



## ЗООНОЗЫН ӨВЧИН СУДЛАЛЫН ҮНДЭСНИЙ ТӨВИЙН ЗАХИРЛЫН ТУШААЛ

2015 оны 06 сарын 25 өдөр

Дугаар 944

Улаанбаатар хот

### Лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар батлах тухай

Захиргааны зөвлөлийн 2015 оны 6 дугаар сарын 11-ний өдрийн хурлын шийдвэрийг үндэслэн “MNS ISO 15189:2008 –Эмнэлгийн лаборатори-Чанар болон ур чадварт тавигдах онцлог шаардлага”, “MNS ISO 17025:2007 –Сорилтын болон шалгалт тохируулгын лабораторийн чадавхид тавих ерөнхий шаардлага” стандартыг хэрэгжүүлэх зорилгоор ТУШААХ нь:

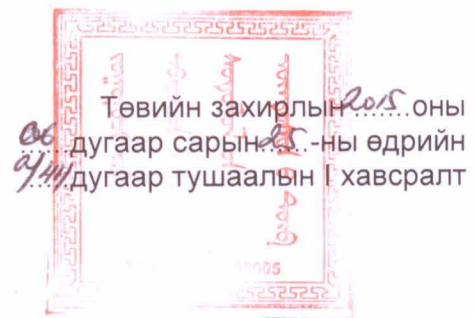
1. Листериоз өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын зааврыг I, Ям өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын зааврыг II, Хуурамч ям өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын зааврыг III, Бруцеллёз өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын зааврыг IV, Хумхаа өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын зааврыг V, Бэтэг өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын зааврыг VI, Анаплазмоз өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын зааврыг VII, Токсоплазмоз өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын зааврыг VIII, Криптоспоридоз өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын зааврыг IX, Татран өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын зааврыг X, Крым Конгийн цусархаг чичрэг өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын зааврыг XI, Денгийн чичрэг өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын зааврыг XII, Бөөрний хам шинжит цусархаг чичрэг өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын зааврыг XIII, Япон энцефалит өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын зааврыг XIV хавсралтаар тус тус баталсугай.
2. Тушаалын хэрэгжилтэд хяналт тавьж ажиллахыг Чанар, хяналт-үнэлгээ, дотоод аудитын алба /Э.Тунгалаг/-т даалгасугай

ЗАХИРАЛ

Н.ЦОГБАДРАХ



0000090



## ЛИСТЕРИОЗ ӨВЧНИЙ ЛАБОРАТОРИЙН ШИНЖИЛГЭЭНИЙ СТАНДАРТ АЖЛЫН ЗААВАР

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Листериоз өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 10
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар-А32	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил
Зориулалт: Листериоз өвчний лабораторийн оношлогоонд	
Хэрэглэх хүрээ: Листериоз өвчний шинжилгээ, оношлогоо, судалгааны лабораториуд	
Боловсруулсан: Д.Ганболд, Х.Тунгалаг	Баталсан, зөвшөөрсөн актын дугаар: ЗӨСҮТөвийн захирлын А/44 тоот тушаалын нэгдүгээр хавсралт
Огноо: 2015 он	Огноо: 2015.06.25
Хэвлүүлсэн: Мэргэжлийн тусламжын алба, Лавлагаа лабораторийн тасаг	

<b>ЭМСЯ-ны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв</b>	
<b>Нэр:</b> Листериоз өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	<b>Хуудасны дугаар/тоо-</b> 10
<b>Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар:</b> Стандарт ажлын заавар-А32	<b>Хүчинтэй хугацаа:</b> 5 жил

#### 1. Зорилго, зарчим:

Шинжлэгдэхүүнд лабораторийн шинжилгээ хийж листериоз өвчний үүсгэгч, түүний ДНХ, өвөрмөц эсрэгбие, эсрэгтөрөгч илрүүлэн, баталгаажуулахад оршино.

#### 2. Хамрах хүрээ:

Листериоз өвчний хүний өвчлөлийн сэжигтэй тохиолдол илэрсэн үед болон байгалийн голомт хяналтын шинжилгээ хийхэд энэхүү стандарт ажлын зааврыг мөрдөнө.

#### 3. Тодорхойлолт:

Үүсгэгч нь *Listeriaceae* овгийн *Listeria* төрлийн *Listeria monocytogenes* юм. *Listeria* төрөл нь 7 дэд зүйлтэй. Үүнээс *Listeria monocytogenes* нь хүн ба амьтанд, харин *L.ivanovii* амьтанд эмгэг төрүүлэмжтэй. Бусад дэд зүйл буюу *L. innocua*, *L.welshimeri*, *L.seeligeri*, *L.murrayi*, *L.grayi* эмгэг төрүүлэх шинж чанаргүй байдаг. Эмгэг төрүүлэх хүчин зүйл нь листериолизин О, фосфатидилинозитол, фосфатидилхолин, металпротеаза, актин А уураг зэрэг болно. Листерийн үүсгэгчид бага зэрэг тахирдуу, шулуун эсвэл мохоо төгсгөлтэй, бие биедээ өнцөглөж эсвэл зэрэгцэж байрласан 0.5-2x0.3-0.5μ хэмжээ бүхий, Грам эерэг, кокк савханцарюм. Бүрээс болон үршил үүсгэхгүй. *Listeria* төрлийн үүсгэгчид гадаад орчинд тэсвэртэй. Сэрүүн буюу бага хэмд тэсвэртэй. Буцалгах болон халдваргүйтгэлийн бодисын үйлчлэлд тэсвэргүй.

#### 4. Сорьц цуглуулах хадгалах, тээвэрлэх

##### 4.1. Шаардлагатай багаж хэрэглэл

- Вакуум хуруу шил, зүүний хамт
- Хайч
- Хямсаа
- Спиртэн дэн
- Сорьц цуглуулах эппендорфын хуруу шил
- Эппендорфын тавиур, \100 үүр бүхий сорьц хадгалах хайрцаг\
- Сорьц зөөвөрлөх сав \гадна талд биологийн аюултай гэсэн тэмдэг наасан байна\

- Сорьцны гадуур сав, мөсөн элемент

##### 4.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл

Био аюулгүй ажиллагааны II зэрэглэлийн лабораторид гүйцэтгэнэ.

##### 4.3. Шинжлэх сорьцын төрөл

*Хүнээс цуглуулах сорьц:*

Жирэмсэн эхчүүдээс-цус, шээс, өтгөн болон шулуун гэдэсний арчдас, үтрээний арчдас

Дархлаа суларсан хүнээс-цус, шээс, тархи-нугасны шингэн, (үений шингэн, гялтан хальсны болон хэвлийн шингэн), үтрээний арчдас

Нян тээгчдээс- өтгөн, шулуун гэдэсний арчдас

Мөн жирэмсний үед болон үр зулбалтын үед эхэс, ургийн эд, ургийн шингэн, зунгаг

Эмгэг судлалын шинжилгээний материал- тархины хэрчим, элэг, дэлүү, тунгалагийн зангилаа

*Агуулагч амьтдаас цуглуулах сорьц:*

Агуулагч амьтад- цус, шээс, сүү, үрийн шингэн, өтгөн, зулбасан үр хөврөл, эхэс

Мэрэгчдийн зэм үхдэлийн цус, чөмөг, цуллаг эрхтэнүүд

Гаднын шимэгч- бүүрэг, хачиг, шумуул

*Гадаад орчны сорьц*

Хөрс, голын ус, бохир ус, ургамал, дутуу боловсруулсан мах, сүү, хүнсний ногоо, гадаад орчны эд зүйлсийн арчдас

#### 4.3.1. Сорьцод боловсруулалт хийх

Хөрсийг листерээр бохирлогдсон байж болох газрын гадаргаас доош 15-20 см орчим гүнээс 3-4 цэгээс 150-200 гр сорьцыг ариутгасан шилэн сав болон цаасан уутанд авна. Авсан хөрсийг физиологийн уусмалд 24 цаг дэвтээн боловсруулсний дараа шинжилнэ.

Ил задгай голын болон бохир уснаас 500 мл хэмжээтэй ариун саванд 2 сорьц авна. Гадаад орчны эд материалаас ариун хөвөн савхыг физиологийн уусмалаар чийглэсний дараа 0.5м<sup>2</sup> талбай хамруулан арчиж авна.

Хүнсний бүтээгдэхүүний сорьцыг ариун саванд авч, физиологийн уусмалаар дэвтээсний дараа шинжилнэ.

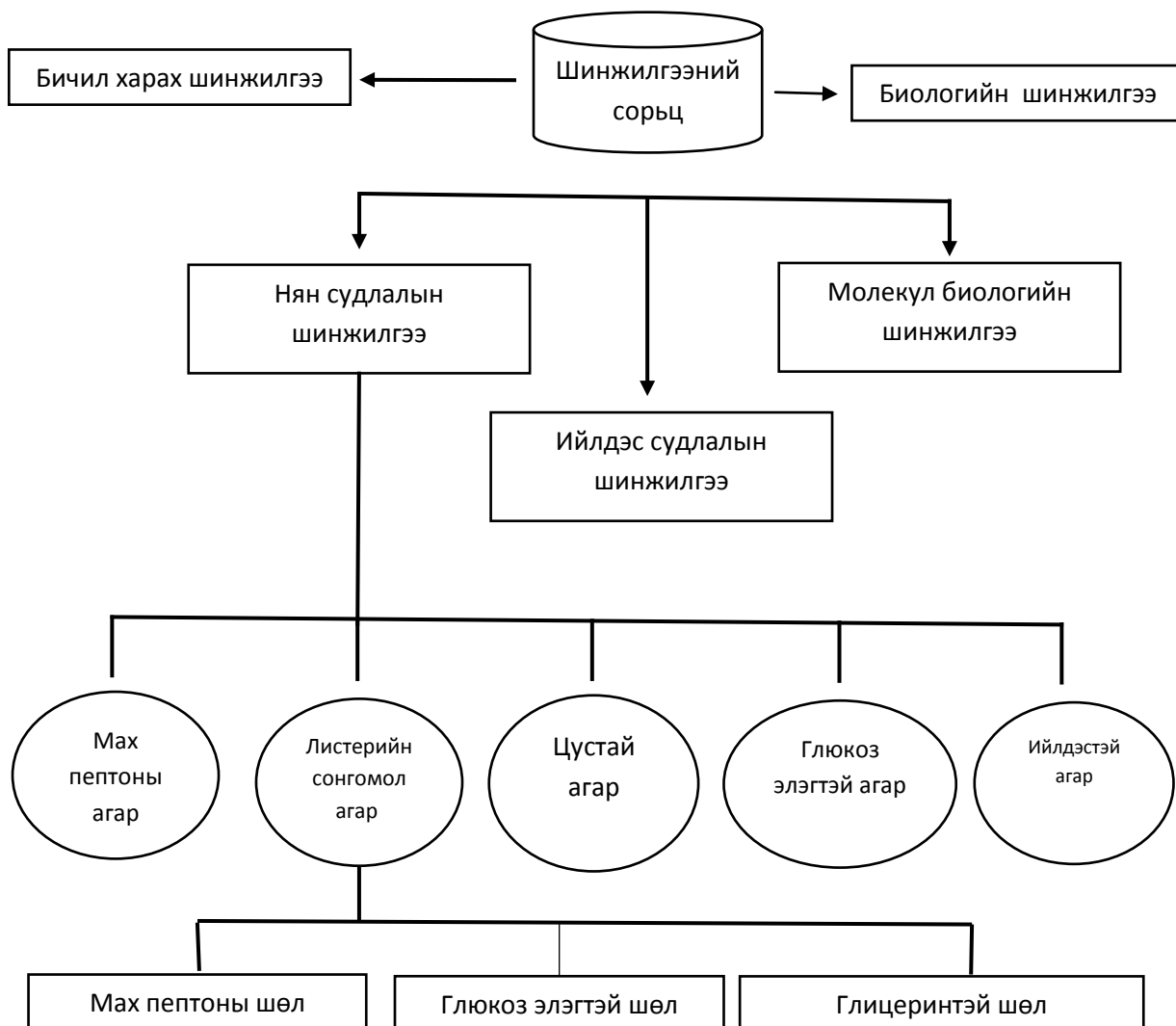
#### 4.3.2. Сорьцийг хадгалах, тээвэрлэх

Шинжилгээний сорьцыг хуурай халуунаар ариутгасан шилэн саванд хийж аль болох хурдан хугацаанд лабораторид хүргэнэ.

Листериоз өвчний сэжигтэй болон халдвартай хүн, мал амьтан, гадаад орчноос дээжилсэн сорьцыг лабораторийн шинжилгээ хийгдэж, онош бүрэн баталгаажих хүртэл 2-оос 8<sup>0</sup> хэмд хадгална.

Сорьцыг хадгалах, зөөвөрлөх, шилжүүлэх, тээвэрлэхэд био аюулгүй ажиллагааны журам, халдвар хамгааллын дэглэмийг баримтална.

### 5. Шинжилгээний аргачлал





### 5.1. Шинжилгээний дараалал

Бичил харах шинжилгээ  
Ийлдэс судлалын шинжилгээ  
Нян судлалын шинжилгээ  
Биологийн шинжилгээ  
Молекул биологийн шинжилгээ

### 5.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл:

Биологийн аюулгүй ажиллагааны II зэрэглэлийн лабораторид ажиллана. Шинжилгээнд ирүүлсэн сорьцыг гадна сав баглаанаас гаргах, бичил харах, хурдавчилсан сорил, ийлдэс судлал, нян судлалын шинжилгээ, сорьцоос ДНХ ялгах үйл ажиллагааг биоаюулгүй ажиллагааны 2-р зэргийн лабораторид биоаюулгүй ажиллагааны II кабинетад гүйцэтгэнэ. Идэвхгүйжүүлсэн материалд полимеразын гинжин урвал (ПГУ) тавих, электрофорез гүйлгэх, үр дүнг тооцох зэрэг үйл ажиллагааг биоаюулгүй кабинетын гадна цэвэр бокс, ширээн дээр хийх ба нүдний хамгаалалтын шил, нүүрний халхавч, бээлий өмсөж ажиллана.

### 5.3. БИЧИЛ ХАРАХ ШИНЖИЛГЭЭ

#### 5.3.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, будаг урвалж

- Бичил харуур
- Тавиур шил
- Бүрхүүл шил
- Грамын будаг, урвалж
- Наац бэхжүүлэх холимог
- Иммерсоны тос

#### 5.3.2. Бичил харах шинжилгээ

Грамын аргаар будах:

- Бэхжүүлсэн наацыг генцианвиолетын будгаар 1 минут будна.
- Усаар угаана.
- Люголын уусмалаар 30 секунд будна.
- Этилийн 96<sup>0</sup>-ийн спиртээр 20 секунд зайлна.
- Усаар угаана.
- Фуксины будгаар 1 минут будна.
- Усаар угааж, агаарт хатаагаад бичил харуураар харж дүгнэнэ.

#### 5.3.3. Чанарын хяналт

Будаг урвалжын үйлдвэрлэгчээс заасан болон найруулсан хугацаа

#### 5.3.4. Шинжилгээний хариуг дүгнэх

*Listeria monocytogenes* нь бага зэрэг тахирдуу, шулуун эсвэл мохоо төгсгөлтэй, бие биедээ өнцөглөж эсвэл зэрэгцэж байрласан 0.5-2х0.3-0.5μ хэмжээ бүхий, Грам эерэг, кокк савханцар харагдана. Хуучирч удсан өсгөврүүд утас шиг нарийсч, уртсан, Грам сөрөг байж болно. Шөлний наацанд гинжилсэн байрлалтай байна. R хэлбэрийн колони нь Грамын будагт жигд биш будагдах ба урт утаслаг хэлбэртэй байж болно. Тэжээлт орчинд удсан өсгөвөр Грам сөрөг будагдаж болно.

### 5.4. ИЙЛДЭС СУДЛАЛЫН ШИНЖИЛГЭЭ:

#### 5.4.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, оношлуур

- Урвалын хавтан
- Бичил хавтан уншигч
- Бичил хавтан угаагч
- Дулаан тогтоогуур
- Автомат дусаагуур\5-50мкл, 20-200мкл, 50-300мкл, 1000мкл\
- Автомат дусаагуурын хошуу

- Усан ванн

**Оношлуур:**

- Бичил нүхнүүдэд листериозын эсрэгтөрөгч суулгасан хавтан
- Эерэг болон сөрөг хяналт
- Коньюгат
- Сорьц шингэлэгч
- Угаагч уусмал
- Зогсоох уусмал
- Листериозын эсрэгбиеийн улаан эст оношлуур
- Листериозын эсрэгтөрөгчийн улаан эст оношлуур

5.4.2. Ийлдэс судлалын шинжилгээ

Эмнэл зүйн болон гадаад орчны сорьцонд эсрэгтөрөгч хайх цус наалдуулах шууд бус урвалыг эсрэгбиеийн улаан эст оношлуурыг ашиглан тавина.

Өвчтөн болон амьтдын цусны ийлдсэнд өвөрмөц эсрэгбие илрүүлэх фермент холбоот урвал, дархан туяаралт урвал, цус наалдуулах шууд бус урвалыг эсрэгтөрөгчийн улаан эст оношлуурыг ашиглан тавина.

**Цус наалдуулах шууд бус урвал тавих:**

Урвалын шингэлэгч- 1:500 бүхий Твин 80-ыг 100 дахин шингэлнэ.

Улаан эст оношлууруудыг 0.6%-иар тус тус найруулна

Урвал тавих дараалал:

- Урвалыг 3-5 нүдэнд тавих ба бүх нүдэнд шингэлэгчээс 0.05 мл-ийг хийнэ.
- Шинжлэх сорьцноос 0.05 мл-ийг I нүдэнд хийж холино.
- I нүднээс 0.05 мл-ийг авч II нүдэнд шатлан шингэлж сүүлийн нүднээс илүүдлийг асгана.
- Эцсийн нүдийг сөрөг хяналт болгоно.
- Улаан эст оношлуураас (эсрэгбие хайхад эсрэгтөрөгчийн, эсрэгтөрөгч хайхад эсрэгбиеийн) 0.025 мл-ийг бүх нүдэнд дусааж, зөөлөн сэгсэрч холино.
- 37<sup>0</sup> С хэмд 30 минут эсвэл тасалгааны дулаанд 1 цаг байлгасны дараа дүгнэнэ.

**Фермент холбоост урвал: /ELISA урвал/**

Эсгэг холбоост урвалыг оношлуурын зааварт заасны дагуу урвалжыг найруулан тавина. Сорьцыг цомгийн сорьц шингэлэгчээр шингэлнэ.

**Дархан туяаралт урвал:**

Оношлуурын цомгийн зааварт заасны дагуу урвалыг тавина. Үр дүнг дархан туяаралт бичил харуураар харж дүгнэнэ.

5.4.3. Чанарын хяналт

- Оношлуурын таньц
- Оношлуур найруулсан хугацаа
- Оношлуурын үйлдвэрлэгчээс заасан дуусах хугацаа

5.4.4. Шинжилгээний хариуг дүгнэх

Цус наалдуулах шууд бус урвал:

- Шинжилж буй сорьцонд листериоз өвчний эсрэгтөрөгч эсвэл эсрэгбие байгаа тохиолдолд хавтангийн нүдний ёроолоор улаан эс жигд тархаж шүхэр хэлбэрээр суусан байх ба урвалыг “эерэг” гэж дүгнээд +/--ээр тэмдэглэнэ. Эсрэгбиеийн таньцыг ийлдсийн эцсийн шингэрлээр, эсрэгтөрөгчийг эерэг дүнтэй нүдний тоогоор дүгнэнэ. (Ж-нь: ЦНШБУ/+/- 1:80, ЦНШБУ/+/- 3н)

- Харин сорьцонд эсрэгбие, эсрэгтөрөгч байхгүй бол хавтангийн нүдний ёроолд улаан эс бөөгнөрч товч хэлбэрээр тунах ба урвалыг сөрөг гэж дүгнэнэ.
- Урвалд сөрөг шалгуур байх ёстой.

Фермент холбоост урвал:

- Бичил хавтан уншигч машинд хавтанг уншуулж тоон үзүүлэлтийг гаргаж оношлуурын зааварт заасан таслах утгын үзүүлэлттэй харьцуулж дүгнэнэ. Урвалаар листериозын иммуноглобулинМ, G тодорхойлно.

Дархан туяаралт урвал:

- Урвал эерэг тохиолдолд өвөрмөц эсрэгбиеийн гэрэлт өгнө.

## 5.5. *НЯН СУДЛАЛЫН ШИНЖИЛГЭЭ*

### 5.5.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, тэжээлт орчин

- Дулаан тогтоогуур
- Бичил харуур
- Биологийн аюулгүй ажиллагааны кабинет
- Цахилгаан хурилдуур
- Гогцоо шатаагч
- Хөргөгч
- Хуруу шил
- Петрийн аяга
- Нянгийн гогцоо
- Хайч
- Хямсаа
- Хамгаалах өмсгөл

*Тэжээлт орчин:*

- Мах пептоны агар
- Хонины 5%-ийн цустай агар
- Триптоз-фосфатны нитрофуразонтой шөл эсвэл Мюллер Хинтоны агар
- Мах пептоны шөл
- Глюкозтой шөл
- Глюкоз-элэгтэй шөл
- Глицеринтэй шөл
- 1%-ийн глюкоз, 2%-ийн глицерин, 3-5%-ийн ийлдэстэй шөл
- 1%-ийн глюкоз, 2%-ийн глицерин, 3-5%-ийн ийлдэстэй агар
- 1%-ийн глюкоз, 30%-ийн элэгтэй мах пептоны агар
- 1%-ийн глюкоз, 30%-ийн элэгтэй мах пептоны шөл
- Листерийн сонгомол агар
- Листерийн баяжуулагч шөл
- Хромогеник агар

### 5.5.2. Нян судлалын шинжилгээ

Өвчний эхний 7-10 хоногт цус 10 мл, нугасны шингэн 2-5мл-ийг авч 100-150 мл глюкоз, глюкоз-элэгтэй, глюкоз-глицеринтэй шөлөнд суулган 37<sup>0</sup>С-д 24-48 цаг өсгөвөрлөнө.

Эд эрхтэний нухашийг пептоны усаар шингэлж, цустай агар, листерийн сонгомол орчинд суулган 37<sup>0</sup>С-д 24-48 цаг өсгөвөрлөнө.

Өвчтөний баасыг пептоны усаар шингэлж, листерийн сонгомол шөлөнд 9:1 харьцаагаар шингэлэн 37<sup>0</sup>С-д 4 ба 24 цаг ургуулан, ургацаас листерийн сонгомол тэжээлт орчинд суулган 37<sup>0</sup>С-д 24-48 цаг өсгөвөрлөнө.

Хүнсний сорьцыг шинжлэхдээ 25гр-ыг авч жигд булинга болтол нухсны дараа 225 мл листерийн баяжуулах шөлөнд хийж 30<sup>0</sup>С-д 48 цаг өсгөвөрлөнө.

Хромогеник агарт листерийн баяжуулагч шөлний ургацаас суулган 35<sup>0</sup>С-д 24-48 цаг өсгөвөрлөнө.

*Listeria monocytogenes*-ийн ургах тохиромжтой рН 7.2-7.4, хэм нь 30-37<sup>0</sup>С, 4<sup>0</sup>С удаан ургах онцлогтой. 20-25<sup>0</sup>С-д хөдөлгөөнтэй, 37<sup>0</sup>С-д хөдөлгөөн буурдаг.

5.5.3. Чанарын хяналт

- Тэжээлт орчны үйлдвэрлэгчээс заасан хугацаа
- Тэжээлт орчин бэлтгэсэн хугацаа
- Тэжээлт орчны ариун чанар

5.5.4. Шинжилгээний хариуг дүгнэх:

**Хатуу тэжээлт орчинд:** 24-48 цагийн колони нь жижиг (1-2мм), глюкозтой орчинд том хэмжээтэй ургана. “S” хэлбэрээс “R” хэлбэрт шилждэг. “S” хэлбэртэй колони нь гөлгөр гадаргатай, тэгш зах ирмэгтэй, гүдгэр, оройгоороо нягтарсан төвгөр төвтэй, тунгалаг, өнгөгүй эсвэл бага зэрэг хөхөвтөр өнгөтэй. Гэрэлд саарал сүүн өнгөтэй харагдана. Өсгөвөр аарц эсвэл сүүний үнэртэй байна. “R” хэлбэртэй колони нь барзгар гадаргатай, эмтэрсэн зузаан зах ирмэгтэй, 1.5-3 мм орчим хэмжээтэй байна.

Рамнозын 1%-ийн агууламжтай агарт *L.monocytogenes* рамнозыг хүчил үүсгэн задалж гэрэлтэлт өгнө. *L. ivanovii* рамнозыг задаллгүй.

Триптозын агар эсвэл Мюллер Хинтоны агарт өсгөвөрлөхөд цайвар хөх ногоон өнгийн колони ургана.

Хонины цустай агарт бетта цус задлалт өгнө. “S” хэлбэрээс “R” хэлбэрт шилжихэд цус задлах идэвхи нь буурдаг.

Хромогеник агарт: *L.monocytogenes* ба *L. ivanovii* нь хөх ногооноос хөх-нил ягаан өнгөтэй, төвгөр 1-2 мм-ийн голчтой колони ургана. Энэ колони нь 24 цагт ургана. Харин бусад эмгэг төрүүлэмжгүй *Listeria*-ийн бусад зүйлүүд (*L.innocua*, *L.welshimeri*, *L.seeligeri*, *L.grayi*) ягаан өнгийн төвгөр, 0.1-0.2 мм-ийн голчтой колони ургана.

**Шингэн тэжээлт орчинд:** жигд булинга үүсгэн ургана. Аажимдаа тунадасжина. Тунадас салсархаг, бутарч задрахдаа муу байдаг. Зарим омогт мөхлөгт тунадастай, хөхөвтөр өнгөр үүсгэнэ.

**Хагас шингэн тэжээлт орчин:** Хатгалтын дагуу ба ихэнхдээ гадаргууд элбэг ургана. Мах пептонтой желатинд ойролцоогоор 10 хоногт өсгөвөр перпиндикуляр ургалт үүсэж, глюкозтой желатинд мөчир хэлбэртэй ургах ба хөдөлгөөн тодорхойлох орчинд шүхэр хэлбэртэй ургана.

**Биохимийн шинж чанар:** Каталлаза эерэг, индол, оксидаза, уреаза сөрөг, глюкоз, левулёз, рамноз, мальтоз, декстрин, салицин задална. Маннит, крахмалыг задлахгүй.

*Listeria*-ийн дэд зүйлүүдийн ялгагдах шинж

Хүснэгт 1

д/д	Шинж	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L.grayi</i>	<i>L.murrayi</i>
1	Нитратыг ангижруулах	/-/	/-/	/-/
2	Хөдөлгөөн	/+/	/+/	/+/
3	Каталаза	/+/	/+/	/+/
4	Гидролиз эскулин	/+/	/+/	/+/
5	В цус задлалт	/+/	/-/	/-/
6	Глюкозыг хүчиллэгжүүлэх	/+/	/+/	/+/
7	Маннит	/-/	/+/	/+/
8	Рамноз	/+/	/-/	/±/
9	Ксилоз	/-/	/-/	/-/

10	Крахмал	/-/	/+/ /+/	/+/ /+/
11	Гиппуратын гидролиз	/+/ /+/	/-/ /+/	/-/ /+/
12	Цагаан хулганад эмгэг төрүүлэмж	/+/ /+/	/-/ /+/	/-/ /+/

## 5.6. **БИОЛОГИЙН ШИНЖИЛГЭЭ**

### 5.6.1. Шаардлагатай амьтны зүйл:

Цагаан хулгана, усан гахай

### 5.6.2. Биологийн шинжилгээ:

*Listeria monocytogenes* нь лабораторийн амьтанд хоруу чанартай. Лабораторийн амьтдаас цагаан хулгана, усан гахайд нэлээд мэдрэг, молтогчин туулайн долоо хоногтой бүжин бага зэрэг мэдрэг.

Цагаан хулгана, усан гахайн нүдний салстад 1 дуслыг дусаан халдварлуулна. Эсвэл арьсан дор 0.5мл-ээр халдварлуулна. Туршилтын амьтныг кортизоноор мэдрэгжүүлэх нь ач холбогдолтой бөгөөд халдвар хийхээс 4 цагийн өмнө 4-5 мл-ээр булчинд тарина. Халдвар хийсэн амьтныг 6 хоног хүртэл хугацаагаар ажиглана.

### 5.6.3. Чанарын хяналт

Туршилтын амьтан эрүүл байх

### 5.6.4. Шинжилгээний хариуг дүгнэх

Ажиглалтын хугацаа дууссан эсвэл амьтныг үхсний дараа бүх эрхтэнээс бичил харах, нян судлалын шинжилгээ хийнэ. Амь сорьцын амьтан хоолонд дүргүй болж, хөдөлгөөн муудаж, нүднээс нуух гоожиж, 2-оос 6 хоногт амьтан үжлээр үхнэ. Үхсэн амьтны эмгэг судлалын шинжилгээгээр элэг, дэлүү томорч, эрхтэнүүдэд цагаан саарал зангилаанууд үүссэн байдаг.

## 5.7. **МОЛЕКУЛ БИОЛОГИЙН ШИНЖИЛГЭЭ**

### 5.7.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл, урвалж бодис, праймер

- Биооюулгүйн 2-р зэрэглэлийн кабинет
- ПГУ-ын олшруулагч машин
- Дулаан тогтоогуур
- Бичил хурилдуур
- Хүчдэл тохируулагч
- Электрофорезийн аппарат
- Холигч
- Гель хайлуулагч
- Электрон жин
- ПГУ-ын үр дүнг хэт ягаан туяаны тусламжтайгаар дүрслэн харж дүгнэх систем
- Нэг удаагийн бээлий
- Эппендорфийн хуруу шил (1,5-2 мл, 0,2 мл, 0,5мл)
- Эппендорфийн хуруу шилний тавиур
- Автомат дусаагуур
- Фильтертэй ариун хошуу (20-200мкл, 1000мкл, 0,5-10мкл, 2-20мкл)
- Шилний харандаа
- Хаягдал хийх сав

*Урвалж:*

*ДНХ ялгах ажиллагаанд:* Задлагч уусмал (нэрмэл ус, Трис, Твин 20, протейназа К, лизоцим, ЭДТА), фенолхлорформ, 96% , 70% этилийн спирт, давхар нэрсэн ус, фирмийн цомгийн бүрэлдэхүүн

*ПГУ-д:* ПГУ-ын цомог, өвөрмөц праймер (хүснэгт 2), ионгүйжүүлсэн ус, ДНХ-ийн молекул жингийн маркер (хүснэгт 2)



Листерийн үүсгэгчийн ДНХ илрүүлэх өвөрмөц праймерийн дараалал  
Хүснэгт 2

Бай ген	Праймерын нэр	Праймерийн дараалал 5'..... 3'	Молекул жин (bp)
<i>Listeria spp</i> тодорхойлох			
Putative phosphoribosyl pyrophosphate synthetase ген	List F	GCT GAA GAG ATT GCG AAA GAA G	370bp
	List R	CAA AGA AAC CTT GGA TTT GCG G	
<i>Listeria monocytogenes</i> тодорхойлох			
<i>hly</i> ген тодорхойлох	List, <i>hly</i> F	CAT TAG TGG AAA GAT GGA ATG	730bp
	List, <i>hly</i> R	GTA TCC TCC AGA GTC ATC GA	
Division I or III	D1-F ( <i>Listeria</i> 1)	CGATATTTTATCTACTTTGTCA	214bp
	D1-R ( <i>Listeria</i> 2)	TTGCTCCAAAGCAGGGCAT	
Division II	D2 – F	GCGGAGAAAGCTATCGCA	140 bp

*Агарозын гель электрофорезэд:* Трис-боратын буфер pH=8.3 (5xTBE) (89 mM Трис, 89 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2mM ЭДТА), 1xTBE (5x буфер 100 мл, нэрсэн ус 400 мл), 1.5% агароз гель, этидиум бромидын 0,001%-ийн уусмал (250 мл нэрсэн усанд 2,5 мг этидиум бромид)

5.7.2. Молекул биологийн шинжилгээ:

*ДНХ ялгах:*

*Фенол хлороформын аргаар ДНХ ялгах:*

- Задлагч уусмалаа бэлтгэж (5мл ариун нэрмэлд: трис 30мг, ЭДТА 15мг, твин 20 15мкл, протейназа К 15мкл, лизоцим 10мг), 37°-д 30 мин тавьна.
- Сорьцноос 100 мкл-ийг авч эппендорфийн хуруу шилэнд хийж, 100 хэмийн усан баннд 15 минут тавьж идэвхигүйжүүлнэ
- Сорьцийг усан баннаас гаргаад дээр нь 100 мкл задлагч уусмал нэмж 37°С хэмд 1 цаг тавина
- Задлагч уусмал нэмсэн сорьцон дээр 200 мкл фенол: хлорформ (1:1) нэмж сайтар холиод 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулна
- Дээд шингэнийг соруулан авч, хаяг бүхий шинэ хуруу шилэнд хийж, 2 эзэлхүүн 96% спирт нэмээд -20°С 1 цаг тавина
- 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 70%-ийн этилийн спирт нэмж 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана
- 60° С хэмд 15 мин тавьж спиртийг ууршуулна.
- Хатаасан ДНХ-г ойролцоогоор 30 мкл нэрмэл усаар шингэлж авна.

*ДНХ ялгах цомог ашиглан ДНХ ялгах:*

Цус, эдээс ДНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан сорьцноос ДНХ ялгаж болох ба үйлдвэрлэгчийн дагалдуулсан зааврын дагуу ялгана.

*ПГУ тавих:*

ПГУ-ын холимгийг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу бэлтгэнэ. *Listeria spp* тодорхойлох ПГУ-ыг **ListF/ListR** праймераар: 95° хэмд 5 минут, 36 цикл (95° хэмд 30 сек, 55° хэмд 30 сек, 72° хэмд 60 сек), 72° хэмд 3 минутаар гүйцэтгэнэ.

*Listeria monocytogenes*-ийн бүх ийлдэс хүрээг тодорхойлох ПГУ-ыг **List, hly F/List, hly R** праймераар: 94° хэмд 3 минут, 30 цикл (94° хэмд 30 сек, 55°

хэмд 30 сек, 72° хэмд 60 сек), 72° хэмд 3 минутаар; *L. monocytogenes*-ийн ийлдэс хүрээг ялган тодорхойлох ПГУ-ыг **D1-F/R; D2-F/R праймераар**: 94° хэмд 5 минут, 36 цикл (94° хэмд 30 сек, 56° хэмд 30 сек, 72° хэмд 30 сек), 72° хэмд 10 минутаар тус тус гүйцэтгэнэ.

*Гель электрофорез тавих:*

ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг 1.5%-ийн агарозын гельд 100 вольт хүчдэлээр 30 минут электрофорез гүйлгэнэ.

5.7.3. Чанарын хяналт:

- Эерэг хяналтанд листериоз өвчний үүсгэгчийн ДНХ-ийг авна.
- Сөрөг хяналтанд ариун нэрмэл ус юмуу ТВЕ буфер авна.
- Урвалж, оношлуур, праймерын хадгалалтын горимыг чанд мөрдөх ба праймер, урвалж бодисын хүчинтэй хугацаанд байнга хяналт тавьна.

5.7.4. Оношилгооны хариуг дүгнэх

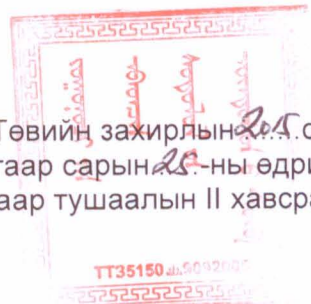
Электрофорез дууссаны дараа гель детекцийн аппарат DijiDoc-It Image System ашиглан үр дүнг авна. *Listeria* spp тодорхойлох урвалын эерэг хяналт болон *Listeria* spp бүхий дээжний ДНХ-д 370bp бүхий толбо үүснэ. *Listeria monocytogenes*-ийн бүх ийлдэс хүрээг тодорхойлох урвалаар 730bp бүхий толбо, *L. monocytogenes*-ийн ийлдэс хүрээг ялган тодорхойлох урвалаар 214bp болон 140bp бүхий хэмжээтэй толбо тус тус үүснэ.

--oOo--

#### Хавсралт

1. Лабораторийн шинжилгээний гарын авлага. 2003 он
2. Байгалийн голомтот халдварт өвчний лабораторийн оношлогооны протокол. 2010 он
3. Медицинская микробиология. 1997 он
4. "Listeria Surveillance Protocol" West Virginia Department of Health and Human Resources, 2008
5. "Recommendation to health care professionals Listeriosis" Public Health Agency of Canada, 2008
6. Jami, S., Jamshidi, A., and Khanzadi, S. 2010. The presence of *Listeria monocytogenes* in raw milk samples in Mashhad, Iran //Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University. Vol. 11, No. 4, Ser. No. 33. Products //Food Technol. Biotechnol. 43 (2). 201–205.
7. Monica K. Borucki and Douglas R. Call. 2003. *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR // JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. p. 5537–5540.
8. P.A. GOUWS and I. LIEDEMANN. 2005. Detection of *L. monocytogenes* in Food

Төвийн захирлын 2015 оны  
06 дугаар сарын 25-ны өдрийн  
044 дугаар тушаалын II хавсралт



### ЯМ ӨВЧНИЙ ЛАБОРАТОРИЙН ШИНЖИЛГЭЭНИЙ СТАНДАРТ АЖЛЫН ЗААВАР

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Ям өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 9
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар-A24	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил
Зориулалт: Ям өвчний лабораторийн оношлогоонд	
Хэрэглэх хүрээ: Ям өвчний шинжилгээ, оношлогоо, судалгааны лабораториуд	
Боловсруулсан: Д.Ганболд, Х.Тунгалаг	Баталсан, зөвшөөрсөн актын дугаар: 3ӨСҮТөвийн захирлын А/44 тоот тушаалын хоёрдугаар хавсралт
Огноо: 2015 он	Огноо: 2015.06.25
Хэвлүүлсэн: Мэргэжлийн тусламжын алба, Лавлагаа лабораторийн тасаг	

<b>ЭМСЯ-ны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв</b>	
<b>Нэр:</b> Ям өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	<b>Хуудасны дугаар/тоо-</b> 9
<b>Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар:</b> Стандарт ажлын заавар-A24	<b>Хүчинтэй хугацаа:</b> 5 жил

#### 1. Зорилго, зарчим:

Шинжлэгдэхүүнд лабораторийн шинжилгээ хийж ям өвчний үүсгэгч, түүний ДНХ, өвөрмөц эсрэгбие, эсрэгтөрөгч илрүүлэн, баталгаажуулахад оршино.

