

ҮХРИЙН ЦУСАН ХАЛДВАРЫГ ОНОШЛОХ ШУУД ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТ УРВАЛЫН ФЛУОРЕСЦЕНТ ИЙЛДЭСИГГЭ БЭЛТГЭН СОРЬСОН ДҮН

Б.Энхтуул, Ц.Лундаа, Б.Нарангэрэл, Д.Ганболд, Б.Сарантуяа, Ж.Эрдэнэбаатар

Мал эмнэлгийн хүрээлэн

aguallena@yahoo.com

ХУРААНГУЙ

*Цусан халдвар нь грам сөрөг жижиг савханцар *Pasteurella multocida* төрлийн нянгаар үүсгэгддэг, дэлхийн олон улс оронд өргөн тархсан цочмог халдварт өвчин бөгөөд өртөмтгий амьтан нь үхэр, хонь. Манай орны хангай, тал хээрийн бүсэд зонхилон гарч улс орны эдийн засагт ихээхэн хохирол учруулдаг халдварт өвчин юм.*

Цусан халдварыг эмнэл зүйн шинж тэмдэг, нян судлалын аргаар оношлодог. Нян судлалын аргаар оношлоход харьцангуй их цаг хугацаа зарцуулдаг, лабораторийн нөхцөлд, нян судлалаар мэргэшсэн хүн хийх шаардлагатай зэрэг сул талтай учир өвчнийг түргэн оношлох шинэ аргыг боловсруулах шаардлага тавигдаж байна.

*Үхэр, хонины цусан халдварыг оношлох дархан туяарах өвөрмөц ийлдсийг *P. multocida* №18 В омгоор туулайд хэт дархлаажуулалт хийн, хэт дархлаат ийлдэс гарган авч, түүнээсээ иммуноглобулин G-г тунадасжуулан, цэвэршүүлж флуорес- цейн изотиоционат (ФИТЦ)-тай холбон гаргаж авсан.*

Цочмог хэлбэрээр өвчилж, үхсэн үхэр, хонины эмгэгт материал болон түүнээс өсгөвөрлөсөн өсгөвөрөөс түрхэц бэлтгэн уг оноилуураар /дархан туяарах ийлдсээр/ үйлчлүүлэн харахад мэдрэг, өвөрмөц чанартай болох нь тодорхойлогдов.

ТҮЛХҮҮР ҮГ: Үхрийн цусан халдвар, *B. multocida*, дархлаат глобулин, флуоресцент ийлдэс

ОРШИЛ

Цусан халдвар нь грам сөрөг жижиг савханцар *Pasteurella multocida* төрлийн нянгаар үүсгэгддэг, дэлхийн олон улс оронд өргөн тархсан цочмог халдварт өвчин бөгөөд өртөмтгий амьтан нь үхэр, хонь юм. Цусан халдвар өвчин дэлхийн олон улс оронд өргөн тархсан өвчин бөгөөд манай оронд лабораторийн шинжилгээний аргаар анх 1950 онд оношлогдож, 1978 оноос судалгаа шинжилгээний ажил хийгдэж эхэлсэн. Судалгаанаас үзвэл уг өвчин манай улсын хангай, тал хээрийн бүсийн аймгуудад зонхилон гарч, олон тооны мал хорогдож, улсын эдийн засагт ихээхэн хохирол учруулсаар байна. Ялангуяа өндөр уулын бүсийн сарлаг өвөл, хаврын улиралд олноор өвчилж хорогддог.

Үхрийн цусан халдварыг эпизоотологи, өвчилсөн малын эмнэлзүйн шинж тэмдэг, эмгэг анатомийн хувиралт, нян судлалын зэрэг аргуудаар тус тус оношлодог.

