



Гахайн сонгомол мялзангийн шалгалтын омгийн генийн молекул биологийн судалгааны дүнгээс

С.Өсөхгэрэл¹, Ш.Мөнхдүүрэн², Д.Содгэрэл¹, Г.Уудамсайхан¹, Т.Буяннэмэх³, Р.Одбилэг^{3*}

¹-Мал эмнэлгийн эмийн сорилт, баталгаажуулалтын улсын лаборатори, Улаанбаатар, Монгол Улс

²-Улсын мал эмнэлэг ариун цэврийн төв лаборатори, Улаанбаатар, Монгол Улс

³-Мал эмнэлгийн хүрээлэн, ХААИС, Улаанбаатар, Монгол Улс

*Холбоо барих хаяг: rodbileg@gmail.com

ХУРААНГУЙ

Гахайн сонгомол мялзан өвчин нь гахайн аж ахуйд ихээхэн хохирол учруулдаг халдварлалт өндөртэй гоц халдварт өвчин юм. Манай орны хувьд гахайн сонгомол мялзангаас сэргийлэх амьд вакциныг Биокомбинатад үйлдвэрлэдэг ба тухайн вакцины идэвхит чанарыг амь сорилын аргаар гахайнд омгийг халдаах замаар тодорхойлдог. Энэхүү вакцины шалгалтын “Унгар” омгийн хоруу чанарыг тодорхойлох зорилгоор торойд зохих тунгаар халдварлуулахад омгийн эмгэг төрүүлэх чанар өндөртэй байв. Вакциныг шалгах зорилгоор ашиглаж байгаа омгийн 5`UTR генийн нуклеотидын дараалалыг Генбанкны бүртгэлд байгаа гахайн мялзангийн омгуудтай харьцуулан судалж үзэхэд Eustrup, 39, cF114, Koslov, India зэрэг омгуудын дараалалтай адил төсөөтэй (98-100%) болох нь тогтоогдов.

ТҮЛХҮҮР ҮГ: амь сорил, полимеразын гинжин урвал, нуклеотидын дараалал

ОРШИЛ

Сүүлийн жилүүдэд манай орны гахайн аж ахуйнуудад вирусын халдварт өвчнүүдийн гаралт, тархалт халдварлалтын түвшин нэмэгдэж, малын эрүүл мэнд, улс орны эдийн засагт ихээхэн хохирол учруулсаар байна. Иймд гахайн сүргээ халдварт өвчнөөс эрүүлжүүлж, хүнсний аюулгүй байдлыг ханган улмаар экспортын бүтээгдэхүүнийг нэмэгдүүлэх, чанартай, өртөг зардал багатай вакцин хэрэглэх талаар төр засгаас хөрөнгө хүч гаргаж байгаа болно [1]. Манай улсын гахай, шувууны тоо толгой жилээс жилд өсч байгаа тооцоолол байна. Тухайлбал: Монгол улсын үндэсний статистикийн хорооны 2016 оны байдлаар нийт гахайн тоо, толгой 31489, 6339 мэгж, 2017 онд нийтдээ 31870 гахай тоологдсон байна [10]. Энэхүү судалгааны ажил нь “Монгол мал” үндэсний хөтөлбөр,

Монгол улсын шинжлэх ухаан технологийг 2007-2020 онд хөгжүүлэх мастер төлөвлөгөө (2008), Монгол улсын Инновацийн тогтолцоог хөгжүүлэх хөтөлбөр (2008) болон “Хөдөө өж ахуйн шинжлэх ухааныг хөгжүүлэх мастер төлөвлөгөө” (2010-2020) – ний стратеги зорилтын “Мал, амьтны өвчний оношлогоо, эмчилгээний болон эм, биобэлдмэлийн технологийн судалгаа” зэрэг хууль, эрх зүйн баримт бичгээр засгийн газрын олон шийдвэр, хөтөлбөрийн хүрээнд шинжлэх ухааныг хөгжүүлэх, түүний ололтыг ашиглах, тухайн салбарт үйлдвэрлэл, инноваци, бизнесийн үйл ажиллагааг эрчимжүүлэх, үндэсний технологи, үйлдвэрлэлийг дэмжих, эрх зүйн орчныг бий болгох талаарх төрийн цогц бодлоготой уялдаж байна. Гахайн сонгомол