#### 2. Хамрах хүрээ:

Ям өвчний хүний өвчний сэжигтэй тохиолдол, байгалийн голомт хяналтын шинжилгээ хийх үед энэхүү стандарт ажлын зааврыг мөрдөнө.

#### 3. Тодорхойлолт:

Үүсгэгч нь Псевдомоносын төрлийн *Burkholderia mallei* юм. Үршдэггүй. Хөдөлгөөнгүй. Грам сөрөг, мөлгөр төгсгөлтэй, хоёр туйлтай савханцар юм. *Burkholderia mallei* нь олон улсын ангиллаар биологийн аюулын (BSL-III) III түвшинд багтдаг.

#### 4. Сорьц цуглуулах хадгалах, тээвэрлэх

##### 4.1. Шаардлагатай багаж хэрэглэл:

- Вакуум хуруу шилний систем
- Хайч
- Хямсаа
- Спиртэн дэн
- Сорьц цуглуулах эппендорфын хуруу шил
- Эппендорфын тавиур, \100 үүр бүхий сорьц хадгалах хайрцаг\
- Сорьц зөөвөрлөх сав \гадна талд биологийн аюултай гэсэн тэмдэг наасан байна\
- Сорьцны гадуур сав, мөсөн элемент

##### 4.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл:

- Хамгаалах өмсгөл өмсөж ажиллах
- Эмтэрсэн, цуурсан, цав гарсан хуруу шил болон шил саванд сорьц авахгүй байх
- Сорьц авсан савыг унаж асгахаас сэргийлж тогтвортой сууринд байрлуулах
- Сорьцыг агаарт үсэргэхгүй авах
- Будаг, уусмалыг ууршилтаас сэргийлж байнга таглаж байх
- Будаг уусмалыг байнга хаягтай байлгах
- Будаг хортой, идэмхий, шатамхай чанартай бол түүнийг ялгахар тод хаяглах
- Будаг уусмалыг тусгай тавиурт байрлуулах
- Амь сорьцын амьтанд халдвар хийх үед зүүнд хатгуулах, амьтанд хазуулахгүй байх

##### 4.3. Шинжлэх сорьцын төрөл:

Өвчтөнөөс авах сорьц

- Цус
- Цэр
- Буглааны идээ
- Ил шархны арчдас

- Хамраас ялгарч буй шингэн
- Хамар залгиурын арчдас
- Эхэс
- Цогцосны цуллаг эрхтэнүүд болон идээ, салс

Тархвар судлалын заалтаар авах сорьц:

- Ямын үүсгэгчээр бохирлогдсон байж болох ус, бэлчээр, малын хашааны өтөг бууц
- Ямаар өвчилсөн байж болох мал, амьтдын цэр, ил шарх, буглааны идээ

#### 4.3.1. Сорьцод боловсруулалт хийх:

- Дотор эрхтэний хэрчмийг жижиглэн, физиологийн уусмал нэмж жигд булинга бэлдээд цаасан шүүлтүүрээр шүүнэ. Булингыг ийлдэс, нян судлал, биологийн шинжилгээнд хэрэглэнэ.
- Тархвар судлалын шаардлагаар авсан ус, хөрс, бууцыг физиологийн уусмалаар дэвтээнэ.
- Ийлдэс судлалын шинжилгээнд ашиглах сорьцыг 22<sup>0</sup>С-д 4%-ийн формалины уусмалд 12 цаг байлгана.

#### 4.3.2. Сорьцийг хадгалах, тээвэрлэх

Сорьцыг хадгалах:

- Сорьцыг цуглуулаад 48 цагийн дотор лабораторид хүргэх бол 0-4<sup>0</sup>С-ийн хэмд хадгална.
- Авсан сорьцыг 30%-ийн глицерин уусмалд 4<sup>0</sup>С-д 10-15 хоног хүртэл хадгалж болно.
- Бусад бичил биетний ургалтыг дарангуйлах зорилгоор орчинд будагч бодис нэмнэ. Жишээ нь 1:100 000-ийн хүчиллэг фуксин, 1:200 000 кристалл фиолет, 1:1000000-ийн бриллиантын ногоон

Сорьцыг тээвэрлэх:

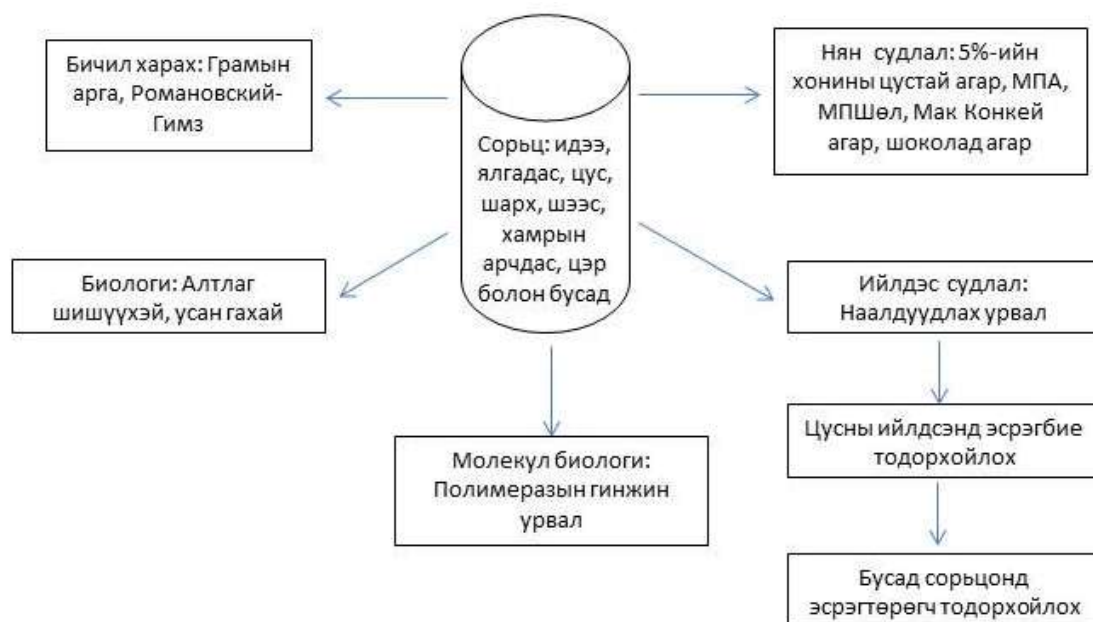
- Сорьцыг савлахдаа “Нэг дээж - нэг сав “ гэдэг зарчмыг баримтлана.
- Тээвэрлэхдээ сорьцыг гурван давхар савлана.
- Анхдагч сав: Сорьцыг шууд хийх сав бөгөөд эргэдэг тагтай, үл хагарах буюу бат бөх зузаан хантай шил эсвэл пластик материалаар хийсэн сав байна.
- Хоёрдах сав: анхдагч сав чөлөөтэй багтах зайтай, нягт таглагдах тагтай, зөөлөвч бүхий хуванцар буюу шахмал цаасаар хийсэн байна.
- Гуравдахь сав нь хоёрдахь сав чөлөөтэй багтах зайтай бөгөөд гадна талд нь хаяг, сорьцын дагалдах бичиг, дээд талыг илэрхийлэх тэмдэг, “ХАЛДВАРТАЙ“ гэсэн үг наасан хатуу картон буюу хөөсөнцрөөр хийсэн байна. Гадна хайрцгийн дотор хөлдөөгч гель эсвэл ус үл гоожих хүүдийд хөлдөөсөн мөс хийнэ.
- Цэврээр нь ялгасан өсгөөртэй хуруу шилний амыг хайлж гагнах эсвэл хөвөн марлин бөглөө хийж амсраас илүү гарсан хэсгийг амсартай нь чацуулан тайраад дотогш нь 1 см хиртэй түлхэж, хайлсан парафин цутгаж амны гадна талын хэсгийг хайлсан парафинд дүрж царцаана. Сорьц, өсгөөр бүхий хуруу шилийг тээвэрлэх саванд зөөлөн материалаар хөдөлгөөнгүйгээр жийрэглэн, битүүмжлэн лацдана.
- Сорьц, өсгөөр хүргэх тухайгаа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төвд урьдчилан мэдэгдэж дагалдах бичиг баримтын хамт биечлэн хүргэнэ.
- Сорьц, өсгөөрийг хүлээлцсэн тухай актыг 2 хувь үйлдэнэ.



## 5. Шинжилгээний аргачлал

### 5.1. Шинжилгээ хийх дараалал:

#### Шинжилгээ хийх зураглал



### 5.2. БИЧИЛ ХАРАХ ШИНЖИЛГЭЭ:

#### 5.2.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, будаг урвалж:

- Цахилгаан бичил харуур
- Спиртэн дэн
- Нянгийн гогцоо
- Наацын шил
- Шилний харандаа
- Иммерсоны тос
- Никифоровын холимог
- Грамын будаг (кристал виолет (генцианвиолет), люголь-иодийн уусмал, ацетон, спиртийн өнгөгүйжүүлэгч, нейтрал-улаан буюу фуксин)
- Романовский-Гимзийн будаг

#### 5.2.2. Бичил харах шинжилгээний аргууд:

##### *Грамын арга:*

- Наацыг 96<sup>0</sup>-ийн этилийн спиртэнд бэхжүүлнэ.
- Бэхжүүлсэн наацан дээр генцианвиолетын будгаар 1 минут будна.
- Усаар угаана.
- Люголын уусмалаар 30 секунд будна.
- Этилийн 96<sup>0</sup> ын спиртээр 20 секунд орчим үйлчлүүлнэ.
- Усаар угаана.
- Фуксиний будгаар 1 минут будна.
- Усаар угааж, хатаана.

##### *Романовский-Гимзын арга:*

- Түрхэцийг агаарт хатаана.
- Никифоровын холимогт 15-20 минут бэхжүүлнэ
- Романовский-Гимз будгаас 1 дуслыг 1 мл нэрмэл усанд оногдохоор тооцож найруулсан ажлын уусмалд түрхэцийг хийж 3-4 цаг будна.
- Нэрмэл усаар зайлж хатаана.

### 5.2.3. Чанарын хяналт

- Будаг, урвалжын хугацаа, хадгалалт
- *B.mallei* ATCC 23344

### 5.2.4. Шинжилгээний хариуг дүгнэх

#### *Грамын арга:*

- 0.5-1х 2-3  $\mu$  хэмжээтэй, шулуун эсвэл бага зэрэг тахирдуу, Грам сөрөг, мөлгөр төгсгөлтэй, хоёр туйлтай савханцар байна.
- Тэжээлт орчинд 48 цагаас дээш өсгөвөрлөхөд гинж үүсгэнэ.
- Хуучин өсгөвөр кокк хэлбэртэй байж болно.

#### *Романовский-Гимзын арга:*

- Романовский-Гимзээр будахад протоплазмын мөхлөгт бүтэц нь хөх өнгөөр будагдана.

### 5.3. **ИЙЛДЭС СУДЛАЛЫН ШИНЖИЛГЭЭ:**

#### 5.3.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, оношлуур:

- ELISA уншигч машин
- ELISA угаагч
- Автомат дусаагуур /1000мкл, 20-200мкл, 50-300 мкл, 2-20мкл, 0,5-10мкл/
- Автомат дусаагуурын хошуу /1000мкл, 20-200мкл/
- Урвалын самбар
- Ямын эсрэгбиеийн улаан эст оношлуур
- Ямын эсрэгтөрөгчийн улаан эст оношлуур
- Ямын өвөрмөц IgM, IgG илрүүлэх ELISA цомог

#### 5.3.2. Ийлдэс судлалын шинжилгээний САА

Эмнэл зүйн болон гадаад орчны сорьцонд эсрэгтөрөгч хайх цус наалдуулах урвалыг эсрэгбиеийн улаан эст оношлуурыг ашиглан тавина.

Өвчтөн болон амьтдын цусны ийлдсэнд өвөрмөц эсрэгбие илрүүлэх фермент холбоот урвал, цус наалдуулах урвалыг эсрэгтөрөгчийн улаан эст оношлуурыг ашиглан тавина.

#### **Цус наалдуулах шууд бус урвал:**

Урвалын шингэлэгч- 1:500 бүхий Твин 80-ыг 100 дахин шингэлнэ.

Улаан эст оношлуурыг 0.6%-иар найруулан урвал тавихад бэлэн болгоно.

Урвал тавих дараалал:

- Урвалыг 3 нүдэнд эхэлж тавих ба бүх нүдэнд шингэлэгчээс 0.05 мл-ийг хийнэ.
- Шинжлэх сорьцноос 0.05 мл-ийг I нүдэнд хийж холино.
- I нүднээс 0.05 мл-ийг авч II нүдэнд шатлан шингэлж илүүдлийг асгана.
- Эцсийн нүдийг хяналт болгоно.
- Улаан эст оношлуураас (эсрэгбие хайхад эсрэгтөрөгчийн, эсрэгтөрөгч хайхад эсрэгбиеийн) 0.025 мл-ийг бүх нүдэнд дусааж, зөөлөн сэгсэрч холино.
- 37<sup>0</sup> С хэмд 30 минут эсвэл тасалгааны дулаанд 1 цаг байлгасны дараа дүгнэнэ.

#### **Эсгэг холбоост урвал / ELISA урвал/**

Эсгэг холбоост урвалыг оношлуурын зааварт зааснаар найруулан тавина.

*Урвалыг дүгнэх:* Уншигч машинд самбарыг уншуулж тоон үзүүлэлтийг гаргаж оношлуурын зааварт заасан үзүүлэлттэй харьцуулж дүгнэнэ.

### 5.3.3. Чанарын хяналт

- Оношлуурын үйлдвэрлэгчийн хугацаа
- Оношлуур, урвалж найруулсан хугацаа
- Эерэг, сөрөг хяналтын үр дүн

#### 5.3.4. Шинжилгээний хариуг дүгнэх

Цус наалдуулах шууд бус урвалын үр дүн

- Шинжилж буй сорьцонд ям өвчний эсрэгтөрөгч эсвэл эсрэгбие байгаа тохиолдолд хавтангийн нүдний ёроолоор улаан эс жигд тархаж шүхэр хэлбэрээр суусан байх ба урвалыг “эерэг” гэж үзээд +/- тэмдгээр бүртгэнэ. Эсрэгбиеийн таньцыг ийлдсийн эцсийн шингэрлээр, эсрэгтөрөгчийг эерэг дүнтэй нүдний тоогоор дүгнэнэ. (Ж-нь: ЦНШБУ/+ 1:160, ЦНШБУ/+ 5н)
- Харин сорьцонд эсрэгбие, эсрэгтөрөгчийн аль нь ч байхгүй бол хавтангийн нүдний ёроолд улаан эс бөөгнөрч товч хэлбэрээр тунах ба урвалыг сөрөг гэж дүгнэнэ.
- Урвалын сөрөг хяналтаар ус ашиглана.

#### 5.4. НЯН СУДЛАЛЫН ШИНЖИЛГЭЭ:

5.4.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, тэжээлт орчин:

- Дулаан тогтоогуур
- Бичил харуур
- Биологийн аюулгүй ажиллагааны кабинет
- Хуруу шил
- Петрийн аяга
- Нянгийн гогцоо
- Гогцоо шатаагч
- Хайч
- Хямсаа
- Кристаллизатор
- Тэжээлт орчин (Мах пептоны агар, мах пептоны шөл, 4-5%-ийн глицерин бүхий триптиказ шөл, *Pseudomonas isolation agar* сонгомол тэжээл, 5%-ийн цустай агар, Макконг агар, төмстэй орчин)

5.4.2. Нян судлалын шинжилгээний САА:

*Burkholderia mallei* –ийн ургах тохиромжтой хэм  $37^{\circ}\text{C}$ , орчин нь РН 6.5-7.2, өсгөвөрлөх тэжээлт орчинд нэмэлт хүчин зүйл шаарддаггүй, энгийн болон 4-5%-ийн глицеринтэй тэжээлт орчинд сайн ургадаг.

**Хатуу тэжээлт орчин:** Сорьц буюу эмгэг материалаас мах пептоны агар эсвэл 4-5%-ийн глицеринээр баяжуулсан мах пептоны агар зэрэгт суулгац хийж,  $37^{\circ}\text{C}$ -д 48-72 цаг өсгөвөрлөнө.

*Burkholderia mallei* –ийн онцлог шинж:

- Төмстэй орчинд 24 цагийн дараа хагас тунгалаг колони ургаж, 6-8 хоногийн дараа тэдгээр нь хоорондоо нийлж зөгийн балны өнгөтэй нянгийн бөөгнөрөл үүснэ.
- Цустай агарт цус задлахгүй
- Желатин хайлуулна
- $42^{\circ}\text{C}$ -д ургалт өгөхгүй
- Хагас шингэн агарт хөдөлгөөнгүй. Агарын гадарга дээр саарал өнгөр үүсгэнэ. Заримдаа шар өнгөтэй болно.
- “*Bacto pseudomonas isolation agar*” сонгомол тэжээлт орчинд ургана.

Бохирдлого ихтэй сорьцыг дарангуйлагчтай тэжээлт орчинд суулгана.

Бусад нянгуудын бохирдолт ихтэй сорьцонд 1 мл 1000ЕД пенициллин байхаар тооцож хийгээд  $37^{\circ}\text{C}$ -д 3 цаг өсгөвөрлөх эсвэл өсөлт зогсоох үйлчилгээтэй бодис нэмсэн тэжээлт орчинд суулгана. Өсөлт зогсоох үйлчилгээтэй бодисоор 1:100000 хүчиллэг фуксин, 1:200000 кристалл виолет, 1:100000 бриллиантын ногоон зэргийн аль нэгийг нь ашиглана.

Шинжилж байгаа сорьцыг агар бүхий 3 петрийн аяга, шөл бүхий 3 хуруу шилэнд суулгаж 37<sup>0</sup>С-д 48-72 цаг өсгөвөрлөж өдөр бүр ургалтыг шалгана.

**Шингэн тэжээлт орчин:** Мах пептоны шөл, 4-5%-ийн глицерин бүхий триптиказ шөл зэргийг ашиглана. Шингэн тэжээлт орчинд өсгөвөрлөхөд 24-48 цагийн дараа шөл жигд булингартай, салсархаг тунадас үүсгэх ба гадарга дээр зузаан өнгөр үүсгэж 4-5 хоногийн дараа цагаан цагирагууд үүсч хуруу шилний ханыг дагаж наалдаж ургана.

**Хагас шингэн орчинд:** Желатиныг шингэрүүлэхгүй. Гадаргууд саарал өнгөр хаг үүсгэн, хатгалтын дагуу дээд хэсгээрээ ургана. /хатгалын зарим хэсэгт шар өнгө үүсгэнэ/

**Биохимийн идэвх:** Оксидаз, каталазын идэвхтэй. Индол үүсгэхгүй. Хүхэрт устөрөгч үүсгэнэ. Сүүг удаан ээдүүлнэ. Глюкоз, левулез, маннит, глицеринийг хүчил үүсгэн задална, нитритыг ангижруулна.

#### 5.4.3. Чанарын хяналт

- Тэжээлт орчин, будаг урвалж бэлтгэсэн хугацаа

#### 5.4.4. Шинжилгээний хариуг дүгнэх

- *Burkholderia mallei* Хатуу тэжээлт орчинд хавтгай, бага зэрэг товгор, хагас тунгалаг, гөлгөр гадаргатай нянгийн бөөгнөрөл ургана.
- Хонины цустай агар 48 цагтаа саарал, хагас тунгалаг, нөсөөгүй колони ургана.

### 5.5. БИОЛОГИЙН ШИНЖИЛГЭЭ:

#### 5.5.1. Шаардлагатай амьтны зүйл

Биологийн шинжилгээнд усан гахай, шижүүхэй /оготно/, муур зэргийг ашиглан хийж болно.

#### 5.5.2. Биологийн шинжилгээ:

Шинжилж байгаа сорьцоос 0.5-1 мл-ийг авч туршлагын амьтны гуяны арьсан дор эсвэл хэвлийн хөндийд халдварлуулна. Халдварлуулсан амь сорьцын амьтныг 10 хоног хүртэл ажиглана. Ажиглалтын хугацаанд амь сорьцын амьтан үхсэн эсвэл үхээгүй тохиолдолд задлан шинжилж эрхтэнээс шинжлэгдэхүүн авч шинжилнэ.

#### 5.5.3. Чанарын хяналт

Туршилтын амьтан эрүүл байх

#### 5.5.4. Шинжилгээний хариуг дүгнэх

Халдварлуулсан амьтан 48-72 цагт үжлээр үхнэ. Халдварлуулсан хэсэгт 2-3 хоногийн дараа хавдрын зангилаа үүсэж, 4-5 хоногт задлахад шарх үүссэн байдаг. Эр усан гахайд хэвлийн хөндийд халдварлуулахад 3-10 хоногт төмсөгний гэмтэл илэрнэ. Үүнийг **феномен Штрауса** гэнэ.

### 5.6. МОЛЕКУЛ БИОЛОГИЙН ШИНЖИЛГЭЭ:

#### 5.7.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл, урвалж бодис, праймер:

**Тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл:** Биоаюулгүйн 2-р зэрэглэлийн кабинет, ПГУ-ын олшруулагч машин, дулаан тогтоогуур, бичил хурилдуур, хүчдэл тохируулагч, электрофорезийн аппарат, холигч, гель хайлуулагч, электрон жин, ПГУ-ын үр дүнг хэт ягаан туяаны тусламжтайгаар дүрслэн харж дүгнэх систем, нэг удаагийн бээлий, эппендорфийн хуруу шил (1,5-2 мл, 0,2 мл, 0,5мл), эппендорфийн хуруу шилний тавиур, автомат дусаагуур, фильтертэй ариун хошуу (20-200мкл, 1000мкл, 0,5-10мкл, 2-20мкл), шилний харандаа, хаягдал хийх сав

**Урвалж: ДНХ ялгах ажиллагаанд:** Задлагч уусмал (нэрмэл ус, Трис, Твин 20, протейназа К, лизоцим, ЭДТА), фенолхлорформ, 96%, 70% этилийн спирт, давхар нэрсэн ус

ПГУ-д: ПГУ-ын цомог, өвөрмөц праймер, ионгүйжүүлсэн ус, ДНХ-ийн молекул жингийн маркер

Ям өвчний үүсгэгчийн ДНХ илрүүлэх өвөрмөц праймерийн дараалал

Хүснэгт 1

№	Илрүүлэх зүйл	Бай ген	Праймерын нэр	Праймерийн дараалал	Молекул жин (bp)
1	<i>B. vietnamiensis</i> <i>B. mallei</i> <i>B. pseudomallei</i>	23S pДНХ	VMP 23-1 MP 23-2	CTT TTG GGT CAT CCT RGA TCC TAC CAT GCG AGA CT	1051
2	<i>B. mallei</i>	23S pДНХ	CVMP 23-1 M 23-2	AAA CCG ACA CAG GTG G CAC CGA AAC TAG CA	526
3	<i>B. mallei</i>	23S pДНХ		TTCGATCGATTCTGCTATC GCGTTAAACGCCGTA CTTTC	756
4	<i>B. mallei</i>	P (fliP)-I S407A	Bma-IS407-flip-f	TCA GGT TTG TAT GTC GCT CGG	989
			Bma- IS407-flip-r	CTA GGT GAA GCT CTG CGC GAG	

Агарозын гель электрофорезэд: Трис-боратын буфер pH=8.3 (5xTBE) (89 мМ Трис, 89 мМ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2мМ ЭДТА) , 1xTBE (5x буфер 100 мл, нэрсэн ус 400 мл), 1.5% агароз гель, этидиум бромидын 0,001%-ийн уусмал (250 мл нэрсэн усанд 2,5 мг этидиум бромид

Шинжилгээний дараалал:

ДНХ ялгах:

Фенол хлороформын аргаар ДНХ ялгах:

- Задлагч уусмалаа бэлтгэж (5мл ариун нэрмэлд: трис 30мг, ЭДТА 15мг, твин 20 15мкл, протейназа К 15мкл, лизоцим 10мг), 37°-д 30 мин тавьна.
- Сорьцноос 100 мкл-ийг авч эппендорфийн хуруу шилэнд хийж, 100 хэмийн усан баннд 15 минут тавьж идэвхигүйжүүлнэ.
- Сорьцийг усан баннаас гаргаад дээр нь 100 мкл задлагч уусмал нэмж 37°С хэмд 1 цаг тавина.
- Задлагч уусмал нэмсэн сорьцон дээр 200 мкл фенол: хлорформ (1:1) нэмж сайтар холиод 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулна.
- Дээд шингэнийг соруулан авч, хаяг бүхий шинэ хуруу шилэнд хийж, 2 эзэлхүүн 96% спирт нэмээд -20°С 1 цаг тавина.
- 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 70%-ийн этилийн спирт нэмж 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 60° С хэмд 15 мин тавьж спиртийг ууршуулна.
- Хатаасан ДНХ-г ойролцоогоор 30 мкл нэрмэл усаар шингэлж авна.

ДНХ ялгах цомог ашиглан ДНХ ялгах:

Цус, эдээс ДНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан сорьцноос ДНХ ялгаж болох ба үйлдвэрлэгчийн дагалдуулсан зааврын дагуу ялгана.

ПГУ таах:

ПГУ-ын холимгийг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу бэлтгэнэ. ПГУ-ыг **VMP 23-1/MP 23-2** праймераар 95° хэмд 5 минут, 25 цикл (95° хэмд 30 сек, 58° 30



сек, 72° хэмд 45 сек), 72° хэмд 5 минутаар; **CVMP 23-1/М 23-2** праймераар 95° хэмд 5 минут, 25 цикл (95° хэмд 30 сек, 47° 30 сек), 72° хэмд 45 сек), 72° хэмд 5 минутаар; **Bma-IS407-flip-f/Bma- IS407-flip-r** праймераар 94° хэмд 5 минут, 35 цикл (94° хэмд 30 сек, 65° 30 сек, 72° хэмд 60 сек), 72° хэмд 7 минутаар тус тус гүйцэтгэнэ.

*Гель электрофорез тавих:*

1.5%-ийн агароз гель бэлтгэж, 1µg/ml этидиум бромид нэмж электрофорезийн аппаратанд цутган зохих саамаа байрлуулж царцаана.

ПГУ бүтээгдэхүүн тус бүрээс 8-10 мкл соруулан авч, 3 мкл хүндрүүлэгч уусмалтай холин 1,5%-ийн агарозийн гелийн үүрэнд хийнэ. 100х.н ДНХ стандарт жишигчээс 8мкл соруулан гелийн нөгөө үүрэнд хийнэ. 1х Трис-боратын буфер ашиглан 100 вольт хүчдэлээр 30 минут электрофорез тавина.

#### 5.7.2. Оношлогооны хариуг дүгнэх

Электрофорез дууссаны дараа гель детекцийн аппарат DijiDoc-It Image System ашиглан үр дүнг уншина. Урвал эерэг тохиолдолд эерэг хяналт болон ямын ДНХ агуулсан сорьцонд ДНХ-ийн толбо (Хүснэгт 1) үүсэх ба сөрөг хяналтанд толбо үүсэхгүй.

#### 5.7.3. Чанарын хяналт

- Эерэг хяналтанд ям өвчний үүсгэгчийн ДНХ
- Сөрөг хяналтанд нуклейн хүчил ялгах, Мастер микс бэлтгэх, ПГУ-ын өрөө тус бүрээс ариун нэрмэл ус юмуу ТБЕ буфер авна.
- Олон улсын стандартад нийцсэн ISO-9001 сертификатай бүтээгдэхүүнийг сонгож хэрэглэнэ.
- Урвалж, оношлуур, праймерын хадгалалтын горимыг чанд мөрдөх ба праймер, урвалж бодисын хүчинтэй хугацаанд байнга хяналт тавьна.

--oOo--

#### **Хавсралт**

Ашигласан ном, хэвлэл:

1. Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней 1973
2. Мелиоидоз 1995
3. Медицинская микробиология 1998
4. Adolf Bauernfeind., Carsten Roller., Detlef Meyer., Renate Jungwirth and Ines Schneider. Molecular Procedure for Rapid Detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*
5. *Burkholderia mallei*. From Wikipedia, the free encyclopedia
6. Glanders. OIE terrestrial Manual. Chapter 2,5.11. 2008
7. Melanie P. Ulrich, David A. Norwood., Deanna R. Christensen and Ricky L. Ulrich. Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. 2006
8. Халдварт өвчний хяналтын лавлах. 18 дахь хэвлэлийн монгол орчуулга. 289-290х

Төвийн захирлын 2015 оны  
0.6... дугаар сарын 25.-ны өдрийн  
044... дугаар тушаалын III хавсралт

## ХУУРАМЧ ЯМ ӨВЧНИЙ ЛАБОРАТОРИЙН ШИНЖИЛГЭЭНИЙ СТАНДАРТ АЖЛЫН ЗААВАР

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Хуурамч ям өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 10
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- А24.4	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил
Зориулалт: Хуурамч ям өвчний лабораторийн оношлогоонд	
Хэрэглэх хүрээ: Хуурамч ям өвчний шинжилгээ, оношлогоо, судалгааны лабораториуд	
Боловсруулсан: Д.Ганболд, Х.Тунгалаг	Баталсан, зөвшөөрсөн актын дугаар: ЗӨСҮТөвийн захирлын А/44 тоот тушаалын гуравдугаар хавсралт
Огноо: 2015 он	Огноо: 2015.06.25
Хэвлүүлсэн: Мэргэжлийн тусламжын алба, Лавлагаа лабораторийн тасаг	

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Хуурамч ям өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 10
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- A24.4	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил

## 1. Зорилго

Шинжлэгдэхүүнд лабораторийн шинжилгээ хийж ям өвчний үүсгэгч, түүний ДНХ, өвөрмөц эсрэгбие, эсрэгтөрөгч илрүүлэн, баталгаажуулахад оршино.

## 2. Хамрах хүрээ:

Хуурамч ям өвчний хүний өвчний сэжигтэй тохиолдол, байгалийн голомт хяналтын шинжилгээ хийх үед энэхүү стандарт ажлын зааврыг мөрдөнө.

## 3. Тодорхойлолт:

Үүсгэгч нь псевдомонасын төрлийн *Burkholderia melioidosis*. Энэ нян нь үршдэггүй, хөдөлгөөнтэй, янз бүрийн хэлбэршилтэй Грам-сөрөг, 1.5-6 микрон урт, 0.5-1 микрон өргөнтэй савханцар юм.

## 4. Сорьц цуглуулах хадгалах, тээвэрлэх

### 4.1. Шаардлагатай багаж хэрэглэл:

- Вакуум хуруу шилний систем
- Хайч
- Хямсаа
- Спиртэн дэн
- Сорьц цуглуулах эппендорфын хуруу шил
- Эппендорфын тавиур, \100 үүр бүхий сорьц хадгалах хайрцаг\
- Сорьц зөөвөрлөх сав \гадна талд биологийн аюултай гэсэн тэмдэг наасан байна\
- Сорьцны гадуур сав, мөсөн элемент

### 4.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл:

- Хамгаалах өмсгөл өмсөж ажиллах
- Эмтэрсэн, цуурсан, цав гарсан хуруу шил болон шил саванд сорьц авахгүй байх
- Сорьц авсан савыг унаж асгахаас сэргийлж тогтвортой сууринд байрлуулах
- Сорьцыг агаарт үсэргэхгүй авах
- Будаг, уусмалыг ууршилтаас сэргийлж байнга таглаж байх
- Будаг уусмалыг байнга хаягтай байлгах
- Будаг хортой, идэмхий, шатамхай чанартай бол түүнийг ялгахаар тод хаяглах
- Будаг уусмалыг тусгай тавиурт байрлуулах
- Амь сорьцын амьтанд халдвар хийх үед зүүнд хатгуулах, амьтанд хазуулахгүй байх

### 4.3. Шинжлэх сорьцын төрөл:

#### Өвчтөнөөс авах сорьц

- Өвчтэй хүний цэр, ил шарх буглааны идээ, хамраас гарч байгаа ялгадас

- Хурц үжил хэлбэрийн үед цус, шээс, нугасны шингэн
- Цогцосны тунгалагийн зангилаа, дэлүү, элэг, уушиг, бөөр, цус

#### **Тархвар судлалын шаардлагаар авах сорьц**

- Гадаад орчноос хөрс, ус, хөрсний сорьцыг дулаан чийглэг газруудаас тухайлбал: мал усалдаг газрын орчим, хөрзөн хадгалж байгаа газар, шалбааг, жижиг усан сан зэрэг газруудаас авна. Ариун саванд 50-100 мл ус авна. Хөрсийг 2-3 см-ын гүнээс 5-10 гр-ийг ариун хуруу шилэнд авна.
- Хуурмаг ямаар өвчилсөн байж болох амьтдын цэр, ил шарх, буглааны идээ

#### **4.3.1. Сорьцод боловсруулалт хийх:**

Дотор эрхтний хэрчмийг нухан физиологийн уусмал нэмж булинга бэлдээд цаасан шүүлтүүрээр шүүнэ. Булингыг ийлдэс, нян судлал, биологийн шинжилгээнд хэрэглэнэ.

Тархвар судлалын шаардлагаар авсан хөрс, бууцийг физиологийн уусмалаар дэвтээнэ.

#### **4.3.2. Сорьцыг хадгалах:**

Авсан сорьцыг шинжилгээнд орох хүртэл тасалгааны хэмд 24 цагаас дээшгүй хугацаанд хадгална. 4<sup>0</sup>C-д хадгалвал *Burkholderia melioidosis* ургах чадваргүй болдог. Авсан сорьц, илэрсэн өсгөвөртэй хуруу шилний амыг хайлж гагнах эсвэл хөвөн марлин бачуу бөглөө хийж амсраас илүү гарсан хэсгийг амсартай нь чацуулан тайраад дотогш нь 1 см хиртэй түлхэж, хайлсан парафин цутгаж амны гадна талын хэсгийг хайлсан парафинд дүрж царцаана.

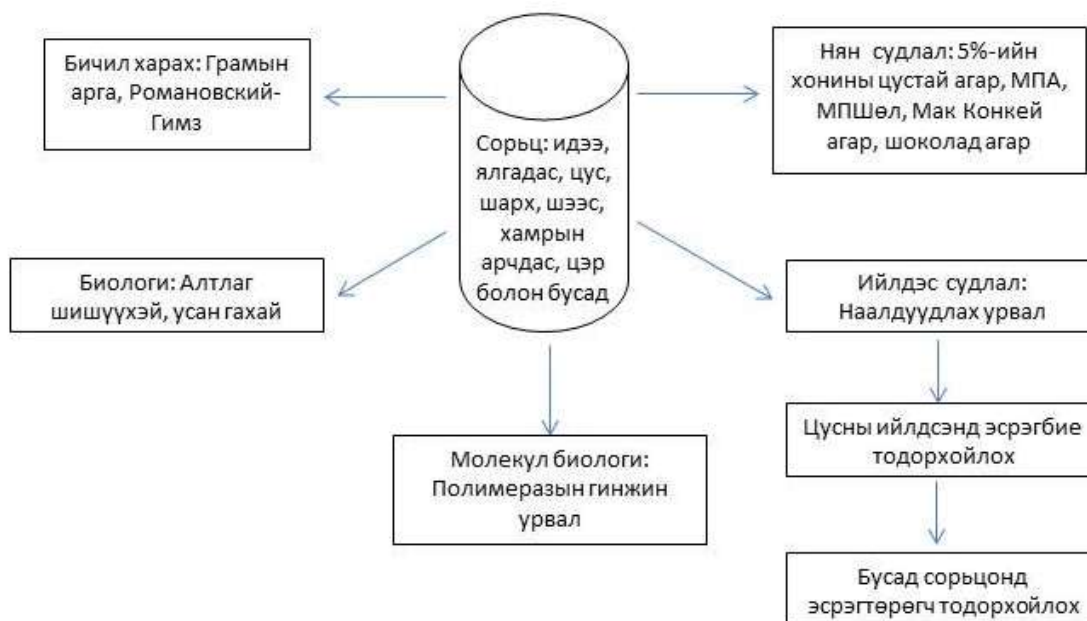
Сорьц, өсгөвөр бүхий савыг вакцин тээвэрлэх саванд зөөлөн материалаар хөдөлгөөнгүйгээр жийрэглэн, битүүмжлэн лацдана.

Сорьц, өсгөвөр хүргэх тухайгаа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төвд урьдчилан мэдэгдэж дагалдах бичиг баримтын хамт биечлэн хүргэнэ.

Сорьц, өсгөвөрийг хүлээн авсан тухай актыг 2 хувь үйлдэнэ.

## 5. Шинжилгээний төрөл

### Шинжилгээ хийх зураглал



#### 5.1. Бичил харах шинжилгээ:

Тосгүйжүүлсэн, цэвэр наацны шилэн дээр сорьцуудаас дарц бэлтгэн тасалгааны хэмд хатаана. Наацыг 96<sup>0</sup> –ийн этилийн спиртэнд бэхжүүлээд Грам болон Романовский-Гимзийн аргаар будаж харна.