Нян судлалын арга нь цусан халдварыг оношлох хамгийн найдвартай, олон улсад түгээмэл хэрэглэгддэг арга боловч малын эмгэгт дээжийг

лабораторит шинжлэхэд хамгийн багадаа 24 цаг шаарддаг. Цусан халдвар нь цочмог, хурц халдварт өвчин бөгөөд богино хугацаанд олон мал өвчлөн хорогдох магадлал өндөр тул оношийг түргэн тавьж, шаардлагатай арга хэмжээг өвчний голомтонд цаг алдалгүй хэрэгжүүлэх шаардлага зайлшгүй тавигддаг. Иймээс цусан халдварыг түргэн хугацаанд оношлох шинэ аргыг боловсруулах зорилт тавин судалгаа шинжилгээний ажлыг хийж гүйцэтгэлээ. Австрийн эрдэмтэн Келер, Зидентопф нар 1908 онд анхны люминесцентны микроскопыг зохион бүтээсэн ба Келер (1938), Хайтингер ба Швертнер нар (1939), люминесцентний үзэгдэх гэрлийн цэнхэр, нил ягаан өнгөнүүдийг нээсэн байна. 1940 онд Америкийн эрдэмтэн А.Кунс флуоресцент үүсгэдэг будгаар тэмдэглэсэн эсрэг биеийг нян судлалын шинжилгээнд хэрэглэх санааг сэдэж флуоресценц 4-изотиоцианат будгийг гаргаж авчээ. А.Кунс, Х.Крич, Р.Джонс (1941) нар Иммунофлуоресценцийн аргаар түргэн оношлох аргыг боловсруулжээ.

СУДАЛГААНЫ ХЭРЭГЛЭГДЭХҮҮН АРГА ЗҮЙ

Судалгаанд Халдварт өвчин дархлал судлалын лабораторид хадгалагдаж байгаа үхрийн цусан халдварын үүсгэгч хоруу чанар бүхий *P. multocida* №18В хэвшлийн омгийг ашиглан оношлуурыг бэлтгэв.

Омгийн шинж чанарыг шалгах болон туулайд хэт дархлаа хийх

Pasteurella multocida №18В хэвшлийн омгийг судалгаанд ашиглахын өмнө түүний өсгөвөржилт, хэлбэр зүй, будагдалт, биохимийн шинж чанарыг шалгав.

Цусан халдварын үүсгэгч *P. multocida* №18В омгийг 10%-ийн ийлдэстэй мах пептоны агар /МПА/-г 18-20 цаг 37⁰С-г өсгөвөрлөж ургалтын хэв шинжийг үзсэн ба өсгөвөрөөс түрхэц бэлтгэн граммын аргаар будаг хэлбэр зүй, будагдах байдлыг тодорхойлов. Биохимийн шинжийг глюкоз, маннит, сахароз, арабиноз, галактоз зэрэг сахарын орчингууд дээр

шалгав. Шинж чанар нь баталгаажсан омгийг МПАгарт суулгаж, 37⁰С хэмийн дулаан тогтоогуур 20 цаг тавьж өсгөвөрлөв.

Агарын гадаргуугаас нянгийн массыг 0,3%-ийн формалин агуулсан физиологийн уусмалаар угаан авч өтгөрүүлгийг нь Браун №7-тай харьцуулан ойролцоогоор 200 млр\мл байхаар тохируулан 37⁰С хэмийн дулаанд 48 цаг тавьж омгийг идэвхигүйжүүлэв. Үүний дараа цийдмэгийн ариун цэврийг мах пептоны агар /МПА/, мах пептоны шөл /МПШ/ зэрэг тэжээлт орчингуудад суулган, тасалгааны хэм болон 37⁰С-г 3-4 хоног тавьж шалгав. Хэт дархлаат ийлдэс бэлтгэхдээ 2,5 кг-аас жинтэй, эрүүл туулай хэрэглэв. Тарилтыг графикийн дагуу Фрейндийн бүрэн бус хүчлүүртэй хольсон 200 сая нянгийн эсийн цийдмэгээр нурууны арьсан дор /6 хэсэг газар/ тарив. Дараагийн удаад /хүснэгт-1/ нянгийн эсийн тоог өсгөн нэмэгдүүлсэн тунгаар 7 хоногийн зайтайгаар хураагуур судсаар тарив.