мялзан (ГСМ) өвчинтэй тэмцэх гол аргуудын нэг нь урьдчилан сэргийлэх зорилгоор вакцинжуулах арга хэмжээ юм. Манай улсын хувьд гахайн сонгомол мялзан өвчнөөс сэргийлэх зорилгоор Биокомбинат УТҮГ-ын үйлдвэрлэдэг “Гахайг мялзан өвчнөөс сэргийлэх амьд вакцин”-ыг ашиглаж байна. Вакцины омгийн хувьд генийн 1.1 хамаарах C /China/ омог байдаг [3]. Энэхүү вакцины чанар, идэвхийг тодорхойлохдоо Мал эмнэлгийн, эмийн бэлдмэлийн сорилт, баталгаажуулалтын лаборатори (МЭЭСБУЛ)-ийн ГСМ-ын шалгалтын

“Унгар” омгийг ашигладаг байна. Вакцины идэвхит чанарыг амь сорилын аргаар сорьж, баталгаажуулахад олон улсад хүлээн зөвшөөрөгдөн баталгаажсан шалгалтын омог ашиглах нь чухал юм. Тиймээс МЭЭСБУЛ-д хэрэглэгдэж байгаа гахайн сонгомол мялзангийн “Унгар” омог нь урьд өмнө нь молекул биологийн судалгаа хийгдэж байгаагүй учраас бидний хийсэн судалгааны ажил нь мал эмнэлгийн салбарт чухал ач холбогдолтой төдийгүй вакцины чанарын сорилт, баталгаажуулалтын асуудлыг шийдвэрлэх ач холбогдолтой юм.

СУДАЛГААНЫ ХЭРЭГЛЭГДЭХҮҮН, АРГА ЗҮЙ

ГСМ өвчний “Унгар” омгийг сэргээхдээ МЭЭСБУЛ-ийн омог сэргээх заавар болон ХААИС-ийн туршилтанд амьтан хэрэглэх ёс зүйн хяналтын зөвлөлийн шийдвэрийн (МЭБАУС-18/02/14) дагуу “Амь сорил-биоаюулгүйн лаборатори”-т хийж гүйцэтгэв. Энэхүү омгийг сэргээж таньцлахдаа 4 сарын настай, эр, 25 кг амьдын жинтэй, сүүлийн 30 хоногийн хугацаанд ямар нэгэн вакцин болон антибиотик олгож байгаагүй, урьд өмнө нь гахайн мялзангийн вакцинд хамрагдаж байгаагүй, эрүүл 2 толгой торойг тухайн өвчнөөр тайван бүс нутгаас сонгон авсан болно. Туршилтын 2 толгой торойг

омог сэргээхээс 2 хоногийн өмнө урьдчилан туршилтын байранд дасгасан болно. Үүний дараа шалгалтын омгийг торойн хүзүүг гурав хуваасны дундах хэсгийн булчинд шалгалтын “Унгар” омгоос тарьж халдаав. Омог сэргээлтийн явцад өдөр бүр халдвар хийсэн торойн биеийн халууныг бүртгэж, ажиглалт явуулан, омгийн материал ялган, задлан шинжилгээгээр баталгаажуулав. Омгийн дээжийг “TIANamp Virus RNA kit” цомгийг ашиглан ялгав. ГСМ-ын вирусын 5’ UTR генийн хэсгийг илрүүлэх буцаан хувиргах ПГУ-ын (Праймер 324,326) шинжилгээ хийв.