Үр дүн:

- Грам сөрөг, мөлгөр төгсгөлтэй, жижиг савханцар байна.
- Романовский-Гимзийн аргаар будахад бүрхүүл (шинэ ялгасан өсгөвөр хуурамч бүрхүүлтэй байдаг)
- Райтийн будгаар будахад цитоплазм мөхлөгт бүтэц, анилины будгаар 2 туйл нь сайн будагдана. 24-48 цагийн ургалтнаас бэлдсэн наацанд мөлгөр төгсгөлтэй жижиг савханцар харагдана. 48 цагаас дээш бол гинж хэлбэрийг үүсгэнэ.

Лабораторид удаан хадгалагдсан өсгөвөр бол кокк хэлбэртэй болдог. Цэвэр өсгөврөөс бэлдсэн наацанд ганц нэгээрээ, хосоороо эсвэл 5-7 ширхэгээс тогтсон гинж маягийн савханцар, эрхтэнээс бэлдсэн дардацанд ганц нэгээрээ эсвэл нягт бөөгнөрч байрласан байна.

#### 5.2. Нян судлалын шинжилгээ:

Нянгийн ургах тохиромжтой хэм нь 37<sup>0</sup>С, рН 6.8-7.0



- Цус, нугасны шингэн болон бусад сорьцыг 4%-ийн глицерин агуулсан мах пептоны шөл, мах пептоны агарт суулгана. Нас барсан хүн болон үхсэн амьтны дотор эрхтнүүдээс авсан эмгэг материалыг 4%-ийн глицерин агуулсан мах пептоны агар, Эшдауны орчин зэрэгт суулгац хийнэ. 1см<sup>3</sup> эзэлхүүнтэй эрхтэнүүдийн хэрчимийг (элэг, дэлүү, уушиг, бөөр) 4%-ийн глицерин бүхий мах пептоны шөл эсвэл антибиотиктой минималь шингэн орчинд хийж, гадаад орчны сорьцын адилаар шинжилнэ.
- Усны сорьцыг зохих журмын дагуу авч түүнээс 0.1 мл-ийг антибиотиктой хатуу тэжээлт орчин, эсвэл Эшдауны орчинд суулгана. Баяжуулах зорилгоор 2 мл усыг 10 мл антибиотиктой минималь шингэн орчинд суулгаж, 37<sup>0</sup>С-д 24 цаг байлгаад, орчны гадаргуу дээрх ургацаас нянгийн гогцоогоор авч антибиотиктой хатуу тэжээлт орчинд суулгаж 24 цаг өсгөвөрлөнө.
- Хөрсийг шинжлэхдээ булинга бэлтгэнэ. Үүний тулд 1 гр хөрсийг 10 мл ариун нэрмэл усанд хийж, 10 минут сэгсэрнэ. Дараа нь булингаа 10-30 минут байлгасны дараа тунасан шингэнээс нь антибиотиктэй хатуу тэжээлт орчинд тарина. Баяжуулах зорилгоор антибиотиктой минималь шингэн орчинд суулгаж, 37<sup>0</sup>С-д 24 цаг өсгөвөрлөнө. Дараа нь нянгийн гогцоогоор авч антибиотиктой хатуу тэжээлт орчин эсвэл Эшдауны орчинд суулгаж 37<sup>0</sup>С-д 8 хоногоос багагүй хугацаанд өсгөвөрлөнө.

*Хатуу тэжээлт орчинд ургах нянгийн хэв шинж:*

4%-ийн глицерин бүхий мах пептоны агарт хуурмаг ямын үүсгэгч 24 цагийн дараа жижиг, хагас тунгалаг, сааралдуу өнгөтэй, тэгш дугуй ирмэгтэй, гөлгөр гадаргатай, товгор "S" бөөгнөрлийг үүсгэнэ. 48 цагийн дараа бөөгнөрлийн хэмжээ эрс нэмэгдэж, хэв шинжийн хувьд ялгаа гарч эхэлнэ. Зарим нь гялалзсан өнгөтэй, гөлгөр гадаргатай, товгор, тэгш ирмэгтэй (S), зарим нь барзгар гадаргатай, тэгш бус ирмэгтэй (R) болно. Зарим тохиолдолд хэв шинжийн хувьд нэг төрлийн бөөгнөрөл үүсгэдэг омог байдаг. Цөөн биш тохиолдолд "M" бөөгнөрөл ургана.

Эшдауны орчинд хар улаан өнгөтэй бөөгнөрөл ургана. Түүнчлэн бөөгнөрлийн эргэн тойронд тунгалаг хүрээ үүснэ.

Хуурамч ямын эсрэг тунадасжуулагч ийлдэстэй орчинд 2 хоногийн дараа хуурамч ямын үүсгэгчийн бөөгнөрлийг тойроод өвөрмөц зурвас үүснэ.

*Шингэн тэжээлт орчинд ургах:*

4%-ийн глицерин агуулсан мах пептоны шөл 1 хоногийн дараа жигд булингар үүсгэж ургана. 2-3 дахь өдөр өнгөр үүсгэнэ. Аажимдаа өнгөр зузаарч, шөл тунгалагжиж хөвөн шиг тунадас үүснэ. Хөгцний үнэр гарна. Шөлний ургалт дээр улаан будаг (нейтральный красный) нэмэхэд улаан ягаан өнгө өгнө.

Биохимийн идэвх:

Каталазын идэвхитэй. Индол үүсгэхгүй. Нитрат ангижруулна. Сүү ээдүүлэхгүй. Глюкоз, галактозыг хүчил үүсгэн задална. Арабиноз, лактоз, мальтоз, маннит, манноз, глицеринийг хүчил үүсгэн задална. Желатин хайлуулна.

*API 20 NE сорил*

API 20NE сорилыг үйлдвэрлэгчээс заасан зааврын дагуу тавина.

*Сорилын дүнг унших:* 35-37<sup>0</sup>С-д 18-24 цаг өсгөвөрлөсний дараа дүнг хүснэгтээс уншина.

### **5.3. Биологийн шинжилгээ:**

Биологийн шинжилгээнд алтлаг шишүүхэй, усан гахай зэргийг ашиглана. Цус болон нугасны шингэнээс 0.5-1 мл-ээр 2-5 ширхэг алтлаг шишүүхэйн арьсан дор халдварлуулна. Шинжилж байгаа усыг алтлаг шишүүхэйн хэвлийн хөндийд 2.0 мл-ээр, бохирдолт ихтэй ус, хөрсийг 0.5-1.0 мл-ээр арьсан дор халдварлуулна. Хуурмаг ям алтлаг шишүүхэйд хурц, үжил хэлбэрээр явагдаж 4-5 хоног, усан гахайг 8-10 хоногийн дараа үхэлд хүргэнэ. Амь сорьцын амьтан үхээгүй тохиолдолд 20 хоног хүртэл ажиглана. Ажиглалтын хугацаанд амь сорьцын амьтан үхсэн эсвэл үхээгүй тохиолдолд задлан шинжилж эрхтэнээс шинжлэгдэхүүн авч шинжилнэ.

### **5.4. Ийлдэс судлалын шинжилгээ:**

Эмнэл зүйн болон гадаад орчны сорьцонд эсрэгтөрөгч хайх цус наалдуулах шууд бус урвалыг эсрэгбиеийн улаан эст оношлуурыг ашиглан тавина.

Өвчтөн болон амьтдын цусны ийлдсэнд өвөрмөц эсрэгбие илрүүлэх цус наалдуулах шууд бус урвалыг эсрэгтөрөгчийн улаан эст оношлуурыг ашиглан тавина.

#### **5.4.1. Фермент холбоот урвал / ELISA урвал / :**

Эсгэг холбоост урвалыг оношлуурын зааварт зааснаар найруулан тавина.

*Урвалыг дүгнэх:* Уншигч машинд самбарыг уншуулж тоон үзүүлэлтийг гаргаж оношлуурын зааварт заасан үзүүлэлттэй харьцуулж дүгнэнэ.

## 5.5. Молекул биологийн оношлогоо:

5.5.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл, урвалж бодис, праймер:

- Биоаюулгүйн 2-р зэрэглэлийн кабинет
- ПГУ-ын олшруулагч машин
- Дулаан тогтоогуур
- Бичил хурилдуур
- Хүчдэл тохируулагч
- Электрофорезийн аппарат
- Холигч
- Гель хайлуулагч
- Электрон жин
- ПГУ-ын үр дүнг хэт ягаан туяаны тусламжтайгаар дүрслэн харж дүгнэх систем
- Нэг удаагийн бээлий
- Эппендорфийн хуруу шил /1,5-2 мл, 0,2 мл, 0,5мл/
- Эппендорфийн хуруу шилний тавиур
- Автомат дусаагуур
- Фильтертэй ариун хошуу /20-200мкл, 1000мкл, 0,5-10мкл, 2-20мкл/
- Шилний харандаа
- Хаягдал хийх сав

Урвалж:

*ДНХ ялгах ажиллагаанд:* Задлагч уусмал (нэрмэл ус, Трис, Твин 20, протейназа К, лизоцим, ЭДТА), фенолхлорформ, 96% , 70% этилийн спирт, давхар нэрсэн ус, фирмийн цомгийн бүрэлдэхүүн

*ПГУ-д:* ПГУ-ын цомог, өвөрмөц праймер (хүснэгт 1), ионгүйжүүлсэн ус, ДНХ-ийн молекул жингийн маркер

Хуурамч ям өвчний үүсгэгчийн ДНХ илрүүлэх өвөрмөц праймерийн дараалал

Хүснэгт 1

Бай ген	Праймерын нэр	Праймерийн дараалал 5'..... 3'	Молекул жин (bp)
<i>B. mallei</i> and <i>B. pseudomallei</i>	VMP 23-1	CTT TTG GGT CAT CCT RGA	1051
	MP 23-2	TCC TAC CAT GCG AGA CT	

<i>B. pseudomallei</i> тодорхойлох			
16S rRNA gene	Outer U33	AAG TCG AAC GGC AGC ACG G	717
	OL731	TTT GCT CCC CAC GCT TTC G	
	Inner BS3L	ACG GGC TTC GGC TGG TG	397
	BS4R	CAC TCC GGG TAT TAG CCA G	

Агарозын гель электрофорезэд: Трис-боратын буфер рН=8.3 (5хТВЕ) (89 мМ Трис, 89 мМ Н<sub>3</sub>ВО<sub>3</sub>, 2мМ ЭДТА), 1хТВЕ (5х буфер 100 мл, нэрсэн ус 400 мл), 1.5% агароз гель, этидиум бромидын 0,001%-ийн уусмал (250 мл нэрсэн усанд 2,5 мг этидиум бромид)

5.5.2. Молекул биологийн шинжилгээ:

*ДНХ ялгах:*

*Фенол хлороформын аргаар ДНХ ялгах:*

- Задлагч уусмалаа бэлтгэж (5мл ариун нэрмэлд: трис 30мг, ЭДТА 15мг, твин 20 15мкл, протейназа К 15мкл, лизоцим 10мг), 37°-д 30 мин тавьна.
- Сорьцноос 100 мкл-ийг авч эппендорфийн хуруу шилэнд хийж, 100 хэмийн усан баннд 15 минут тавьж идэвхигүйжүүлнэ.
- Сорьцийг усан баннаас гаргаад дээр нь 100 мкл задлагч уусмал нэмж 37°С хэмд 1 цаг тавина.
- Задлагч уусмал нэмсэн сорьцон дээр 200 мкл фенол: хлорформ (1:1) нэмж сайтар холиод 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулна.
- Дээд шингэнийг соруулан авч, хаяг бүхий шинэ хуруу шилэнд хийж, 2 эзэлхүүн 96% спирт нэмээд -20°С 1 цаг тавина.
- 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 70%-ийн этилийн спирт нэмж 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 60°С хэмд 15 мин тавьж спиртийг ууршуулна.
- Хатаасан ДНХ-г ойролцоогоор 30 мкл нэрмэл усаар шингэлж, 1-2мкл-ийг ПГУ-д ашиглана.

*ДНХ ялгах цомог ашиглан ДНХ ялгах:*

Цус, эдээс ДНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан сорьцноос ДНХ ялгаж болох ба үйлдвэрлэгчийн дагалдуулсан зааврын дагуу ялгана.

**ПГУ тавих:**

ПГУ-ын холимгийг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу бэлтгэнэ. *B. mallei* болон *B. pseudomallei* тодорхойлох ПГУ-ыг **VMP 23-1/ MP 23-2** праймераар: 95° хэмд 5 минут, 36 цикл (95° хэмд 30 сек, 47° хэмд 30 сек, 72° хэмд 30 сек), 72° хэмд 5 минутаар гүйцэтгэнэ.

*B. pseudomallei* тодорхойлох үүрэн ПГУ-ыг **U33/OL731** праймераар: 95° хэмд 5 минут, 35 цикл (95° хэмд 60 сек, 60° хэмд 60 сек, 72° хэмд 60 сек), 72° хэмд минутаар гүйцэтгэнэ.

**Гель электрофорез тавих:**

1.5%-ийн агароз гель бэлтгэж, 1µg/ml этидиум бромид нэмж электрофорезийн аппаратанд цутган зохих самаа байрлуулж царцаана.

ПГУ бүтээгдэхүүн тус бүрээс 8-10 мкл соруулан авч, 3 мкл хүндрүүлэгч уусмалтай холин 1,5%-ийн агарозийн гелийн үүрэнд хийнэ. 100х.н ДНХ стандарт жишигчээс 8мкл соруулан гелийн нөгөө үүрэнд хийнэ. 1х Трис-боратын буфер ашиглан 100 вольт хүчдэлээр 30 минут электрофорез тавина.

**5.5.3. Чанарын хяналт:**

- Эерэг хяналтанд хуурамч ям өвчний үүсгэгчийн ДНХ-ийг авна.
- Сөрөг хяналтанд нуклейн хүчил ялгах, Мастер микс бэлтгэх, ПГУ-ын өрөө тус бүрээс ариун нэрмэл ус юмуу TBE буфер авна.
- Олон улсын стандартад нийцсэн ISO-9001 сертификаттай бүтээгдэхүүнийг сонгож хэрэглэнэ.
- Урвалж, оношлуур, праймерын хадгалалтын горимыг чанд мөрдөх ба праймер, урвалж бодисын хүчинтэй хугацаанд байнга хяналт тавьна.

**5.5.4. Оношлогооны хариуг дүгнэх:**

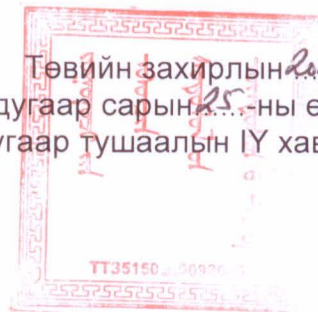
Электрофорез дууссаны дараа гель детекцийн аппарат DijiDoc-It Image System ашиглан үр дүнг авна. *B. pseudomallei* тодорхойлох урвалын эерэг хяналт болон *B. pseudomallei* бүхий дээжинд 1051bp болон 717bp бүхий толбо тус тус үүсэх ба сөрөг хяналтанд толбо үүсэхгүй.

## **Хавсралт**

Ашигласан ном, хэвлэл:

1. Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней 1973
2. Мелиоидоз 1995
3. Медицинская микробиология 1998
4. Adolf Bauernfeind., Carsten Roller., Detlef Meyer., Renate Jungwirth and Ines Schneider. Molecular Procedure for Rapid Detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*
5. Burkholderia mallei. From Wikipedia, the free encyclopedia
6. Glanders. OIE terrestrial Manual. Chapter 2,5.11. 2008
7. Melanie P. Ulrich, David A. Norwood., Deanna R. Christensen and Ricky L. Ulrich. Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. 2006
8. Халдварт өвчний хяналтын лавлах. 18 дахь хэвлэлийн монгол орчуулга. 289-290х

Төвийн захирлын 2015 оны  
06 дугаар сарын 25-ны өдрийн  
А/44 дугаар тушаалын IY хавсралт



## БРУЦЕЛЛЭЗ ӨВЧНИЙ ЛАБОРАТОРИЙН ШИНЖИЛГЭЭНИЙ СТАНДАРТ АЖЛЫН ЗААВАР

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Бруцеллэз өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 18
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар-A23	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил
Зориулалт: Бруцеллэз өвчний лабораторийн оношлогоонд	
Хэрэглэх хүрээ: Бруцеллэз өвчний шинжилгээ, оношлогоо, судалгааны лабораториуд	
Боловсруулсан: Д.Ганболд, Х.Тунгалаг	Баталсан, зөвшөөрсөн актын дугаар: ЗӨСҮТөвийн захирлын А/44 тоот тушаалын дөрөвдүгээр хавсралт
Огноо: 2015	Огноо: 2015.06.25
Хэвлүүлсэн: Мэргэжлийн тусламжын алба, Лавлагаа лабораторийн тасаг	

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Бруцеллёз өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 18
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар-А23	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил

### 1. Зорилго, зарчим:

Шинжлэгдэхүүнд лабораторийн шинжилгээ хийж бруцеллёз өвчний үүсгэгч, түүний ДНХ, өвөрмөц эсрэгбие, эсрэгтөрөгч илрүүлэн, баталгаажуулахад оршино.

### 2. Хамрах хүрээ:

Бруцеллёзын хүний өвчлөлийн сэжигтэй тохиолдол, байгалийн голомт хяналтын шинжилгээ хийх үед энэхүү стандарт ажлын зааврыг мөрдөнө.

### 3. Тодорхойлолт:

Бруцеллёзын өвчний үүсгэгч нь *Brucella*-ийн төрөлд багтдаг, *Br.melitensis*, *Br.abortus*, *Br.suis*, *Br.ovis*, *Br.canis*, *Br.neotomae* зэрэг дэд зүйлүүд байдаг. Эдгээрээс *Br.melitensis*, *Br.abortus*, *Br.suis* хүнд голчлон өвчин үүсгэдэг. *Br.melitensis* хамгийн хоруу чанар ихтэй, *Br.ovis*, *Br.neotomae* хүнд өвчлөл үүсгэхгүй.

*Үүсгэгчийн ерөнхий шинж чанар:*

Бруцелла нь хөдөлгөөнгүй, Грам сөрөг, зууван, бөөрөнхий хэлбэртэй, бүрээсгүй, спор үүсгэдэггүй, агаартан нян бөгөөд эд, эсийн дотор амьдрах чадвартай, дотор хор ялгаруулдаг.

*Үүсгэгчийн тэсвэрт чанар:*

Бруцелла нь гадаад орчинд тэсвэртэй, усанд 2-оос дээш сар, сүүнд 40 өдөр, бяслагт 2 сар ба түүнээс дээш, түүхий маханд 3 сар, давсалсан маханд 30 өдөр, арьс ширэнд 4 сар хүртэл, халдвартай мал, амьтны шээс, үтрээний ялгадас, ихэс, зулбадас зэргээр бохирлогдсон хуурай хөрс, харанхуй, хүйтэн нөхцөлд байгаа өтгө, бууцанд 6 сар хүртэл амьдрах чадвартай. Цельсийн 60 хэм хүртэл халаахад 10 минутад үхнэ. Буцалгах, пастерчлах болон халдваргүйтгэлийн бодист тэсвэргүй. Халдварлуулах хамгийн бага тун нь 10-100 бруцеллын бие байна.

### 4. Сорьц цуглуулах хадгалах, тээвэрлэх

Өвчтөнөөс авах сорьц:

- Цус
- Тархи нугасны шингэн
- Шээс

Тархвар судлалын заалтаар авах сорьц:



- Халдвартай мал, амьтны шээс, үтрээний ялгадас, ихэс, зулбадас
- Малын цус, цуллаг эрхтэн
- Малын өтөг бууц
- Малын сүү, сүүн бүтээгдэхүүн
- Гадаад орчны сорьц: ус,

Хүнээс сорьц авахад анхаарах:

Нян судлалын шинжилгээнд хамгийн өргөн ашигладаг сорьц бол цус. Иймээс цусны сорьц авахад анхаарах нь:

- Антибиотик эмчилгээ эхлэхээс өмнө сорьц авах
- Цусны сорьцыг өвчтөн халуурч байгаа үед 2-4 цагийн зайтай 3 удаа авах
- 1 удаа 10мл-ээс багагүй цусыг антикоагуланттай (EDTA-тай) болон антикоагулантгүй (EDTA-гүй) 2 вакум теннерт авах

### **Цусны сорьц авах:**

*Материал хэрэгсэл:*

- Вакум теннер (EDTA-тай)
- Вакум теннер (EDTA-гүй)
- Вакум теннерийн зүү
- Хөвөн бөмбөлөг
- Этилийн спирт-70<sup>0</sup>
- Судас чангалагч
- Зөөлөвч
- Бээлий
- Шархны лент

*Ажилбар:*

- Хуруу шилэн дээр тэмдэглэгээ хийнэ.
- Хатгах газрыг сонгоод чангалуур тавьж, цусны урсгалыг саатуулна. Ихэвчлэн өнгөц хураагуур судсыг сонгоно.
- Сонгосон талбайн арьсыг 70%-ийн спирт шингээсэн хөвөн бөмбөлгөөр арчаад хатаана.
- Зүүг арьсны гадаргууд хурц өнцөг үүсгэхээр барьж хураагуур судсыг хатгана.

- Зүү хураагуур судсанд ормогц вакуум хуруу шилийг зүүний араас угсарч, цусыг соруулан авна.
- Вакуум тейнерын систем байхгүй бол цусыг халдвар хамгааллын дэглэмийг баримтлан бөглөөтэй ариун хуруун шилэнд урсгаж авна.
- Хүрэлцэхүйц цус авсны дараа чангалуурыг суллан зүүг авч хөвөн бөмбөлгийг зүү орсон хэсэг дээр тавина. Хөвөн бөмбөлгийг цус тогттол чанга дарна.

#### **Анхааруулга:**

- Антикоагуланттай вакуум тейнерт авсан цусыг тээвэрлэх орчин эсвэл бруцеллёзын үүсгэгч өсгөвөрлөх тэжээлт орчинд юүлнэ.

#### **Ийлдэсний сорьц**

##### *Материал хэрэгсэл:*

- Хурилдуур
- Автомат дусаагуур (100-1000мкл), эсвэл нэг удаагийн дусаагуур
- Автомат дусаагуурын хошуу
- Шилний харандаа

##### *Ажилбар:*

- Өвчтөнөөс цус авсанаас хойш тодорхой хугацааны дараа ийлдсийг 3500 эргэлтээр 5 минутийн турш хурилдуурдаж цусны нөж, бүлэнгээс ялгаж авна.
- Хурилдуур байхгүй нөхцөлд цусыг хөргөгчинд тавьж ийлдсийг тунах үед нөжнөөс салгаж болох хүртэл байлгана
- Ийлдсийг цусны улаан эс оруулахгүйгээр ариун нөхцөлд (био аюулгүй ажиллагааны кабинетэд эсвэл спиртэн дэнгийн дөлөнд) дусаагуураар 1.5-2 мл-ийг болгоомжтой соруулан эппендорфийн хуруун шилэнд ялган авч хийнэ.
- Эппендорфийн хуруун шилэн дээр тэмдэглэгээ хийнэ.
- Ялгасан ийлдсийг мөстэй саванд зохих журмын дагуу хийж дараагийн шатны лабораторид яаралтай хүргэнэ. Хэрэв шууд хүргэх боломжгүй бол – 20<sup>0</sup>С-д долоо хоног хүртэл хугацаагаар хадгалж болно. Дахин гэсгээж болохгүй.

#### **Анхааруулга:**

- Ялгасан ийлдэс улаан эсийн хольцгүй, тунгалаг, шаргал өнгөтэй байна.
- Ялгасан ийлдсийг хөлдүү байдлаар хадгална. (-20<sup>0</sup>С)
- Сорьцыг хүлээн авсан лабораторийн мэргэжилтэнтэй холбогдож 14 хоногийн дараа дахин цус авч, ийлдэс ялган илгээх эсэх асуудлыг шийднэ.

## Сорьцийг савлах, баглах, тээвэрлэх

Материал хэрэгсэл:

- Сорьц зөөвөрлөх сав (Гадна талд нь биологтйн аюултай гэсэн тэмдэг, “БИО-АЮУЛТАЙ ИЛГЭЭМЖ” гэсэн бичиг байна)
- Сорьцны гадуурхи сав эсвэл эппендорфийн хуруун шилний тагтай тавиур
- Мөсөн элемент

Ажилбар:

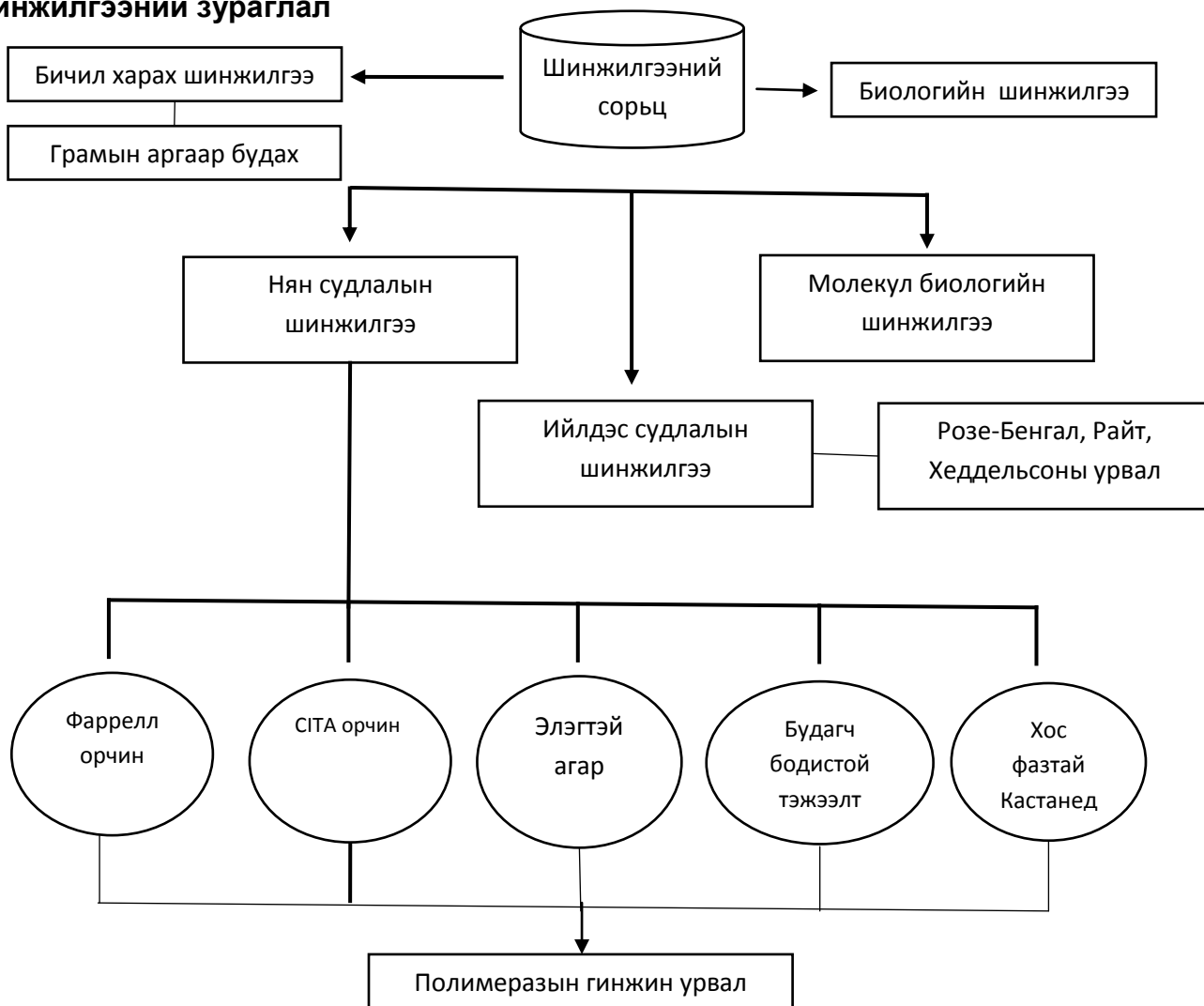
- Сорьцыг битүүмжлэн зориулалтын саванд хийж, зөөвөрлөх хайрцагт хөдөлгөөнгүй байрлуулж хайрцгийг цоожилж лацдана.
- Сорьцыг бие хүнээр эсвэл шуудангийн сүлжээ ашиглан ЗӨСҮ Төвд хүргэх ба энэ талаар урьдчилан мэдээлнэ.

### 5. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл:

Лабораторийн ажилтнууд тусгай хамгаалалтын хувцас (халат, малгай, бээлий, амны хаалт) өмсөх шаардлагатай.

### 6. Лабораторийн шинжилгээний аргууд:

Шинжилгээний зураглал



### 6.1. Бичил харах шинжилгээ:

- *Бичил харах шинжилгээнд шаардлагатай багаж, тоног төхөөрөмж:* Бичил харуур, тавиур шил, нянгийн гогцоо, спиртэн дэн, шилний харандаа, иммерсоны тос
- *Бичил харах шинжилгээнд шаардлагатай будаг, урвалж:* Грамын будаг,

*Грамын аргаар будах:*

- Бэхжүүлсэн наацыг кристал виолет будгаар 30-60 секунд будна.
- Будгийг цэвэр усаар угаана.
- Люголь-иодын уусмалаар 30-60 секунд будна.
- Иодыг цэвэр усаар угаана.
- Ацетон-спиртийн холимог уусмалаар хурдан өнгөгүйжүүлнэ. (хэдхэн секунд)  
Дараа нь шууд цэвэр усаар угаана.
- Наацыг нейтрал улаан будгаар 2 минут будна.
- Будгийг цэвэр усаар угаана.
- Наацыг микроскопоор иммерсийн тосон системээр харж дүгнэнэ.

*Үр дүн:* Грам сөрөг, зууван, бөөрөнхий хэлбэртэй. Савханцар эсвэл кокк савханцар харагдана. *Br.melitensis* ихэнхдээ кокк хэлбэртэй, *Br.abortus*, *Br.suis* савханцар хэлбэртэй. Кокк хэлбэртэй бруцелла 0.3-0.6 мкм, савханцар хэлбэртэй бруцелла 0.6-1.5 мкм хэмжээтэй.

*Козловскийн аргаар будах:*

- Наацыг дэнгийн дөлөн дээр бэхжүүлээд сафранины 2%-ийн усан уусмалаар уур гартал халааж 2 минут будна.
- Усаар угаагаад малахитын ногооны 0.75-1%-ийн усан уусмал болон метилен хөхийн 1%-ийн усан уусмалаар халаахгүйгээр будна.
- Усаар угааж хатаана.

*Үр дүн:* Бруцеллууд улаан, бусад нянгууд хөх өнгөөр будагдана.

### 6.2. Ийлдэс судлалын шинжилгээ:

Ийлдэс судлалын шинжилгээг өвчтөний цусны ийлдсэнд хийнэ.

#### **Розе Бенгалын урвал:**

Цэвэр, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16-аар шингэлсэн шинжлэх ийлдэс, *Brucella abortus* –ийн бүхэл эсээр бэлтгэсэн эсрэгтөрөгчийг урвалд ашиглана.

Урвалын техник: Цагаан өнгийн хавтан дээр шинжлэх ийлдэс болон бруцеллагийн

эсрэгтөрөгчийг адил хэмжээтэй буюу 30мл-ийг дусааж, ойролцоогоор 2 см голч бүхий толбо үүсгэхээр холино. Холимогийг тасалгааны хэмд 4 минутын турш зөөлөн хөдөлгөх ба дараа нь наалдалт явагдаж байгаа эсэхийг тогтооно.

Урвалын үр дүнг тооцох:

- Ийлдсэн дэх дархлаат глобулин, эсрэгтөрөгчийн хооронд наалдалт явагдсан нь нүдэнд харагдахуйц байвал урвалыг эерэг гэж дүгнэнэ.
- Өвчтөний цусны ийлдэсний 1:8-аас дээш шингэрүүлэлтэнд урвал эерэг

**Райтын урвал:** Хуруу шилэнд урвал тавих

Шинжлэх ийлдсийг 0.9%-ийн натри хлоридын уусмалаар 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 дэс дараалан шингэрүүлнэ. Эхний хуруу шилэнд 2.3 мл, дараагийн хуруу шил тус бүрт нь 0.5 мл физиологийн уусмал хийж 1-р хуруу шилэнд 0.2 мл ийлдэс нэмж холиод түүнээс 1.5 мл-ийг асгаад, 0.5 мл-ийг авч, 2-р хуруу шилэнд хийж хольж, дахин 0.5 мл-ийг 3-р хуруу шилэнд хийх зэргээр дараагийн хуруу шил бүрт 0.5 мл-ийг дамжуулан сүүлчийн хуруу шилнээс 0.5 мл-ийг асгана. 0.9%-ийн натри хлоридын уусмалаар 1:10 шингэрүүлсэн оношлуурын эсрэгтөрөгчөөс 0.5 мл-ийг хуруу шил бүрт нэмнэ. Сайтар хөдөлгөж хольсны дараа 36-38°C халуун тогтоогуурт 18-24 цаг байлгана. Урвалын дүнг эерэг, сөрөг хяналттай харьцуулна.

Урвалын үр дүнг тооцох:

- Шингэн тунгалагжиж, тунадас шилний ёроолд шүхэр хэлбэртэй буусан бол эерэг
- Шингэний анхны өнгө өөрчлөгдөөгүй, тунадас үүсгээгүй бол сөрөг
- Урвал зөвхөн 1:25, 1:50 шингэрүүлэлтэд явсан бол сул эерэг
- 1:100, 1:200-д явсан бол эерэг
- 1:400-с дээш таньцад явсан бол хүчтэй эерэг гэж дүгнэнэ.

**Хеддельсоны урвал:** Тавиур шилэнд тавих

Урвалыг урвалын самбар дээр тавина. Шинжлэх ийлдсээс 0.01, 0.02, 0.04, 0.08 мл-ыг авч тавиур шилэн дээр дусаана. Ийлдэс тус бүр дээр 0.03 мл оношлуурын эсрэгтөрөгчийг нэмж, багаас нь эхлэн 1 савхаар дэс дараалуулан хольж, цахилгаан сэгсрэгчийн тусламжтайгаар 5-8 минут холино. Урвал эерэг бол эхний минутад ээдэж үзэгдэхүйц лавс үүснэ. Урвалын дүнг эерэг, сөрөг хяналтын ийлдэстэй харьцуулж дүгнэнэ.

Урвалын үр дүнг тооцох:

- Урвал зөвхөн 0.04 мл-т явбал сул эерэг
- 0.02 мл-т бол эерэг
- 0.02- 0.01 мл-т явбал хүчтэй эерэг гэнэ.

### **6.3. Нян судлалын шинжилгээ:**

- *Нян судлалын шинжилгээнд шаардагдах багаж, тоног төхөөрөмж:* Биоаюулгүйн 2-р зэрэглэлийн кабинет, Бичил харуур, CO<sub>2</sub> үүсгэгчтэй болон энгийн дулаан тогтоогуур, стомакер, соронзон холигч
- *Нян судлалын шинжилгээнд хэрэглэх тэжээлт орчин:* Хос фазтай Кастанедагийн орчин, Фарреллын орчин, СІТА орчин, элэгтэй агар, ийлдэст декстрозын агар, элэгтэй шөл, тионин, фуксин, сафранин зэрэг будагч бодис агуулсан тэжээлт орчин, Tb, Iz, WB, R\С фагууд,

Бруцеллыг өвчтөний тархи нугасны шингэн, шээс, үений шингэн зэргээс өсгөвөрлөж болох ч нян судлалын шинжилгээнд хамгийн өргөн ашигладаг сорьц бол цус юм. Цусыг өсгөвөрлөхийн өмнө цагаан эсийн фракцийг бөөгнөрүүлэн задлах нь нян ялган авах хувь хэмжээг нэмэгдүүлдэг.

Өвчтөн халуурч байгаа, антибиотик хэрэглээгүй үед өсгөврийг хамгийн ихээр ялгаруулж байдаг тул энэ үед шинжилгээ авахад хамгийн тохиромжтой байдаг. Өвчтөний тохойн венээс 10 мл-ээс багагүй хэмжээтэй цус авч тэжээлт орчнуудад суулгана. Мөн ясны чөмөг, шээс, тархи нугасны шингэн, хөхний сүү, цөс, цэр, цогцосны материал зэргээс ялган ургуулж болно. Шинжилж байгаа материалаа 0,1мл-ээр тэжээлт орчны гадаргуу дээр тарааж суулгана. Мөн шингэн тэжээлт орчинд 5-10 мл-ээр суулгана. Суулгацыг 37<sup>0</sup>С-ийн 5-10%-ийн нүүрсхүчлийн агууламжтай, чийгшил ихтэй дулаан тогтоогуурт өсгөвөрлөнө. Мөн нүүрс хүчлийн хийн агууламжгүй дулаан тогтоогуурт зэрэгцүүлэн өсгөвөрлөнө.

Суулгасны дараа 4 дэх хоногоос эхлэн суулгацуудыг өдөр бүр хянаж үзнэ. Суулгацыг 45 хоног хүртэл ажиглана.

*Нян судлалын шинжилгээний үр дүн:* Бруцеллагийн колони гөлгөр (S) болон барзгар (R) хэлбэрээр ургана.

Хатуу тэжээлт орчинд бруцелла нь гөлгөр гадаргатай, товгор, тэгш зах ирмэгтэй, дугуй S колони ургана. Энэ хажуугийн гэрэл тусгаж харахад цайвар, нэвтэрсэн гэрэлд шар өнгөтэй харагдана.

Өсгөвөрлөлтийн 7-10 дах хоногт колони нь том, тунгалаг, микроскопоор харахад жигд төвдөө бага зэрэг мөхлөгтэй байна.