Хүснэгт 1

Туулайд хэт дархлаа хийсэн схем

№	Хугацаа	Хаана тарих	Нянгийн эсийн тоо Тарих тун
1	Эхний өдөр	Арьсан дор	1мл /200сая
2	7 хоног	Хураагуур судсаар	0,2 мл /200сая
3	7 хоног	Хураагуур судсаар	0,5 мл /500
4	7 хоног	Хураагуур судсаар	1,0 мл /1млр
5	7 хоног	Хураагуур судсаар	1,5 мл /1,5млр
6	7 хоног	Хураагуур судсаар	2 мл /млр

Сүүлийн тарилга хийснээс хойш 4 хоногийн дараа цус авч ийлдсийг 1:2-1:32 хүртэл шингэлэлт хийж нэвчин тунадасжуулах урвал тавьж таньцыг тогтоов.

Ийлдэс ялган, флуоресцент ийлдэс бэлтгэх

Өндөр таньцтай туулайг цусалж ийлдсийг ялган авав. Цусан халдварын үүсгэгчээр хэт дархлаа хийсэн туулайн ийлдсээс дархлаат глобулиныг ялгахдаа сульфат аммоны ханасан уусмал, физиологийн уусмал, зэргийг 33%-ийн харьцаагаар тооцон уургийг тунадасжуулж тунасан массаа 10мл фосфат бамбайн уусмал /ФБУ/-д уусгаж, сульфат аммоны ханасан уусмалын эсрэг, ФБУ-ыг өдөрт 3 удаа солих замаар 72 цагийн турш диализ хийв.

Уургийн дээжийг аффинитив хроматографийн аргаар цэвэршүүлэв. Үүний тулд 3см³ протейн G гель бүхий колонкийг ашиглан шүүж, задрагуудыг спектрофотометрийн 280 nm долгионы уртад хэмжиж өндөр нягттай задрагуудыг нэгтгэн авч 12%-ийн гель акриламид бүхий электрофорезаар цэвэршилт болон уургийн концентрацийг тодорхойлов.

Цэвэршүүлсэн иммуноглобулин Жи /IgG/-г флуоресцент изотоцианат /ФИТЦ/-тай холбож, холбогдсон IgG-г холбогдоогүй ФИТЦ-аас ялгахын тулд сефадекс G-25 гелеер шүүж, цэвэршүүлэв.

Цэвэршүүлсэн дархлаат глобулиныг спектрофотометрийн 495, 280 нм долгионы уртад 1:20, 1:40 шингэлэлтээр хэмжин уураг, флуоресцент бодисын молийн харьцааг дараах томъёогоор бодож тодорхойлов.

$$\text{Молийн харьцаа} = 2.87 \times A_{495} / A_{280} - 0.35 \times A_{495}$$

Флуоресцент дархлаат глобулины мэдрэг болон өвөрмөц чанарыг тодорхойлох

Бэлтгэсэн ийлдсийн мэдрэг чанарыг *P. multocida* №18В болон *P. multocida* 796 хэвшлийн омгууд дээр, өвөрмөц чанарыг үүсгэгчийн хэлбэр зүй, хэмжээний хувьд ижил төстэй бруцеллөз, адууны ям зэрэг өвчний үүсгэгчүүд дээр тус тус шалгав.

Дээрхи үүсгэгчидийн өсгөвөрөөс түрхэц бэлтгэн - 30⁰С хүртэл хөргөсөн метанолд 15 минут бэхжүүлж, ФБУ-аар угаан хатаав.

Флуоресцент ийлдсээ 1:2, :1:4, 1:8, 1:16-харьцаагаар шингэлж бэлтгэсэн түрхэц дээрээ 30 мкл-ээр дусааж 37 хэмийн чийгтэй, харанхуй орчинд 1 цаг тавьж урвалыг явуулав.