Хүснэгт 1

ПГУ –ын горим			
	Циклийн тоо	Температур	Хугацаа
1-р шат	1	45	30 sec
	1	94	5 min
		94	30 sec
		50	30 sec
2-р шат	40	72	60 sec
	1	72	5 min
3-р шат	1	4	-

Полимеразын гинжин урвалын бүтээгдэхүүнээс нуклеотидын дараалал тогтоох: Полимеразын гинжин урвалын бүтээгдэхүүнийг цэвэршүүлэн template DNA ялган авч олшруулан дээжийг а-е хүртэл давтан хийж, хатаасны дараа хөргөгчинд тавьж хонуулаад 10 мкл HiDi нэмээд 98 хэмд

3 минут байлгаад Hitachi маркын 3130 xl Genetic Analyzer машинаар Sequencing хийв. Үр дүнг Codon Code Alligner программыг ашиглан уншуулан, 246 bp урттай нуклеотидыг PUBMED-ийн BLAST системийг ашиглан харьцуулалт хийв.

ҮР ДҮН

ГСМ-ын шалгалтын “Унгар” омгийг сэргээж таньцлах туршилтанд ашиглагдаж буй 2 толгой торойн биеийн халуун болон биеийн ерөнхий байдлын үнэлэж, тэмдэглэл хөтлөн, өдөр бүр торойн биеийн халууныг бүртгэж, ажиглалт явууллаа. Ажиглалтын 9 дэх хоног дээр туршилтын торойн биеийн ерөнхий байдал муудаж, хоол тэжээлдээ дургүй болж, чацга алдсан, чихний ар, суга, цавиар улаан тууралт гарсан байдалтайгаар 13 хонож, үхлүүт болсон учир зориудаар цуслан нядлав. Омгийн материалыг ялган авч хөлдөөгчинд хөлдөөж хадгалав. Туршилтын

2 толгой торойг задлан шинжилгээнд оруулж өвчний эмгэг хувиралыг тодорхойлов.

Задлан шинжилгээний дүн: Уушгинд цус харвалтууд үүссэн, зүрхэнд цус харвалт үл мэдэг үзэгдсэн, дэлүү уртаашаа сунасан байдалтай цэглэг цус харвалтуудтай, зах ирмэгүүд нь хөрөөний ир шиг болсон, тунгалгийн зангилаа томорч хүрэн улаан өнгөтэй болсон, ходоод гэдсэнд цочмог урвал явагдаж салст үрэвссэн, гүвдрүү үүссэн, бүдүүн гэдэсний салст бүрхүүлд мялзангийн бундуу (чумная бутан) үүссэн байдалтайгаар гахайн сонгодог мялзангийн хэв шинжийг тод үзүүлж байлаа.