### S болон R бруцеллагийн шинж чанар

Шинж чанар	S хэлбэр	R хэлбэр
Хатуу тэжээлт орчинд ургах колони	Зөв дугуй хэлбэртэй, товгор, жигд эсвэл бага зэрэг мөхлөгтэй, гөлгөр гадаргатай, гялалзсан, чийглэг	Дугуй, бага зэрэг товгор, мөхлөг ихтэй, гадаргуу тэгш биш, тунгалаг биш
Шингэн тэжээлт орчинд ургах	Жигд булингартай	Тунгалаг, тунадастай
Физиологийн уусмалтай холилдох чадвар	Булинга жигд, тогтвортой байна.	Булинга тунадастай, тогтвортой биш
Наалдах чадвар	Ийлдсийн эцсийн тань хүртэл	Өвөрмөц биш
Хоруу чанар	Өндөр хоруу	Ихэнхдээ сул
Трипафлавины урвал	Сөрөг	Эерэг
Дулааны урвалд орох чадвар	Сөрөг	Эерэг
Уайт Вильсоны будаг	Цайвар шаргал эсвэл цайвар ногоон	Гүн хөх ягаан эсвэл цайвар цэнхэр

**Трипафлавины сорил:** Трипафлавины уусмалыг 1:500-аар физиологийн уусмалаар шингэлнэ. Шингэлсэн уусмалаас тавиур шилэн дээр 1 дуслыг дусааж шинжилж байгаа өсгөврийг холино.

*Урвалын үр дүн:* Урвал эерэг 1-2 минутын хугацаанд наалдалт явагдаж тод харагдахуйц тунадас үүснэ.

**Дулааны урвал:** 48 цаг ургуулсан бруцеллагийн өсгөврийг физиологийн уусмалд  $2 \times 10^9$  нянгийн булинга бэлтгэнэ. Булингыг  $90^{\circ}\text{C}$ -ийн усан ваннд 45 минут халаана.

*Урвалын үр дүн:* Эхний үр дүнг халааж дуусмагц, эцсийн үр дүнг тасалгааны хэмд тавьж 24 цагийн дараа харна. Энэ хугацаанд эсийн задрал явагдсан тохиолдолд бруцеллагийн эсийн наалдалт явагдсан нь тод харагдана. Задрал болоогүй бол булинга жигд байна.

**Уайт Вильсоны будгаар будах:** Альбимын агарыг петрийн аяганд савлаад 1 хоног хатаана. Үүний дараа шинжилж байгаа өсгөврөө хатаасан агар дээр тариад  $37^{\circ}\text{C}$ -д 4 хоног ургуулна. Ургуулсны дараа агарын гадарга дээр 1:2000-ийн кристал ягааны усан уусмалыг асгана. 3-5 минутын дараа будагаа буцаан халдваргүйтгэх уусмал руу асгана.

Урвалын үр дүн: Өсгөврийг томруулдаг шил стероскопмикроскопоор харахад S хэлбэрийн колони цайвар шаргал эсвэл цайвар ногоон, R хэлбэрийн колони гүн хөх ягаан эсвэл цайвар цэнхэр өнгөтэй байна.

### Бруцеллын төрөл зүйл, биологийн хэвшлийг ялгах шинж

Зүйл	Биологийн хэвшил	CO <sub>2</sub> -ийн хэрэгцээ	H <sub>2</sub> S үүсэлт	Өнгөт тэжээлт орчинд ургах			Нэг эсрэгтөрөгчид өвөрмөц ийлдсийн наалдуулах урвал		
				Шээг	Тионин	Фуксин	A	M	R
<i>B.melitensis</i>	1	-	-	+	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>B.abortus</i>	1	(+)	+	+	-	+	+	-	-
	2	(+)	+	+	-	-	+	-	-
	3	(+)	+	+	+	+	+	-	-
	4	(+)	+	+	-	(+)	-	+	-
	5	-	-	+	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	+	-	-
	9	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>B.suis</i>	1	-	+	+	+	(-)	+	-	-
	2	-	-	+	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	+	(-)	+	+	-
	5	-	-	+	+	-	-	+	-
<i>B.canis</i>	-	-	-	+	+	(-)	-	-	+
<i>B.ovis</i>	-	+	-	-	+	(-)	-	-	+

Тайлбар:

- + эерэг
- (+) ихэвчлэн эерэг
- - сөрөг
- (-) ихэвчлэн сөрөг
- A- abortus
- M-melitensis
- R-барзгар

Нян судлалын шинжилгээнд Кастанедагийн хос фазтай орчин ашиглаж байгаа бол сорьцыг эхлээд шингэн фазад хийж лонхыг босоо байдалд тавьж өсгөвөрлөнө. 24-48 цагийн зайтай шингэн хэсгийг агарын гадаргуу дээр хэдэн минутын турш гүйлгэн



угааж, лонхоо буцаан босоо тавьж үргэлжлүүлэн өсгөвөрлөнө. Хэрэв сорьцонд бруцеллёзын үүсгэгч байвал агар дээр, мөн түүнчлэн шингэн фазад бруцеллын колонууд ургана.

### Бруцеллын гөлгөр (S) ба барзгар (R) гадаргуут нянгуудыг задлах фагийн идэвхи

Фагийн омгууд	<i>B.abortus</i>		<i>B.suis</i>		<i>B.melitensis</i>		<i>B.canis</i>		<i>B.ovis</i>	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
Tb	L	NL	NL	NL	NL	NL		NL		NL
Wb	L	NL	L	NL	V	NL		NL		NL
R/C	NL	L	NL	NL	NL	NL		L		L
Iz1	L	NL	bg1,4,L bg 2,3,5; PL	bg1,4,V bg 2,3,5; NL	L or NL	V		NL		NL

Тайлбар:

- L –нэлэнхүй задрал
- PL – хэсэгчилсэн задрал, дан колони эсвэл ургалт саатсан
- NL- Задраагүй
- V- хувьсамхай, зарим омгууд задарсан
- bg- биологийн бүлэг

### Биохимийн идэвхи

Бруцелла нь каталаза, уреаза, гиалуронидаза, пероксидаза, амилаза, липаза, фосфатаза, цитохромоксидаза зэрэг ферментийн идэвхитэй.

### Нян судлалын шинжилгээнд ашиглах тэжээлт орчныг бэлтгэх:

**Кастанедын орчин:** Кастанедагийн хос фазтай орчин бэлтгэхэд ийлдэс декстрозын шөлийг шингэн фаз, ийлдэс декстрозын агарыг хатуу фаз болгон ашиглана. Мөн Броди, Синтоны шингэн орчныг ашиглаж болно. Хавтгай ханатай 125мл-ийн лонхонд 20 мл агарыг урт ханыг жигд бүрхэж байхаар савлаад автоклавт ариутгаад, урт ханан дээрээ царцтал нь хөдөлгөөнгүй байлгана. Царцсны дараа лонхонд 2%-ийн лимонхүчлийн натритай (цус бүлэгнэхээс сэргийлнэ) ариутгасан шөлийг 10-15 мл-ийг нэмнэ. Лонхны нэг талын ханан дээр хатуу орчин бүрэлдэж тогтох ба харин ёроолдоо шингэн орчинтой болно. Бэлэн болсон тэжээлт орчныг 37<sup>0</sup>C-д 2-3 хоног байлгасны дараа шинжилгээнд хэрэглэнэ.

**Элэгний агар:** Элэгнээс шинээр бэлтгэсэн 500 г таташ дээр 500 мл ус нэмнэ. Холимгийг 1 цагийн турш хутгаж буцалгана. Буцалгах үед үүссэн хөөсийг шүүж авна.

Дараа нь цаасан шүүлтүүрээр шүүнэ. Элэгний хандыг шилэн лонхонд савлан автоклаванд 120-115 хэмд 20 минут ариутгана.

Агар бэлтгэхийн тулд 500 мл элэгний ханданд 10 г хуурай пептон, 5 г химийн цэвэр хлорт натри, 26 г усаар угааж сайтар шүүсэн агар-агар нэмнэ. Орчныг агарыг бүрэн хайлтал чанаж, рН-ийг 7,4-д тохируулан хэрэглэх саванд юүлнэ. Бэлэн болсон орчныг 115<sup>0</sup>С-д 20 минут автоклавдаж, урьдчилан бүлээн усаар норгосон хөвөн марлин шүүлтүүрээр шүүж, рН-ийг 7,2-д тохируулан саванд юүлж, 115<sup>0</sup>С-д 30 минут ариутгана.

**Ийлдэст декстрозын агар:** 835 мл нэрмэл усанд 15 г агар-агар, 10 г пептон, 5 г химийн цэвэр хлорт натри, 165 мл манхы ус нэмнэ. Бүх орцыг холиод ууранд 1 цагийн турш боловсруулж, орчины рН 7,8 болгоно. Дараа нь савыг автоклавт хийж, 120 хэм, 2 атмосферин даралтанд фосфатуудыг тунатал байлгана.

Орчныг цаасан шүүлтүүрээр шүүж, рН-ийг 7,4-д тохируулан, саванд хийж, 116<sup>0</sup>С-д 15 минут ариутгана.

Тэжээлт агарыг хэрэглэх хэмжээгээрээ хайлуулан, 50<sup>0</sup>С хүртэл хөргөж, түүн дээр идэвхгүйжүүлсэн адууны эсвэл үхрийн 5% ийлдэс, 1% декстрозын (глюкозын) уусмал нэмнэ.

**Элэгний шөл:** 500 мл элэгний ханданд 500 мл крантны ус нэмж, 10 г хуурай пептон, 5 г химийн цэвэр хлорт натри нэмнэ. Холимгийг буцалгаж, рН-ийг 7,4-д тохируулан шүүлтүүрийн цаасаар шүүж, 115-120 хэмд 20 минут ариутгана. Ариутгасны дараа шөлний Ph 7,1-7,2 байх ёстой.

#### **Фарреллын орчин:**

Суурь: ийлдэс, декстроз, агар

Brucella Medium Base (Oxoid CM169) агар дээр 5 % -иар тугал эсвэл адууны ийлдэс нэмнэ. Дараа нь антибиотикийг 1 литр тэжээлт орчинд орохоор тооцож нэмнэ. Үүнд:

- Бацитрацин 25 нэгж\мл
- Циклогексамид 100 нэгж\мл
- Полимиксин Б сульфат 5 нэгж\мл
- Ванкомицин 20 млг\мл
- Налидиксийн хүчил 5 млг\мл
- Нистатин 100 нэгж\мл

### **СИТА орчин:**

Цустай агарын суурь тэжээлийг 40.5гр-ыг 1 литр нэрмэл усанд найруулан, 120<sup>0</sup>С-д 20 минут ариутгана. Бэлэн болсон тэжээлт орчин дээр шинэ төрсөн тугалын ийлдэс 5%-иар нэмнэ. Дараа нь антибиотикийг 1 литр тэжээлт орчинд орохоор тооцож нэмнэ.

Үүнд:

- Ванкомицин 20 млг
- Колистин 7.5 млг
- Нистатин 100 нэгж\мл
- Нитрофурантион 10 млг
- Амфотерицин 4 млг

### **Будагч бодистой тэжээлт орчин:**

Тионин, фуксин, сафранин зэрэг будагч бодис агуулсан тэжээлт орчны сууриар Trypticase soy агар-ыг хэрэглэнэ.

Будагч бодисын үндсэн уусмалыг тионин 0.1%, фуксин 0.1%, сафранин О-г 1%-иар тооцож нэрмэл усаар найруулж бэлэн болгоно. Уусмалыг 20 минут уур гартал нь зөөлөн халаана. Бэлэн болсон будагч бодисын үндсэн уусмалыг 4<sup>0</sup>С-д 3 сар хүртэл хадгална.

Trypticase soy агар-ыг хайлуулаад 45<sup>0</sup>С хүртэл хөргөөд тугалын болон адууны ийлдэс 5%-иар тооцож нэмнэ. Дараа нь будагч бодисын үндсэн уусмалаас 100 мл тэжээлт орчинд:

- Тионин 2мл, 1мл (20млг\мл, 10млг\мл эцсийн концентраци)
- Фуксин 2мл, 1мл (20млг\мл, 10млг\мл эцсийн концентраци)
- Сафранин О 1мл (100млг\мл эцсийн концентраци) тус тус тооцож нэмнэ.

### **Броди, Синтоны шингэн орчин:**

Ийлдэс декстрозын шөлөн дээр антибиотикуудыг доорхи хэмжээгээр нэмнэ. Үүнд:

- Бацитрацин 25 нэгж\мл
- Циклогексимид 100 нэгж\мл
- Полимексин Б сульфат 6 нэгж\мл
- Налидиксийн хүчил 5 мкг\мл
- Ванкомицин 20 мкг\мл
- Амфотерицин Б 1 нэгж\мл
- Д-циклосерин 100 нэгж\мл

#### **6.4. Биологийн шинжилгээ:**

Бусад бичил биетнээр бохирдсон эсвэл үүсгэгчийг маш бага хувиар агуулж байгаа сорьцноос бруцеллыг ялгаж авах зорилгоор биологийн шинжилгээ хийнэ. Биологийн шинжилгээнд цагаан хулгана, усан гахай ашиглана. Шинжилгээнд ашиглах цагаан хулгана 17-18 гр, усан гахай 250-300 гр жинтэй байна. Шинжлэх сорьцыг цагаан хулганад 0.5 мл, усан гахайд 1 мл-ээр цавьны арьсан дор халдварлуулна. Халдварлуулсан цагаан хулганыг 20-25, усан гахайг 30-35 хоног хүртэл ажиглаад, задалж шинжилнэ. Усан гахайг задлан шинжлэхийн өмнө зүрхнээс нь цус авч наалдуулах урвалаар шинжилгээ хийнэ. Суулгац хийхийн тулд усан гахайнаас тунгалагийн булчирхай (цавины, эрүүний доод, хүзүүний, гол судасны орчмын), элэг, дэлүүний хэлтэрхий, ясны чөмөг, цус, шээсийг шинжилгээнд авна. Харин цагаан хулганаас тунгалагийн булчирхай (цавины, суганы, гол судасны орчмын, эрүүний доод), элэг, дэлүүний хэрчим авч шинжилнэ.

Тунгалгийн булчирхай, элэг, дэлүүний хэрчимийг бутлагч аппаратаар няцлан жигд булинг болгосны дараа тэжээлт орчинд суулгаж шинжилнэ. Ясны чөмөгийг гуяны яснаас, зүрхний цус, шээсийг ариутгасан дусаагуураар авч шууд тэжээлт орчинд тарьж шинжилнэ. (агар эсвэл шөл)

#### **6.5. Молекул биологийн шинжилгээ:**

6.5.1 Молекул биологийн шинжилгээнд шаардлагатай багаж, тоног төхөөрөмж, урвалж бодис, праймер:

- Биоаюулгүйн 2-р зэрэглэлийн кабинет
- Холигч
- Бичил хурилдуур
- ПГУ-ын олшруулагч машин
- Хүчдэл тохируулагч
- Электрофорезийн аппарат
- Гель хайлуулагч
- Электрон жин
- ПГУ-ын үр дүнг хэт ягаан туяаны тусламжтайгаар дүрслэн харж дүгнэх систем
- Нэг удаагийн бээлий
- Эппендорфийн хуруу шил /1,5-2 мл, 0,2 мл, 0,5мл/

- Эппендорфийн хуруу шилний тавиур
- Автомат дусаагуур, фильтртэй ариун хошуу /20-200мкл, 1000мкл, 0,5-10мкл, 2-20мкл/
- Шилний харандаа
- Хаягдал хийх сав

Урвалж бодис:

**ДНХ ялгаж ажиллагаанд:** Задлагч уусмал (нэрмэл ус, Трис, Твин 20, протейназа К, лизоцим, ЭДТА), фенолхлорформ, 96% , 70% этилийн спирт, давхар нэрсэн ус

**ПГУ явуулахад:** ПГУ-ын цомог, өвөрмөц праймерууд, ионгүйжүүлсэн ус, ДНХ-ийн молекул жингийн маркер

Бруцеллэзын нянгийн праймерийн өвөрмөц дараалал

Бай ген	Праймерийн нэр	Праймерийн дараалал 5'3'	Молекул жин (bp)
<b><i>Brucella spp</i> тодорхойлох</b>			
31 kDa immunogenic <i>bcspr</i> 31 кодлогч ген	B4	TCGGTTGCCAATATCAA	223bp
	B5	CGCGCTTGCCTTTTCAGGTCTG	
<i>omp2</i> гадаад мембраны уураг кодлогч ген	JPF	GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA	193bp
	JPR	ACCAGCCATTGCGGTTCGGTAA	
<i>B. abortus</i> -ийн 16S rRNA –ийн дараалал	F4	TCG AGC GCC CGC AAG GGG	905bp
	R2	AAC CAT AGT GTC TCC ACT AA	
<b><i>Brucella</i> зүйлүүдийг ялган тодорхойлох</b>			
Glycosyltransferase gene <i>wboA</i>	BMEI 0998f	ATC CTA TTG CCC CGA TAA GG	1682bp
	BMEI 0997r	GCT TCG CAT TTT CAC TGT AGC	
Immunodominant антиген, <i>bp26</i> ген	BMEI 0535f	GCG CAT TCT TCG GTT ATG AA	450bp (1320bp*)
	BMEI 536r	CGC AGG CGA AAA CAG CTA TAA	
<i>omp31</i> гадаад мембраны уураг кодлогч ген	BMEI 0843f	TTT ACA CAG GCA ATC CAG CA	1071bp
	BMEI 0844r	GCG TCC AGT TGT TGT TGA TG	
Polysaccharide deacetylase	BMEI 1436f	ACG CAG ACG ACC TTC GGT AT	794bp
	BMEI 1435r	TTT ATC CAT CGC CCT GTC	

		AC	
Erythritol catabolism, <i>eryC</i> ген	BMEI 0428f	GCC GCT ATT ATG TGG ACT GG	587bp
	BMEI 0428r	AAT GAC TTC ACG GTC GTT CG	
ABC transporter холбогч уураг	BMEI 0953f	GGA ACA CTA CGC CAC CTT GT	272bp
	BMEI 0953r	GAT GGA GCA AAC GCT GAA	
Рибосомын уураг S12, <i>rpSL</i> ген	BMEI 0752f	CAG GCA AAC CCT CAG AAG C	218bp
	BMEI 0752r	GAT GTG GTA ACG CAC ACC AA	
Transcriptional gerulator, CRP family	BMEI 0987f	CGC AGA CAG TGA CCA TCA AA	152bp
	BMEI 0987r	GTA TTC AGC CCC CGT TAC CT	
	Bmicroti-spec fw	AGA TAC TGG AAC ATA GCC CG	510 bp
	Bmicroti-spec rev	ATA CTC AGG CAG GAT ACC GC	
*Далайн амьтнаас илрүүлсэн <i>Brucella</i> -ийн омогт <i>brp26</i> гений ампликоны хэмжээ 1320bp байна.			

Агарозын гель электрофорезэд: Трис-боратын буфер pH=8.3 (5xTBE) (89 mM Трис, 89 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2mM ЭДТА) , 1xTBE (5x буфер 100 мл, нэрсэн ус 400 мл), 1.5% агароз гель, этидиум бромидын 0,001%-ийн уусмал (250 мл нэрсэн усанд 2,5 мг этидиум бромид)

6.5.2. Молекул биологийн шинжилгээ:

ДНХ ялгах үйл явц: 2 аргаар ДНХ-г ялгана.

➤ Фенол хлороформын аргаар ДНХ ялгах:

- Задлагч уусмалаа бэлтгэж (5мл ариун нэрмэлд: трис 30мг, ЭДТА 15мг, твин 20 15мкл, протейназа К 15мкл, лизоцим 10мг), 37°-д 30 мин тавина.
- Сорьцноос 100 мкл-ийг авч эппендорфийн хуруу шилэнд хийж, 100 хэмийн усан баннд 15 минут тавьж идэвхигүйжүүлнэ.
- Идэвхигүйжүүлсэн сорьцон дээр 100 мкл задлагч уусмал нэмж 37°C хэмд 1 цаг тавина.
- Задлагч уусмал нэмсэн сорьцон дээр 200 мкл фенол хлорформийн холимог (1:1) нэмж сайтар холиод 14000 эрг\мин хурдаар 10 мин хурилдуулна.

- Дээд шингэнийг соруулан авч, хаяг бүхий шинэ хуруу шилэнд хийж, 2 эзэлхүүн 96% спирт нэмээд -20°C 1 цаг тавина.
- 14000 эрг\мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 70%-ийн этилийн спирт нэмж 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 60° С хэмд 15 мин тавьж спиртийг ууршуулна.
- Хатаасан ДНХ-г ойролцоогоор 30 мкл нэрмэл ус нэмж шингэлнэ.

➤ *ДНХ ялгах цомог ашиглан ДНХ ялгах:* Цус, эдээс ДНХ ялгах цомог ашиглан үйлдвэрлэгчийн дагалдуулсан зааврын дагуу ялгана.

*Полимеразын гинжин урвал (ПГУ) тавих:*

ПГУ-ын холимгийг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу бэлтгэнэ. *Brucella* spp тодорхойлох ПГУ-ыг **B4/B5-д:** 93° хэмд 5 минут, 35 цикл (90° хэмд 60 сек, 60° хэмд 30 сек, 72° хэмд 60 сек), 72° хэмд 5 минут, **JPF/JPR –д:** 94° хэмд 4 минут, 35 цикл (94° хэмд 60 сек, 60° хэмд 60 сек, 72° хэмд 60 сек), 72° хэмд 5 минут, **F4(F)/R2(R)-д:** 95° хэмд 5 минут, 30 цикл (95° хэмд 30 сек, 54° хэмд 90 сек, 72° хэмд 90 сек), 72° хэмд 6 минутаар тус тус гүйцэтгэнэ.

*Brucella* зүйлүүдийг ялган тодорхойлох ПГУ-ыг: 95° хэмд 15 минут, 25 цикл (94° хэмд 30 сек, 58° хэмд 90 сек, 72° хэмд 180 сек), 72° хэмд 10 минутаар гүйцэтгэнэ.

*Гель электрофорез тавих:*

ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг 1.5%-ийн агарозын гельд 60 вольт хүчдэлээр 30 минут электрофорез гүйлгэнэ.

6.5.3. Урвалын үр дүнг тооцох:

Электрофорез дууссаны дараа гель детекцийн аппарат DijiDoc-It Image System ашиглан үр дүнг авна. *Brucella* spp тодорхойлох урвалын эерэг хяналт болон *Brucella* spp бүхий дээжний ДНХ-д 223bp, 193 bp, 905 bp бүхий толбо үүснэ. *Brucella* зүйлүүдэд дараах хэмжээгээр толбо үүснэ. Үүнд:

- *B.abortus* (152bp, 450bp, 587bp, 794bp, 1682bp)
- *B. melitensis* биотип 1-3 (152bp, 450bp, 587bp, 794bp, 1071bp, 1682bp)
- *B. ovis* (152bp, 450bp, 587bp, 794bp, 1071bp)
- *B. suis* биотип 1-5 (152bp, 272bp, 450bp, 587bp, 794bp, 1071bp, 1682bp)
- *B. canis* (152bp, 272bp, 450bp, 587bp, 1071bp, 1682bp)
- *B. neotomae* (272bp, 450bp, 587bp, 794bp, 1071bp, 1682bp)

#### 6.5.4. Чанарын хяналт:

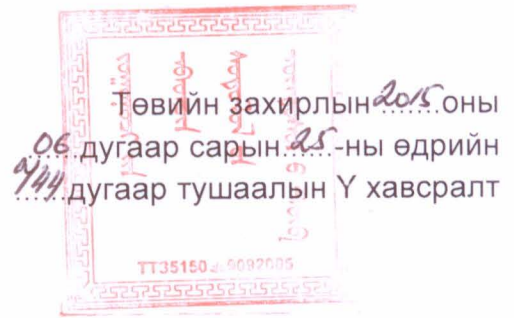
- Эерэг хяналтанд бруцеллөз өвчний үүсгэгчийн ДНХ-ийг авна.
- Сөрөг хяналтанд нуклейн хүчил ялгах, Мастер микс бэлтгэх, ПГУ-ын өрөө тус бүрээс ариун нэрмэл ус юмуу ТВЕ буфер авна.
- Олон улсын стандартад нийцсэн ISO-9001 сертификаттай бүтээгдэхүүнийг сонгож хэрэглэнэ.
- Урвалж, оношлуур, праймерын хадгалалтын горимыг чанд мөрдөх ба праймер, урвалж бодисын хүчинтэй хугацаанд байнга хяналт тавьна.

--oOo-

#### **Хавсралт**

1. Лабораторийн шинжилгээний гарын авлага. 2003 он
2. Байгалийн голомтот халдварт өвчний лабораторийн оношлогооны протокол. 2010 он
3. Медицинская микробиология. 1997 он
4. Хүн, малын бруцеллөз 2013





## ХУМХАА ӨВЧНИЙ ЛАБОРАТОРИЙН ШИНЖИЛГЭЭНИЙ СТАНДАРТ АЖЛЫН ЗААВАР

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Хумхаа өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо-22
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- B50-54	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил
Зориулалт: Хумхаа өвчний лабораторийн шинжилгээ, оношлогоонд	
Хэрэглэх хүрээ: Хумхаа өвчний шинжилгээ, оношлогоо, судалгааны лабораториуд	
Боловсруулсан: Л.Оргилбаяр, Х.Тунгалаг	Баталсан, зөвшөөрсөн актын дугаар: ЗӨСҮТөвийн захирлын А/44 тоот тушаалын тавдугаар хавсралт
Огноо: 2015 он	Огноо: 2015. 06.25
Хэвлүүлсэн: Мэргэжлийн тусламжын алба, Лавлагаа лабораторийн тасаг	

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Хумхаа өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 22
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- B50-54	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил

## 1. Зорилго, зарчим

Тухайн шинжлэгдэхүүнээс хумхаа өвчний үүсгэгч, эсрэгтөрөгч, ДНХ, өвөрмөц эсрэгбиеийг илрүүлэн баталгаажуулахад оршино.

## 2. Хамрах хүрээ

Хумхаа өвчний сэжигтэй хүний өвчлөлийн тохиолдол, байгалийн голомт хяналтын шинжилгээгээр цуглуулсан сорьцуудыг шинжлэх, шимэгчийг дүйн тодорхойлох, судлах ажиллагааг гүйцэтгэдэг лабораториудад мөрдөнө.

## 3. Тодорхойлолт

Хумхаагийн үүсгэгч нь олон улсын ангилалаар биологийн аюулын (BSL-II) II түвшинд багтдаг ба *Plasmodidae* овгийн *Plasmodium*-ийн төрөлд хамаарах *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae*, *P.ovale* зэрэг 4 зүйлийн эгэл биет шимэгч юм.

***Plasmodium falciparum***: Дэлхийн хамгийн дулаан чийглэг, халуун орны газар нутгаар тархсан байдаг ба хэд хэдэн хувиралтай ба эдгээр нь газар зүйн тархалт, хүнд халдварлах онцлог, бүтэц болон эсрэгтөрөгчийн агууламжаар өөр байдаг.

***Plasmodium vivax***: *P.falciparum*-ыг бодвол илүү бага хэмд шумуулын биед хөгжих чадвартай, иймээс халуун орны нутгуудаар илүү өргөн тархсан. *P.vivax*-ын зүйл нь хэд хэдэн зүйлтэй ба эдгээр нь нууц үе, өвчний дахилтын байдал, хүний улаан эсэд байх шимэгчийн тоо, бүтэц зэргээр ялгагдана.

***Plasmodium malariae***: Хүний өвчлөлийн халдварын 10 хүрэхгүй хувийг эзэлдэг.

***Plasmodium ovale***: Тархалт хязгаарлагдмал, дэгдэлт бага, халдварын хүний өвчлөлийн 10 хүртэлх хувь нь үүсдэг.

## 4. Сорьц цуглуулах хадгалах, тээвэрлэх

### 4.1. Шаардлагатай багаж хэрэглэл

Вакуум хуруу шилний систем (EDTA), өндөг цоологч зүү, пастерийн гуурс, хайч, хямсаа, спиртэн дэн, чангалуур, 2x2 хэмжээтэй цэвэр самбай, нарийн үзүүртэй шилний маркер, харандаа, цантсан төгсгөлтэй наацны шил, сорьц зөөвөрлөх сав (биологийн аюулын тэмдэгтэй), сорьцны гаднах сав, мөсөн элемент.

### 4.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл

Халдвартай материал үсрэх, асгарах, шил сав хагарах, залгих, арьс нүдэнд хүрэхээс сэргийлж эмтэрсэн, цуурсан, ан цав гарсан хуруу шил болон шилэн саванд сорьц авахгүй байх, сорьц авсан савыг тогтвортой сууринд байрлуулах, хувийн хамгаалах хэрэгсэл (хамгаалах өмсгөл, бээлий, маск)-ээс гадна халдваргүйтгэлийн бодисыг хэрэглэнэ. Тариурын зүү, пастерийн шилэн гуурс эсвэл хагарсан шил зэрэг хурц ирмэгтэй зүйлсээс гэмтэхээс

болгоомжилно. Халдвар хамгааллын болон аюулгүй ажиллагааны дэглэмийг баримтална.

#### 4.3. Шинжлэгээний сорьцын төрөл

- Өвчтнөөс сорьц авах: захын цус, хураагуур судасны цус

Захын цуснаас хамгийн багадаа 3 зузаан, 3 нимгэн наац шууд бэлтгэн авна. Хураагуур судасны цусыг бүлэгнүүлэхгүйн тулд EDTA агуулсан вакуум хуруу шилний системд авна. Эмчилгээ эхэлснээс хойш зөвхөн *Plasmodium falciparum* хумхаагийн ихэнхи тохиолдолд өвчтний цусан дахь шимэгчийг хянах зорилгоор 24 цаг, 36 цаг, 48 цаг, 72 цагт сорьц авна.

*Захын цусны сорьц авах:*

- Өвчтний зүүн гарын алгыг дээш харуулан дунд эсвэл ядам хурууг чимхэж барина. Бага насны хүүхдэд хөлний эрхий хурууг сонгож болно (Зураг 1).
- Спиртийн уусмалаар чийглэсэн цэвэр самбайгаар хурууны өндөгний гадаргууг хүчтэй арчиж бохир, тосыг цэвэрлэнэ. Өөр хуурай цэвэр самбайгаар үлдэгдэл спиртийг хүчтэй арчих нь цусны эргэлтийг сайжруулна.
- Ариун өндөг цоологчоор эргүүлэх маягаар хатгана. Хурууг болгоомжтой шахаж эхний дусал цусыг хуурай цэвэр самбайгаар арчина
- Наацны шилийг ирмэгээс нь барьж хурууг болгоомжтой шахаж, жижиг дуслыг наацны шилний цантсан төгсгөлийн ойролцоо хэсэгт дусаан нимгэн түрхэц бэлтгэнэ.
- Хурууг дахин шахаж, дээрхээс 2 - 3 дахин том хэмжээний дуслыг нимгэн түрхцээс 1 см-ийн зайтай байхаар дусаана. Хуруунд үлдсэн цусыг цэвэр самбайгаар арчина.



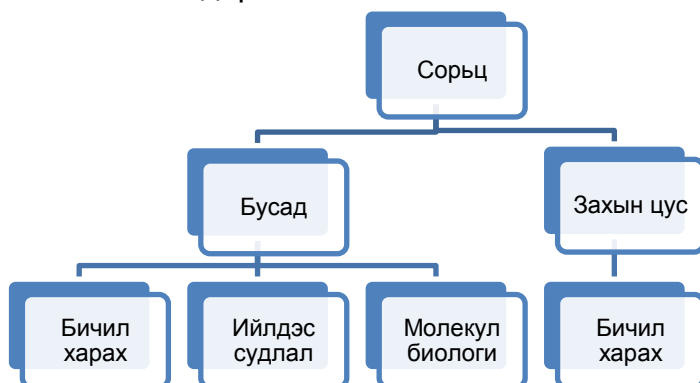
- Нас барсан тохиолдолд зүрх, дэлүүнээс сорьц авна.
- Шумуулыг цуглуулан төрөл зүйлийг тодорхойлно.

4.3.1. Сорьцод боловсруулалт хийх: Хумхаагийн сэжигтэй сорьц материалд шимэгч судлалын бичил харуурын шинжилгээнд боловсруулалт хийгдэхгүй. Харин ийлдэс судлал, молекул биологийн шинжилгээнд хэрэглэгдэж буй оношлуурын цомгийн зааврын дагуу боловсруулалт хийгдэнэ.

4.3.2. Сорьцыг хадгалах: Цусны зузаан болон нимгэн түрхэц, эрхтний түрхэц зэргийг будсны дараа наалттай гялгар цаас нааж хадгална. Ялгасан ДНХ-ийг  $-20^{\circ}\text{C}$  хэмд хадгална.

## 5. Шинжилгээний аргачлал

### 5.1. Шинжилгээний дараалал



### 5.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл (аюулгүй ажиллагааны ижил нөхцлөөр бүлэглэж болно)

Био аюулгүйн II түвшингийн лаборатори

### 5.3. Бичил харах шинжилгээ

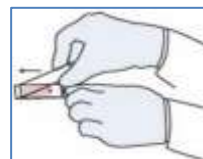
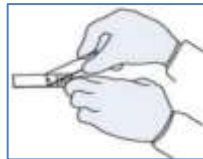
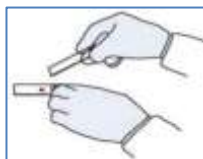
#### 5.3.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, будаг урвалж

Бичил харуур, спиртэн дэн, наацны гүүр, цантсан төгсгөлтэй наацны шил, бүрхүүл шил, Горевын тор, пастерийн гуурс, эппиндорфын хуруу шил, цэвэр метанол, Гимзийн будаг, нарийн үзүүртэй шилний маркер, харандаа.

#### 5.3.2. Бичил харах шинжилгээний

Цусны нимгэн наац бэлтгэх

- Наацны шилний цантсан төгсгөлийн ойролцоо жижиг цусны дусал тавина
- Хоёрдогч “тараагч” наацны шилний мөлгөр ирмэгийг 40-450-ийн өнцгөөр цусны дусалд байрлуулна. Цусыг наацны шилний өргөнөөр бүхэлд нь цусыг тараана (Зураг 5).
- Наацны шилний төгсгөлийн эсрэг тал руу цусыг хойш татан “тараагч” наацны шилийг хурдан ба тэгшхэн байдлаар түлхэнэ. Түрхэц нь наацны шилний захаас хэтрэхгүй байна (Зураг 6).
- Тасалгааны хэмд хатаана. Тоос болон шавьжаас хамгаална. Цэвэр метанолд бэхжүүлнэ.
- Наацанд бичил харуурын шинжилгээ хийх бол будна.



Цусны зузаан наац бэлтгэх

- Зузаан наацыг ойролцоогоор 12 мм голчтой, үл ялиг зузаан хангалттай хэмжээтэй, дөнгөж хэвлэгдсэн сонин мэт шууд уншигдахаар байна.

Зузаан наацыг бэлтгэхэд гардаг хамгийн нийтлэг алдаа бол цусны дуслыг маш том авдаг. Онолын үүднээс 12 мкл орчим цус ашиглана.

- б) Цусны дуслыг наацны шилэнд дөнгөж дусаагаад, хуруугаар тойруулан авна. Хураагуур цусны дуслыг Пастерийн гуурс ашиглан авч наацны шилний төвд дусаана.
- в) Модон савх эсвэл өөр ондоо наацны шилний өнцөг ашиглан эргэлдэх хөдөлгөөнөөр нарийн нягт хүрч дуслыг тараана. Цусыг хэт удаан хугацаагаар холих шаардлагагүй
- г) Тасалгааны хэмд 8-12 цаг хатаана. Тоос болон шавьжаас хамгаална. /Сэнсээр хатаах үед 1-4 цаг болгоно/
- д) Цусны зузаан наацыг спиртээр бэхжүүлж болохгүй.

Тэмдэглэл: Яаралтай шинжилгээний үед цусны нимгэн болон зузаан наацыг хоёуланг нь нэг наацны шилэнд бэлтгэн түргэвчилсэн аргаар будаж болно.

#### Наацтай харьцах

- а) Наацыг тэгш гадаргуу дээр тавьж хатаана.
- б) Ажлын Гимзийн будгийг бэлтгэнэ.
- в) Зузаан наацыг 1 цаг хатаасны дараа бэхжүүлсэн нимгэн наацнаас нэгийг нь Гимзээр будна. Хэрэв зузаан наац наацны шилнээсээ унах, эсвэл эвдэрвэл 2 дахь зузаан наацыг будахад хамгийн багадаа 3-аас дээш цаг хүлээнэ.
- г) Будаагүй нэг зузаан, нэг нимгэн наацыг лавлагаа лаборатори луу илгээхээр хадгална.
- д) Хэрэв наацыг EDTA-тай цуснаас бэлтгэсэн бол, хуруу шилийг 2-80C-ийн хэмд PCR болон бусад судалгаанд ашиглахаар хадгална.

Бичил харах шинжилгээний арга зүй

#### Гимзийн аргаар будах

Зузаан болон нимгэн наацыг будах энгийн арга:

- Нимгэн наацанд 3 дусал метанол дусаах буюу метанол бүхий шилэн аяганд хэдэн секунд байлгаж бэхжүүлнэ.

Анхааруулга:

- Хэт удаан бэхжүүлбэл Шюффнер бижмэг, Маурер толбо зэрэг үүсэхэд бэрхшээл учруулна. Зузаан наацны гемоглобин устахаас сэргийлж түүнийг бэхжүүлэх шаардлагагүй ба метанол, түүний уураар үйлчлүүлж болохгүй.
- Наацны шилнүүдийг түрхэцгүй талаар нь өөд өөдөөс нь харуулан будах савд байрлуулна.
- Буфер, давхар нэрмэл ус, ионгүйжүүлсэн ус зэргээр рН 7,2-той 3%-ийн Гимзийн будгийг бэлтгэнэ.

