол учруулахаас гадна нийтийн эрүүл мэндэд сөргөөр нөлөөлдөг. Нүүдлийн шувууд тэр дундаа усны шувууд нь AIV-ын байгалийн эзэн, халдварын эх уурхай төдийгүй улс болон тив хооронд тархахад үндсэн дамжуулагч хүчин зүйл учраас нүүдлийн шувуудын дунд уг вирусын тархалт, хувьсал өөрчлөлтийг байнга тандан судлах нь болзошгүй цар тахал, халдварын эрсдэлээс сэргийлэхэд

чухал ач холбогдолтой юм.[3] Монгол улс нь нүүдлийн шувуудын дундах AIV-ын тархалтыг судлахад нэн тохиромжтой хэд хэдэн давуу талуудтай гэж үздэг. Тухайлбал Монгол улс нь 2005 онд БНХАУ-ын Цинхай нууранд өндөр хоруу чанартай шувууны томуугийн (highly pathogenic avian influenza (HPAI)) A/H5N1 дэд хэвшилээр үүссэн [4] өвчлөл нүүдлийн шувуудад бүртгэгдсэн анхны тохиолдолын дараа уг халдвар тархсан хоёрдогч улс болж бүртгэгдсэн бөгөөд 2006-2012 оны хооронд 10 удаагийн өвчлөл бүртгэгдсэн байна. Мөн газар зүйн байршлийн хувьд шувуудын нүүдлийн үндсэн 4 замнал (Австрали, Төв ази/ Энэтхэгийн, Баруун Ази/ Африк Газар дундын тэнгис/ Хартэнгис) дайран өнгөрч огтлолцдог. Эдгээр замналаар дамжин нүүдэллэдэг 391 зүйлийн нүүдлийн шувууд Монгол улсад бүртгэгдсэнээс [5] 170 орчим зүйлийн усны шувууд Монгол орны гол нууруудад зусаж үржилд ордог эсвэл дамжин өнгөрдөг байна. Монгол улсад 2005 оноос эхлэн нүүдлийн шувуудын дундах шувууний томуугийн тандах судалгааг сангасны болон амьд шувууны арчдасны дээж шинжлэх зэрэг олон төрлийн арга зүйгээр идэвхтэй зохион байгуулж байгаа боловч эдгээр нь зарим нэг сул талууд

ажиглагдсаар байна. Тухайлбал сангасны дээж шинжлэхэд дээжийн чанар болон тээвэрлэлтийн нөхцөл зэргээс хамаарч үр дүнд сөргөөр нөлөөлж илрүүлэх хувь харьцангуй бага (0,1-1%) байдаг. Харин амьдаар барьсан, үхсэн эсвэл зориудаар агнасан шувуунаас авсан арчдасны дээж шинжлэхэд вирус илрүүлэх хувь нь харьцангуй өндөр (1-10%) байдаг[6]. Мөн Канад улсын Аляска мужид шувууны аж ахуй, ан агнуур эрчимтэй хөгжсөн газар ба нүүдлийн болон зэрлэг шувууд ихээр цугладаг шувууны томуугийн эрсдэлтэй бүс хэмээн үздэг. Тиймээс 2006-2010 он хүртэлх 5 жилийн хугацаанд 55000 гаруй шувуу агнан шинжилгээ хийгдэж байсан байна [7]. Гэвч эдгээр үр дүнтэй аргууд нь манай орны нөхцөлд хэрэгжүүлэх боломжгүй эсвэл хүндрэлтэй байдаг

## СУДАЛГААНЫ АРГА ЗҮЙ

**Тандалт судалгаа хийсэн нуур.** Бид 2005-2009 онд өндөр хоруу чанартай шувууны томуу оношлогдож байсан Булган аймгийн Сайхан сумын Хунт нуур (GPS 48°26'05.5"N 102°34'40.4"E) (зураг 1)-ыг сонгон МЭЕГ болон Булган аймгийн МЭГ-ын дэмжлэгтэйгээр тандах судалгааг хийж гүйцэтгэлээ. Хунт нуур газарзүйн байршил таатай нөхцөл, жижиг арал дээр нь олон зүйлийн шувууд өндөглөдөг, гуужилтын үедээ зусдаг зэрэг олон давуу талтай.