1-р зураг. Лимфийн зангилаанд үүссэн товруу



2-р зураг. Шулуун гэдсэнд үүссэн CSF-ийн цус харвалт



3-р зураг. Дэлүүнд үүссэн цусан шигдээс

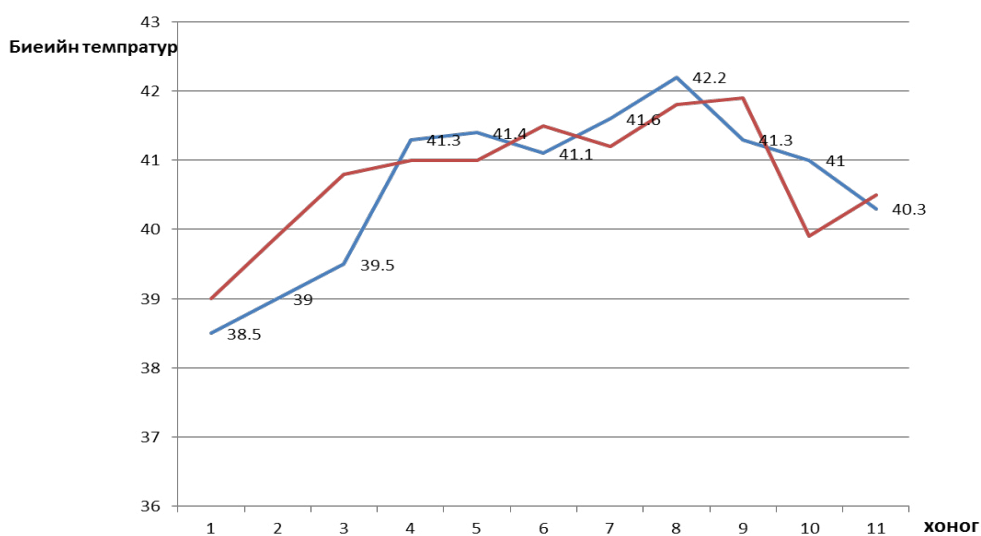


4-р зураг. Туршилтын өвчилсэн торой

Хүснэгт 2

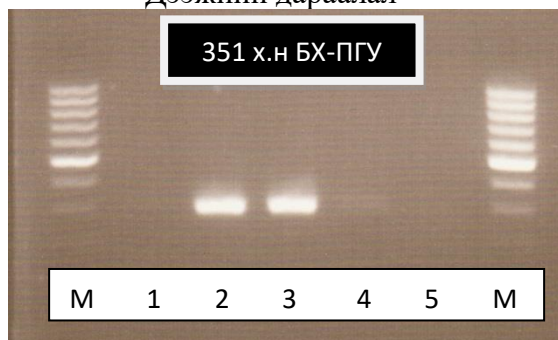
Туршилтын 2 толгой торойн биеийн халууны бүртгэл

Д/д	Амьтны төрөл	Торойн биеийн амь халуун (°C) хоногоор												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	Торой №1	38.5	39.0	39.5	41.3	41.4	41.1	41.6	42.2	41.3	41.0	40.3	40.1	40.2
2	Торой №2	39.0	39.9	40.8	41.0	41.0	41.5	41.2	41.8	41.9	39.9	40.5	39.9	39.8



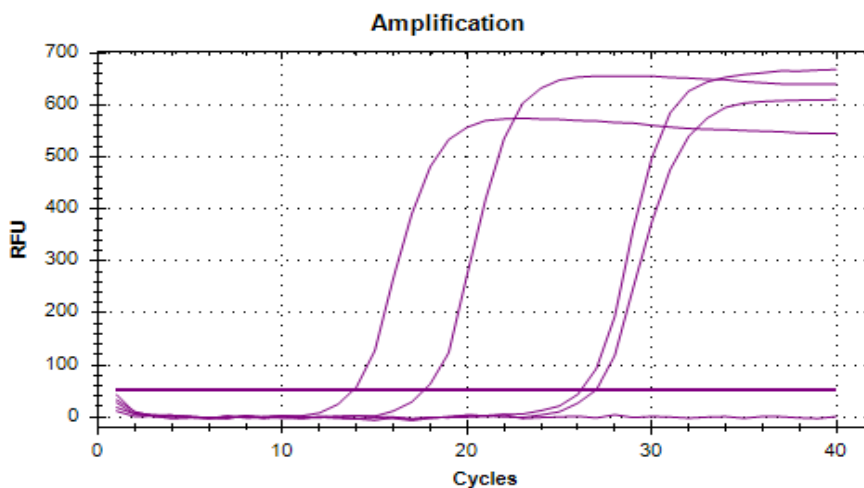
4-р зураг. Туршилтын өвчилсөн торойн биеийн халуун