- Савтай наацны шилнүүд дээр будгийг болгоомжтой хийнэ. Ингэхдээ тавиур шилнүүдийг будганд гүйцэд дүрнэ.
- 40-45 минут будаж, нарны шууд гэрлээс хамгаалж таглана.
- Будгийн гадаргуу дээр солонгортсон хөөс бий болтол цэвэр усыг болгоомжтой нэмнэ.
- Будгийн үлдэгдлийг асгаад, усаар дахин хэдэн секунд угаана.
- Наацыг доош харуулан хатаана.

Нэг наацны шилэн дээрх зузаан болон нимгэн наацыг будах түргэвчилсэн арга:

- Зузаан наацыг гүйцэд хатаана. Яаралтай үед агааржуулагчийн урсгалаар үлээлгэх, бичил харуурын гэрлийн дулаанд тавих зэргээр түргэн хатааж болно.
- Нимгэн наацыг метанол шингээсэн хөвөнд хүрэлцүүлэх, эсвэл савтай метанолд хэдхэн секунд дүрэх замаар бэхжүүлнэ. Зузаан наацыг бэхжүүлэхгүй, метанол болон түүний уураар үйлчлүүлэхгүй.
- Буфер, давхар нэрмэл ус, ионгүйжүүлсэн ус зэргээр рН 7,2-той 10%-ийн Гимзийн будгийг бэлтгэнэ. Хэрвээ зөв төвшрүүлэгтэй бага хэмжээний ажлын будгийн уусмал хэрэгтэй бол 1 мл буфер дээр 3 дусал будгийн үндсэн уусмал нэмж бэлтгэнэ /1 түрхэцийг будахад ойролцоогоор 3 мл ажлын уусмал шаардагдана/. 5 - 10 минут будна
- Цэвэр усыг дусал дуслаар дусаан түрхцээс будгийг болгоомжтой угаана.
- Наацан дээрх будгийг асгаад, угаахгүй. Тэгвэл бохир тунадас үлдэх талтай.
- Наацыг хатаахдаа наацны шилэн дэх түрхэцтэй талыг доош харуулж зузаан түрхэцийг тавиурт хүрэлцүүлэхгүйгээр тавина.

Фильдийн аргаар будах

Зузаан наацыг будах:

- Фильдийн А будгийн уусмалаар наацыг 3 секунд будна.
- Цэвэр усаар болгоомжтой угаана.
- Фильдийн Б будгийн уусмалаар 1 секунд будна.
- Цэвэр усаар угаана.
- Наацыг тавиурт босоо байрлуулж агаарт хатаана.

Нимгэн наацыг будах:

- Наацыг метанолд 1 секунд бэхжүүлнэ.
- Усаар угаана.
- Фильдийн Б будгийн шингэрүүлсэн уусмалаас 1 дусал А будгийн уусмалаас 1 дусал нэмээд, наацны шилийг ийш тийш хөдөлгөн хольж 1 минут будна.
- Цэвэр усаар угаана.
- Наацыг агаарт хатаана.

Анхаарах зүйлс:

- Зузаан болон нимгэн наацны дуслын зузаан зөв байх ёстой. Нимгэн наацны захад цусны эсүүд нь улаан эсийн бүтэц харагдахуйц нэг давхрагаар байрлана.
- Наац нь хэтэрхий зузаан бол улаан эсүүд “зоосон багана” болон давхарлаж, тэдгээрийн нарийн бүтцийг харах боломжгүй болно. Хэт нимгэн бол улаан эсүүдийн хэлбэр хүчтэй өөрчлөгдөж, мөн муу будагдана. Ийм наацанд шимэгчдийн хэлбэр эрс өөрчлөгдсөн байдлаар харагдана.
- Зузаан наац нь хэвлэмэл үсгийг уншиж болохоор байна. Хэрэв хэт зузаан бол зарим хэсэг нь будах үед ховхорч, хуурч унадаг. Хэт нимгэн үед цусны ихэнх хэсэг хаягдаж үрэгдэнэ.
- Зузаан наацыг хэзээ ч бэхжүүлж болохгүй. Зузаан наацанд метанол орохоос байнга сэргийлэх хэрэгтэй.

5.3.3. Чанарын хяналт (будаг урвалж, оношлуурын чанар, хяналтын омгийн дүнтэй холбох)

Хэрэглэсэн будаг урвалжууд нь үйлдвэрлэгчийн хадгалах хугацаа, горимыг баримталсан чанарын шаардлага хангасан байна.

5.3.4. Шинжилгээний хариуг дүгнэх

Халдварласан улаан эсийн хэлбэр:

- Хэмжээ. Халдварласан улаан эс ердийн улаан эс шиг хэмжээтэй буюу томорсон эсэх.
- Бижмэг. Халдварласан улаан эсэд ягаан ба улаан өнгөөр будагдсан цэг шиг бүрдвэрүүд байгаа эсэх. Тэдгээрийг Шюффнерийн цэг гэж нэрлэдэг ба зөвхөн *P.vivax*-ийн үүсгэдэг 3 өдрийн хумхаа өвчний үед тохиолдоно. Ердийн улаан эсэд дээрх цэгүүд байдаггүй. *P.falciparum*-ын трофозоитүүдийн хөгших шатанд улаан ягаан, хөх ягаан өнгөөр будагдсан янз бүрийн хэлбэртэй бүрдвэрүүд тохиолдоно. Үүнийг Маурер толбо гэж нэрлэнэ /Хүснэгт 2, зургаар харуулав/.

Хумхаагийн шимэгчдийн хэлбэр:

- Трофозоитүүдийн ургалтын үе шатанд зөв биш хэлбэр байгаа эсэх.
- Энэ үе шатанд зөв буюу тэгш хэлбэр байгаа эсэх.
- Хөгшин трофозоитүүд, шизонтууд, гаметоцитүүдэд Нөсөө нь ямар өнгөтэй.
- Хэрвээ мерозоитууд байгаа бол гүйцэт боловсорсон шизонт хэд байгаа.
- Хэрвээ гаметоцитүүд байгаа бол тэдгээр нь ямар хэлбэртэй.
- Түрхцэнд хумхаагийн шимэгчдийн ямар ямар үе шатууд байгаа /бөгж, ургаж буй трофозоит, шизонтууд, гаметоцитүүд/ зэрэг болно.

- Том дусалд шимэгчид нимгэн түрхцэнд байдгаас нилээд бага харагддаг ч төрөл, зүйлийн шинж тэмдэгүүд нь хэвээр байна.
- Зарим тохиолдолд том дуслын захын нимгэн хэсгээс илэрсэн шимэгчид нимгэн түрхцийнхтэй адил байдаг. Том дуслын захын хэсэгт улаан эсийн дүрс харагдах тохиолдол гарна.

Шимэгчдийн төрөл, зүйлийг таньж тодорхойлох

Нимгэн түрхэц дэх хумхаагийн шимэгчийн төрөл, зүйлийг тодорхойлох:

Хумхаагийн шимэгчдийг илрүүлэх нимгэн түрхэцийг шинжлэхдээ халдварласан улаан эс болон түүний доторх шимэгчийн хэлбэр судлалын онцлогийг тодорхойлно. Хумхаагийн шимэгчийн үндсэн 4 зүйлийн бөгж хэлбэр нь өөр хоорондоо адилхан байж болно. Хэрэв бөгжийг олж харвал аль болох боловсорч гүйцсэн үе шатыг хайх хэрэгтэй. Халуун орны хумхаагийн үед зөвхөн бөгж харагдана. Өвчний хүнд үед хөгширмөл үе нь тааралдана. Нимгэн түрхэц ба том дусал дахь хумхаагийн шимэгчдийн зүйлийн оношлогооны шинж тэмдэгийг хүснэгт 1-д үзүүлэв.

Том дусал дахь хумхаагийн шимэгчийг тодорхойлох: Будсан том дусалд улаан эс нь хемолиз болдог учраас хумхаагийн шимэгчийг таньж тодорхойлох нь тэдгээрийн хэлбэр судлалын шинж тэмдэгт үндэслэнэ. Том дусалд хумхаагийн шимэгч нь нимгэн түрхцийг бодвол бөөн, нягт харагдана.

Анхааруулга:

- Хумхаагийн шимэгчидтэй андуурч болох объектууд
- Цусны түрхэцэнд дараах объектууд нь хумхаагийн шимэгчдийг санагдуулна.

Үүнд:

- Нимгэн наацанд улаан эсэд наалдсан тромбоцитууд
- Тромбоцитийн бөөгнөрөл
- Улаан эс дэх будагны тунадас
- Тоосонцор, нян, хөрөнгө мөөгөнцөр, спор.
- Хумхаагийн шимэгчдийн үндсэн 3 бүтэц байхгүй /хөх өнгөөр будагдсан сийвэн, улаан буюу ягаан цөм, хар буюу хүрэн нөсөө

#### 5.3.5. Шимэгчийн тоо хэмжээг тодорхойлох

*Plasmodium falciparum* шимэгч нь эмэнд тэсвэртэй учир энэ зүйлээр үүсгэгдэх хумхаагийн үед эмчилгээ эхэлснээс өвчтний цусан дахь шимэгчийг хянах нь чухал ач холбогдолтой. Иймд эмчилгээ эхэлснээс хойш өвчтний цусан дахь шимэгчийг 24 цаг, 36 цаг, 48 цаг, 72 цагт хянана. Хумхаагийн шимэгч нь эмчилгээний системд мэдрэг бол эхний 24 цагийн дотор цусан дахь шимэгчийн тоо 50% ба түүнээс илүү хэмжээгээр буурах ёстой.

а) Эритроцит эс бүр дэх шимэгчийн тоо хэмжээг тодорхойлох



Хумхаагийн халдварууд голчлон тоологдсон 100 эритроцит эс тутмын халдварлагдсан улаан эсийн тооны хувиар процентоор тодорхойлогдоно. Цусны эсийг тоолох аргачлалыг энэ тодорхойлолтыг ашиглаж болно. Нимгэн түрхэцэнд хамгийн багадаа 10-20 талбайд тоолно.

- Талбай дахь шимэгчлэгдсэн эритроцит эсийн тоог тоолох
- Талбай дахь нийт эритроцит эсийн тоог тоолох
- Дахин хамгийн багадаа 10 талбайг тоолсон байх
- Шимэгчлэгдсэн эритроцит эсийн тоог нийт улаан эсийн тоонд хуваах

Жишээ нь: Шимэгчлэгдсэн эритроцит эсийн тоо = 40

Нийт эритроцитэсийн тоо = 2500

$40/2500 \times 100 = 1.6\%$ -ийн цусны шимэгчлэл

б) Лейкоцит эс бүрээр шимэгчийн тоонд суурилан үзэх

Энэ арга нь наацан дахь лейкоцит эс бүрийн шимэгчийн тоог тоолдог. Энэ тоололтыг зузаан нимгэн наацны хоёуланд нь гүйцэтгэж болно. Цусны лейкоцит эсний/мкл-ийн тоогоор ба 100-аар 100 лейкоцит эс бүрийн шимэгчийн тоогоор цусны мкл дахь шимэгчийн тоогоор хувааж хөрвүүлнэ. Цусны шимэгчлэлээс хамаарч тоологдсон эсийн тоо хуваагч өөрчлөгдөн лейкоцит эс бүр дэх шимэгчийн нарийн зөв тоолон тогтооно.

- Хамгийн багадаа 100 лейкоцит эсийг тоолж шимэгчийн тоог тоолно.
- Шимэгчлэлийг % хувиан тооцоолон гаргана.

Жишээ нь: Шимэгчийн тоо = 800

лейкоцит эсийн тоо = 120

Өвчтний лейкоцит эсийн тоо = 6.000/мкл

Өвчтний эритроцит эсийн тоо = 4,000/ мкл

$800 \text{ шимэгч} / 120 \text{ лейкоцит эс} \times 6,000 \text{ лейкоцит/мкл} = 40,000 \text{ шимэгч/мкл}$

$40,000 \text{ шимэгч/мкл} / 4,000,000 \text{ эритроцит эс/мкл} = 1,0\% \text{ цус дахь шимэгч}$

Цусны шимэгчлэлийг дараалсан цусны сорьц авч хянахыг санах нь чухал. Ер нь наац ба эс тоолох наацыг хоёуланг нь ижил цагт цуглуулж, чанартай сорьцонд энэ арга замыг ашиглан хянах шаардлагатай.

#### 5.4. Ийлдэс судлалын шинжилгээ

Хурдавчилсан сорил



Хялгасан судасны цус авч, улаан эс задлагч бодис агуулсан жижиг хуруу шилэнд хийнэ. *P.falciparum*-ын өвөрмөц эсрэг төрөгч HRP2 (гистидинээр баялаг уураг) туузыг даган нэвчдэг. Задарсан цус туузыг даган дээшлэхэд, сорьц доторхи HRP2 эсрэгтөрөгч эсрэг биетэй нэгдэнэ. HRP2 эсрэгтөрөгчид баригдаж ягаан өнгөтэй зурвас үүсгэнэ. Цагаан суурь дээр 2 ягаан зураас харагдах нь *P.falciparum*-ын сорил эерэг байгааг харуулна.

## Фермент холбоот урвал

*P.falciparum* –ийн эсрэг бие IgM, IgG фермент холбоот урвалаар илрүүлэх. Урвал тавин дүгнэх ажиллагааг оношлуурын цомог үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу гүйцэтгэнэ.

## Шууд бус дархан туяаралт урвал

Хумхаагийн эсрэг биеийг шууд бус дархан туяарах уравлын тусламжтай эсрэг бие илрүүлэх тест (IFA). Хэрвээ өвчтөн *Plasmodium* –аар халдварласан бол шууд бус дархан туяарах урвалаар тодорхойлно. Гэхдээ эсрэг биеийг илрүүлэхэд хугацаа шаардлагатай ба цочмог хумхаагийн үед эсрэг биеийг оношлоход серилогийн тест үр дүнтэй биш энгийн арга юм.

Харин магадгүй эсрэг бие илрүүлэхэд доорх нөхцөл бүрдсэн байна:

- Донорын цусаныг шинжлэхгүйгээр юулэх нь эргэлзээтэй тиймээс гол төлөв эхний шатанд хумхаагын сэжигтэй донороос цусны түрхэц бэлтгэн шимэгчийг илрүүлэх
- Өвчтөнд тестийг - голдуу халдвартай орон нутгийн шалтгаантай, архаг давтамжтай хумхаагийн халдварын нөхцөл байдал илэрхий халуун орны цөс томорлын хам шинжтэй
- Өвчтөнд тестийг - ойрын үед хумхааг эмчлээ хийгдсэн эсэхийг тодруулж байж шинжлэх.

### 5.4.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, оношлуур

ELISA уншигч, флюоресцент микроскопи, автомат пипетик 2мкл-20мкл, 20мкл-200мкл, 20мкл-1000мкл, фосфатын буфер, оношлуур цомог.

### 5.4.2. Чанарын хяналт

Цомгийн хүчинтэй хугацаа, хадгалах хэм, оношлуурын чанарын хуудастай эерэг, сөрөг хяналтын харьцаа.

### 5.4.3. Шинжилгээний хариуг дүгнэх

Тухайн цомгийн заврын дагуу шинжилгээний хариуг үнэлнэ.

## 5.5. Молекул-биологийн оношилгоо

### 5.5.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл, урвалж бодис, праймер

- Биоаюулгүйн 2-р зэрэглэлийн кабинет
- ПГУ-ын олшруулагч машин
- Дулаан тогтоогуур
- Бичил хурилдуур
- Хүчдэл тохируулагч
- Электрофорезийн аппарат
- Холигч
- Гель хайлуулагч
- Электрон жин
- ПГУ-ын үр дүнг хэт ягаан туяаны тусламжтайгаар дүрслэн харж дүгнэх систем

- Нэг удаагийн бээлий

- Эппендорфийн хуруу шил (1,5-2 мл, 0,2 мл, 0,5мл)
- Эппендорфийн хуруу шилний тавиур
- Автомат дусаагуур
- Фильтертэй ариун хошуу (20-200мкл, 1000мкл, 0,5-10мкл, 2-20мкл)
- Шилний харандаа
- Хаягдал хийх сав

Урвалж:

*ДНХ ялгах ажиллагаанд:* Задлагч уусмал (нэрмэл ус, Трис, Твин 20, протейназа К, лизоцим, ЭДТА), фенол:хлорформ, 96%, 70% этилийн спирт, давхар нэрсэн ус, фирмийн цомгийн бүрэлдэхүүн

*ПГУ-д:* ПГУ-ын цомог, төрөл болон зүйл өвөрмөц праймер (хүснэгт 1), ионгүйжүүлсэн ус, ДНХ-ийн молекул жингийн маркер

Хумхаагийн үүсгэгчийн ДНХ илрүүлэх өвөрмөц праймерийн дараалал

Хүснэгт 1

Бай ген	Праймерын нэр	Праймерийн дараалал 5'..... 3'	Молекул жин (bp)	
<i>Plasmodium</i> spp төрөл тодорхойлох (үүрэн ПГУ 1)				
rRNA ген	rPLU6	ТТА ААА ТТГ ТТГ САГ ТТА ААА СГ	1050bp	
	rPLU5	ССТ ГТТ ГТТ ГСС ТТА ААС ТТС		
	<i>P. falciparum</i> тодорхойлох (үүрэн ПГУ 2)			
	rFAL1	ТТА ААС ТГГ ТТТ ГГГ ААА АСС ААА ТАТ АТТ	205bp	
	rFAL2	АСА САА ТГА АСТ САА ТСА ТГА СТА ССС ГТС		
	<i>P. malariae</i> тодорхойлох (үүрэн ПГУ 2)			
	rMAL1	АТА АСА ТАГ ТТГ ТАС ГТТ ААГ ААТ ААС СГС	144bp	
	rMAL2	ААА АТТ ССС АТГ САТ ААА ААА ТТА ТАС ААА		
	<i>P. ovale</i> тодорхойлох (үүрэн ПГУ 2)			
	rOVA1	АТС ТСТ ТТТ ГСТ АТТ ТТТ ТАГ ТАТ ТГГ АГА	787 bp	
	rOVA2	ГГА ААА ГГА САС АТТ ААТ ТГТ АТС СТА ГТГ		
	<i>P. Vivax</i> тодорхойлох (үүрэн ПГУ 2)			
	rVIV1	СГС ТТС ТАГ СТТ ААТ ССА САТ ААС ТГА ТАС	117 bp	
	rVIV2	АСТ ТСС ААГ ССГ ААГ САА АГА ААГ ТСС ТТА		

#### *Агарозын гель электрофорезэд:*

Трис-боратын буфер рН=8.3 (5хТВЕ) (89 мМ Трис, 89 мМ  $H_3BO_3$ , 2мМ ЭДТА), 1хТВЕ (5х буфер 100 мл, нэрсэн ус 400 мл), 1.5% агароз гель, этидиум бромидын 0,001%-ийн уусмал (250 мл нэрсэн усанд 2,5 мг этидиум бромид)

#### 5.5.2. Молекул биологийн шинжилгээ:

##### *ДНХ ялгах:*

##### *Фенол:хлороформын аргаар ДНХ ялгах:*

- Задлагч уусмалаа бэлтгэж (5мл ариун нэрмэлд: трис 30мг, ЭДТА 15мг, твин 20 15мкл, протейназа К 15мкл, лизоцим 10мг), 37°-д 30 мин тавьна.
- Сорьцноос 100 мкл-ийг авч эппендорфийн хуруу шилэнд хийж, 100 хэмийн усан баннд 15 минут тавьж идэвхигүйжүүлнэ.
- Сорьцийг усан баннаас гаргаад дээр нь 100 мкл задлагч уусмал нэмж 37°C хэмд 1 цаг тавина.
- Задлагч уусмал нэмсэн сорьцон дээр 200 мкл фенол: хлорформ (1:1) нэмж сайтар холиод 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулна.
- Дээд шингэнийг соруулан авч, хаяг бүхий шинэ хуруу шилэнд хийж, 2 эзэлхүүн 96% спирт нэмээд -20°C 1 цаг тавина.
- 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 70%-ийн этилийн спирт нэмж 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 60°C хэмд 15 мин тавьж спиртийг ууршуулна.
- Хатаасан ДНХ-г ойролцоогоор 30 мкл нэрмэл усаар шингэлж, 1-2мкл-ийг ПГУ-п ашиглана.

##### *ДНХ ялгах цомог ашиглан ДНХ ялгах:*

Цус, эдээс ДНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан сорьцноос ДНХ ялгаж болох ба үйлдвэрлэгчийн дагалдуулсан зааврын дагуу ялгана.

##### *ПГУ тавих:*

ПГУ-ын холимгийг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу бэлтгэнэ. *Plasmodium* spp тодорхойлох үүрэн ПГУ 1-ийг **rPLU6/rPLU5** **праймераар**: 94° хэмд 5 минут, 30 цикл (95° хэмд 30 сек, 53° хэмд 30 сек, 68° хэмд 90 сек), 68° хэмд 5 минутаар гүйцэтгэнэ.

Зүйл тодорхойлох үүрэн ПГУ 2-ыг зүйл өвөрмөц праймеруудаар (***P. falciparum*** тодорхойлох ПГУ-ыг **rFAL1/rFAL2**; ***P. malariae*** тодорхойлох ПГУ-ыг **rMAL1/rMAL2**; ***P. ovale*** тодорхойлох ПГУ-ыг **rOVA1/rOVA2**; ***P. vivax*** тодорхойлох ПГУ-ыг **rVIV1/rVIV2** **праймераар**) 94° хэмд 5 минут, 30 цикл (95° хэмд 30 сек, 55° хэмд 30 сек, 68° хэмд 60 сек), 68° хэмд 5 минутаар тус тус гүйцэтгэнэ.

##### *Гель электрофорез тавих:*

1.5%-ийн агароз гель бэлтгэж, 1µg/ml этидиум бромид нэмж электрофорезийн аппаратанд цутган зохих саама байрлуулж царцаана.

ПГУ-ын бүтээгдэхүүн тус бүрээс 8-10 мкл соруулан авч, 3 мкл хүндрүүлэгч уусмалтай холин 1,5%-ийн агарозийн гелийн үүрэнд хийнэ. 100х.н ДНХ стандарт жишигчээс 8мкл соруулан гелийн нөгөө үүрэнд хийнэ. 1х Трис-боратын буфер ашиглан 100 вольт хүчдэлээр 30 минут электрофорез тавина.

#### 5.5.3. Оношилгооны хариуг дүгнэх:

Электрофорез дууссаны дараа гель детекцийн аппарат DijiDoc-It Image System ашиглан үр дүнг авна. *Plasmodium* spp тодорхойлох урвалын эерэг хяналт болон эерэг дээжинд дараах хэмжээтэй толбо үүсэх ба сөрөг хяналтанд толбо үүсэхгүй.

*Plasmodium* spp 1050 bp

*P. falciparum* 205 bp

*P. Malariae* 144 bp

*P. Ovale* 787 bp

*P. Vivax* 117 bp

#### 5.5.4. Чанарын хяналт:

- Эерэг хяналтанд *Plasmodium* spp болон зохих зүйлүүдийн ДНХ-ийг авна.
- Сөрөг хяналтанд нуклейн хүчил ялгах, Мастер микс бэлтгэх, ПГУ-ын өрөө тус бүрээс ариун нэрмэл ус юмуу ТВЕ буфер авна.
- Олон улсын стандартад нийцсэн ISO-9001 сертификаттай бүтээгдэхүүнийг сонгож хэрэглэнэ.

--oOo--

Хавсралт 1

#### Ашигласан материал

1. S Nandwani, M Mathur, S Rawat. Evaluation of the polymerase chain reaction analysis for diagnosis of falciparum malaria in Delhi, India //Indian Journal of Medical Microbiology. 2005. Vol: 23. Issue: 3. Page: 176-178
2. The UNICEF-UNDP-World Bank-WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases
3. Sedigheh Zakeri., Sohaila Talebi Najafabadi ., Ahmad Zare and Navid Dinparast Djadid. Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern, Iran //Malaria Journal. 2002. Feb.
4. Sungano Mharakurwa., Christopher Simoloka., Philip E Thuma., Clive J Shiff and David J Smkllivan. PCR detection of Plasmodium falciparum in human urine and saliva samples //Malaria journal. 2006. 08 Nov
5. <http://www.who.int/entity/malaria/publications/atoz/9789241502092/en/index.html>

<i>Plasmodium</i> –ийн зүйл	Цусанд дах үе шат	Улаан эсэд илрэх өөрчлөлт	Шимэгчийн гадаад шинж төрх
<i>P. falciparum</i>	Цагираг	энгийн: олон дахин халдварлалтын улаан эсэд илрэх өөрчлөлт бусад зүйл дэхээс илүү энгийн байна. Маурэрийн хагархай /будагдах байдал хангалтгүй/	Нарийн цитоплазм: 1-2 хүртэл жижиг хроматины цэгтэй, хааяа хатгамал хэлбэртэй байна.
	Трофозоит	энгийн: ховорхон, Маурэрийн хагархай /будагдах байдал хангалтгүй/	Захын цусанд ховор тохиолддог. Нягт цитоплазмтай, хар нөсөөтэй.
	Шизонт	энгийн: ховорхон, Маурэрийн хагархай /будагдах байдал хангалтгүй/	Захын цусанд ховор тохиолддог. Гүйцэд боловсорсон нь 8-24 жижиг мерозоиттой, хар нөсөөтэй, бөөн хэсэг нь нэг масс болно.
	Gametocyte Гаметоцит	шимэгчээр үрчийж, хэлбэр нь эвдэрсэн	хавирган сар эсвэл зайдсан хэлбэртэй, дан масс (macrogametocyte) эсвэл сарнисан (microgametocyte) хроматин байна. Масс нь хар нөсөөтэй.
<i>P. vivax</i>	Цагираг	энгийн 1-1/4 х, дугариг: заримдаа нарийн, Шуффнерийн цэгүүд: олон дахин халдварлалтын улаан эсэд илрэх өөрчлөлт	өргөн цитоплазмтай, ховор тохиолдолд хуурамч буурцагтай, том хроматин цэгтэй

		энгийн бус байна.	
	Трофозоит	1-1/2-2 х томорсон. Үрчийсэн байж болно, нарийн Шуффнерийн цэгүүд байна.	том амёбдсан цитоплазм, том хроматин, нарийн, шаргалаас бор нөсөөтэй.
	Шизонт	1-1/2-2 х томорсон. Үрчийсэн байж болно, нарийн Шуффнерийн цэгүүд байна.	том, улаан эсийн өөрчлөлтөөр бараг дүүрсэн байдаг, боловсорсон нь 12-24 мерозоиттой, шаргалаас бор, нэгдсэн нөсөөтэй.
	Gametocyte Гаметоцит	1-1/2-2 х томорсон. Үрчийсэн байж болно, нарийн Шуффнерийн цэгүүд байна.	дугаригаас зууван хэлбэртэй, нягт, улаан эсийн өөрчлөлтөөр бараг дүүрсэн байдаг, хроматин нягттай, өвөрмөц хачин (macrogametocyte) эсвэл тархсан (microgametocyte) –той, энд тэндгүй тархсан бор нөсөөтэй.
<i>P. ovale</i>	Цагираг	энгийнээс 1-1/4 Х хүртэл, дугаригаас зууван, заримдаа Шуффнерийн цэгүүд байна. Хааяа цацаг гарсан, олон дахин халдварлалтын улаан эсэд илрэх өөрчлөлт энгийн бус байна.	бат бөх цитоплазмтай, том хроматинтай
	Трофозоит	энгийнээс 1-1/4 Х хүртэл, дугаригаас	нягт том хроматинтай, хар-бор нөсөөтэй.

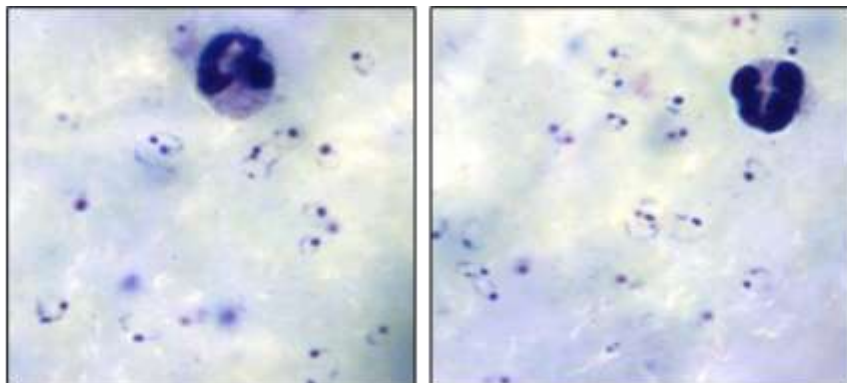
		зууван, Зарим нь цацаг гарсан, Шуффнерийн цэгүүд байна.	
	Шизонт	энгийнээс 1-1/4 X хүртэл, дугаригаас зууван, Зарим нь цацаг гарсан, Шуффнерийн цэгүүд байна.	боловсорсон нь том бөөмтэй 6-14 мерозоитууд байна. Бөөн массыг тойроод хар-бор нөсөөтэй.
	Gametocyte Гаметоцит	энгийнээс 1-1/4 X хүртэл, дугаригаас зууван, Зарим нь цацаг гарсан, Шуффнерийн цэгүүд байна.	дугаригаас зууван хэлбэртэй, нягт, улаан эсийн өөрчлөлтөөр бараг дүүрсэн байдаг, хроматин нягттай, өвөрмөц хачин (macrogametocyte) эсвэл тархсан (microgametocyte) –той, энд тэндгүй тархсан бор нөсөөтэй.
<i>P. malariae</i>	Цагираг	энгийнээс 3/4 х	бат бөх цитоплазмтай, том хроматинтай
	Трофозоит	энгийнээс 3/4 х, Зиеманны цэглэсэн мөр сийлсэн мэт /будагдах байдал хангалтгүй/	нягт цитоплазмтай, том хроматинтэй, ховор тохиолдолд туузан хэлбэртэй, хар-бор нөсөөтэй
	Шизонт	энгийнээс 3/4 х, Зиеманны цэглэсэн мөр сийлсэн мэт /будагдах байдал хангалтгүй/	боловсорсон нь том бөөмтэй 6-12 мерозоитуудтай, бөөгнөрсөн массыг тойроод барзгар, хар-бор нөсөөтэй, хааяа сарнайн хэлбэртэй.



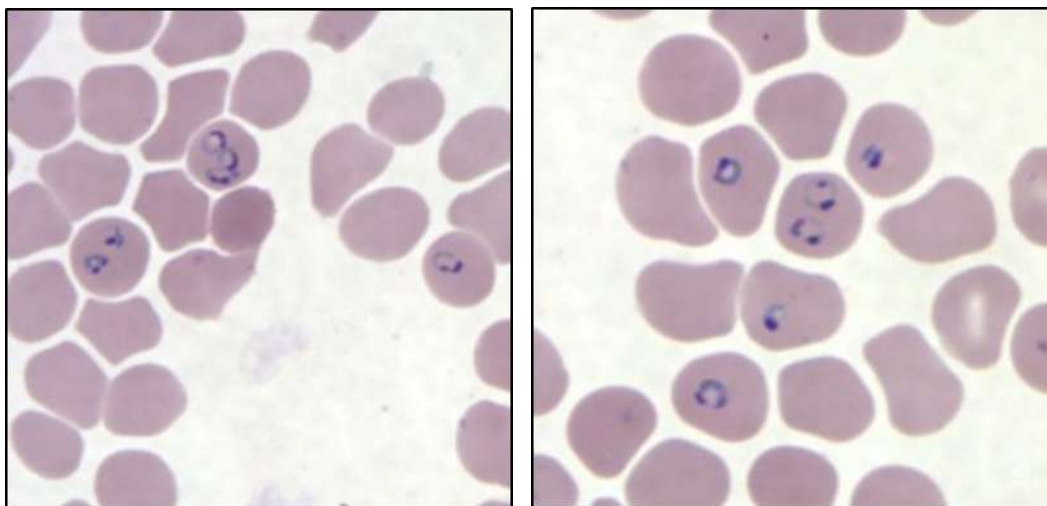
	Gametocyte Гаметоцит	энгийнээс 3/4 х, Зиеманны цэглэсэн мөр сийлсэн мэт /будагдах байдал хангалтгүй/	дугаригаас зууван хэлбэртэй, нягт, улаан эсийн өөрчлөлтөөр бараг дүүрсэн байдаг, хроматин нягттай, өвөрмөц хачин (macrogametocyte) эсвэл тархсан (microgametocyte) –той, энд тэндгүй тархсан бор нөсөөтэй.
<i>P. knowlesi</i>	Цагираг	энгийнээс 3/4 х, олон дахин халдварлалт нийтлэг бус	нарийн эмзэг цитоплазм, 1-2 хүртэл цухуйсан хроматины цэгтэй, хааяа хатгамал хэлбэртэй байна.
	Трофозоит	энгийнээс 3/4 х, ховор, Синтон ба Муллигануудын цэглэсэн мөр сийлсэн мэт /будагдах байдал хангалтгүй/	нягт цитоплазмтай, том хроматинтэй, ховор тохиолдолд туузан хэлбэртэй, хар-бор нөсөөтэй
	Шизонт	энгийнээс 3/4 х, ховор, Синтон ба Муллигануудын цэглэсэн мөр сийлсэн мэт /будагдах байдал хангалтгүй/	боловсорсон нь том бөөмтэй 16 хүртэлх мерозоитуудтай, бөөгнөрсөн массыг тойроод барзгар, хар- бор нөсөөтэй, хааяа сарнайн хэлбэртэй. Боловсорсон мерозоитууд нь сегменттэй буюу хэсэгчилж харагдана.
	Gametocyte Гаметоцит	энгийнээс 3/4 х, ховор, Синтон ба Муллигануудын	дугаригаас зууван хэлбэртэй, нягт, улаан эсийн өөрчлөлтөөр

		цэглэсэн мөр сийлсэн мэт /будагдах байдал хангалтгүй/	бараг дүүрсэн байдаг, хроматин нягттай, өвөрмөц хачин (macrogametocyte) эсвэл тархсан (microgametocyte) –той, энд тэндгүй тархсан бор нөсөөтэй.
--	--	---	--

Цусны наацан дахь *Plasmodium falciparum* -ын үе шат

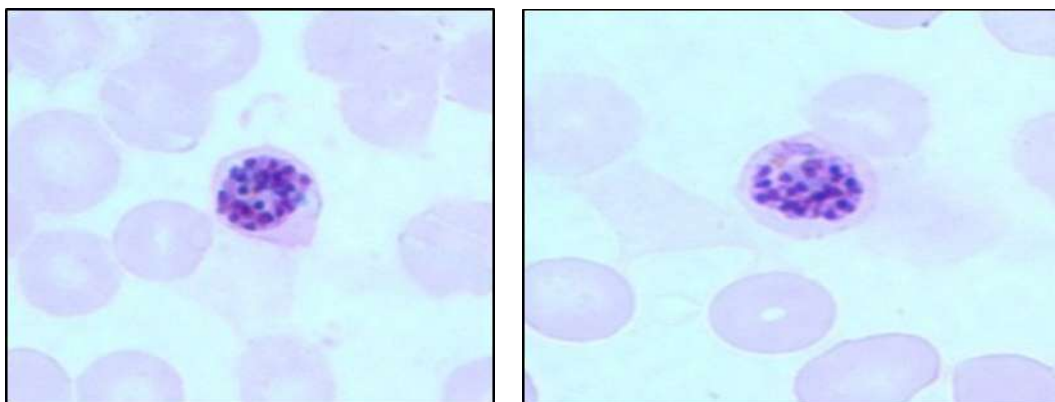


Цусны зузаан наацан дахь *P. falciparum*-ын цагираг хэлбэрийн трофозойт

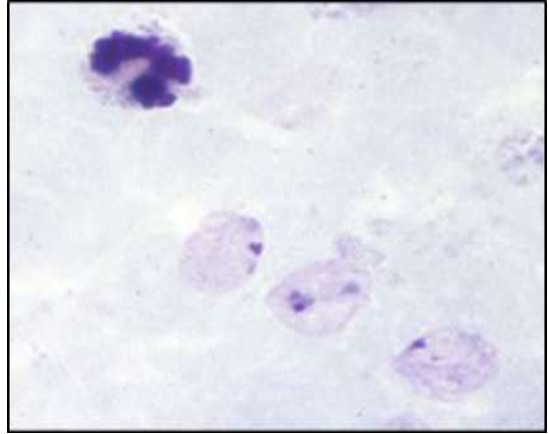
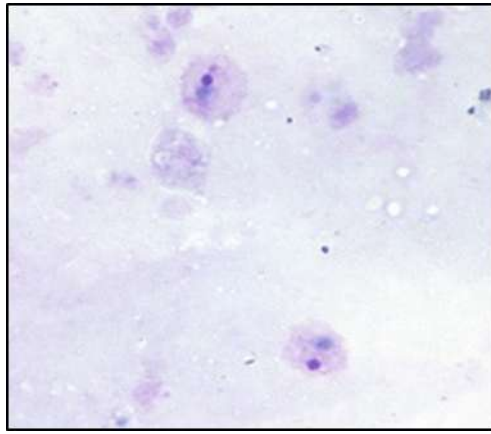