Түрхэцээ 0.01М фосфат бамбайн уусмал /ФБУ/-аар угааж, рН9 ФБУ-д 90%-иар бэлтгэсэн глицерин дусааж бүрхүүл шилээр хий оруулахгүйгээр бүрхэж люминесцентийн микроскопын иммерсийн системээр харав.

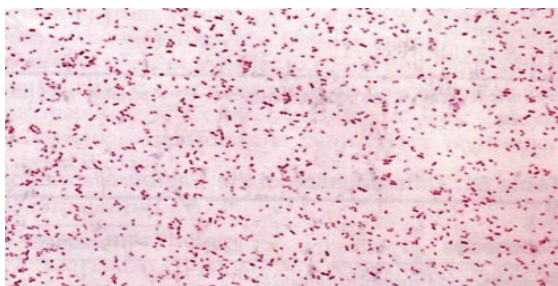
СУДАЛГААНЫ АЖЛЫН ҮР ДҮН

1. *B. multocida* №18В омгийн

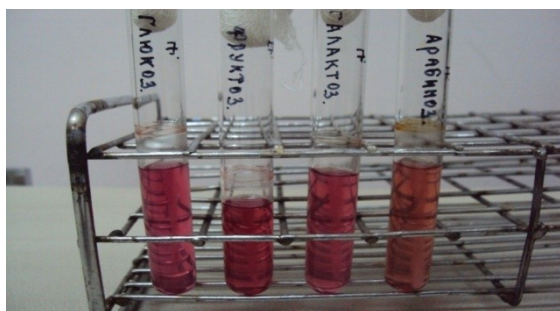
өсгөвөрлөгдөх байдлыг хатуу болон шингэн тэжээлт орчинд шалгахад МПШөлөнд жигд булингартаж, тунадас үүсгэн ургаж байсан ба МПАгарт тэгш захтай, дугуй хэлбэртэй усны дусал шиг тунгалаг колони ургасан байв.

2. Омгийн хэлбэр дүрс, хэмжээ

будагдах байдлыг түрхэц бэлтгэн грамын аргаар будаж харахад грамм сөрөг кокк хэлбэрийн жижиг савханцар харагдаж байв. /Зураг-№1/ 3. Биохимийн идэвхийг богино алаг эгнээнд гиссийн орчинд шалгахад глюкоз, фруктоз, галактоз, арабиноз зэрэг сахаруудыг хүчил үүсгэн задалж байв /Зураг 2/.

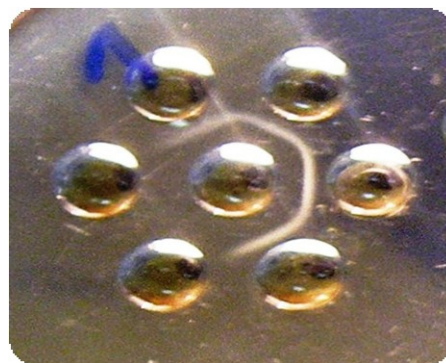


1-р зураг. *P. multocida* омог грамын аргаар будагдсан байдал 100 х 25

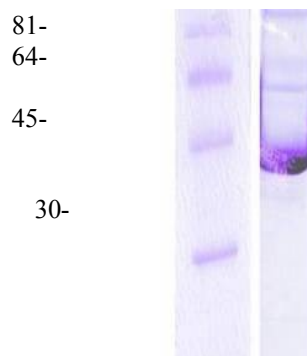


2-р зураг. *P. multocida* №18В омгийн биохимийг үзсэн

P. multocida №18В омгоор тарьж дархалсан туулайн цусны ийлдсэнд НТУ тавихад урвалын таныц 1:16 байв.



3-р зураг. НТУ тавьсан дүн: 1- 1:2, 2- 1:4, 3- 1:8, 4- хяналтын эерэг ийлдэс, 5- Сөрөг ийлдэс



4-р зураг. Дархлаат уургийн цэвэршилт, молекул жинг SDS-PAGE 45кДа байна

Үхрийн цусан халдварыг оношлох шууд иммунофлуоресцент урвалын дархлаат глобулин (IgG) нь 15,68мг/мл, конъюгатын FITC/Protein-ны харьцаа 1,2 байв.

