



Шувууны томуугийн тандах судалгаанд зөөврийн полимеразын гинжин урвалыг ашигласан дүнгээс

О.Нямсүрэн, Б.Балжидмаа, Д.Баярмагнай, 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@mul.s.edu.mn

ХУРААНГУЙ

Шувууны томуугийн тандах судалгаанд зөөврийн (insulated isothermal PCR (iiPCR)) ПГУ-ыг хээрийн нөхцөлд хэрэглэх боломжийг турших зориолгоор 2018 оны 8 сард Булган аймгийн Сайхан сум Хунт нуурны орчмоос цуглуулсан нийт 686 (сангас; $n=682$, арчдас; $n=4$) усны шувуудын дээжинд хээрийн нөхцөлд шинжилгээ хийж үр дүнг гаргав. Гарсан үр дүнг лабораторид үр хөврөлт өндгөнд өсгөвөрлөх, ЦНУ болон RT-PCR-р баталгаажуулж илэрсэн вирусын НА дэд хэвшлийг нуклеотидын дараалал тогтоох аргаар тодорхойлов. Хээрийн нөхцөлд 137 багц дээжинд (4-6 дээж = 1 багц) iiPCR-р хийсэн илрүүлэх шинжилгээгээр шувууны томуугийн вирусын генийн өвөрмөц хэсэг 3 багц дээжинд илрэв. Лабораторид вирус өсгөвөрлөх болон ЦНУ-р шинжлэхэд 9 багц дээж эерэг гарсанаас шувууны томуугийн вирус ($n=4$) болон шувууны парамиксовирус ($n=5$)-ын халдвар байгааг RT-PCR-р баталгаажуулж, гений дараалал тогтоох аргаар шувууны томуугийн H3 ($n=3$) болон H2 ($n=1$) дэд хэвшил болохыг тодорхойлов. iiPCR-аар шувууны томуугийн вирусын генийн өвөрмөц хэсэг илэрсэн 3 багц дээжийн үр дүн лабораторийн шинжилгээний дүнгээр баталгаажсан нь энэхүү хэрэглэхэд хялбар, мэдрэг чанар өндөр, түргэвчилсэн аргыг тандах судалгаанд хэрэглэх боломжтойг илтгэж байна.

Түлхүүр үг: нүүдлийн шувуу, тандалт, үүсгэгч илрүүлэх, дэд хэвшил

ОРШИЛ

Томуу (influenza) нь бүх төрлийн шувуу, сүүн гэжээлтэн амьтад болон хүн өвчлүүлдэг амьсгалын замын халдварт өвчин юм. Шувууны томуу (Avian influenza) нь Ортомиксовирусийн язгуурт хамаарагддаг [1] ба гадаргуугийн хоёр уургийн эсрэгтөрөгчийн хэв шинжээр нь гемагглютинин (H)18, нейраминидаза (N)-ийн 11 өөр дэд хэвшилд ангилдаг [2]. Усны шувууд нь ялангуяа нугасны овгийнхон тухайн вирусын байгалийн тээгч эзэн болж өвчний тархалт, үүсгэгчийн хувьсалд голлох нөлөө үзүүлдэг байна [3]. Нүүдлийн шувуудын Ази, Номхон далайн бүсийн гурван томоохон зам Монгол орны нутаг дэвсгэр дээгүүр дайран өнгөрдөг ба шувуу судлаачдын судалгаагаар манай оронд 391 зүйлийн нүүдлийн шувууд ирж өндөглөх, зусах болон дамжин нүүдэллэдэг байна [4]. Монгол улс нь шувууны томуугийн вирусын хөдлөл зүй болон зэрлэг шувуудад тандалт судалгаа хийхэд тохиромжтой газрын нэг юм [5]. Түүнчлэн манай орны тэжээвэр шувуудын тоо толгой бусад орныхтой харьцуулахад харьцангуй бага учраас