Дээжийн дараалал



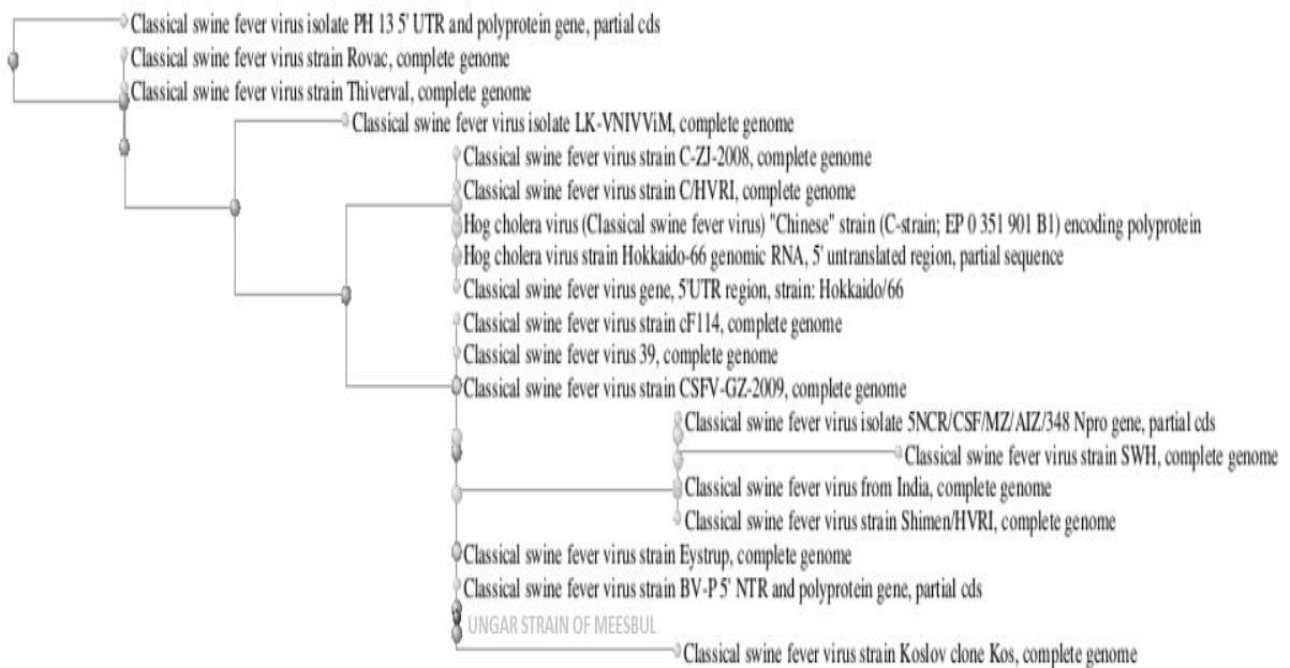
1.	CSF 5 dpi 2015.11.21 - weak pos
2.	CSF 5 dpi Dec 03 /symptoms/ - pos
3.	CSF blood 2016 - pos
4.	Pos Control /IAEA/ - weak pos
5.	Neg Control /N.F.Water/ - neg

5-р зураг. БХ-ПГУ зурган үр дүн



6-р зураг. БЦ-ПГУ-ын зурган үр дүн

Харьцуулан жиших ба ургийн мод байгуулах: Нуклеотидын дараалалыг PUBMED-ийн BLAST болон Mega 6 программыг ашиглан ургийн модны зургийг гаргав. МЭЭСБУЛ-ийн гахайн сонгомол мялзангийн шалгалтын “Унгар” омог