Цусны нимгэн наацан дахь *P. falciparum*-ийн цагираг хэлбэрийн трофозойт

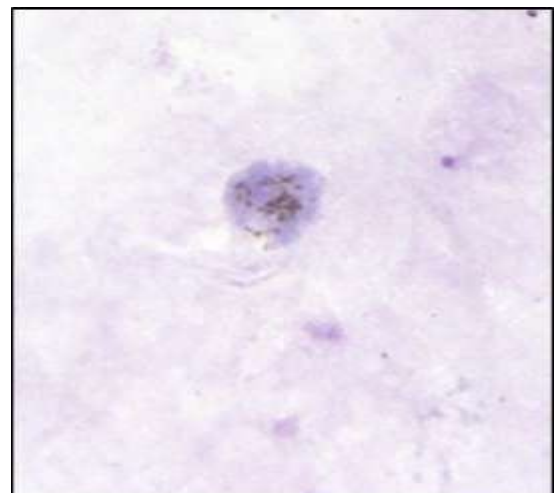
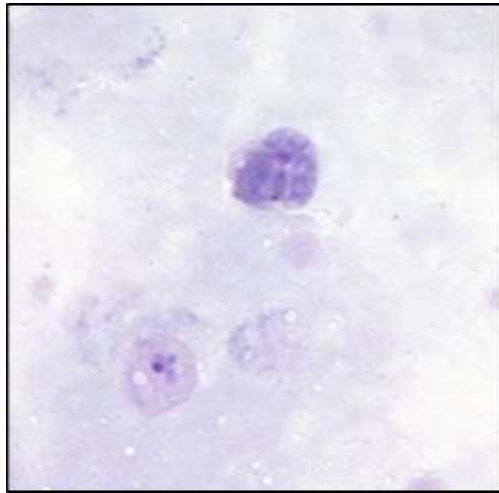
Цусны наацан дахь *Plasmodium vivax*



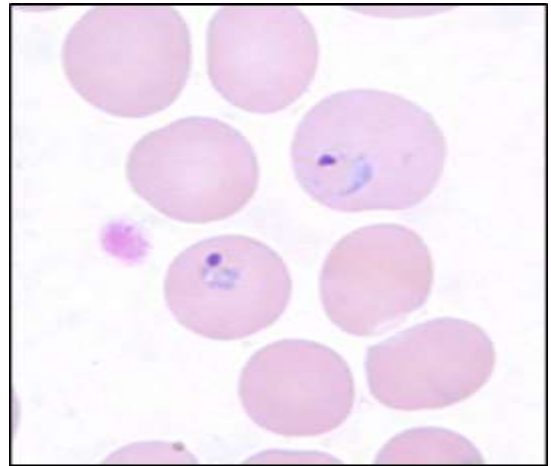
Цусны нимгэн наацан дахь *P. falciparum*-ын шизонт



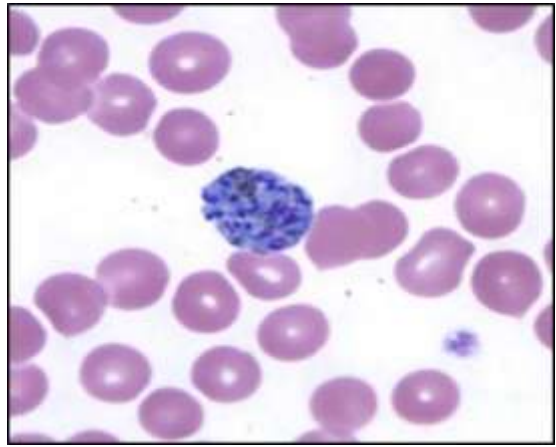
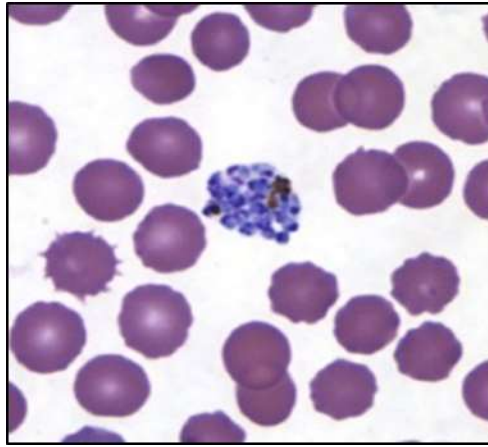
Цусны зузаан наацан дахь *P. vivax*-ын трофозойт



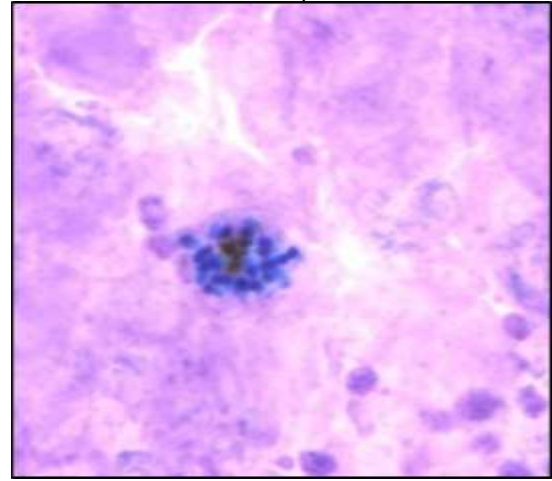
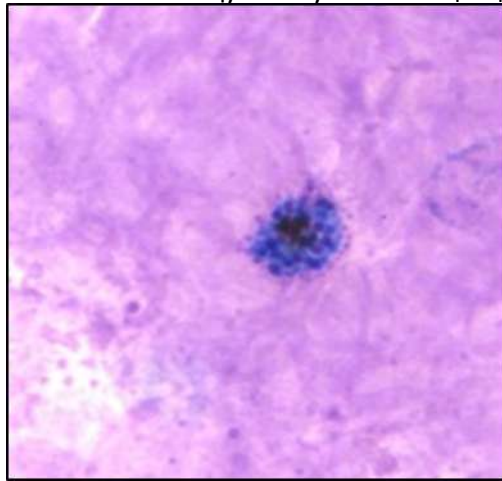
Цусны нимгэн наацан дахь *P. vivax*-ын трофозойт



Цусны зузаан наацан дахь *P. vivax*-ын шизонт

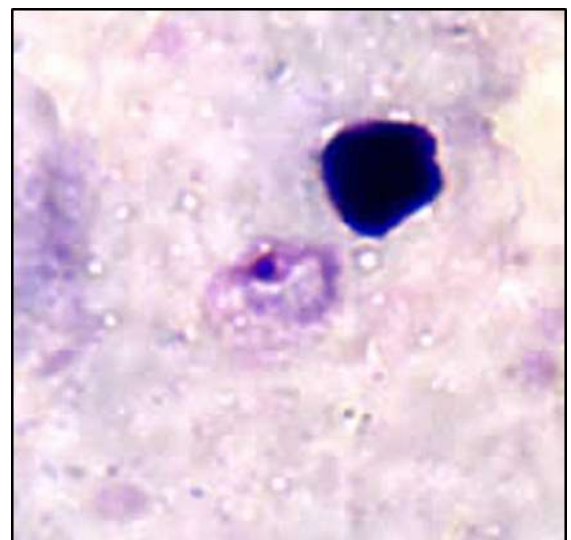
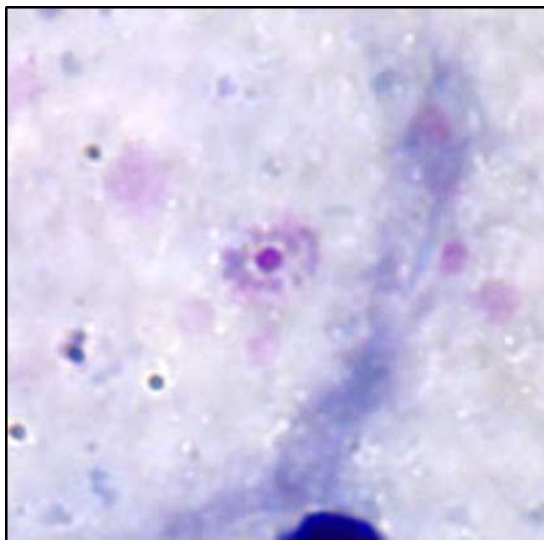


Цусны зузаан наацан дахь *P. vivax*-ын гематоцит



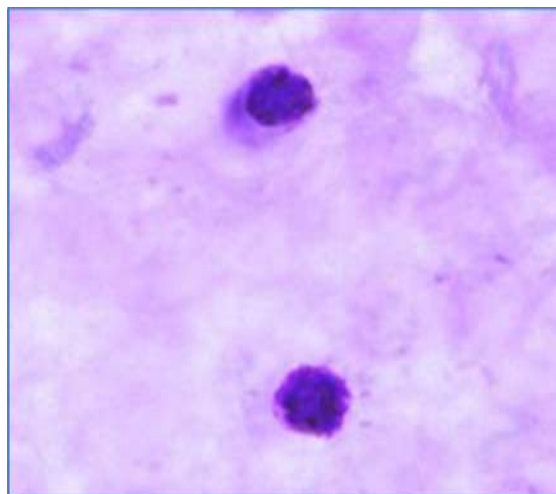
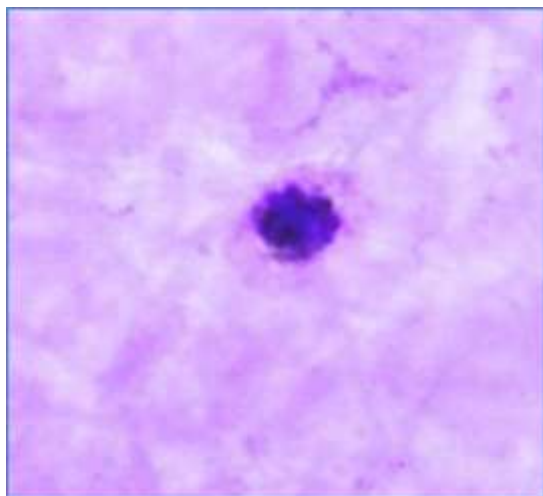
Цусны нимгэн наацан дахь *P. vivax*-ын шизонт

**Цусны наацан дахь *Plasmodium ovale***

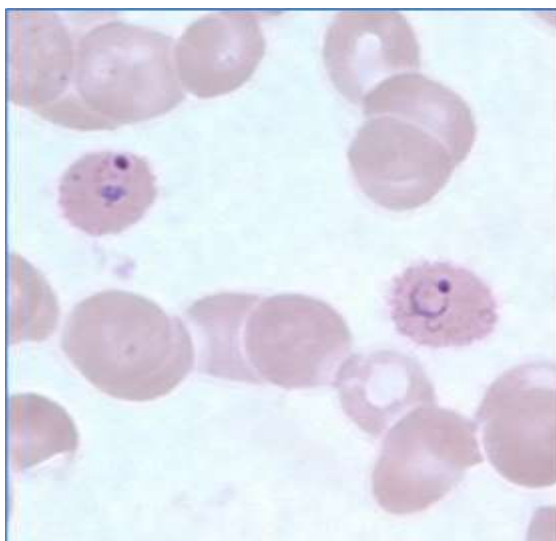
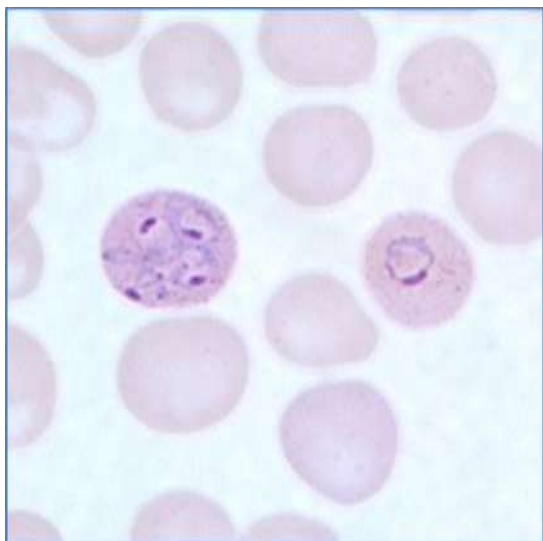


Цусны нимгэн наацан дахь *P. ovale*-ын трофозойт

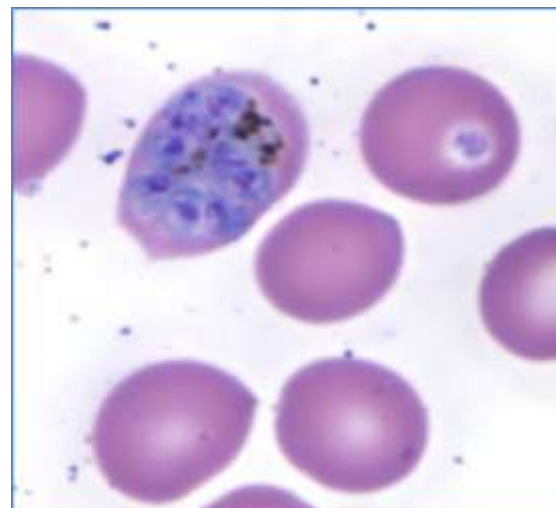
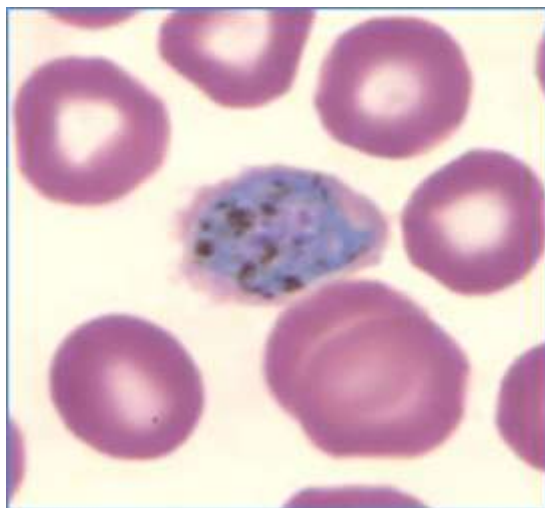




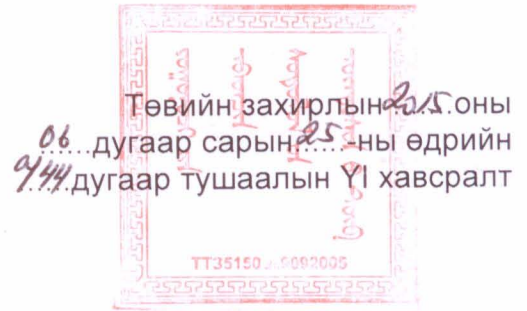
Цусны зузаан наацан дахь *P. ovale*-ын шизонт



Цусны нимгэн наацан дахь *P. ovale*-ын трофозойт



Цусны нимгэн наацан дахь *P. ovale*-ын шизонт



## БЭТЭГ ӨВЧНИЙ ЛАБОРАТОРИЙН ШИНЖИЛГЭЭНИЙ СТАНДАРТ АЖЛЫН ЗААВАР

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Бэтэг өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 10
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- В67	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил
Зориулалт: Бэтэг өвчний лабораторийн оношлогоонд	
Хэрэглэх хүрээ: Бэтэг өвчний шинжилгээ, оношлогоо, судалгааны лабораториуд	
Боловсруулсан: И.Отгончимэг, Х.Тунгалаг Огноо: 2015 он	Баталсан, зөвшөөрсөн актын дугаар: ЗӨСҮТөвийн захирлын А/44 тоот тушаалын зургаадугаар хавсралт Огноо: 2015.06.25
Хэвлүүлсэн: Мэргэжлийн тусламжын алба, Лавлагаа лабораторийн тасаг	

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Бэтэг өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 10
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- B67	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил

### 1. Зорилго, зарчим

Тухайн шинжлэгдэхүүнээс бэтэг өвчний шимэгч, эсрэгтөрөгч, ДНХ, өвөрмөц эсрэгбиеийг илрүүлэн, тодорхойлж баталгаажуулахад оршино.

### 2. Хамрах хүрээ

Бэтэг өвчний сэжигтэй хүний өвчлөлийн тохиолдол, байгалийн голомт хяналтын шинжилгээгээр цуглуулсан сорьцуудыг шинжлэх, шимэгчийн хөгжлийн үе шатыг дүйн тодорхойлох, судлах ажиллагааг гүйцэтгэдэг лабораториудад мөрдөнө.

### 3. Тодорхойлолт

Эхинококкусын төрөлд багтдаг *E.granulosus*, *E.multilocularis*, *E.oligathrus*, *E.vogeli* *E.shiquicus* зэрэг 5 зүйлийн шимэгчээр үүсгэгддэг уйланхайт өвчнийг бэтэг өвчин гэнэ. Бэтэг өвчин нь элэг болон уушгинд байрладаг. Эдгээрээс нь *E.granulosus*–аар үүсдэг уйланхайт бэтэг өвчин нь дэлхийд өргөн тархсан ба *E.multilocularis* –аар цулцант бэтэг өвчин нь дэлхийн хойд бөмбөрцөгийн хойд өргөргийн 38 градусаас дээш оршдог улсуудад тохиолддог. Харин *E.oligathrus*, *E.vogeli* *E.shiquicus*–аар үүсдэг бэтэг өвчин маш ховор тохиолддог.

Шимэгчийн морфологи: Жижиг цист нь 0,5 см хүртэл урттай, цагаан өнгөтэй, толгойны эргэн тойронд 4 ширхэг соруул болон дэгээтэй. 3-4 залгиурын хэсэгтэй, төгсгөлийн хэсэгт боловсрогдсон 800 орчим өндөг агуулагддаг. Биеийн төгсгөлийн хэсэг нь хөдөлгөөнтэй үүгээр гэдэсний агууламжаа өөрөө ялгаруулдаг. Өндөг нь гинжилсэн, цуварсан том бөмбөлөгүүд харагдана.

Амьдралын мөчлөг:

- Эцсийн эзэн амьтнаас өндөг өтгөнөөр ялгарч арьс, үс болон хөрс, ус, гадаад орчны эд зүйлсийг бохирдуулна.
- Онкосфер нь гадаад орчин усанд сайн хадгалагдах бөгөөд мал, амьтдад хүнс тэжээлээр дамжин авгалдай нэвтэрч, элэг болон уушгинд байрлана. Тэнд авгалдай томорч, 10-20 см голчтой уйланхай, цулцан үүсгэнэ.



- Эхинококкусын уйланхай нь хоёр давхаргатай бүрхүүлтэй, өнгөгүй, тунгалаг шингэнээр дүүрсэн, “эхинококкусын элс” гэж нэрлэх маш олон жижиг охин цулцангуудтай байдаг.
- Хүнд онкосфер нь бохирлогдсон жимс, хүнсний ногоо, бохир гараар дамжин халдварладаг.

#### **4. Сорьц цуглуулах хадгалах, тээвэрлэх**

##### **4.1. Шаардлагатай багаж хэрэгсэл**

Вакум хуруу шилний систем, зүү тариур, хуруу шил, пастерийн гуурс, хайч, хямсаа, хөвөн бөмбөлөг, спиртэн дэн, чангалуур, эрэгдэг тагтай шилэн том, жижиг сав, сорьц зөөвөрлөх сав /биологийн аюулын тэмдэгтэй/, шинжлэгдэхүүн тээвэрлэх сав, мөсөн элемент.

##### **4.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл**

Халдвартай материал үсрэх, асгарах, шил сав хаграх, аэрозолоор амьсгалах, залгих, арьс нүдэнд хүрхээс сэргийлж, хамгаалах өмсгөл, нэг удаагийн бээлий, резинэн урт бээлий, маск хэрэглэхээс гадна халдваргүйтгэлийн бодисыг хэрэглэнэ.

Тариурын зүү, шилэн пипетик эсвэл хагарсан шил зэрэг хурц ирмэгтэй зүйлээр гэмтэхээс болгоомжилно.

Халдвар хамгааллын болон аюулгүй ажиллагааны дэглэмийн зааварыг баримтална.

##### **4.3. Өвчтнөөс сорьц авах**

- Өвчтнийг мэс засал хийлгэхээс өмнө хураагуур судаснаас ЭДТА-тай вакуум хуруу шилний системд 5-6 мл цус аваад лабораторид хүргүүлэн ийлдсийг ялгана.
- Уушигны бэтэгтэй өвчтнөөс өглөө хооллохоос өмнө амыг 2–оос доошгүй удаа усаар сайн зайлуулж, гүнзгий олон удаа ханиалгуулж цэрийг тагтай ариун шилэнд авна. Цэр дээжилсэн дариуд лабораторид хүргүүлнэ.
- Хэвлийн хөндийн мэс заслын үед наалдацыг салгана, бэтэгийг чөлөөлнө, бэтэгийг хэвлийн хальснаас тусгаарлана, бэтэгийг нээж шингэнийг соруулан фиброз бүрхүүлийн ирмэгийг тусгаарлах хавчаараар барин уйланхайг бөөрөн тавганд авч тагтай ариун том амсартай шилэнд суллаж авна.

Хэвлийн хөндийн мэс заслын үед авсан бэтэгийг дараах байдлаар ангилна. Үүнд:

- Үр уйланхайгүй бэтэг: Мэдэгдэхүйц тодорхой бүрхүүл бүхий жигд тунгалаг шингэнтэй уйланхай
- Залуу үр уйланхайт бэтэг: Дүүрэн үр уйланхайтай

- Хагас үхсэн бэтэг: Захаараа үр уйланхайнууд нь байрлаж голын хэсэг нь нэгэн жигд өтгөн эд харагдана.
- Үхсэн бэтэг: Үр уйланхайгүй, жигд өтгөн эд агуулсан, зузаан ханатай уйланхай. Заримдаа зузаан хитин бүрхүүл нь угалз хэлбэртэй болж харагдана. Үүнийг угалзан шинж гэж нэрлэнэ.
- Хагас эсвэл бүтэн шохойжсон бэтэг: Хагас шохойжсон бол шохойжсон хэсэг бүр нь дууны долгионыг сарниулан сүүдэр татах учир “Судалтсан шинж” илэрнэ. Бүрэн шохойжсон бол “Шүхэр шинж” илэрнэ.
- Олон бэтэг (анхдагч, хоёрдогч, нахиалсан бэтэг)
- Идээлсэн бэтэг
- Хагарч цоорсон бэтэг гэж ангилна.

#### 4.4. Тэжээвэр амьтнаас

Халдвартай байж болзошгүй гэрийн тэжээвэр нохой, гахай, хонь, ямаа, үхэр, тэмээний ийлдэс болон нядалгаанд орсон мал амьтны нарийн гэдсийг цуглуулна. Мөн нохойг туулгах замаар ялгарсан өтгөнийг шинжлэнэ.

#### 4.5. Сорьцод боловсруулалт хийх

##### 4.5.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, бодис урвалж:

Хурилдуур, 10-15 мл-ийн сорьц цуглуулах хуруу шил, 50 мл-ийн шовгор ёроолтой сорьц цуглуулах хуруу шил, 100 мкм-ийн төмөр торон шүүгч, наацны шил ариун нэрмэл, 0,3%-ийн Твин 20-той 1%-ийн формалин, 0,5%-ийн Твин 80, цайрын сульфат, сахарозын уусмал, 0,9%-ийн давсны уусмал

4.5.2. Өвчтний уйланхайн шингэнийг 5 мкм хэмжээт шүүгч цаасаар шүүнэ. Эсвэл 500 х г хурдаар 10 минут хурилдуурдана. Шүүгдсэн хэсэг болон тунадасны үрлэн хэсгийг бичил харуурын аргаар шинжилнэ. Уушигны хэлбэрийн үед уушигны уйланхай хагарсан тохиолдолд цэрэнд шимэгч илэрч болно. Цэрний идээ, салстай хэсгийг бичил харуурын аргаар шинжилнэ.

##### 4.5.3. Гадаад орчны сорьцноос *Echinococcus*-ийн өндгийг илрүүлэх

Өтгөний сорьцыг өтгөрүүлгийн аргаар боловсруулахдаа 0,5-2 гр-ыг ус эсвэл 0,3%-ийн Твин 20-той 1%-ийн формалинтай 10-15 мл сорьцын хуруу шил /Tube/-нд хийж холиод 1000 г хурдаар 10 минутаар 1-2 удаа буюу дээд хэсэг тунгалаг болтол хурилдуурдана. Тунадасыг цайрын сульфат эсвэл сахарозын уусмалын аль нэгийг нь дүүртэл хийж холиод 1000 г хурдаар 5-10 минут хурилдуурдана. Сорилын хуруу

шилний амсар дээр шинжилгээний наацны шил байрлуулна. 2-16 цагийн дараа бүрхүүл шилийг бичил харуурын аргаар шинжилнэ.

Хөрсний сорьц: 20 гр хөрсийг 50 мл-ийн шовгор ёроолтой тубед хийгээд 40 мл 0,05%-ийн Твин 80 нэмнэ. Сайтар хутгаж хольсны дараа 100 мкм-ийн төмөр торон шүүгчид шигшиж шүүнэ. Булингыг 1000 г хурдаар 5 минут хурилдуурдаад дээд хэсгийг асгана. Цааш өтгөний өтгөрүүлгийн аргатай адилхан гүйцэтгэнэ.

#### 4.5.4. *Echinococcus*-ийн авгалдайг илрүүлэх

Хүн, амьтны эдэд *Echinococcus*-ийн авгалдайг илрүүлэх ба формалинд бэхжүүлсэн сорьцыг гистологийн аргаар будна.

Амьтнаас шимэгчийн авгалдайг илрүүлэхдээ олзворлосон амьтан, эсвэл зэм, үхдлээс шинжилгээнд нарийн гэдэсний сорьц авна. Сорьцыг хөлдөөж, эсвэл формалинд бэхжүүлж болохгүй, шууд 24 цагийн дотор шимэгчийг шинжилнэ. Формалин өндгийг үхүүлж чадахгүй. Шинэхэн нарийн гэдсийг хэдэн хэсэгт хуваагаад, 0,9%-ийн давсны уусмалд живүүлж хийгээд 37<sup>0</sup>С хэмд өсгөвөрлөнө. Нарийн гэдэсний хана дахь өтийг шинжилж, томруулдаг шил ашиглан тоолно. Нарийн тоолохын тулд бэхжүүлээгүй нарийн гэдсийг 4 эсвэл 6 хэсэгт хуваан нээж 0,9%-ийн давсны уусмалд живүүлээд 30 минут 37<sup>0</sup>С хэмд тавьж шимэгчийг чөлөөлнө.

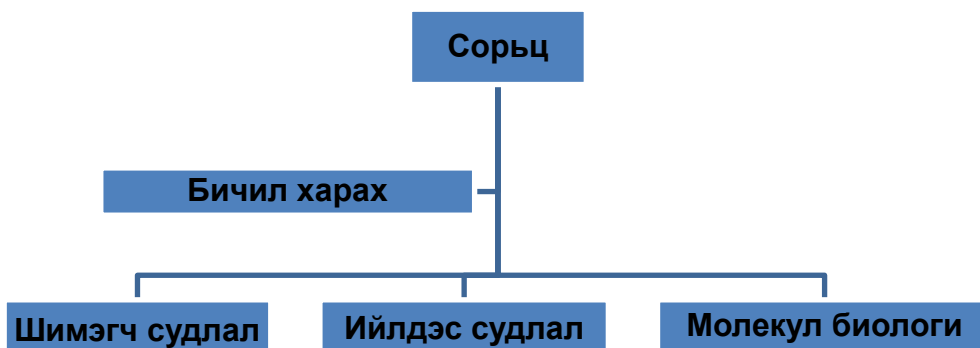
4.5.5. Ийлдэс судлал, молекул биологийн шинжилгээнд хэрэглэгдэж буй оношлуурын цомгийн зааврын дагуу боловсруулалт хийгдэнэ.

4.6. Сорьцыг хадгалах: Ийлдсийг 0,05%-ийн натрийн уусмалд хийж шинжлэх хүртэл -20<sup>0</sup>С-ийн хэмд хадгална. Ялгасан ДНХ-ийг -20<sup>0</sup>С хэмд хадгална.

Мал, амьтны хоол боловсруулах замын сорьцыг -80<sup>0</sup>С-ийн хэмд 3-4 хоног, амьтны эдийг шинжлэх хүртэл 4%-ийн формалинд бэхжүүлэх ба +4<sup>0</sup>С хэм, эсвэл -20<sup>0</sup>С хэмд хөлдөөж хадгална.

## 5. Шинжилгээний аргачлал

5.1. Шинжилгээний дараалал:



## 5.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл

Энэхүү аргачлалыг шинжлэгч ямар ч хамгаалалтгүй гүйцэтгэвэл халдварын эрсдэлд өртөж, өвчлөх магадлалтай тул аюулгүй ажиллагааг эзэмшсэн нүүрний хаалт, нэг удаагийн бээлий, хормогч зэрэг хувийн хамгаалалттай, халдвар хамгааллын дэглэмийн зааврыг баримтлан ажиллана.

Халдвартай материалыг  $-80^{\circ}\text{C}$ -д 48 цаг,  $-70^{\circ}\text{C}$  хэмд 4 өдөр хөлдөөхөд, эсвэл  $+70^{\circ}\text{C}$ -д 12 цаг байлган халдваргүйтгэнэ. Химийн халдваргүйтгэл найдваргүй, баталгаагүй, боловч гипохлорид натрид өндөгнүүдийн идэвхийг бууруулна. Бохирдсон материалыг халуунаар, халуун усаар,  $+85^{\circ}\text{C}$  болон түүнээс дээш хэмээр идэхигүйжүүлэх нь үр дүнтэй.

Лабораторийн халдваргүйтгэлийг хамгийн багадаа 48 цаг өрөөний хэмийг  $30^{\circ}\text{C}$  хүртэл нэмэгдүүлэхийн зэрэгцээ харьцангуй чийгшилийг 40%-иас багасгах нь үр дүнтэй байна.

## 5.3. Бичил харах шинжилгээ

### 5.3.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, будаг, урвалж, оношлуур:

Хурилдуур, 10 х объектив өсгөлттэй бичил харуур, тавиур шил, бүрхүүл шил, 1,5 мл, 50 мл-ийн хэмжээст хуруу шил, Циль-Нильсоны будаг, ПАС будаг. 0.5% эозин будаг. Сүүн хүчлийн кармин будаг.

### 5.3.2. Бичил харах шинжилгээ:

- Уйланхайн шингэнийг хурилдуурдсны дараа шингэнийг халдваргүйтгэлийн уусмал руу асган тунадасны үрлэн хэсгийг, цэрний идээ, салстай хэсгийг пастерийн гуурсаар аваад наацны шилэнд дусаагаад агаарт хатаана.
- Хатсан наацыг метанолд 2 минут бэхжүүлээд агаарт хатаана.
- Грамын арга, САА-МТ-Бх-01:02, Аураминаар будах арга, САА-МТ-Бх-01:12, Циль-Нильсоны арга, Хенриксэн ба Похлензээр баяжуулсан Циль-Нильсоны арга зэргээр будна.

### **Циль-Нильсоны арга:**

- Метанолд бэхжүүлсэн наацыг карбол фуксинаар 10 минут халааж будна.
- Усаар угаана.
- 3%-ийн хүхрийн хүчилтэй, 95%-ийн этанолаар 30 секунд будна.
- Усаар угаана.
- 1%-ийн метилен хөхөөр 30 секунд будна.
- Усаар угааж, агаарт хатаана.

## Хенриксэн ба Похлензээр баяжуулсан Циль-Нильсоны арга:

- Метанолд бэхжүүлсэн наацыг карбол фуксинд 20 минут будна.
- Усаар угаана.
- 7%-ийн сульфатын хүчлээр 30 секунд будна.
- Усаар угаана.
- Малахит ногооноор 30 секунд будна.
- Усаар угааж, агаарт хатаана.

- Будсан наацыг 10 х, 40 х-ийн өсгөлттэй объективээр харж шинжилнэ.

### 5.3.3. Шинжилгээний үр дүн:

Тунадасны үрлэн хэсгийг харж дотогш болон гадагш эргэсэн толгой бүхий протоскоксуудыг хайж шимэгчийн морфологи шинжийг тодорхойлно.



### 5.3.4. Чанарын хяналт

Хэрэглэх будаг, урвалжын хадгалалт, хугацаа, гадаад шинж төрхийг шалгаж чанар хангасан будаг урвалж хэрэглэнэ.

## 5.4. Ийлдэс судлалын шинжилгээ

### 5.4.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, будаг, урвалж, оношлуур:

Хурилдуур, ФХУ уншигч машин, принтер, нэг эсвэл олон автомат дусаагуур, урвалж, оношлуур найруулж бэлтгэх хэмжээст цилиндр, колбо, хавсарга холбох урвалын хуруу шилнүүд, петрийн аяга, наацны шил, U ёроолтой олон үүрт хавтан, агароз, хагас шингэн агар, ариун нэрмэл, фосфатын буфер, физиологийн уусмал

5.4.2. Халдвартай хүнээс бэтэгний өндөг ялгардаггүй учраас бэтэгний хүний өвчлөлийн тохиолдолыг ийлдэс судлалын аргаар оношлох нь чухал бөгөөд наалдуулах урвал, САА-МТ-Ис-03:01, ЦНШБУ, САА-МТ-Ис-03:06, хавсарга холбох урвал, САА-МТ-Ис-03:11, гельд нэвчүүлэн тунадасжуулах урвал, САА-МТ-Ис-03:08, ФХУ, САА-МТ-Ис-03:14-ын аргыг оношлуур, урвалжийн зааврын дагуу хийж гүйцэтгэн үр дүнг тооцно.

### 5.4.3. Чанарын хяналт:

Тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгслийн хэвийн ажиллагаа, хэмжээст багаж хэрэгсэл, шилэн эдлэлийн хэмжилтийн баталгаажилт, ашигласан оношлуур, урвалжийн цомгийн зааварын дагуу урвалын чанарын үзүүлэлт, хадгалалтын хугацаа болон нөхцөл зэргийг тодорхойлно.

## 5.5. Молекул-биологийн оношилгоо

5.5.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл, урвалж бодис, праймер:

*Тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл:* Биоаюулгүйн 2-р зэрэглэлийн кабинет, ПГУ-ын олшруулагч машин, бичил хурилдуур, дулаан тогтоогуур, хүчдэл тохируулагч, электрофорезийн аппарат, холигч, гель хайлуулагч, электрон жин, ПГУ-ын үр дүнг хэт ягаан туяаны тусламжтайгаар дүрслэн харж дүгнэх систем, нэг удаагийн бээлий, эппендорфийн хуруу шил /1,5-2 мл, 0,2 мл, 0,5мл/, эппендорфийн хуруу шилний тавиур, автомат дусаагуур, фильтертэй ариун хошуу /20-200мкл, 1000мкл, 0,5-10мкл, 2-20мкл/, шилний харандаа, хаягдал хийх сав

*Урвалж: ДНХ ялгах ажиллагаанд:* Задлагч уусмал (нэрмэл ус, Трис, Твин 20, протейназа К, лизоцим, ЭДТА), фенолхлорформ, 96% , 70% этилийн спирт, давхар нэрсэн ус, фирмийн цомгийн бүрэлдэхүүн

*ПГУ-д:* ПГУ-ын цомог, өвөрмөц праймер (хүснэгт 1), ионгүйжүүлсэн ус, ДНХ-ийн молекул жингийн маркер

Бэтэг өвчний үүсгэгчийн ДНХ илрүүлэх өвөрмөц праймерийн дараалал

Хүснэгт 1

Бай ген	Праймерын нэр	Праймерийн дараалал 5'..... 3'	Молекул жин (bp)
<i>E. multilocularis</i> тодорхойлох			
mitochondrial 12S rRNA gene	EM-H15	CCA TAT TAC AAC AAT ATT CCT ATC	200bp
	EM-H17	GTG AGT GAT TCT TGT TAG GGG AAG	
<i>E. granulosus</i> тодорхойлох			
mitochondrial 12S rRNA gene	Eg1f	CAT TAA TGT ATT TTG TAA AGT TG	255bp
	Eg1r	CAC ATC ATC TTA CAA TAA CAC C	

*Агарозын гель электрофорезэд:* Трис-боратын буфер рН=8.3 (5xTBE) (89 mM Трис, 89 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2mM ЭДТА), 1xTBE (5x буфер 100 мл, нэрсэн ус 400 мл), 1.5% агароз гель, этидиум бромидын 0,001%-ийн уусмал (250 мл нэрсэн усанд 2,5 мг этидиум бромид)

5.5.2. Молекул биологийн шинжилгээ:

*ДНХ ялгах:*

*Фенол хлороформын аргаар ДНХ ялгах:*

- Задлагч уусмалаа бэлтгэж (5мл ариун нэрмэлд: трис 30мг, ЭДТА 15мг, твин 20 15мкл, протейназа К 15мкл, лизоцим 10мг), 37°-д 30 мин тавьна.
- Сорьцноос 100 мкл-ийг авч эппендорфийн хуруу шилэнд хийж, 100 хэмийн усан баннд 15 минут тавьж идэвхигүйжүүлнэ.
- Сорьцийг усан баннаас гаргаад дээр нь 100 мкл задлагч уусмал нэмж 37°С хэмд 1 цаг тавина.
- Задлагч уусмал нэмсэн сорьцон дээр 200 мкл фенол: хлорформ (1:1) нэмж сайтар холиод 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулна.
- Дээд шингэнийг соруулан авч, хаяг бүхий шинэ хуруу шилэнд хийж, 2 эзэлхүүн 96% спирт нэмээд -20°С 1 цаг тавина.
- 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 70%-ийн этилийн спирт нэмж 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 60°С хэмд 15 мин тавьж спиртийг ууршуулна.
- Хатаасан ДНХ-г ойролцоогоор 30 мкл нэрмэл усаар шингэлж, 1-2мкл-ийг ПГУ-п ашиглана.

*ДНХ ялгах цомог ашиглан ДНХ ялгах:*

Цус, эдээс ДНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан сорьцноос ДНХ ялгаж болох ба үйлдвэрлэгчийн дагалдуулсан зааврын дагуу ялгана.

*ПГУ тавих:*

ПГУ-ын холимгийг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу бэлтгэнэ. *E. multilocularis* тодорхойлох ПГУ-ыг **EM-H15/EM-H17** праймераар, *E. granulosus* тодорхойлох ПГУ-ыг **Eg1f/Eg1r** праймераар: 94° хэмд 3 минут, 40 цикл (94° хэмд 30 сек, 53° хэмд 30 сек, 72° хэмд 45 сек), 72° хэмд 10 минутаар тус тус гүйцэтгэнэ.