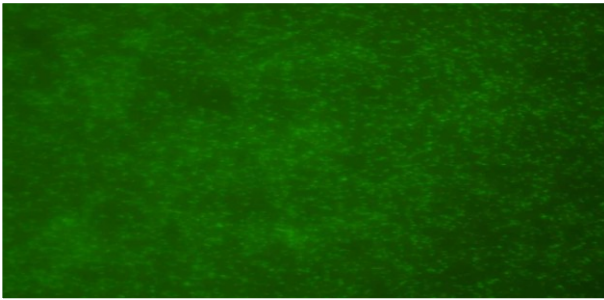
Флуоресцент дархлаат глобулины таныц, өвөрмөц чанарыг тодорхойлсон дүн.

Судалгааны дүнгээс үзэхэд сарлагийн үхрийн эмгэгт дээжнээс ялгасан *P. multocida* №18 болон *P. multocida* 796 өсгөвөр нь флуоресцент дархлаат глобулины 1:2-ын шингэлэлтэнд 4 чагт, 1:4-ийн шингэлэлтэнд 3 чагт, 1:8-ын шингэлэлтэнд 2 чагт 1:16 шингэлэлтэнд 2 чагтын үнэлгээ өгч байна.

Харин бруцеллёзын өсгөврөөс бэлтгэсэн түрхцэнд дархлаат глобулины 1:2-ын шингэлэлтэнд 1 чагт, 1:4, 1:8, 1:16-ийн шингэлэлтэнд сөрөг үнэлгээ өгөв. Дархлаат глобулины таныц 1:8 байв.

Хүснэгт 2

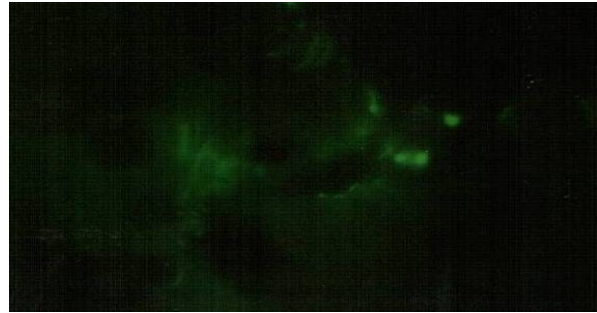
Шингэлэлт	1:2	1:4	1:8	1:16
<i>P. multocida</i> №18	++++	+++	++	++
<i>P. multocida</i> 76	++++	+++	++	++
<i>Br. abortus</i>	+	-	-	-



5-р зураг. *P. multocida* омгоос түрхэц бэлтгэн флуоресцент ийлдсээр үйлчлүүлж люминесцент микроскопоор харсан

Мөн зориудаар халдвар хийж үхсэн хулганы эмгэгт материалд гисто-химийн (2010) боловсруулалт хийж

флуоресцент дархлаат глобулинаар будаж Люминесценцийн микроскопоор шинжлэхэд *P. multocida* байгаа нь тодорхойлогдов.



6-р зураг. *P. Multocida* 18В омгоор халдвар хийсэн хулганы эмгэгт эрхтэнд үйлчлүүлж люминесценц микроскопоор харсан

ШҮҮН ХЭЛЭЛЦЭХҮЙ

Цусан халдварын флуоресцент ийлдсээр өсгөвөр болон эмгэгт материалаас хийсэн түрхэцийг үйлчлүүлж, люминесценц микроскопоор харахад нянгууд харанхуй дэвсгэр дээр хурц ногоон өнгөөр туяаран харагдаж байна.