зөвхөн нүүдлийн шувуудын дунд эргэлдэж байгаа томууг судлах боломжтой байдаг. Монголд 2005 оноос эхлэн шувууны томууг тандах судалгааг тодорхой хэмжээгээр хийж байгаа боловч дээж цуглуулах газар байршлын хувьд хол, дээж тээвэрлэх нөхцөл зэргээс хамаараад илрэх хувь нь харьцангуй бага байдаг. Иймд хэрэглэхэд хялбар, мэдрэг чанар өндөр, түргэвчилсэн аргыг тандах судалгаанд нэвтрүүлэх шаардлагатай тул бид уг судалгаанд зөөврийн (iiPCR) ПГУ-ын аргыг хээрийн нөхцөлд хэрэглэх боломжийг туршиж үзлээ. Энэхүү (iiPCR) ПГУ нь (Rayleigh-Benard)-ын конвекцын дагуу халаалтын нэг эх үүсвэрийг капилляр хоолойн ёроолд ашигладаг. Энгийн ПГУ-аас халаалт болон хөргөлтийн хэд хэдэн мөчлөг нь ялгаатай бөгөөд энэ нь урвалын хугацааг багасгадаг [6]. (iiPCR) ПГУ нь флуоресцент цацрагт суурилсан (520нм/550нм) гэрлээр нуклейн хүчлийг илрүүлдэг. Энэхүү судалгаагааны зорилго нь хээрийн нөхцөлд оношилж, гарсан үр дүнг лабораторит баталгаажуулахад оршино.

СУДАЛГААНЫ АРГА ЗҮЙ

Дээж. Булган аймгийн Сайхан сумын Хунт нуурын (GPS 48°26'05.5"N 102°34'40.4"E) эрэг орчмын болон арлаас шинэхэн сангасны нийт 682 дээж, 4 арчдас цуглуулан (Table 1) зөөврийн 4⁰C-н хөргөгчинд хийж шинжлэх хүртэл хадгалав.

Нуклейн хүчил ялгах. Судалгаанд авсан сангасны дээжийг 5-р багцлаад Drop-N-Go Extraction цомог (GeneReach, Taiwan) ашиглан үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу RNA ялгасан. Drop-N-Go Extraction цомог нь нуклейн хүчлийг богино хугацаанд цэвэршүүлдэг. Энэ цомог нь авсаархан загвартай, тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, цахилгаан хангамж хэрэглэх шаардлагагүй учраас давуу талтай юм [7].

Үүсгэгч илрүүлэх шинжилгээ. Томуугийн вирус илрүүлэх шинжилгээг POKKIT-Micro Duo Nucleic Acid Analyzer зөөврийн багаж (GeneReach, Taiwan) болон Pockit Influenza A detection цомгийг (GeneReach, Taiwan) ашиглан үйлдвэрлэгчийн зааврийн дагуу хээрийн нөхцөлд iiPCR-р хийж гүйцэтгэв.

Вирус өсгөвөрлөх. Нийт 682 сангас болон 4 арчдасны дээжийг багцлан 137 дээжнээс тарьц

бэлтгэн, 9-11 хоногтой хөврөлжүүлсэн өндөгний аллантойсын хөндийд 0.2 мл-ээр халдааж, 37°C-д 72 цаг өсгөвөрлөөд тахианы цусны улаан эс (red blood cell, RBC)-ийн 10%-ийн уусмал ашиглан хавтант цус наалдуулах урвал (ЦНУ), (plate HA test)-р вирусын илэрцийг тодорхойлов.

Дэд хэвшил тодорхойлох. ЦНУ-р эерэг гарсан дээжинд шувууны томуугийн вирус оношлох зорилгоор хөврөлжүүлсэн өндөгний аллантойсын шингэнээс RNA-г (INTRON Viral DNA/RNA extraction kit, South Korea) цомгийн зааврын дагуу ялган, Omniscript IV, reverse transcription kit, (QIAGEN, Germany) цомог болон universal (uni12F, uni13R) [8] праймер ашиглан cDNA бэлтгэв. Бэлтгэсэн cDNA-г темплейт болгон, HA-1, NS-890-R праймер ашиглан буцаан хувиргах полимеразын гинжин урвал (БХ-ПГУ) [8]-аар олшруулав. БХ-ПГУ-р эерэг гарсан дээжийг шувууны томуугийн вирус гэж оношлон ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг HA дэд хэвшлийг тодорхойлох зорилгоор БНСУ-ын Macrogen компани (Seoul, Republic of Korea)-д илгээж, нуклеотидын дараалалыг тогтоов.