**Судалгааны шувуу ба дээж цуглуулах.** Бид 20 толгой гэрийн тэжээвэр нугас (*Anas platyrhynchos domesticus*) судалгаанд ашиглав. Судалгаа эхлэхээс өмнө бүх шувуудаас арчдас болон ийлдсийн дээж аван томуугаар эрүүл эсэхийг

тул үр дүнтэй шинэ арга зүйг ашиглах шаардлага тулгарч байна. Шувууны томуу өвчнийг тандан судлах зорилгоор туршуул шувуу ашиглах арга зүйг 2005 оноос Европын орнууд болох Швейцарь, Герман, Австри улсууд [8][9], 2008-2013 онд Румын улсад Азийн орноос Япон, Солонгос, Хятад туршуул шувуу (sentinel bird) буюу гэрийн шувуудыг зэрлэг усны шувууд дунд байршуулан [10] шувууны томуу өвчний тандан судалгаа хийсэн нь үр дүнтэй байсан ба дэлхийн олон оронд энэхүү аргийг хэрэглэж байгаа тул бид туршуул шувуудыг зэрлэг усны шувуудтай нууранд байршуулан тандах судалгаа хийх арга зүйг манай орны нөхцөлд туршиж эхний үр дүнгээс танилцуулж байна.

батлах шинжилгээ хийв. Эдгээрээс 15 шувууг 2019 оны 07-р сарын 15-наас 9-р сарын 30 хүртэл хугацаанд нуурын арал дээр байрлуулсан тусгай торон байранд, 5 шувууг сөрөг хяналтын бүлэг болгон ХААИС-ийн МЭС-ийн мал амьтны байранд маллан судалгааг гүйцэтгэв. Дээжийг 7-10 хоногийн давтамжтай авч нийт 104 ийлдэс, 104 арчдасны дээжинд үүсгэгч болон ийлдэс судлалын шинжилгээг хийв.

**Вирусын RNA ялгах.** Арчдасны дээжнээс Preloaded DNA-RNA Extraction set (GeneReach, Taiwan)-цомгоор TacoMini-Automatic Nucleic Acid Extraction System (GeneReach, Taiwan) төхөөрөмж ашиглан үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу вирусын RNA-г ялгасан.[11]



Figure 1. The located mesh fence on the khunt lake



Figure 2. Bulgan province, Saikhan soum, Khunt lake

**Үүсгэгч илрүүлэх. Insulated Isothermal PCR (iiPCR):** Томуугийн вирус илрүүлэх шинжилгээг iiPCR урвалаар РОСКIT-Micro Duo Nucleic Acid Analyzer зөөврийн багаж (GeneReach, Taiwan) болон Рокит Influenza A detection цомгийг (GeneReach, Taiwan) ашиглан үйлдвэрлэгчийн зааврийн дагуу хээрийн нөхцөлд хийж гүйцэтгэв.[12]

**Баталгаажуулах. Real Time RT-PCR (qPCR) (Бодит хугацааны полимеразаан гинжин урвал):** iiPCR-р эерэг болон сөрөг гарсан дээжний үр дүнг бататгах зорилгоор ялгасан РНХ-г QuantiTect Probe RT-PCR kit (QIAGEN, Hilden, Germany) болон StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, US) ашиглан үйлдвэрлэгчийн заавар (2X QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix 12.5 ul RFW 5.75 ul 0.5 ul, RT mix 0.25 ul RNA 5 нийт 25ul хэмжээгээр бэлтгэн [13], өмнөх судалгааны арга зүйд (Forward; AGA TGA GTC TAA CCG AGG TGG, Reverse; TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG) 0.5 ul Probe (FAM-TCA GGC CTC AAA GCC GA-TAMRA) дурдсан [14] primer болон ПГУ-ын дараалалыг ашиглан шинжилгээ хийсэн.