7-р зураг. “Унгар” омгийн удам зүйн хамаарал

ШҮҮН ХЭЛЭЛЦЭХҮЙ БА ДҮГНЭЛТ

Вакцины идэвхит чанарыг тодорхойлох зорилгоор амь сорилд ашиглаж буй шалгалтын омог нь хоруу чанартай байх ба харин амьд вакцины үйлдвэрлэлд ашиглаж байгаа омгийн хувьд хоруу чанаргүй, дархлаа төрүүлэх идэвхитэй байх зарчим мөрдөгддөг. ГСМ-ын омог сэргээлтийн туршилтын дүнгээс харахад халдвар хийснээс хойш 7-9 дэх хоногт өвчлөлийн дээд хязгаарт хүрч халдвар хийсэн торойн биеийн ерөнхий байдал муудаж, хоол тэжээлдээ дургүй болж, чацга алдсан, чихний ар, суга, цавиар улаан тууралт гарсан байдалтайгаар өвчний шинж тэмдэг тод илэрч байлаа. Мөн задлан шинжилгээний дүнгээс үзэхэд “Унгар” омог нь хоруу чанар өндөртэй болохыг харуулж байна. Туршилтын торойд илэрч буй клиник шинж тэмдэг, задлан шинжилгээний үр дүн нь Энэтхэгийн судлаач Parveen Kumar, Vikramaditya Urmanu and Pronab Dhar нарын ГСМӨ-ний үүсгэгчийн судалгааны үр дүнтэй дүйж байна [14]. Энэхүү судалгааны ажил нь МЭЭСБУЛ-т байгаа “Унгар” омгийн хоруу чанар, молекул биологийн судалгааг

хийж, “Гахайг мялзан өвчнөөс сэргийлэх амьд вакцин”-ы идэвхит чанарын үзүүлэлтийг баталгаажуулж байгаагаараа чухал ая холбогдолтой юм. Учир нь олон улсын, үндэсний фармакопей болон Дэлхийн мал амьтны эрүүл мэндийн байгууллагын (ОИЕ) зөвлөмж, гарын авлагад тус вакцины идэвхит чанарын сорилт, шинжилгээнд баталгаажуулах зорилгоор “Амь сорилын арга (Challenge tests)”-ыг хэрэглэхэд хоруу чанар өндөртэй олон улсын референсе омгийг ашиглаж эзэн амьтан дээр туршдаг. Манай орны хувьд вакцины идэвхит чанарыг МЭЭСБУЛ-т амь сорилын аргаар эзэн амьтан (торойд)-д “Унгар” омгоор халдаах замаар тодорхойлдог. ГСМ-ын “Унгар” омгийн молекул биологийн судалгаа анх удаа хийгдэж байгаа нь вакцины үйлдвэрлэлийн С омог болон сүүлийн үед гарч буй гахайн мялзан өвчний үүсгэгчийн генийн дараалал, ген банкны бүртгэлтэй харьцуулах нь энэхүү өвчинтэй тэмцэх ажилд чухал хувь нэмэр үзүүлнэ. Одоогоор Биокombинатад үйлдвэрлэдэг “Гахайг мялзан өвчнөөс сэргийлэх амьд вакцин”-ыг удам

зүйн хувьд 1.1 бүлэгт хамаарах С омгийг ашиглан үйлдвэрлэж байгаа ба 2007-2015 онд гарсан гахайн мялзан өвчний 14 тохиолдолд вирусын удам зүйн хамаарлын шинжилгээг вирусын 5'UTR генийн хэсгийн 242-243 хос нуклеотидын дарааллыг харьцуулан гаргасан дүн нь генийн 2-р бүлэгт хамаарч байсныг УМЭАЦТЛ-ийн судлаач Э. Базаррагчаа, Ш. Мөнхдүүрэн бусад судлаачдын судалгааны шинжилгээний үр дүнд байдаг [3]. “Унгар” омгийн хувьд 1973 онд МЭЭСБУЛ-т Унгар улсаас шилжүүлэн өгсөн байдаг. ГСМ-ын “Унгар” омгийн 5'UTR генийн нуклеотидын

дараалалыг (sequencing) Генбанкны бүртгэлд байгаа гахайн мялзангийн омгуудтай харьцуулан судлахад Eustrup, 39, cF114, Koslov, India зэрэг омгуудын дараалалтай 98-100% ойролцоо байгаа нь бидний судалгааны дүнгээс харагдаж байна. Цаашдын судалгаанд энэхүү шалгалтын омгийн нуклеотидын бүтэн дараалалыг (sequencing) хийлгэх зорилт тавин, үр дүнг тодорхойлон баталгаажуулахаар Тайваний Пиндуны шинжлэх ухаан, технологийн их сургуулийн Мал амьтны вакцины технологийн хүрээлэнд дээжээ (cDNA) явуулав.