*Гель электрофорез тавих:*

1.5%-ийн агароз гель бэлтгэж, 1µg/ml этидиум бромид нэмж электрофорезийн аппаратанд цутган зохих самаа байрлуулж царцаана.

ПГУ бүтээгдэхүүн тус бүрээс 8-10 мкл соруулан авч, 3 мкл хүндрүүлэгч уусмалтай холин 1,5%-ийн агарозийн гелийн үүрэнд хийнэ. 100х.н ДНХ стандарт жишигчээс 8мкл соруулан гелийн нөгөө үүрэнд хийнэ. 1x Трис-боратын буфер ашиглан 100 вольт хүчдэлээр 30 минут электрофорез тавина.

### 5.5.3. Оношлогооны хариуг дүгнэх:

Электрофорез дууссаны дараа гель детекцийн аппарат DijiDoc-It Image System ашиглан үр дүнг авна. *E. multilocularis* тодорхойлох урвалын эерэг хяналт болон *E. multilocularis* бүхий дээжинд 200bp бүхий толбо, *E. granulosus* тодорхойлох урвалын эерэг хяналт болон *E. granulosus* бүхий дээжинд 255bp бүхий толбо тус тус үүсэх ба сөрөг хяналтанд толбо үүсэхгүй.

### 5.5.4. Чанарын хяналт:

- Эерэг хяналтанд *E. granulosus* болон *E. multilocularis* үүсгэгчийн ДНХ-ийг авна.
- Сөрөг хяналтанд нуклейн хүчил ялгах, Мастер микс бэлтгэх, ПГУ-ын өрөө тус бүрээс ариун нэрмэл ус юмуу TBE буфер авна.
- Олон улсын стандартад нийцсэн ISO-9001 сертификатай бүтээгдэхүүнийг сонгож хэрэглэнэ.
- Урвалж, оношлуур, праймерын хадгалалтын горимыг чанд мөрдөх ба праймер, урвалж бодисын хүчинтэй хугацаанд байнга хяналт тавьна.

--oOo--

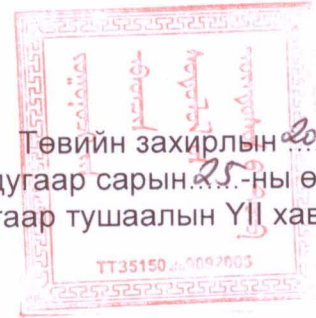
### Хавсралт:

Ашигласан ном, хэвлэл:

- OIE *Terrestrial Manual*, 2008
- Prathapan Rema Prathiush, Placid Eugene D'Souza\*, and Ananda K. Javare Gowda, “*Diagnosis of Echinococcus granulosus infection in dogs by a coproantigen sandwich ELISA*”, 2008
- Hashemitabar, G. R.; Razmi, G. R. and Shahroozian, A. “*Application of a modified human enzyme-linked immunosorbent assay kit for diagnosis of hydatidosis in sheep*”, 2008
- Donald P McManus, Wenbao Zhang, Jun Li, Paul B Bartley, “*Echinococcosis*”, 2003
- Vasile Cozma, “*Epidmiology and serological diagnosis of human cystic echinococcosis in the central and North-Western part of Romania*”, 2011
- Зонхилон тохиолдох өвчин, эмгэгийн онологоо, эмчилгээний удирдамж, “Хэвлийн хөндийн мэс заслын өвчнүүд, Б.Гоош



Төвийн захирлын 2015 оны  
0.6 дугаар сарын 25-ны өдрийн  
0.44 дугаар тушаалын YII хавсралт



## АНАПЛАЗМОЗ ӨВЧНИЙ ЛАБОРАТОРИЙН ШИНЖИЛГЭЭНИЙ СТАНДАРТ АЖЛЫН ЗААВАР

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Анаплазмоз өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 9
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- А79.8	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил
Зориулалт: Анаплазмоз өвчний лабораторийн оношлогоонд	
Хэрэглэх хүрээ: Анаплазмоз өвчний шинжилгээ, оношлогоо, судалгааны лабораториуд	
Боловсруулсан: И.Отгончимэг, Х.Тунгалаг	Баталсан, зөвшөөрсөн актын дугаар: ЗӨСҮТөвийн захирлын А/44 тоот тушаалын долоодугаар хавсралт
Огноо: 2015 он	Огноо: 2015.06.25
Хэвлүүлсэн: Мэргэжлийн тусламжын алба, Лавлагаа лабораторийн тасаг	

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Анаплазмоз өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо-9
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- A79.8	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил

### 1. Зорилго, зарчим

Тухайн шинжлэгдэхүүнээс анаплазмоз өвчний үүсгэгч, эсрэгтөрөгч, ДНХ, өвөрмөц эсрэгбиеийг илрүүлэн баталгаажуулахад оршино.

### 2. Хамрах хүрээ

Анаплазмоз өвчний сэжигтэй хүний өвчлөлийн тохиолдол, байгалийн голомт хяналтын шинжилгээгээр цуглуулсан сорьцуудыг шинжлэх, үүсгэгчийг дүйн тодорхойлох, судлах ажиллагааг гүйцэтгэдэг лабораториудад мөрдөнө.

### 3. Тодорхойлолт

Анаплазмозын үүсгэгч нь *Anaplasmataceae* овгийн *Anaplasma* төрөлд багтдаг. *Anaplasma phagocytophilum* зүйлийн Грам сөрөг, мөхлөгт эсийн дотор үрждэг бичил биетэн. Үүсгэгчийн гадаад орчинд тэсвэрлэх чадвар риккетситэй төстэй. Анаплазм нь цитраттай цусанд 3-5 хэмд 82 хоног, глюкоз-сахароз-цитраттай уусмалд 3-5 хэмд хоног эмгэг төрүүлэх чадвараа хадгалдаг. Байгаль дээр үүсгэгч нь олон зүйлийн сүүн тэжээлтний дунд тархсан боловч голлох эзэн амьтан нь жижиг сүүн тэжээлтэн, иксод төрлийн олон зүйлийн хачиг дамжуулагч болдог. Анаплазмозын халдвар хачгийн хөгжлийн дараагийн үе шатанд дамжиж, өндгөнд халдвар дамждаггүй. Хачгийн авгалдай жижиг мэрэгчдэд шимэгчлэн цусын нь сорж нимфын шатандаа шилжих бөгөөд хаврын сүүлч, зуны эхэн сард идэвхжилийн оргил үе нь болдог. Зуны сүүлчээр анаплазм агуулсан авгалдайн шинэ үе солигдож жижиг мэрэгчдэд шимэгчлэн орчил эргэлт явагдана.

Анаплазмозын хүний өвчлөлийн тохиолдол хавар-зуны улиралд иксодын хачгийн идэвхижлийн үед ой мод, цэцэрлэгт хүрээлэн, зуслангийн газарт ажиллах, амрах явцад халдвар авч бүртгэгддэг. Өвөрмөц IgM өвчин эхэлсэнээс хойш 11 дэх хоногоос үүсч эхлэн 12-17 дахь хоногт дээд хэмжээндээ хүрч, 35 дахь хоног хүртэл аажмаар буурдаг бол IgG өвчний эхний өдрөөс илэрч тасралтгүй өссөөр 37-39 дэх хоногтоо дээд хэмжээндээ хүрдэг байна.

### 4. Сорьц цуглуулах хадгалах, тээвэрлэх

#### 4.1. Шаардлагатай багаж хэрэглэл

Вакуум хуруу шилний систем (гепарин, EDTA), пастерийн гуурс, хайч, хямсаа, спиртэн дэн, чангалуур, 2x2 хэмжээтэй цэвэр самбай, нарийн үзүүртэй шилний маркер, харандаа, цантсан төгсгөлтэй наацны шил, сорьц зөөвөрлөх сав (биологийн аюулын тэмдэгтэй), сорьцны гаднах сав, мөсөн элемент.

#### 4.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл

Халдвартай материал үсрэх, асгарах, шил сав хагарах, залгих, арьс нүдэнд хүрэхээс сэргийлж эмтэрсэн, цуурсан, ан цав гарсан хуруу шил болон шилэн саванд сорьц авахгүй байх, сорьц авсан савыг тогтвортой сууринд байрлуулах, хувийн хамгаалах хэрэгсэл (хамгаалах өмсгөл, бээлий, маск)-ээс гадна халдваргүйтгэлийн бодисыг хэрэглэнэ. Тариурын зүү, пастерийн шилэн гуурс эсвэл хагарсан шил зэрэг хурц ирмэгтэй зүйлсээс гэмтэхээс болгоомжилно. Халдвар хамгааллын болон аюулгүй ажиллагааны дэглэмийг баримтална.

#### 4.3. Шинжилгээний сорьцын төрөл

- Өвчтнөөс цус, ийлдэс, нас барсан тохиолдолд эмгэг судлалын шинжилгээгээр элэг, дэлүү, эмгэг өөрчлөлт бүхий эрхтэн, эдээс сорьц авч, физиологийн уусмалд хийнэ. Амьд эсвэл үхсэн мал, мэрэгч амьтад, ус, хөрс, хачиг зэргийг шинжилгээнд хамруулна.
- Нимгэн наац бэлтгэнэ. Нимгэн наацыг агаарт хатаагаад тасалгааны хэмд 1 долоо хоног хадгална. Цусны сорьцыг аваад +4<sup>0</sup>C хэмд зөөвөрлөн, лабораторийн шинжилгээг 5 цагийн дотор хийнэ. Энэхүү сорьц нь цэвэр наац бэлтгэн баталгаат сорилыг хангахгүй байдаг. Нэмэлтээр улаан эсийг тоолж эсийн эзэлхүүн буурсныг батлах, наацанд илрэх морулагийн тоо, түүнчлэн өвчний үе шатыг тодорхойлно.

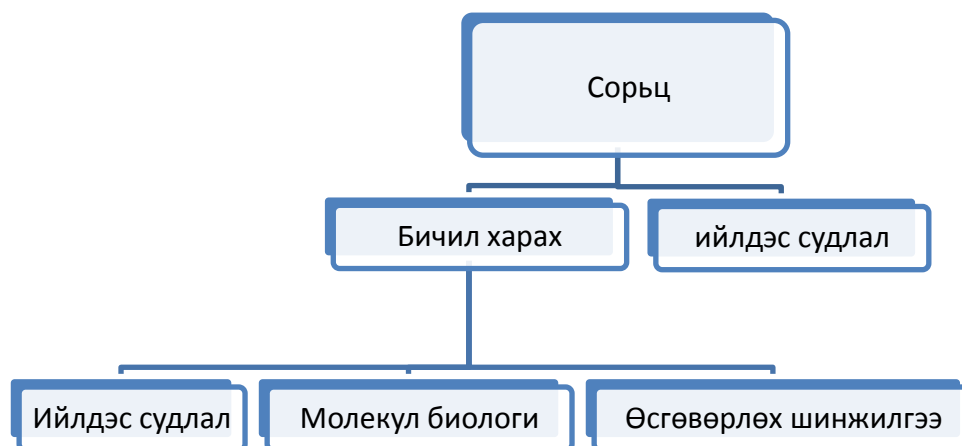
Үхсэн мал, амьтнаас элэг, бөөр, зүрх, уушиг, түүнчлэн захын судасны цуснаас нимгэн наац бэлтгэн агаарт хатаан сорьц авна.

4.3.1. Сорьцод боловсруулалт хийх: Ийлдэс судлал, молекул биологийн шинжилгээнд хэрэглэгдэж буй оношлуурын цомгийн зааврын дагуу боловсруулалт хийгдэнэ.

4.3.2. Сорьцыг хадгалах: Цусны түрхэц, эрхтний түрхэц зэргийг будсны дараа наалттай гялгар цаас нааж хадгална. Ялгасан ДНХ-ийг -20<sup>0</sup>C хэмд хадгална.

### 5. Шинжилгээний аргачлал

#### 5.1. Шинжилгээний дараалал



## 5.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл

Сорьцыг гадна сав баглаанаас гаргах, наац болон дарцыг будах, ДНХ ялгах, урвал тавих зэрэг үйл ажиллагааг биоаюулгүй ажиллагааны (II) кабинетад гүйцэтгэнэ.

### 5.3. Бичил харах шинжилгээ

#### 5.3.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, будаг урвалж

Бичил харуур, спиртэн дэн, наацны гүүр, цантсан төгсгөлтэй наацны шил, бүрхүүл шил, Гораявын тор, пастерийн гуурс, эппиндорфын хуруу шил, цэвэр метанол, Гимзийн будаг, нарийн үзүүртэй шилний маркер, харандаа.

#### 5.3.2. Бичил харах шинжилгээ (Гимзын арга)

Цус ба эрхтний наац хоёуланг нь цэвэр метанолд 1 минут бэхжүүлсний дараа 10%-ийн Гимзийн будгаар 30 минут будна. Будсаны дараа наацыг усанд 3-4 удаа дүрж будгийг зайлуулаад, агаарт хатаана. Лабораториос лаборатори руу Гимзийн будагийн нөхцөл байдал, өөрчлөгдөж болно. Наацыг иммерсионы системд х 700-1000 өсгөлтөөр бичил харуураар шинжилнэ.

#### 5.3.3. Чанарын хяналт

Хэрэглэх будаг, урвалжын хадгалалт, хугацаа, гадаад шинж төрхийг шалгаж чанар хангасан будаг урвалж хэрэглэнэ.

#### 5.3.4. Шинжилгээний хариуг дүгнэх

5.3.5. Цайвар хөх дэвсгэр дээр улаан хүрэн, улаан ягаан өнгөтэй, моноцит эсийн дотор 0,3-1,0 мкм голчтой, дугуй хэлбэртэй, хөх ягаан өнгөөр өтгөн шигүү, гүн будагдсан, тус тусдаа байрлалтай морулууд харагдана.

#### 5.4. Ийлдэс судлалын шинжилгээ:

5.4.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, оношлуур: Хурилдуур, ФХУ уншигч машин, принтер, нэг эсвэл олон автомат дусаагуур, урвалж, оношлуур найруулж бэлтгэх хэмжээст цилиндр, колбо, хавсарга холбох урвалын хуруу шилнүүд, петрийн аяга, наацны шил, U ёроолтой олон үүрт хавтан, агароз, хагас шингэн агар, ариун нэрмэл, фосфатын буфер, физиологийн уусмал

- Ялган оношлогооны зорилгоор хачигт риккетсиоз, ку халуурал, бруцеллёз, эрлихиоз, хачигт боррелиозын оношлогооны цомог ашиглаж болно.

5.4.2. ФХУ, ДТШБУ-ыг тухайн цомгийн зааврын дагуу тавьж, дүгнэнэ. Өвчтөний эхний ийлдсийг эмнэл зүйн шинж тэмдэг эхэлснээс хойш 1-ээс 14 хоногийн дотор, эхний ийлдсийг авснаас хойш 21 хоногийн дараа давтан ийлдсийг шинжилж оношлуур, урвалжийн зааврын дагуу хийж гүйцэтгэн үр дүнг тооцно. Хос ийлдсэн дэх эсрэгбиеийн таньцын зөрүүгээр (4 дахин ба түүнээс дээш) оношлоно.

#### 5.4.3. Чанарын хяналт:

Тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгслийн хэвийн ажиллагаа, хэмжээст багаж хэрэгсэл, шилэн эдлэлийн хэмжилтийн баталгаажилт, ашигласан оношлуур, урвалжийн цомгийн зааварын дагуу урвалын чанарын үзүүлэлт, хадгалалтын хугацаа болон нөхцөл зэргийг тодорхойлно.

#### 5.5. Өсгөвөрлөх шинжилгээ:

5.5.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, тэжээлт орчин:

- Лабораторийн цагаан хулганад *A.phagocytophilum*-ийг халдварлуулахад: Class II, Type B2, босоо урсгалтай, биологийн аюулгүй кабенит, бүлэгнээгүй цус, *A.phagocytophilum* –аар халдварлагдсан захын цус (*A.phagocytophilum* – халдварлагдсан хулгана цус, мөн өвчтний антибиотик эмчилгээ эхлэхээс өмнө авсан халдвартай цус), 5%-ийн лизол, 70%-ийн этанол, 3-5 долоо хоногтой цагаан хулгана, кетамин эсвэл ксилазин зэрэг мэдээгүйжүүлэгч бодис, эсвэл эдгээртэй адил үйлчилгээтэй бусад мэдээгүйжүүлэгч бодис, 12,7 мм зүүтэй, 28-G, ½-тэй 1 мл-ийн тариур, 12,7 мм зүүтэй, 26-G, ½-тэй 1 мл-ийн сүрьеэгийн тариур, самбай даавуу, марль, мэдээгүйжүүлэлтийн багаж хэрэгсэл, урвалж.

- HL-60 эсийн өсгөвөрт *A.phagocytophilum*-ийг өсгөвөрлөхөд: 5%-ийн лизол, 70%-ийн этанол, HL-60 эсийн ургалттай өсгөвөр, 10%-ийн халааж идэвхижүүлсэн FBS-ээр баяжуулсан IMDM-10 тэжээлт орчин, цус бүлэгнүүлэгчгүй вакуум системд цуглуулсан *A.phagocytophilum*–аар халдварлагдсан цусны сорьц, Class II, Type B2, босоо

урсгалтай, биологийн аюулгүй кабенит, шовгор ёроолтой хурилдуурын хуванцар 15 мл-ийн хуруу шил, агааржуулах тагтай 25 см<sup>2</sup> эдийн өсгөврийн дашмаг, эс өсгөвөрлөхөд шаардлагатай багаж хэрэгсэл, урвалж

5.5.2. Лабораторийн цагаан хулганад *A.phagocytophilum*-ийг халдварлуулах: Эдийн булинга болон цусны сорьцоос 0,3 мл-ийг цагаан хулганы хэвлийн хөндийд халдвар хийнэ. Халдвар хийснээс хойш 7-14 хоногийн дараа цус авч молекул биологийн шинжилгээг хийнэ.

HL-60 эсийн өсгөвөрт *A.phagocytophilum*-ийг өсгөвөрлөх: Өвчтний болон халдварлуулсан цагаан хулганы цуснаас 300 мкл-ийг  $2 \times 10^5$ -аас  $6 \times 10^5$  эс/мл хүртэлх нягтшилтайгаар HL-60 эсэд суулган 5%-ийн нүүрс хүчлийн хийтэй, 37<sup>0</sup>C-д 2-3 хоног өсгөвөрлөн өдөр бүр цитоплазмд морула үүсч буй эсэхийг өдөр бүр ажиглаж, шалгана.

5.5.3. Чанарын хяналт: Халдварлуулах цагаан хулгана нь 3-5 долоо хоногтой, ямар нэгэн эмнэлзүйн шинж тэмдэг илрээгүй эрүүл байна. Эсийн өсгөвөр нь нэг үет байх ба гадны (нян, мөөгөнцөр, механик) бохирдолгүй байна.

5.5.4. Халдварлуулсан цагаан хулганы цусанд молекул биологийн шинжилгээгээр *A.phagocytophilum*-ийн ДНХ тодорхойлогдоно. HL-60 эсийн цитоплазмд морула үүснэ.

5.6. Молекул биологийн оношилгоо:

5.6.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл, урвалж бодис, праймер:

*Тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл:* Биоаюулгүйн 2-р зэрэглэлийн кабинет, ПГУ-ын олшруулагч машин, дулаан тогтоогуур, бичил хурилдуур, хүчдэл тохируулагч, электрофорезийн аппарат, холигч, гель хайлуулагч, электрон жин, ПГУ-ын үр дүнг хэт ягаан туяаны тусламжтайгаар дүрслэн харж дүгнэх систем, нэг удаагийн бээлий, эппендорфийн хуруу шил (1,5-2 мл, 0,2 мл, 0,5мл), эппендорфийн хуруу шилний тавиур, автомат дусаагуур, фильтртэй ариун хошуу (20-200мкл, 1000мкл, 0,5-10мкл, 2-20мкл), шилний харандаа, хаягдал хийх сав

*Урвалж: ДНХ ялгах ажиллагаанд:* Задлагч уусмал (нэрмэл ус, Трис, Твин 20, протейназа К, лизоцим, ЭДТА), фенолхлорформ, 96%, 70% этилийн спирт, давхар нэрсэн ус, фирмийн цомгийн бүрэлдэхүүн

*ПГУ-д:* ПГУ-ын цомог, өвөрмөц праймер (хүснэгт 1), ионгүйжүүлсэн ус, ДНХ-ийн молекул жингийн маркер

Анаплазмоз өвчний үүсгэгчийн ДНХ илрүүлэх өвөрмөц праймерийн  
дараалал

Хүснэгт 1

Бай ген	Праймерын нэр	Праймерийн дараалал 5'..... 3'	Молекул жин (bp)	
<i>A.phagocytophylum</i> болон <i>A.playtes</i> тодорхойлох				
Үүрэн ПГУ	groEL ген	EphplgroEL-F	ATG GTA TGC AGT TTG ATC GC	624bp
		EphplgroEL-R	TCT ACT CTG TCT TTG CGT TC	
		<i>A.phagocytophylum</i> тодорхойлох		
		EphplgroEL-F	ATG GTA TGC AGT TTG ATC GC	525 bp, 21bp, 27bp
		EphgroEL (1142) -R	TTGAGTACAGCAACACCACCGGAA	
		<i>A.playtes</i> тодорхойлох		
		EphplgroEL-F	ATG GTA TGC AGT TTG ATC GC	199 bp, 316bp
		EplgroEL(1084) -R	CAT AGT CTG AAG TGG AGG AC	
<i>A.phagocytophylum</i> тодорхойлох				
Үүрэн ПГУ	16S рДНХ	EE1f	TCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	925bp
		EE2r	GTCACCTGACCCAACCTTAAATGGCTG	
		EE3f	GTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGC	
		EE4r	CCCTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC	
		SSAP2f	GCTGAATGTGGGGATAATTTAT	641 bp
		SSAP2r	ATGGCTGCTTCCTTTTCGGTTA	

*Агарозын гель электрофорезэд*: Трис-боратын буфер рН=8.3 (5хТВЕ) (89 мМ Трис, 89 мМ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2мМ ЭДТА), 1хТВЕ (5х буфер 100 мл, нэрсэн ус 400 мл), 1.5% агароз гель, этидиум бромидын 0,001%-ийн уусмал (250 мл нэрсэн усанд 2,5 мг этидиум бромид)

5.6.2. Молекул биологийн шинжилгээ:

*ДНХ ялгах:*

*Фенол хлороформын аргаар ДНХ ялгах:*

- Задлагч уусмалаа бэлтгэж (5мл ариун нэрмэлд: трис 30мг, ЭДТА 15мг, твин 20 15мкл, протейназа К 15мкл, лизоцим 10мг), 37°-д 30 мин тавьна.
- Сорьцноос 100 мкл-ийг авч эппендорфийн хуруу шилэнд хийж, 100 хэмийн усан баннд 15 минут тавьж идэвхигүйжүүлнэ.
- Сорьцийг усан баннаас гаргаад дээр нь 100 мкл задлагч уусмал нэмж 37°С хэмд 1 цаг тавина.
- Задлагч уусмал нэмсэн сорьцон дээр 200 мкл фенол: хлорформ (1:1) нэмж сайтар холиод 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулна.
- Дээд шингэнийг соруулан авч, хаяг бүхий шинэ хуруу шилэнд хийж, 2 эзэлхүүн 96% спирт нэмээд -20°С 1 цаг тавина.
- 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 70%-ийн этилийн спирт нэмж 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.

- 60°C хэмд 15 мин тавьж спиртийг ууршуулна.
- Хатаасан ДНХ-г ойролцоогоор 30 мкл нэрмэл усаар шингэлж, 1-2мкл-ийг ПГУ-п ашиглана.

*ДНХ ялгах цомог ашиглан ДНХ ялгах:*

Цус, эдээс ДНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан сорьцноос ДНХ ялгаж болох ба үйлдвэрлэгчийн дагалдуулсан зааврын дагуу ялгана.

*ПГУ тавих:*

ПГУ-ын холимгийг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу бэлтгэнэ.

*A.phagocytophylum*, *A.playtes* зүйлүүдийг тодорхойлох ПГУ-ыг **EphplgroEL-F/R** праймераар: 94° хэм 2 минут, 40 цикл (94° хэмд 60 сек, 52° хэмд 120 сек, 72° хэмд 120 сек), 72° хэмд 8 минутаар; *A.phagocytophylum* тодорхойлох үүрэн ПГУ-ыг **EphplgroEL-F/EphgroEL (1142) –R** праймераар 94° хэм 2 минут, 40 цикл (94° хэмд 60 сек, 55° хэмд 120 сек, 72° хэмд 120 сек), 72° хэмд 8 минутаар; *A.playtes* зүйлийг тодорхойлох ПГУ-ыг **EphplgroEL-F/EphgroEL (1084) –R** праймераар: 94° хэм 2 минут, 40 цикл (94° хэмд 60 сек, 55° хэмд 120 сек, 72° хэмд 120 сек), 72° хэмд 8 минутаар тус тус гүйцэтгэнэ.

*A.phagocytophylum* тодорхойлох үүрэн ПГУ-ыг **EE1/EE2; EE3/EE4** праймераар 94° хэм 2 минут, 35 цикл (95° хэмд 30 сек, 55° хэмд 30 сек, 72° хэмд 60 сек), 72° хэмд 5 минутаар; урвал эерэг гарсан үед үүрэн ПГУ-ыг **SSAP2f/SSAP2r** праймераар 94° хэм 4 минут, 35 цикл (94° хэмд 60 сек, 55° хэмд 60 сек, 72° хэмд 60 сек), 72° хэмд 10 минутаар тус тус гүйцэтгэнэ.

*Гель электрофорез тавих:*

1.5%-ийн агароз гель бэлтгэж, 1µg/ml этидиум бромид нэмж электрофорезийн аппаратанд цутган зохих саамаа байрлуулж царцаана.

ПГУ бүтээгдэхүүн тус бүрээс 8-10 мкл соруулан авч, 3 мкл хүндрүүлэгч уусмалтай холин 1,5%-ийн агарозийн гелийн үүрэнд хийнэ. 100х.н ДНХ стандарт жишигчээс 8мкл соруулан гелийн нөгөө үүрэнд хийнэ. 1х Трис-боратын буфер ашиглан 100 вольт хүчдэлээр 30 минут электрофорез тавина.

5.6.3. Оношилгооны хариуг дүгнэх:

Электрофорез дууссаны дараа гель детекцийн аппарат DijiDoc-It Image System ашиглан үр дүнг авна. *A.phagocytophylum* болон *A.playtes* зүйлүүдийг тодорхойлох урвалаар эерэг хяналт болон эерэг дээжинд 624bp бүхий толбо,



*A.phagocytophylum* тодорхойлох урвалаар 525 bp, 21bp, 27bp; *A.playtes* тодорхойлох урвалаар 199bp, 316bp (restriction endonuclease HindIII үед) бүхий толбо үүсэх ба сөрөг хяналтанд толбо үүсэхгүй.

*A.phagocytophylum* тодорхойлох үүрэн ПГУ (EE1/EE2; EE3/EE4) -аар 925bp ба (SSAP2f/SSAP2r) 641bp бүхий толбо үүсэх ба сөрөг хяналтанд толбо үүсэхгүй.

#### 5.6.4. Чанарын хяналт:

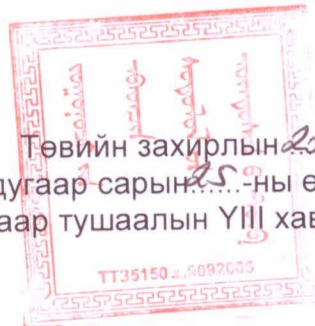
- Эерэг хяналтанд *A.phagocytophylum* болон *A.playtes* үүсгэгчийн ДНХ-ийг авна.
- Сөрөг хяналтанд нуклейн хүчил ялгах, Мастер микс бэлтгэх, ПГУ-ын өрөө тус бүрээс ариун нэрмэл ус юмуу ТВЕ буфер авна.
- Олон улсын стандартад нийцсэн ISO-9001 сертификаттай бүтээгдэхүүнийг сонгож хэрэглэнэ.
- Урвалж, оношлуур, праймерын хадгалалтын горимыг чанд мөрдөх ба праймер, урвалж бодисын хүчинтэй хугацаанд байнга хяналт тавьна.

--oOo--

#### Хавсралт:

1. <http://www.capcvet.org/capc-recommendations/ehrlichia-spp-and-anaplasma-spp1/>
2. <https://en.wikipedia.org/wiki/Anaplasmosis>
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682151>
4. Б.Бямбаа, М.Даш, И.В.Тарасевич. Шинээр оношлогдсон риккетсийн өвчнүүд. 1994, 1-5
5. Б.Бямбаа, Природно –очаговые риккетсиозы в монголии. два десятилетия российско-монгольского научного сотрудничества. Вестник российской амн, № 7, 2008: 44-45
6. Медицинская микробиология
7. Rickettsial Diseases, by Dibier Raoult, Philippe Pabola
8. Boyd AS. *Rickettsialpox*. Dermatol Clin. 1997;15:313–318.
9. Dumler JS, Dey C, Meier F. *Human monocytic ehrlichiosis: A potentially severe disease in children*. Arch Pediatr Adolesc Med. 2000;154:847–849.

Төвийн захирлын 2015 оны  
0.6 дугаар сарын 25-ны өдрийн  
А/44 дугаар тушаалын VIII хавсралт



## ТОКСОПЛАЗМОЗ ӨВЧНИЙ ЛАБОРАТОРИЙН ШИНЖИЛГЭЭНИЙ СТАНДАРТ АЖЛЫН ЗААВАР

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Токсоплазмоз өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо-9
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- B58	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил
Зориулалт: Токсоплазмоз өвчний лабораторийн шинжилгээ, оношлогоонд	
Хэрэглэх хүрээ: Токсоплазмоз өвчний шинжилгээ, оношлогоо, судалгааны лабораториуд	
Боловсруулсан: Л.Оргилбаяр, Х.Тунгалаг	Баталсан, зөвшөөрсөн актын дугаар: ЗӨСҮТөвийн захирлын А/44 тоот тушаалын наймдугаар хавсралт
Огноо: 2015 он	Огноо: 2015.06.25
Хэвлүүлсэн: Мэргэжлийн тусламжын алба, Лавлагаа лабораторийн тасаг	

<b>Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв</b>	
Нэр: Токсоплазмоз өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 9
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- B58	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил

### 1. Зорилго, зарчим

Тухайн шинжлэгдэхүүнээс токсоплазмоз өвчний үүсгэгч, түүний ДНХ, өвөрмөц эсрэгбие, эсрэгтөрөгч илрүүлэн, баталгаажуулахад оршино.

### 2. Хамрах хүрээ

Токсоплазмоз өвчний сэжигтэй хүний өвчлөлийн тохиолдол илэрсэн үед болон байгалийн голомт хяналтын шинжилгээгээр цуглуулсан сорьцуудыг шинжлэх, шимэгчийг дүйн тодорхойлох, судлах ажиллагааг гүйцэтгэдэг лабораториудад мөрдөнө.

### 3. Тодорхойлолт

Токсоплазмоз нь *Toxoplasma gondii* эгэл биетэнээр үүсгэгддэг өвчин. Токсоплазм нь байгалд өргөн тархсан. Зэрлэг болон гэрийн тэжээмэл амьтад ялангуяа нохой, муур агуулагч болдог. Анхдагч эзэн нь зөвхөн муурын төрлийн амьтад. Амьтдын халдвар нь хооллох үед халдварлана. Муур нь хоолоор, баасаар өөрийгөө халдварлуулна. Халдвар зөөвөрлөгдөх эх үүсвэр нь үр хөврөл. Токсоплазмозтай муур үргэлж загнуулсан мэт байдаг. Халуун оронд хүний халдварын эх үүсвэр нь шархтай болон гэмтсэн арьсаар хавьтал нилээд их байдаг ба өөр хүчин зүйл нь баасаар гар бохирдсон тохиолдол.

*Toxoplasma gondii* нь эсийн дотор амьдардаг, хагас саран хэлбэртэй, нэг төгсгөл нь хурц үзүүртэй, нөгөө төгсгөл нь мөлгөр, бөөм нь төвийн байрлалтай ба мөлгөр төгсгөлтэй ойр байрлана. Хөдөлгөөнтэй боловч элэг, дэлүү гэх мэт эрхтэн орж байрласан тохиолдолд хөдөлгөөнгүй болдог. Халдварын цочмог үед шимэгч нейтрофил, моноцит эсийг гэмтээнэ (тахизоит). Халдварын архаг үед шимэгч нь эд эсийн дотор үржиж, цист үүсгэнэ (брадизоит). Ооцист биед орсны дараа шимэгч эсийн дотор орох ба тунгалгийн булчирхай, элэг, булчин, төв мэдрэлийн систем болон бусад дотор эрхтэнд үржинэ.

Токсоплазмозын үүсгэгч нь олон улсын ангилалаар биологийн аюулын (BSL-II) II түвшинд багтдаг.

### 4. Сорьц цуглуулах хадгалах, тээвэрлэх

#### 4.1. Шаардлагатай багаж хэрэглэл

Вакуум хуруу шил, зүүний хамт, хайч, хямсаа, чангалуур, спиртэн дэн, сорьц цуглуулах эппендорфын хуруу шил, эппендорфын тавиур, \100 үүр бүхий сорьц хадгалах хайрцаг\, сорьц зөөвөрлөх сав \гадна талд биологийн аюултай гэсэн тэмдэг наасан байна\, Сорьцны гадуур сав, мөсөн элемент.

#### 4.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл

Халдвартай материал үсрэх, асгарах, шил сав хагарах, арьс, салстад хүрэхээс сэргийлж, эмтэрсэн, цуурсан, ан цав гарсан хуруу шил болон шил саванд сорьц авахгүй байх, сорьц авсан савыг тогтвортой сууринд байрлуулах, хувийн хамгаалах хэрэгсэл (хамгаалах өмсгөл, бээлий, амны хаалт) болон халдваргүйтгэлийн бодис хэрэглэнэ. Тариурын зүү зэрэг хурц ирмэгтэй зүйлсээс гэмтэхээс болгоомжилно. Халдвар хамгааллын болон аюулгүй ажиллагааны дэглэмийг баримтална.

#### 4.3. Шинжилгээний сорьцын төрөл

Хүнээс цуглуулах сорьц:

- Цус- Хураагуур судасны цусыг бүлэгнүүлэхгүйн тулд EDTA агуулсан вакум хуруу шилэнд авна.
- Тархи-нугасны шингэн
- Эмгэг судлалын шинжилгээний материал- зүрх, дэлүү

Агуулагч амьтдаас цуглуулах сорьц:

- Агуулагч амьтад- цус, шээс, сүү, үрийн шингэн, өтгөн, зулбасан үр хөврөл, эхэс
- Мэрэгчдийн зэм үхдэлийн цус, чөмөг, цуллаг эрхтэнүүд
- Гаднын шимэгч- бүүрэг, хачиг, шумуул

Гадаад орчны сорьц:

- Хөрс, голын ус, бохир ус, ургамал, дутуу боловсруулсан мах, сүү, хүнсний ногоо, гадаад орчны эд зүйлсийн арчдас

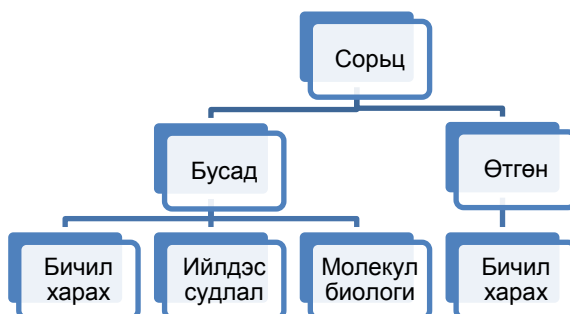
##### 4.3.1. Сорьцод боловсруулалт хийх:

Тархи нугасны шингэнийг хуруу шилэнд хийж дундаас өндөр хурдаар /RCF 1000g/ 5 минут хурилдуурдна. Дээр нь тунасан шингэнийг өөр хуруу шилэнд шилжүүлнэ. Хуруу шилний доод хэсэгт тунасан тунадсыг хольсны дараа шинжилнэ.

4.3.2. Сорьцыг хадгалах: Шинжилгээний сорьцыг ариун шилэн саванд авч аль болох хурдан хугацаанд лабораторид хүргэнэ. Токсоплазмоз өвчний сэжигтэй сорьцыг лабораторийн шинжилгээ хийгдэж, онош бүрэн баталгаажих хүртэл 2- 80 хэмд хадгална. Сорьцыг хадгалах, зөөвөрлөх, шилжүүлэх, тээвэрлэхэд био аюулгүй ажиллагааны журам, халдвар хамгааллын дэглэмийг баримтална.

## 5. Шинжилгээний аргачлал

### 5.1. Шинжилгээний дараалал



### 5.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл

Шинжилгээнд ирүүлсэн сорьцыг гадна сав баглаанаас гаргах, бичил харах, хурдавчилсан сорил, ийлдэс судлал, сорьцоос ДНХ ялгах үйл ажиллагааг био аюулгүй ажиллагааны II зэрэглэлийн лабораторид биоаюулгүй ажиллагааны 2-р ангилалын кабинетэд гүйцэтгэнэ. Идэвхгүйжүүлсэн сорьцонд полимеразын гинжин урвал (ПГУ) тавих, электрофорез гүйлгэх, үр дүнг унших зэрэг үйл ажиллагааг биоаюулгүй кабинетын гадна цэвэр бокс, ширээн дээр хийх ба нүдний хамгаалалтын шил, нүүрний халхавч, бээлий өмсөж ажиллана.