**Ийлдэс судлалын шинжилгээ (эсрэгбиом илрүүлэх). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA):** 104 ийлдсийн дээжийг AIV Ab ELISA kit (BioNote inc, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, South Korea)-р үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу шинжилж Multiskan EX (Thermo Scientific, MS, US) уншигчаар уншуулан үр дүнг тооцоолов. Үр дүнг дараах томъёогоор MS Excel програм ашиглан тооцоолов. Үүнд: Сөрөг хяналтын OD<sub>450</sub> (OD<sub>450</sub>NCx) дундаж хэмжээ 1.0-аас их ба эерэг хяналтын дундаж OD<sub>450</sub> (OD<sub>450</sub>PCx) - 0.005-0.5-аас бага байна. Хэрэв эдгээр утгуудын аль нэг нь хязгаараас хэтэрсэн бол туршилтыг хүчингүйд тооцсон бөгөөд дээжийг дахин туршсан. [PI утгыг тооцоолох], PI утгыг дээж тус бүрээр, хувь дарангуйлах томъёог ашиглан тооцоолов. PI утга = [1 - (дээж OD<sub>450</sub> / OD<sub>450</sub>NCx)] x 100 Жишээлбэл: OD<sub>450</sub>NCx: 2.040, OD<sub>450</sub>PCx: 0.059, OD<sub>450</sub> загвар: 1.950 PI утгыг цомгийн зааварт заасны дагуу ≥ 50 бол эерэг, <50 бол сөрөг гэж дүгнэв. Жишээлбэл: PI утга = [1 - (1.950 / 2.040)] x 100 = 4.4 → Энэ түүврийг сөрөг гэж үзнэ. Хэрэв PI утга нь хасах (-) байвал 0 гэж үзнэ.

## СУДАЛГААНЫ ҮР ДҮН

Туршуул шувуудаас авсан арчдасны дээжийг iiPCR-р шинжлэхэд 39/104 (37,5%), qPCR (M gene)-р шинжлэхэд 42/104 (40,38%) дээж эерэг

дүн үзүүлэв. Ийлдсэнд ELISA-ийн шинжилгээ хийхэд 35/104(33,65%) эерэг дүн үзүүлэв. (Хүснэгт 1)

Table 1

The result of the analysis of the detection virus and antibody (Research control group)

Дээж авсан давтамж	Огноо	iiPCR	qPCR (M gene)	ELISA
1	2019/07/20	2/15	0/15	0/15
2	2019/07/26	2/15	2/15	0/15
3	2019/08/03	0/15	4/15	0/15
4	2019/08/12	2/15	3/14	0/14
5	2019/08/20	0	0	0
6	2019/08/28	0	0	0
7	2019/09/09	11/15	11/15	10/15

8	2019/09/22	12/15	12/15	12/15
9	2019/09/30	10/15	10/15	13/15
<b>Нийт</b>	Арчдас болон ийлдэс	39/104	42/104	35/104

Table 2

The result of the analysis of the detection virus and antibody (Negative control group)

Дээж авсан давтамж	Огноо	iiPCR	qPCR (M gene)	ELISA
1	2019/07/20	0/5	0/5	0/5
2	2019/07/26	0/5	0/5	0/5
3	2019/08/03	0/5	0/5	0/5
4	2019/08/12	0/5	0/5	0/5
5	2019/08/20	0/5	0/5	0/5
6	2019/08/28	0/5	0/5	0/5
7	2019/09/09	0/5	0/5	0/5
8	2019/09/22	0/5	0/5	0/5
9	2019/09/30	0/5	0/5	0/5
<b>Нийт</b>	Арчдас болон ийлдэс	0/45	0/45	0/45

## ШҮҮН ХЭЛЭЛЦЭХҮЙ

Дэлхий дахинд шувууны томуу өвчин хурдацтай тархаж байгаа нь ДЭМБ, ДМАЭМБ-ын өмнө тулгарч байгаа томоохон асуудал юм [15]. Иймээс шувууны томуу өвчний тандалт судалгааг хийж олон аргаар зохион байгуулж байна. Тухайлбал, зэрлэг шувуу барьж дээж авах, дамжуулагч зүүж замналыг нь тодорхойлох [16], сангас түүн дээжийг шинжлэх зэрэг аргууд байна. Эдгээр аргууд нь цаг хугацаа их зарцуулдаг, зардал их шаардсан, цаг агаарын нөхцөлөөс хамаарч дээжний хадгалалтын горим алдагдах, мөн тээвэрлэлтэнд алдаа гарвал дээжний чанарт сөргөөр нөлөөлөх олон сул талуудтай байгаа нь өмнөх хийсэн тандалт судалгаа дүн шинжилгээнээс харагдаж байна. 2005 оноос Европын орнууд (Швейцарь, Герман, Австри) тэр дундаа 2008-2013 онд Румын улсад туршуул шувуу буюу гэрийн шувуудыг зэрлэг усны шувууд дунд байршуулан шувууны томуу өвчний тандалт судалгаа хийсэн [17] арга зүйн дагуу туршуул шувуудыг (sentinel bird) зэрлэг усны шувуудтай нууранд байршуулан тандалт судалгаа хийх арга зүйг туршив. Судалгааг хийхдээ шувууны сангас түүж, зэрлэг шувуу барилгүй тусгай торон хашаанд байрлах шувуудаас дээжийг цуглуулсан. Энэхүү судалгааны явцад зөөврийн, TacoMini-Automatic Nucleic Acid Extraction System (GeneReach, Taiwan), РОСКИТ-Micro Duo Nucleic Acid Analyzer (GeneReach, Taiwan) [18] тээвэрлэх болон хэрэглэхэд хялбар