ТАЛАРХАЛ

Энэхүү судалгааны ажлыг хийхэд ихээхэн туслалцаа үзүүлсэн МЭЭСБУЛ, УМЭАЦТЛ, МЭХ-ийн Вирус судлалын болон Молекул генетикийн лабораторийн хамт олонд,

судалгааны ажлыг санхүүжүүлсэн ШУТ-ын санд чин сэтгэлээсээ баярлаж талархсанаа илэрхийлье.

АШИГЛАСАН МАТЕРИАЛ

- [1] Ц. Базарцэрэн, Б. Болдбаатар “Мал амьтдын вируст өвчин” 2010 он. 1-1 ба 1-2
- [2] Ц. Базарцэрэн, Б. Болдбаатар Мал амьтдын вируст өвчин -3 2003 он
- [3] УМЭАЦТЛ “Оношлох эрдэм дэвшилтэт арга” 2015, 2016 он,
- [4] Ж.Бэх-Очир, Б.Пүрэвцэрэн, Д.Эрдэнэчимэг “Гахайн мялзан өвчнөөс сэргийлэх вакцины технологийг боловсронгуй болгох “ сэдэвт ажлын 2009-2011 онд гүйцэтгэсэн ажлын тайлан”
- [5] Мал эмнэлгийн холбогдолтой журам заавруудын эмхтгэл УБ хот “Гахайн сонгомол мялзан өвчинтэй тэмцэх заавар” 2012 он
- [6] OIE Terrestrial manual 2014 он /Classical Swine fever/
- [7] Гахайн мялзангийн омог сэргээх заавар
- [8] Монгол орны мал амьтанд шинээр илэрч буй болон сэргэж байгаа зарим халдварт өвчнүүд 2011 он
- [9] www.veterinaryworld.org
- [10] <http://www.1212.mn>
- [11] <http://journals.plos.org>
- [12] [www.plosone .org /Challenge of pigs with Classical Swine Fever Viruses after C-Strain Vaccination Reveals Remarkably Rapid Protection and Insights into Early Immunity/](http://www.plosone.org/Challenge%20of%20pigs%20with%20Classical%20Swine%20Fever%20Viruses%20after%20C-Strain%20Vaccination%20Reveals%20Remarkably%20Rapid%20Protection%20and%20Insights%20into%20Early%20Immunity/)
- [13] Гахайг мялзангаас сэргийлэх амьд вакцин (МЭҮФӨ 11.220-00063-16)
- [14] Parveen Kumar, Vikramaditya Upmanyu and Pronab Dhar “Biological and molecular characterization of classical swine fever challenge virus from India” 16-03-2015

Biological and molecular characterization of classical swine fever challenge virus from Mongolia

Usukhgerel S.¹, Munkhduuren Sh.², Sodgerel D.¹, Uudamsaikhan G.¹, Buyannemekh T.³, Odbileg R.^{3*}

¹State Veterinary Drug Quality Control Laboratory, Ulaanbaatar, Mongolia

²Institute of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

³-State Central Veterinary Laboratory, Ulaanbaatar, Mongolia

*Corresponding author: rodbileg@gmail.com

ABSTRACT

Classical swine fever (CSF) or hog cholera is a highly contagious disease and it causes significant damage to pig farming. The Biocombinat is producing live vaccine for Classical swine fever in our country. We determining vaccine potency test by challenging method in pigs. Virulence "Hungaria" strain injected in piglets with optimal doses. The strain was highly pathogenic. That virulence strain sequencing of 5'UTR genomic region compared with GenBank registered Classical swine fever strains. It was 98-100% consistent with Eystrup, 39, cF114, Koslov and India strains.

KEYWORDS: *challenge test, PCR, sequencing*