Table 1

Samples collection location, numbers and birds information			
Аймаг/сум	Нуурын нэр	Шувууны төрөл/зүйл	Дээжний тоо
Булган аймаг, Сайхан сум	Хунт нуур	Гангар хун / <i>Cygnus cygnus</i> / Зэрлэг нугас / <i>Anas platyrhynchos</i> / Хондон ангир / <i>Tadorna ferruginea</i> / Мөнгөлөг цахлай / <i>Larus argentatus</i> /	686

СУДАЛГААНЫ ҮР ДҮН

Үүсгэгч илрүүлэх шинжилгээ. Усны шувуудын сангасны нийт дээжийг тав таваар багцлан, Drop-N-Go Extraction цомог (GeneReach, Taiwan)

ашиглан РНХ ялган, зөөврийн (iiPCR) ПГУ-аар зааврын дагуу шинжлэхэд 3 багц дээж (нийт дээжний 0.4%) эерэг үр дүн үзүүлэв. (Figure 1)



Figure 1. Result of 3 samples positive in POKKIT (Micro Duo Nucleic Acid Analyzer) insulated isothermal PCR (iiPCR)

Вирус өсгөвөрлөх. Шувуудын сангасны нийт багцалсан дээжинд тарыц бэлтгэн хөврөлжүүлсэн өндгөнд халдааж, хавтант ЦНУ-р шалгахад 9 багц дээж эерэг дүн үзүүлэв. ЦНУ-ын дүнг нотлох

зорилгоор эерэг дээжүүдэд буцаан хувиргах полимеразын гинжин урвалаар шинжилгээ хийхэд 4 эерэг үр дүн нь үзүүлэв.

Table 2

Байршил	Дээжний тоо	Багцалсан тоо /4-6/	Results of assay			Дэд хэвшил
			iiPCR	ЦНУ	Үр дүн RT-PCR (НА ген)	
Эрэг орчмын (сангас)	527	105	2	8	3	H2(n=1), H3(n=2)
Арал орчмын (сангас)	155	31	1	1	1	H3 (n=1)
Арчдас	4	1	ND	ND	ND	ND
Нийт	686	137	3	9	4	ND

Нуклеотидын дараалал тодорхойлох. Томуугийн вирусын гадаргуугийн НА генийн нуклеотидын дараалал тогтоож, NCBI мэдээллийн сангийн Blast хайлтын системийг

ашиглан Генбанкны мэдээлэлтэй харьцуулахад томуугийн вирусын H3(3), H2(1) дэд хэшилтэй 98-99%-р хамааралтайг тодорхойлов. (Figure 2)