олон улсад хүлээн зөвшөөрөгдсөн мэдрэг чанар өндөртэй төхөөрөмжийг ашигласан. Эдгээр төхөөрөмжийг ашиглахад тусгай лабораторийн орчин шаардагдахгүй хөдөө хээрийн нөхцөлд цахилгаан үүсгүүрт холбон дээжний RNA-г ялгаж ПГУ-р үр дүнг гарган авах боломжтой юм. Ингэснээр дээжний чанар алдагдахгүй, үр дүнг шууд гарган авах давуу талтай юм. Бидний судалгаагаар хяналтын бүлгийн 5 шувуунаас нийт дээжний 0/45 бүгд сөрөг буюу (0%) туршилтын бүлгийн 15 шувууны 12-13 (80-86,6%) нийт дээжний 42/104 нь эерэг (40,38%) байгаа нь 2016 онд Хятад улсын Вукси хот, Жиансу мужийн Тайху нууранд тахиа шувуу байрлуулан нийт 3/1623 дээж эерэг (0,18%) (30°55'40"–31°32'58" N, 119°52'32"–120°36'10" E) [19] дүн үзүүлсэнтэй харьцуулбал үр дүн өндөр байна. AIV-н генийн өвөрмөц хэсэг илэрсэн нь сангасны дээжнээс вирус илрүүлэх зэрэг бусад арга зүйгээс харьцангуй үр дүнтэй гэж үзэх боломжтой байна. Энэ нь сангас түүх, зэрлэг шувуу барих зэргээр цаг алдахгүй, туршуул шувуудаас дээж авч шинжилсэн нь давуу талтай байв. Гэвч судалгааны эхэн үед буюу 7-8 сард вирусын илэрц харьцангуй бага байсан боловч 9 сараас эхлэн вирус болон эсрэг биенийн илэрц нэмэгдсэн нь цаг агаарын хүйтэн сэрүүн нөхцөл нүүдлийн шувуудын дундах AIV халдвар дамжих тархах замд голлох нөлөөтэй байх боломжтойг илтгэж байна.

## ДҮГНЭЛТ

Туршуул шувуу байрлуулан орчин үеийн техник тоног төхөөрөмжийг ашиглан тандалт судалгаа хийснээр бид цуглуулсан дээжний чанарыг алдагдуулалгүй газар дээр нь үр дүнг гарган авах боломжтой юм. Мөн цаг хугацаа, эдийн засгийн

хувьд хэмнэлттэй, үр дүн сайтай зэрэг олон давуу талтай тул туршуул шувуу байршуулах арга зүйг манай орны нөхцөлд тохируулан улам боловсронгуй болгох, үргэлжлүүлэх нь чухал ач холбогдолтой юм.

## ТАЛАРХАЛ

Энэхүү судалгааны ажлыг явуулахад туслалцаа үзүүлсэн Мал эмнэлгийн ерөнхий газар, Булган аймгийн Мал эмнэлгийн газар, Ж.Олзбаяр

захиралтай Булган аймгийн Сайхан сумын Угалз сайхан МЭҮН-ийн хамт олонд талархсанаа илэрхийлье.