Харин флуоресцент ийлдсийн өвөрмөц чанарыг бруцеллэз, ям зэрэг өөр төрлийн бактерийн өсгөврөөс бэлтгэсэн түрхэцийг энэ ийлдсээр үйлчлүүлж харахад ямар нэгэн нян харагдахгүй байна.

Цусан халдвараар зориудаар халдвар хийсэн хулганы эмгэгт материалыг гисто-химийн боловсруулалт хийж флуоресцент ийлдсээр үйлчлүүлж люминесценц микроскопоор харахад нянгууд нь тодорч харагдаж байв.

Бидний бэлтгэсэн флуоресцент ийлдэс нь өвөрмөц чанартай, цусан халдварын үүсгэгчийг 2 цагийн дотор илрүүлэн оношлох боломжтой болох нь тогтоогдлоо.

Энэ бүгдээс үзвэл бидний бэлтгэсэн ийлдсийг ашиглан цусан халдварыг түргэн оношлох боломжтой юм.

Хэвлэл мэдээллээс үзэхэд олон улсын судлаачид цусан халдвар өвчин дээр уг оношлуурыг хийсэн судалгаа олдсонгүй. Харин бусад халдварт өвчнийг түргэн оношлох оношлуур хийгдэн үйлдвэрлэлд хэрэглэгдэж байна.

ДҮГНЭЛТ

Судалгааны дүнгээс харахад Иммунофлуоресцент урвалын флуоресцент ийлдсийг ашиглан цусан халдварыг (2 цагийн дотор) түргэн хугацаанд оношлох боломжтой байна.

АШИГЛАСАН ХЭВЛЭЛ

1. Bunei Suito and Masakazu Matsumoto
2. "Puzification of a Protective Antigen from a Saline extract of Pasteurella multocida" (1982). "Infection and immunity" 1218-1226
3. Takuo Sawada uand 1994.
4. Comparison of indirech IHAT, GDPT, ELISA, for defection of serum antibodies to Pas. Multocida in naturally and expecimentally infected rabbits Laboratory Animal Hand books London
5. OIE Terrestrial Manual 2004 537 - 548. НАЕМОРРНАГИС СЕПТИКАЕМИА
6. OIE Terrestrial Manual 2008 737-754. НАЕМОРРНАГИС СЕПТИКАЕМИА
7. Ц. Лундаа, А. Ёндондорж, Б. Сарантуяа "Малын цусан халдвар" 2009 он.
8. Малын халдварт өвчний оношлогоонд фермент холбоот эсрэг биемийн болон иммунофлуоресценцийн урвалыг ашиглах нь. Гарын авлага. Мал эмнэлгийн хүрээлэн, дархлаа судлалын төв. 2006 он. Хуудас 36.
9. "Люминесцентная диагностика инфекционных болезней животных" – К. Ф. Бусыгин Москва-1975

**RESULT OF FLUORESCENCE SERUM OF DIRECT IMMUNOFLUORESCENCE TEST FOR DIAGNOSIS
CATTLE HAEMORRHAGIC SEPTICEMIA**

Haemorrhagic septicaemia (HS) is acute infectious disease, distributed broadly in the world, caused by gram negative bacillus, Pasteurella multocida. Its occurrence can have devastating consequences for the economy of a country and cattle and sheep are more susceptible for this disease. It is occurred in mountainous and steppe area of Mongolia, especially among yak population.

Popular diagnostic method of haemorrhagic septicemia (HS) is specific clinical signs and bacteriological analysis. However, it has some disadvantages, which spend a lot of time, only specialist can do in the bacteriology laboratory. Therefore, it is requiring to develop new method to rapid diagnose the disease.

Hyper immune sera from rabbit, immunized with strain P.multocida №18 B, were used for purification of specific IgG and conjugated with FITC. This conjugate was sensitive and specific for detection of P.multocida in the direct slide smears of P.multocida culture and pathological materials from naturally infected animals.