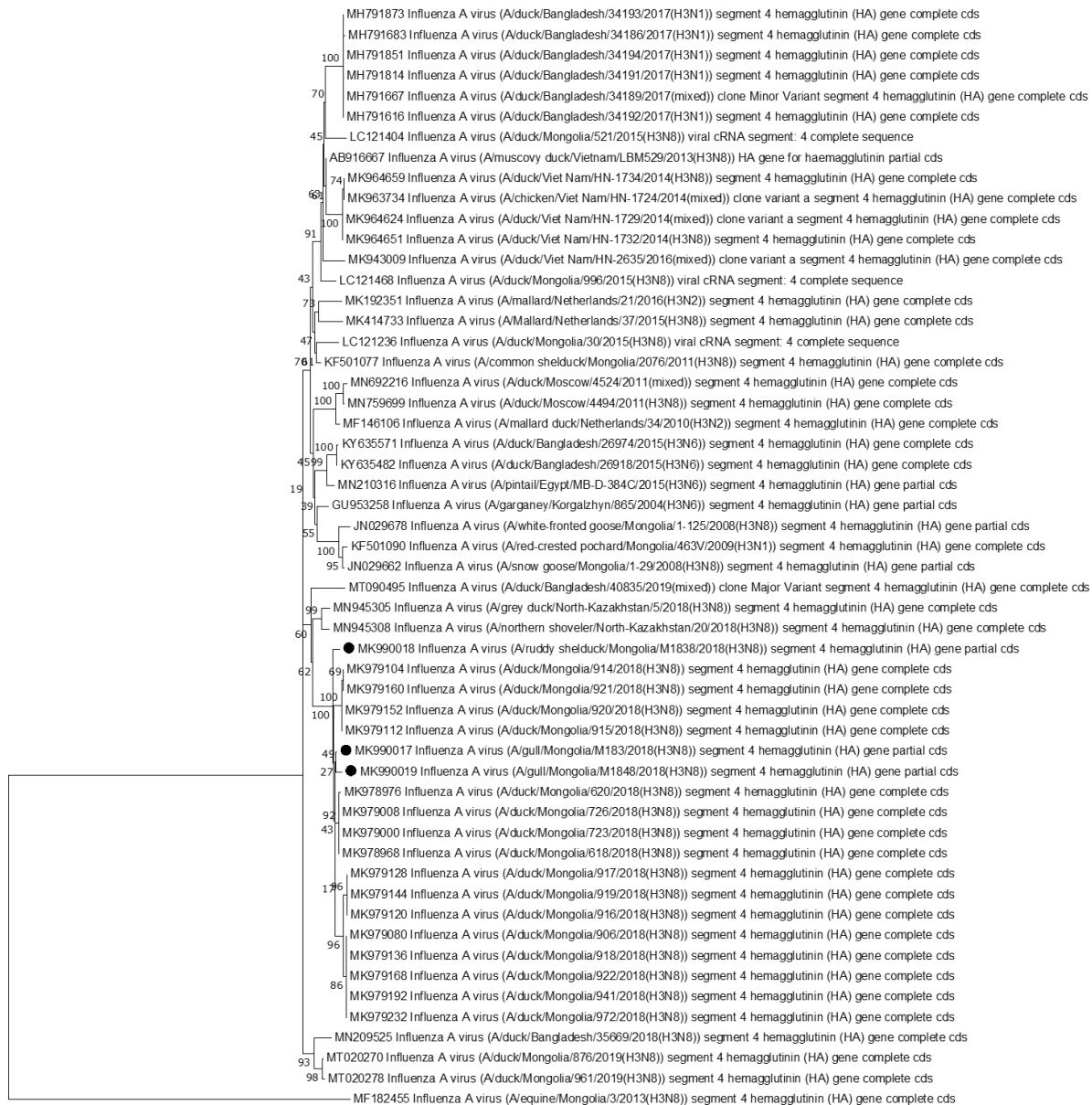


Figure 2. Result of migratory birds avian influenza phylogenetic tree analysis in Khunt lake Saikhan soum Bulgan province

ШҮҮН ХЭЛЭЛЦЭХҮЙ

Томуу (influenza) нь дэлхий нийтэд цар тахал байдлаар тархаж хүн, мал амьтныг өвчлүүлдэг амьсгалын замын цочмог явцтай халдварт өвчин юм. Иймд уг өвчний тархалтаас урьдчилан сэргийлэх зорилгоор дэлхийн улс орон бүр идэвхитэй, идэвхигүй тандалт судалгааг олон аргаар оношилж гүйцэтгэсээр байна. Манай орны хувьд нүүдлийн шувуудын ирэх, буцах үед нь шувууд олноор цуглардаг нуур орчмоос сангас, зарим усны шувуудыг тор ашиглан барьж арчдасны дээж аван лабораторит хүргэж шинжилгээ хийдэг. Энэ нь цаг хугацаа, зардал их шаардсан төдийгүй дээжний хадгалалт, тээвэрлэлтийн горим алдагдах дээжний чанарт сөргөөр нөлөөлөх зэрэг сул талуудтай байна. Эдгээрийг үндэслэн бид тандах судалгаандаа Тайван улсад үйлдвэрлэсэн зөөврийн РОСКИТ-Micro Duo Nucleic Acid Analyzer (insulated isothermal PCR (iiPCR)) ПГУ-ыг ашиглан хээрийн нөхцөлд үүсгэгч илрүүлэн гарсан үр дүнгээ лабораторт баталгаажуулсан. Энэхүү зөөврийн ПГУ (iiPCR)-ыг дэлхийн зарим улс орнууд мал амьтны төрөл бүрийн халдварт болон халдваргүй өвчнийг оношлоход өргөн хэрэглэж байна. Тухайлбал, ДЭХХАА (FAO), АНУ, БНХАУ, Тайван, Вьетнам, Хонконг зэрэг орнуудын их сургуулийн судлаачид хамтран томуугийн судалгаанд (iiRT-PCR) ПГУ-ыг хээрийн баазад байрлуулан үүсгэгчийг амжилттай тодорхойлсон

ДҮГНЭЛТ

Хээрийн нөхцөлд зөөврийн (iiPCR) ПГУ-аар шинжилсэн үр дүн ерөнхийдөө лабораторийн шинжилгээний үр дүнтэй ойролцоо буюу дүйж байгаа нь энэ аргыг шувууны томуугийн тандах