## АШИГЛАСАН БҮТЭЭЛИЙН ЖАГСААЛТ

- [1] Y. Wu, Y. Wu, B. Tefsen, Y. Shi, and G. F. Gao, “Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11,” *Trends in Microbiology*,
- [2] R. A. Lamb and R. M. Krug, “Orthomyxoviridae: The viruses and their replication.” Lippincott-Raven Press, 1996.
- [3] “Avian Influenza Situation in Mongolia.” [Accessed: 18-Oct-2019].
- [4] D. K. L’vov *et al.*, “[Molecular genetic analysis of the biological properties of highly pathogenic influenza A/H5N1 virus strains isolated from wild birds and poultry during epizooty in Western Siberia (July 2005)].,”
- [5] “Эрдэнэ-Очир Ц., Батчулуун Д., Бодьсайхан Х., Сугар С., Цэрэндорж Ш., Содномдаржаа Р., 2010, Монгол орны нүүдлийн шувууд дах томугийн вирусийн тандах судалгааны тойм, Улсын мал эмнэлэг ариун цэврийн төв лабораторийн бүтээл, 37-38.”
- [6] K. Okazaki *et al.*, “Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia.,” *Arch. Virol.*,
- [7] C. Reed *et al.*, “Characterizing wild bird contact and seropositivity to highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in Alaskan residents,” *Influenza Other Respi. Viruses*,
- [8] A. Globig *et al.*, “Ducks as sentinels for avian influenza in wild birds.,” *Emerg. Infect. Dis.*,
- [9] A. Globig *et al.*, “Ducks as sentinels for avian influenza in wild birds,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 15, no. 10, pp. 1633–1636, Oct. 2009,
- [10] T. Zhao *et al.*, “Novel H7N2 and H5N6 avian influenza A viruses in sentinel chickens: A sentinel chicken surveillance study,” *Front. Microbiol.*,
- [11] “DNA/RNA Extraction Kit User Manual.”
- [12] “Pocket-sized PCR machine | News | Chemistry World.” [Accessed: 18-Oct-2019].
- [13] “(EN) - QuantiTect Probe RT-PCR Handbook - QIAGEN.” [Accessed: 18-Oct-2019].
- [14] E. Spackman and D. L. Suarez, “Type A influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR,” *Methods Mol Biol*,
- [15] “Avian Influenza Portal: OIE - World Organisation for Animal Health.” [Accessed: 18-Oct-2019].
- [16] G. Koh, T. Wong, S. Cheong, and D. Koh, “Avian Influenza: a global threat needing a global solution,” *Asia Pac. Fam. Med.*,
- [17] A. Coman *et al.*, “aiv ab elisa bionote,” *Influenza Res. Treat.*,
- [18] “GeneReach Biotechnology Corp.” [Online]. [Accessed: 18-Oct-2019].
- [19] T. Zhao *et al.*, “Novel H7N2 and H5N6 Avian Influenza A Viruses in Sentinel Chickens: A Sentinel Chicken Surveillance Study,” *Front. Microbiol.*,

## **Avian influenza surveillance in wild birds using sentinel ducks**

**Bayarmagnai Davganyam, Nyamsuren Otgontogtokh, Baljidmaa Batmunkh, Davaasuren Nergui, Ariunaa Tserendorj, Uyangaa Temuujin, Chimedtseren Bayasgalan, Nyamdavaa Guugandaa, Tumenjargal Sharav, Batsuuri Nantsag, Tungalag Chultemdorj, Erdene-Ochir Tseren-Ochir\***

School of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

\*Corresponding author: erkavet@muls.edu.mn

### **ABSTRACT**

We conducted active surveillance for avian influenza virus using sentinel ducks in central region of Mongolia (Khunt lake Saikhan soum, Bulgan province) that major wild bird habitat and outbreak site of H5N1 HPAI in wild birds in Mongolia from 2005 to 2011. Total of 39/104 (37,5%) samples were positive by insulated isothermal PCR (iiPCR) and 42/104 (40,38%) swab samples were positive by real time PCR (qPCR). In addition, AIV antibody detected in 35/104 (33,65%) serum samples tested by AIV NP ELISA kit. These results indicated that sentinel surveillance using domestic birds could be an effective method for avian pathogens including influenza in Mongolia. Enhanced sentinel surveillance in wild bird populations in Mongolia is therefore crucial for the understanding of global AIV transmission and epidemiology.

**Key words:** Duck, virus, immunity, epidemiology, PCR (Polymerase chain reaction)