нь үр дүнтэй гэж дүгнэсэн байна[11]. Мөн БНХАУ-д CPV-2-ийн оношлогоог болон (iiPCR) ПГУ ашиглан тандалт судалгааг хийснээр парвовирусын халдвар авсан нохойд газар дээр нь дээж авч түргэн оношлон, тусгаарлах арга хэмжээ авах, эмчилгээг шууд хэрэгжүүлэх зэрэгт үр дүнтэй нөлөө үзүүлсэн нь батлагдсан байна[9]. Мөн АНУ сүүлийн үед адууны томуу (EIV)-ийн генийн судалгаанд (iiRT-PCR) ПГУ-ыг ашигласнаар бусад оношилогооны аргуудаас илүү хурдан илрүүлэх, хянахад найдвартай гэж үзсэн ба тус улсад адууны томуу (EIV)-ийн халдварлалт 24-48 цагийн дотор өндөр өвчлөл үүсгэдэг учраас (iiRT-PCR) ПГУ-аар түргэн оношлож байгаа нь халдвар тархахаас урьдчилан сэргийлэх, хянах арга хэмжээг хэрэгжүүлэх, өвчний эдийн засгийн үр нөлөөг бууруулах чухал ач холбогдолтой байна[10]. (iiPCR) ПГУ-аар шувууны томуугийн вирусын генийн өвөрмөц хэсэг илэрсэн 3 багц дээжийн үр дүн лабораторийн шинжилгээний дүнгээр баталгаажсан нь энэхүү зөөврийн хэрэглэхэд хялбар, мэдрэг чанар өндөр, түргэвчилсэн аргыг тандах судалгаанд хэрэглэх боломжтой гэсэн өмнөх судалгаануудын үр дүнтэй нийцэж байна. Зөөврийн ПГУ нь хөдөө орон нутагт өвчнийг оношлох, эрт илрүүлэхэд үр дүнтэй байгаа нь бусад улс оронд хийгдсэн судалгаанаас харагдаж байна.

судалгаанд өргөн хүрээтэй нэвтрүүлэх боломжтойг илтгэж байна. Цаашид нарийвчилсан судалгаа хийх шаардлагатай.

АШИГЛАСАН БҮТЭЭЛИЙН ЖАГСААЛТ

- [1] “Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication | Request PDF.” .
- [2] S. Tong *et al.*, “New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses,” *PLoS Pathog.*, vol. 9, no. 10, Oct. 2013.
- [3] J. D. Brown and D. E. Stallknecht, “Wild bird surveillance for the avian influenza virus.,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 436, pp. 85–97, 2008.
- [4] S. H. Newman *et al.*, “Eco-virological approach for assessing the role of wild birds in the spread of avian influenza H5N1 along the central Asian flyway,” *PLoS One*, vol. 7, no. 2, pp. 1–12, 2012.
- [5] E. Spackman *et al.*, “Characterization of low pathogenicity avian influenza viruses isolated from wild birds in Mongolia 2005 through 2007,” *Virol. J.*, vol. 6, pp. 2–9, 2009.
- [6] H. F. G. Chang *et al.*, “A thermally baffled device for highly stabilized convective PCR,” *Biotechnol. J.*, vol. 7, no. 5, pp. 662–666, 2012.
- [7] “GeneReach Biotechnology Corp.(瑞基海洋生物科技股份有限公司) .” .
- [8] E. Hoffmann, J. Stech, Y. Guan, R. G. Webster, and D. R. Perez, “Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses,” *Arch Virol*, vol. 146, no. 12, pp. 2275–

- 2289, 2001.
- [9] R. P. Wilkes *et al.*, “An insulated isothermal PCR method on a field-deployable device for rapid and sensitive detection of canine parvovirus type 2 at points of need.,” *J. Virol. Methods*, vol. 220, pp. 35–8, Aug. 2015.
- [10] U. B. R. Balasuriya, “Type A influenza virus detection from horses by real-time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR.,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1161, pp. 393–402, 2014.
- [11] K. Inui *et al.*, “A field-deployable insulated isothermal RT-PCR assay for identification of influenza A (H7N9) shows good performance in the laboratory,” *Influenza Other Respi. Viruses*, Sep. 2019.

Preliminary result of insulated isothermal PCR (IIPCR) for avian influenza surveillance

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

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

*Corresponding author: erkavet@muls.edu.mn

ABSTRACT

In avian influenza (AI) surveillance, total 686 (fecal n=682, swabs n = 4) samples of migratory birds were collected on August 2018 in Saikhan soum, Bulgan aimag, and these samples were analyzed by portable insulated isothermal (iiPCR) PCR in the field condition. Total of 137 pool of samples (each pool contains 4-6 samples) were analyzed by iiPCR and 3 pools of sample were found positive. Total of 9 pool of samples were positive by virus isolation with embryonated egg inoculation and HA analysis and 4/9 were identified as an avian influenza and 5/9 were identified as a Paramyxovirus by RT-PCR analysis. After sequencing, H3 (n=3) and H2 (n=1) subtypes were determined. iiPCR positive 3 pools were confirmed by egg inoculation and HA analysis and it shows that this newly applied method was able to use to the surveillance of avian influenza due to usefulness and high sensitivity.

Key words: migratory birds, surveillance, identify, subtype