### 5.3. Бичил харах шинжилгээ

#### 5.3.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, будаг урвалж

- Бичил харуур
- Тавиур шил
- Романовский – Гимзийн будаг
- Наац бэхжүүлэх Никифоровын холимог
- Иммерсоны тос

#### 5.3.2. Бичил харах шинжилгээний

Романовский-Гимзийн аргаар будах:

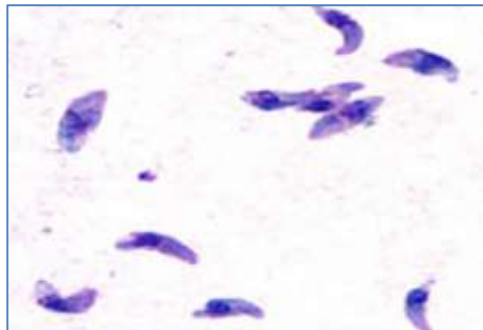
- Бэлтгэсэн наацыг агаарт хатаана.
- Никифоровын холимог эсвэл метилийн спиртэнд 15-20 минут бэхжүүлнэ.
- Романовский-Гимзын найруулсан уусмалд наацыг хийж 3-4 цаг будна.
- Нэрмэл усаар маш сайн зайлж хатаана.
- Бэлэн болсон наацыг 40х объективоор шинжилж шимэгч илрүүлээд, 100х объективоор тахизоит мөн эсэхийг тогтооно.

### 5.3.3. Чанарын хяналт

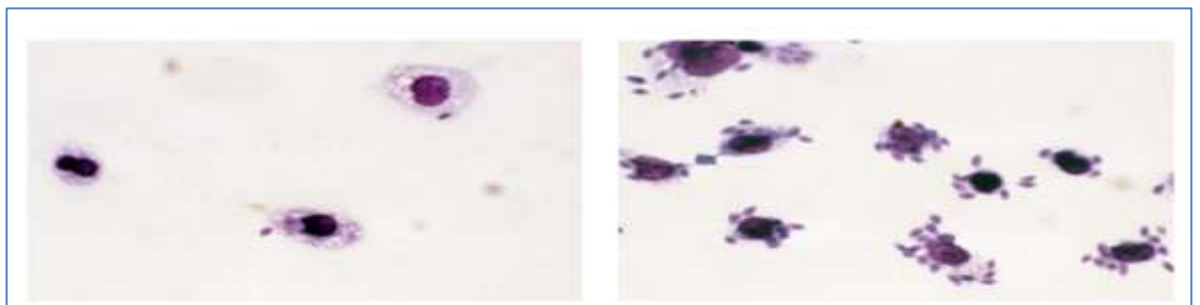
Хэрэглэсэн будаг урвалжууд нь үйлдвэрлэгчийн хадгалах хугацаа, горимыг баримталсан чанарын шаардлага хангасан байна.

### 5.3.4. Шинжилгээний хариуг дүгнэх

- Нейтрофил болон моноцит эсүүд эсүүд дотор шимэгч харагдана.
- Тэдгээр нь тал саран хэлбэртэй жижиг 3х7 мкм хэмжээтэй нэг төгсгөл дугираг, нөгөө төгсгөл нь шовх үзүүртэй байна.
- Бөөм нь дугираг төгсгөлдөө байрлах ба бараан улаанаар будагдана.
- Цитоплазм нь хөхөөр будагдана.



Романовский-Гимзээр будагдсан байдал



24 цагийн дараах *Toxoplasma tachyzoites* макрофаг эсэд халдварласан байдал.

#### 5.4. Ийлдэс судлалын шинжилгээ

Өвчтөний цусны ийлдсэнд өвөрмөц эсрэгбие илрүүлэх фермент холбоот урвал, дархан туяаралт урвлаар шинжилнэ.

Фермент холбоот урвал: / ELISA урвал/

Эсгэг холбоост урвалыг оношлуурын зааварт заасны дагуу урвалжыг найруулан тавина. Сорьцыг цомгийн сорьц шингэлэгчээр шингэлнэ.

Дархан туяаралт урвал:

Оношлуурын цомгийн зааварт заасны дагуу урвалыг тавина.

Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, оношлуур

ELISA уншигч, флюоросцент микроскопи, автомат пипетик 2мкл-20мкл, 20мкл-200мкл, 20мкл-1000мкл, фосфатын буфер, оношлуур цомог.

##### 5.4.1. Чанарын хяналт

Цомгийн хүчинтэй хугацаа, хадгалах хэм, оношлуурын чанарын хуудастай эерэг, сөрөг хяналтын харьцаа.

##### 5.4.2. Шинжилгээний хариуг дүгнэх

Тухайн цомгийн заврын дагуу шинжилгээний хариуг үнэлнэ.

#### 5.5. Молекул-биологийн оношилгоо

5.7.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл, урвалж бодис, праймер  
*Тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл:* Биоаюулгүйн 2-р зэрэглэлийн кабинет, ПГУ-ын олшруулагч машин, дулаан тогтоогуур, бичил хурилдуур, хүчдэл тохируулагч, электрофорезийн аппарат, холигч, гель хайлуулагч, электрон жин, ПГУ-ын үр дүнг хэт ягаан туяаны тусламжтайгаар дүрслэн харж дүгнэх систем, нэг удаагийн бээлий, эппендорфийн хуруу шил (1,5-2 мл, 0,2 мл, 0,5мл), эппендорфийн хуруу шилний тавиур, автомат дусаагуур, фильтртэй ариун хошуу (20-200мкл, 1000мкл, 0,5-10мкл, 2-20мкл), шилний харандаа, хаягдал хийх сав

*Урвалж:*

*ДНХ ялгах ажиллагаанд:* Задлагч уусмал (нэрмэл ус, Трис, Твин 20, протейназа К, лизоцим, ЭДТА), фенолхлорформ, 96%, 70% этилийн спирт, давхар нэрсэн ус, фирмийн цомгийн бүрэлдэхүүн

*ПГУ-д:* ПГУ-ын цомог, өвөрмөц праймер (хүснэгт 1), ионгүйжүүлсэн ус, ДНХ-ийн молекул жингийн маркер

*Агарозын гель электрофорезэд:* Трис-боратын буфер рН=8.3 (5хТВЕ) (89 мМ Трис, 89 мМ Н<sub>3</sub>ВО<sub>3</sub>, 2мМ ЭДТА), 1хТВЕ (5х буфер 100 мл, нэрсэн ус 400 мл), 1.5% агароз гель, этидиум бромидын 0,001%-ийн уусмал (250 мл нэрсэн усанд 2,5 мг этидиум бромид)

Токсоплазмоз өвчний үүсгэгчийн ДНХ илрүүлэх өвөрмөц праймерийн дараалал

Хүснэгт 1

Бай ген	Прайме рын нэр	Праймерийн дараалал 5'..... 3'	Молеку л жин
	B22	AAC GGG CGA GTA GCA CCT GAG AGA	115
	B23	TGG GTC TAC GTC GAT GGC ATG ACA AC	
B1 ген	B5	TGA AGA GAG GAA ACA GGT GGT CG	131
	B6	CCG CCT CCT TCG TCC GTC GTA	
	T1	ATG GTC CGG CCG GTG TAT GAT ATG	191
	T2	TCC CTA CGT GGT GCC GCA GTT GCT	
P30 ген	DS29	TTG CCG CGC CCA CAC TGA TG	914
	DS30	CGC GAC ACA AGC TGC GAT AG	
	DS38	CGA CAG CCG CGG TCA TTC TC	522
	DS39	GCA ACC AGT CAG CGT CGT CC	
	DS29	TTG CCG CGC CCA CAC TGA TG	620
	DS39	GCA ACC AGT CAG CGT CGT CC	
	DS30	CGC GAC ACA AGC TGC GAT AG	815
DS38	CGA CAG CCG CGG TCA TTC TC		

5.7.2. Молекул биологийн шинжилгээ:

*ДНХ ялгаах:*

*Фенол хлороформын аргаар ДНХ ялгаах:*

- Задлагч уусмалаа бэлтгэж (5мл ариун нэрмэлд: трис 30мг, ЭДТА 15мг, твин 20 15мкл, протейназа К 15мкл, лизоцим 10мг), 37°-д 30 мин тавьна.
- Сорьцноос 100 мкл-ийг авч эппендорфийн хуруу шилэнд хийж, 100 хэмийн усан баннд 15 минут тавьж идэвхигүйжүүлнэ.
- Сорьцийг усан баннаас гаргаад дээр нь 100 мкл задлагч уусмал нэмж 37°С хэмд 1 цаг тавина.



- Задлагч уусмал нэмсэн сорьцон дээр 200 мкл фенол: хлорформ (1:1) нэмж сайтар холиод 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулна.
- Дээд шингэнийг соруулан авч, хаяг бүхий шинэ хуруу шилэнд хийж, 2 эзэлхүүн 96% спирт нэмээд -20°C 1 цаг тавина.
- 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 70%-ийн этилийн спирт нэмж 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 60°C хэмд 15 мин тавьж спиртийг ууршуулна.
- Хатаасан ДНХ-г ойролцоогоор 30 мкл нэрмэл усаар шингэлж, 1-2мкл-ийг ПГУ-п ашиглана.

*ДНХ ялгах цомог ашиглан ДНХ ялгах:*

Цус, эдээс ДНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан сорьцноос ДНХ ялгаж болох ба үйлдвэрлэгчийн дагалдуулсан зааврын дагуу ялгана.

*ПГУ тавих:*

ПГУ-ын холимгийг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу бэлтгэнэ. *T.gondii* В ген тодорхойлох ПГУ-ыг **B5/B6; T1/T2 праймераар:** 94° хэмд 5 минут, 35 цикл (94° хэмд 30 сек, 65° хэмд 40 сек, 72° хэмд 40 сек), 72° хэмд 10 минутаар; **B22/B23 праймераар:** 95° хэмд 5 минут, 40 цикл (95° хэмд 60 сек, 58° хэмд 45 сек, 72° хэмд 45 сек), 72° хэмд 10 минутаар тус тус гүйцэтгэнэ.

*T.gondii* P30 ген тодорхойлох ПГУ-ыг **DS29/30; DS38/39; DS29/39; DS30/39 праймераар:** 95° хэмд 5 минут, 30 цикл (95° хэмд 60 сек, 60° хэмд 60 сек, 74° хэмд 180 сек), 72° хэмд 3 минутаар тус тус гүйцэтгэнэ.

*Гель электрофорез тавих:*

1.5%-ийн агароз гель бэлтгэж, 1µg/ml этидиум бромид нэмж электрофорезийн аппаратанд цутган зохих самаа байрлуулж царцаана.

ПГУ бүтээгдэхүүн тус бүрээс 8-10 мкл соруулан авч, 3 мкл хүндрүүлэгч уусмалтай холин 1,5%-ийн агарозийн гелийн үүрэнд хийнэ. 100х.н ДНХ стандарт жишигчээс 8мкл соруулан гелийн нөгөө үүрэнд хийнэ. 1х Трис-боратын буфер ашиглан 100 вольт хүчдэлээр 30 минут электрофорез тавина.

5.7.3. Шинжилгээний үр дүнг дүгнэх:

Электрофорез дууссаны дараа гель детекцийн аппарат DijiDoc-It Image System ашиглан үр дүнг авна. *T.gondii* В ген тодорхойлох урвалын эерэг хяналт болон *T.gondii* бүхий дээжинд 115bp, 131bp, 191bp бүхий толбо, Р30 ген тодорхойлох урвалаар 914bp, 522bp, 620bp, 815bp бүхий хэмжээтэй толбо тус тус үүсэх ба сөрөг хяналтанд толбо үүсэхгүй.

#### 5.7.4. Чанарын хяналт:

- Эерэг хяналтанд *T.gondii* үүсгэгчийн ДНХ-ийг авна.
- Сөрөг хяналтанд нуклейн хүчил ялгах, Мастер микс бэлтгэх, ПГУ-ын өрөө тус бүрээс ариун нэрмэл ус юмуу ТВЕ буфер авна.
- Олон улсын стандартад нийцсэн ISO-9001 сертификаттай бүтээгдэхүүнийг сонгож хэрэглэнэ.
- Урвалж, оношлуур, праймерын хадгалалтын горимыг чанд мөрдөх ба праймер, урвалж бодисын хүчинтэй хугацаанд байнга хяналт тавьна.

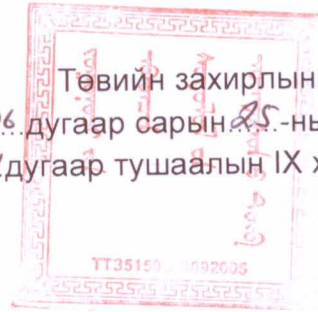
--oOo--

## Хавсралт

### Ашигласан материал

1. <http://www.docstoc.com/docs/123347189/toxoplasmosis-dr-gopalakrishnan>
2. Паразитлогийн шинжилээний арга зүй
3. Toxoplasmosis – F.uan Knapen, P.A.M Ouergaauw
4. <http://www.mariamm.ru/docprint.htm?id=307>
5. Ehrlichia chaffeensis From MicrobeWiki, the student-edited microbiology resource
6. G. Ralph Corey, Christopher Carpenter, Li Quo Kong, Tejel Gandhi, Edward Breitschwerdt, Barbara Hegarty, Sheng-Ming Chen, Hui-Min Feng, Xue-Jie Yu, Juan Olano, David H. Walker, and Stephen J. Daniel J. Sexton, Dumler Dual Infection with Ehrlichia chaffeensis and a Spotted Fever Group Rickettsia: A Case Report
7. Ehrlichia chaffeensis Arkansas Genome Page
8. WILLIAM E. ROLAND, E. DALE EVERETT, TRACY L. CYR, SYED Z. HASAN, CHANDRA B. DOMMARAJU, AND GREGORY A. MCDONALD EHRlichIA CHAFFEENSIS IN MISSOURI TICKS
9. William R. Davidson, J. Mitchell Lockhart, David E. Stallknecht, and Elizabeth W. Howerth SUSCEPTIBILITY OF RED AND GRAY FOXES TO INFECTION BY EHRlichIA CHAFFEENSIS
10. Alan Kocan, Gena Crowder Levesque, Lisa C. Whitworth, George L. Murphy, Sidney A. Ewing, and Robert W. Barker Natural Occurring Ehrlichia chaffeensis Infection in Coyotes from Oklahoma
11. Seung-Ok Lee, Dong-Kyeun Na, Chul-Min Kim, Ying-Hua Li, Yoon-Hee Cho, Jin-Ho Park, John Hwa Lee, Seong-Kug Eo, Terry A. Klein, Joon-Seok Chae Identification and prevalence of Ehrlichia chaffeensis infection in Haemaphysalis longicornis ticks from Korea by PCR, sequencing and phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene

Төвийн захирлын 2015 оны  
06 дугаар сарын 25-ны өдрийн  
9/11 дугаар тушаалын IX хавсралт



## КРИПТОСПОРИДОЗ ӨВЧНИЙ ЛАБОРАТОРИЙН ШИНЖИЛГЭЭНИЙ СТАНДАРТ АЖЛЫН ЗААВАР

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Криптоспоридоз өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо-8
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- А07.2	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил
Зориулалт: Криптоспоридоз өвчний лабораторийн оношлогоонд	
Хэрэглэх хүрээ: Криптоспоридоз өвчний шинжилгээ, оношлогоо, судалгааны лабораториуд	
Боловсруулсан: Л.Оргилбаяр, Х.Тунгалаг	Баталсан, зөвшөөрсөн актын дугаар: ЗӨСҮТөвийн захирлын А/44 тоот тушаалын есдүгээр хавсралт
Огноо: 2015 он	Огноо: 2015.06.25
Хэвлүүлсэн: Мэргэжлийн тусламжын алба, Лавлагаа лабораторийн тасаг	

<b>Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв</b>	
Нэр: Криптоспоридоз өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 8
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- А07.2	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил

### 1. Зорилго, зарчим

Тухайн шинжлэгдэхүүнээс криптоспоридоз өвчний үүсгэгч, түүний ДНХ, өвөрмөц эсрэгбие, эсрэгтөрөгч илрүүлэн баталгаажуулахад оршино.

### 2. Хамрах хүрээ

Криптоспоридоз өвчний сэжигтэй хүний өвчлөлийн тохиолдол илэрсэн үед болон байгалийн голомт хяналтын шинжилгээгээр цуглуулсан сорьцуудыг шинжлэх, шимэгчийг дүйн тодорхойлох, судлах ажиллагааг гүйцэтгэдэг лабораториудад мөрдөнө.

### 3. Тодорхойлолт

*Cryptosporidium parvum* нь өтгөн – ам замаар ооцист биед орох маягаар халдвар дамжина. Өтгөнөөр гармагцаа 3-5 хоногийн дараа халдвартай болдог. Халуун бүсийн болон бусад орнуудад усаар дамжсан *C.parvum* дэгдэлт олонтаа гарсан. Ооцист нь ундны усыг ариутгахад хэрэглэдэг хлор болон бусад ариутгалын бодисуудад тэсвэртэй байдаг. Хулуун бүсийн орнуудад халдвар чийглэг, дулаан улиралд ихсэж, хуурай сэрүүн үед багасдаг нь нотлогдсон. Бэлгийн бус буюу шизогони, бэлгийн буюу спорогони гэсэн амьдарлын тойрогтой. Энэ тойргоо нэг эзний биед өнгөрөөдөг. Гэрийн болон зэрлэг амьтдад халдваралдаг ба энтеритийн болон дархлаа муутай хүн өвчлөх зонхилох шалтгаан болоод байна. Токсоплазмозын үүсгэгч нь олон улсын ангилалаар биологийн аюулын (BSL-II) II түвшинд багтдаг.

### 4. Сорьц цуглуулах хадгалах, тээвэрлэх

#### 4.1. Шаардлагатай багаж хэрэглэл

Эмнэлзүйн зорилгоор өтгөнөөс дөнгөц хэрэгтэй байдаг. Энэ нь шээсээр бохирлогдоогүй байх ёстой ба цэвэр, хуурай, нэвтэрдэггүй, тохирсон хэмэжээ бүхий саванд авагдсан байх. Савыг ариутгах шаардлаггүй боловч антисептик болон устгалын бодисгүй байх ёстой.

#### 4.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл

- Өвчний өвөрмөц эмчилгээ байхгүй тул лабораторийн ажилтанд тавих аюулгүй ажиллагааны зааварчилгаа, эрүүл мэндийн хяналтыг сайжруулах шаардлагатай.
- Шинжилгээнд ирүүлсэн шинжлэгдэхүүн дээжийг гадна сав баглаанаас гаргах, дээж материалаас ДНХ ялгах үйл ажиллагааг биоаюулгүй ажиллагааны 2-р зэргийн лабораторид биоаюулгүй ажиллагааны II кабинетад гүйцэтгэнэ.
- Идэвхгүйжүүлсэн материалд ПГУ тавих, электрофорезын үр дүнг тооцох зэрэг үйл ажиллагааг биоаюулгүй кабинетын гадна цэвэр бокс, ширээн

дээр хийх ба нүдний хамгаалалтын шил, нүүрний халхавч, давхар бээлий өмсөнө.

- Лабораторийн шинжилгээг хийхийн өмнө биоаюулгүй ажиллагааны талаар болон хэрвээ осол болбол хэрхэх тухай зааварчлага авсан байна.

#### 4.3. Шинжилгээний сорьцын төрөл

- Өвчтөний сорьц: цус, ийлдэс, 5-10гр өтгөн, хэрэв өтгөн усархаг шингэн бол 10мл
- Тархвар судлалын холбогдолтой сорьц: өвчтөний хэрэглэж байсан хөтөвчний арчдас
- Байгалийн голомтын сорьц: нохой, муур, тугалын шинэ баас

#### 4.3.1. Өтгөний сорьцонд боловсруулалт хийх:

- 1гр хэмжээтэй өтгөнийг 10% -ын 4мл-ээр савласан формол усанд хийж холино.
- Дээр нь 10% -ын 3-4мл формалин нэмээд, бөглөн сайтар сэгсэрч, булинга бэлдэнэ.
- Бэлэн болсон булингыг конус хэлбэрийн хуруу шилэнд хийж, дээр нь 3-4 мл диэтил эфир буюу ацетат спирт нэмж, холигчоор 15 секундын турш холино. Холигч байхгүй бол 1 минутын турш сэгсэрч холино.
- Бэлэн болсон холимгийг 1000 мин/эргэлтээр 1 минут хурилдуурдана.
- Хурилдуурдсны дараа шимэгч агуулсан байж болох тунадасыг үлдээн, дээд хэсгийг нь соруулан авч, халдваргүйтгэлийн уусмалд асгана. \зураг 1\



Зураг 1

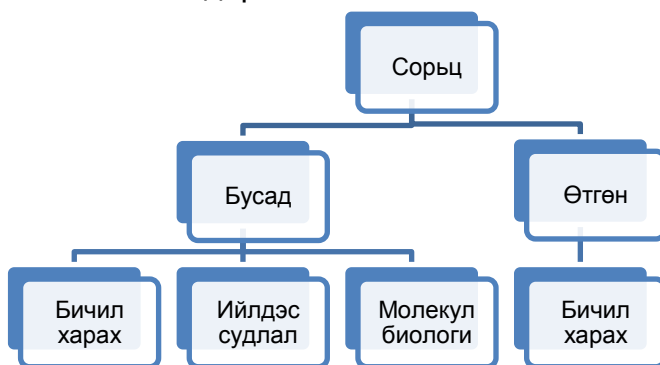
- Шимэгч агуулсан байж болох тунадсан дээр формол 10-15мл-ийг нэмж, 3000 мин\эргэлт 5-10 минут хурилдуурдан, тунадсыг үлдээн дээд шингэнийг асгана.
- Бэлэн болсон сорьц нь ооцист агуулсан байх ба бичил харах болон бусад аргаар шинжилнэ.

#### 4.3.2. Сорьцыг хадгалах:

Шинжилгээний сорьцыг ариун шилэн саванд авч аль болох хурдан хугацаанд лабораторид хүргэнэ. Криптоспоридоз өвчний сэжигтэй сорьцыг лабораторийн шинжилгээ хийгдэж, онош бүрэн баталгаажих хүртэл 2-80 хэмд хадгална. Сорьцыг хадгалах, зөөвөрлөх, шилжүүлэх, тээвэрлэхэд био аюулгүй ажиллагааны журам, халдвар хамгааллын дэглэмийг баримтална.

## 5. Шинжилгээний аргачлал

### 5.1. Шинжилгээний дараалал



### 5.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл

Шинжилгээнд ирүүлсэн сорьцыг гадна сав баглаанаас гаргах, бичил харах, хурдавчилсан сорил, ийлдэс судлал, сорьцоос ДНХ ялгах үйл ажиллагааг био аюулгүй ажиллагааны II зэрэглэлийн лабораторид биоаюулгүй ажиллагааны 2-р ангилалын кабинетад гүйцэтгэнэ. Идэвхгүйжүүлсэн сорьцонд полимеразын гинжин урвал (ПГУ) тавих, электрофорез гүйлгэх, үр дүнг унших зэрэг үйл ажиллагааг биоаюулгүй кабинетын гадна цэвэр бокс, ширээн дээр хийх ба нүдний хамгаалалтын шил, нүүрний халхавч, бээлий өмсөж ажиллана.

### 5.3. Бичил харах шинжилгээ

#### 5.3.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, будаг урвалж

- Бичил харуур
- Тавиур шил
- Метанол
- Карбол фуксин
- 1% -ын хүчиллэг спирт
- 0.5 % -ын малахит ногоон

#### 5.3.2. Бичил харах шинжилгээ

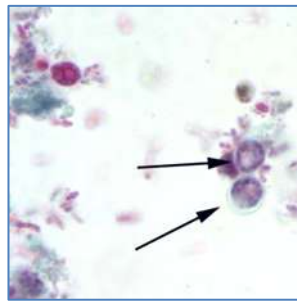
- Гаргаж авсан ооцистээс наац бэлтгэн агаарт хатаан метанолоор 2-3 минут бэхжүүлнэ.
- Карбол фуксинээр 15 минут будан, усаар угаана.
- 1% -ын хүчиллэг спиртээр 10-15 сек турш өнгөгүйжүүлэн, усаар угаана.
- 0.5 % -ын малахит ногооноор 30 сек дахин будаж, усаар угаан хатаана.
- Бэлэн болсон наацыг бичил харуурын 40х өсгөлтөөр харж дүгнэнэ.

#### 5.3.3. Чанарын хяналт

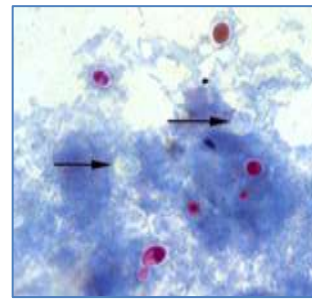
Шинжилгээнд ашиглах будаг урвалжын хадгалах хугацаа, хадгалалтын горимыг баримталсан чанарын шаардлага хангасан байна.

#### 5.3.4. Шинжилгээний хариуг дүгнэх

Залуу ооцист улаан ягаан \зураг 2\ өнгөөр будагдана. 4-6 мкм-ийн хэмжээтэй, дугариг, зуйван хэлбэртэй байна. Хөгшин ооцист цайвар \зураг 3\ өнгөөр будагдана.



Зураг 2



Зураг 3

#### 5.4. Ийлдэс судлалын шинжилгээ

Өвчтөний цусны ийлдсэнд өвөрмөц эсрэгбие илрүүлэх фермент холбоот урвал, дархан туяаралт урвалаар шинжилнэ.

Фермент холбоот урвал: / ELISA урвал/

Фермент холбоост урвалыг оношлуурын зааварт заасны дагуу урвалжыг найруулан тавина. Сорьцыг цомгийн сорьц шингэлэгчээр шингэлнэ.

Оношлуурын цомгийн зааварт заасны дагуу урвалыг тавина.

##### 5.4.1 Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, оношлуур

ELISA уншигч, флюорсцент микроскопи, автомат пипетик 2мкл-20мкл, 20мкл-200мкл, 20мкл-1000мкл, фосфатын буферийн уусмал, оношлуур цомог

##### 5.4.2 Чанарын хяналт

Цомгийн хүчинтэй хугацаа, хадгалах хэм, оношлуурын чанарын хуудсан дах эерэг, сөрөг хяналтын харьцаа

##### 5.4.3. Шинжилгээний хариуг дүгнэх

Тухайн цомгийн заврын дагуу шинжилгээний хариуг үнэлнэ.

#### 5.5. Молекул-биологийн оношилгоо

##### 5.5.1 Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл, урвалж бодис, праймер

*Тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл:* Биоаюулгүйн 2-р зэрэглэлийн кабинет, ПГУ-ын олшруулагч машин, дулаан тогтоогуур, бичил хурилдуур, хүчдэл тохируулагч, электрофорезийн аппарат, холигч, гель хайлуулагч, электрон жин, ПГУ-ын үр дүнг хэт ягаан туяаны тусламжтайгаар дүрслэн харж дүгнэх систем, нэг удаагийн бээлий, эппендорфийн хуруу шил (1,5-2 мл, 0,2 мл, 0,5мл), эппендорфийн хуруу шилний тавиур, автомат дусаагуур, фильтертэй ариун хошуу (20-200мкл, 1000мкл, 0,5-10мкл, 2-20мкл), шилний харандаа, хаягдал хийх сав

*Урвалж:*

*ДНХ ялгах ажиллагаанд:* Задлагч уусмал (нэрмэл ус, Трис, Твин 20, протейназа К, лизоцим, ЭДТА), фенолхлорформ, 96%, 70% этилийн спирт, давхар нэрсэн ус, фирмийн цомгийн бүрэлдэхүүн

*ПГУ-д:* ПГУ-ын цомог, өвөрмөц праймер (хүснэгт 1), ионгүйжүүлсэн ус, ДНХ-ийн молекул жингийн маркер

Криптоспоридоз өвчний үүсгэгчийн ДНХ илрүүлэх өвөрмөц праймерийн дараалал

Хүснэгт 1

Бай ген	Праймерын нэр	Праймерийн дараалал 5'..... 3'	Молекул жин (bp)
<i>Cryptosporidium sp.</i>			
COWP gene	BCOWPF	ACC GCT TCT CAA CAA CCA TCT TGT CCT C	769bp
	BCOWPR	CGC ACC TGT TCC CAC TCA ATG TAA ACC C	
	Cry15	GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT TG	533bp
	Cry9	GGA CTG AAA TAC AGG CAT TAT CTT G	

*Агарозын гель электрофорезэд:* Трис-боратын буфер pH=8.3 (5xTBE) (89 mM Трис, 89 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2mM ЭДТА), 1xTBE (5x буфер 100 мл, нэрсэн ус 400 мл), 1.5% агароз гель, этидиум бромидын 0,001%-ийн уусмал (250 мл нэрсэн усанд 2,5 мг этидиум бромид)

5.5.2. Молекул биологийн шинжилгээ:

*ДНХ ялгах:*

*Фенол хлороформын аргаар ДНХ ялгах:*



- Задлагч уусмалаа бэлтгэж (5мл ариун нэрмэлд: трис 30мг, ЭДТА 15мг, твин 20 15мкл, протейназа К 15мкл, лизоцим 10мг), 37°-д 30 мин тавьна.
- Сорьцноос 100 мкл-ийг авч эппендорфийн хуруу шилэнд хийж, 100 хэмийн усан баннд 15 минут тавьж идэвхигүйжүүлнэ.
- Сорьцийг усан баннаас гаргаад дээр нь 100 мкл задлагч уусмал нэмж 37°С хэмд 1 цаг тавина.
- Задлагч уусмал нэмсэн сорьцон дээр 200 мкл фенол: хлорформ (1:1) нэмж сайтар холиод 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулна.
- Дээд шингэнийг соруулан авч, хаяг бүхий шинэ хуруу шилэнд хийж, 2 эзэлхүүн 96% спирт нэмээд -20°С 1 цаг тавина.
- 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 70%-ийн этилийн спирт нэмж 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 60°С хэмд 15 мин тавьж спиртийг ууршуулна.
- Хатаасан ДНХ-г ойролцоогоор 30 мкл нэрмэл усаар шингэлж, 1-2мкл-ийг ПГУ-п ашиглана.

*ДНХ ялгах цомог ашиглан ДНХ ялгах:*

Цус, эдээс ДНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан сорьцноос ДНХ ялгаж болох ба үйлдвэрлэгчийн дагалдуулсан зааврын дагуу ялгана.

*ПГУ тавих:*

ПГУ-ын холимгийг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу бэлтгэнэ. *Cryptosporidium* sp. тодорхойлох ПГУ-ыг BCOWPF/ BCOWPR **праймераар**: 94° хэмд 5 минут, 30 цикл (94° хэмд 60 сек, 65° хэмд 60 сек, 72° хэмд 60 сек), 72° хэмд 10 минутаар; үүрэн ПГУ-ыг Cry15/ Cry9 **праймераар**: 94° хэмд 5 минут, 30 цикл (94° хэмд 50 сек, 55° хэмд 30 сек, 72° хэмд 50 сек), 72° хэмд 10 минутаар тус тус гүйцэтгэнэ.

*Гель электрофорез тавих:*

1.5%-ийн агароз гель бэлтгэж, 1µg/ml этидиум бромид нэмж электрофорезийн аппаратанд цутган зохих самаа байрлуулж царцаана.

ПГУ бүтээгдэхүүн тус бүрээс 8-10 мкл соруулан авч, 3 мкл хүндрүүлэгч уусмалтай холин 1,5%-ийн агарозийн гелийн үүрэнд хийнэ. 100х.н ДНХ стандарт жишигчээс 8мкл соруулан гелийн нөгөө үүрэнд хийнэ. 1х Трис-боратын буфер ашиглан 100 вольт хүчдэлээр 30 минут электрофорез тавина.

### 5.5.3. Шинжилгээний үр дүнг дүгнэх:

Электрофорез дууссаны дараа гель детекцийн аппарат DijiDoc-It Image System ашиглан үр дүнг авна. *Cryptosporidium* sp тодорхойлох урвалын эерэг хяналт болон *Cryptosporidium* sp бүхий дээжинд 769bp болон 533bp бүхий толбо үүсэх ба сөрөг хяналтанд толбо үүсэхгүй.

### 5.5.4 Чанарын хяналт:

- Эерэг хяналтанд криптоспоридоз өвчний үүсгэгчийн ДНХ-ийг авна.
- Сөрөг хяналтанд нуклейн хүчил ялгах, Мастер микс бэлтгэх, ПГУ-ын өрөө тус бүрээс ариун нэрмэл ус юмуу TBE буфер авна.
- Олон улсын стандартад нийцсэн ISO-9001 сертификаттай бүтээгдэхүүнийг сонгож хэрэглэнэ.
- Урвалж, оношлуур, праймерын хадгалалтын горимыг чанд мөрдөх ба праймер, урвалж бодисын хүчинтэй хугацаанд байнга хяналт тавина.

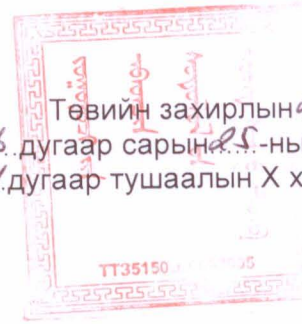
--oOo--

## Хавсралт

### Ашигласан материал

1. [www.cdc.gov/parasites/crypto/diagnosis.html](http://www.cdc.gov/parasites/crypto/diagnosis.html)
2. Паразитлогийн шинжилээний арга зүй 2000 он
3. [www.scielo.br/pdf/rimtsp/v43n2/a05v43n2](http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v43n2/a05v43n2)
4. Dubey JP, Speer CA, Fayer R. General biology of *Cryptosporidium*. Dubey JP, Speer CA, Fayer R, editors. Cryptosporidiosis of man and animals. Boca Raton (FL): CRC Press; 1990.p. 1-29

Төвийн захирлын 2015 оны  
06 дугаар сарын 25-ны өдрийн  
УИХ дугаар тушаалын X хавсралт



## ТАТРАН ӨВЧНИЙ ЛАБОРАТОРИЙН ШИНЖИЛГЭЭНИЙ СТАНДАРТ АЖЛЫН ЗААВАР

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Татран өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 9
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар-А32	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил
Зориулалт: Татран өвчний лабораторийн оношлогоонд	
Хэрэглэх хүрээ: Татран өвчний шинжилгээ, оношлогоо, судалгааны лабораториуд	
Боловсруулсан: Д.Ганболд, Б.Баянмөнх, Х.Тунгалаг	Баталсан, зөвшөөрсөн актын дугаар: ЗӨСҮТөвийн захирлын А/44 тоот тушаалын аравдугаар хавсралт Огноо: 2015.06.25
Огноо: 2015 он	
Хэвлүүлсэн: Мэргэжлийн тусламжын алба, Лавлагаа лабораторийн тасаг	

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Татран өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 9
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар-А32	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил

#### 1. Зорилго, зарчим:

Шинжлэгдэхүүнд лабораторийн шинжилгээ хийж татран өвчний үүсгэгч, түүний ДНХ, өвөрмөц эсрэгбие, эсрэгтөрөгч илрүүлэн, баталгаажуулахад оршино.

#### 2. Хамрах хүрээ:

Татран өвчний хүний өвчлөлийн сэжигтэй тохиолдол илэрсэн үед болон хяналтын шинжилгээ хийхэд энэхүү стандарт ажлын зааврыг мөрдөнө.

#### 3. Тодорхойлолт:

Үүсгэгч нь *Clostridiaceae* овгийн *Clostridium* төрлийн *Clostridium tetani* юм. Эмгэг төрүүлэх хүчин зүйл нь нейротоксин. *C. tetani* нь грам эерэг, туйлбартай агааргүйтэн, ургах хэм нь 14-43°C бөгөөд хамгийн тохиромжтой хэм нь 37 °C, хөдөлгөөнтэй савханцар. Дулаанд мэдрэмтгий, антисептикууд болон дулааны таагүй үйлчлэлд бүрээс үүсгэнэ. Шилбүүрийн антигений бүтцээр нь 10 серотип болгон ангилдаг бөгөөд их биеийн O антиген нь бүх серотипэд байдаг онцлогтой юм. *Clostridium* төрлийн үүсгэгчид гадаад орчинд тэсвэртэй. *C.tetani* нь тетаноспазмин, экзотоксин ялгаруулдаг.

#### 4. Сорьц цуглуулах хадгалах, тээвэрлэх

##### 4.1. Шаардлагатай багаж хэрэглэл

- Вакуум хуруу шил, зүүний хамт
- Хайч
- Хямсаа
- Спиртэн дэн
- Сорьц цуглуулах эппендорфын хуруу шил
- Эппендорфын тавиур, \100 үүр бүхий сорьц хадгалах хайрцаг\
- Сорьц зөөвөрлөх сав \гадна талд биологийн аюултай гэсэн тэмдэг наасан байна\
- Сорьцны гадуур сав, мөсөн элемент

##### 4.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл

Био аюулгүй ажиллагааны II зэрэглэлийн лабораторид гүйцэтгэнэ.

##### 4.3. Шинжлэх сорьцын төрөл

Өвчтөнөөс цуглуулах сорьц:

Цус, тархи нугасны шингэн, шархны шүүдэс болон шархнаас ялгарч байгаа ялгадас, шархны тасархай, эд нэхдэс, хүйн арчдас, зарим тохиолдолд хамар, залгиур, гуурсан хоолойн салс, мөн түүнчлэн төрсний болон үр хөндөлт хийлгэсний дараах үтрээ, умайн ялгадас, өвчтөн нас барсан тохиолдолд элэг, дэлүү, шархны боолтын материал

Гадаад орчноос цуглуулах сорьц:

Хөрс, шороо

##### 4.3.1. Сорьцийг хадгалах

Ариутгасан шилэн саванд хийж аль болох хурдан хугацаанд лабораторид хүргэнэ.

Татран өвчний сэжигтэй хүнээс болон гадаад орчноос дээжилсэн сорьцыг лабораторийн шинжилгээ хийгдэж, онош бүрэн баталгаажих хүртэл 2-оос 8<sup>0</sup> хэмд хадгална.

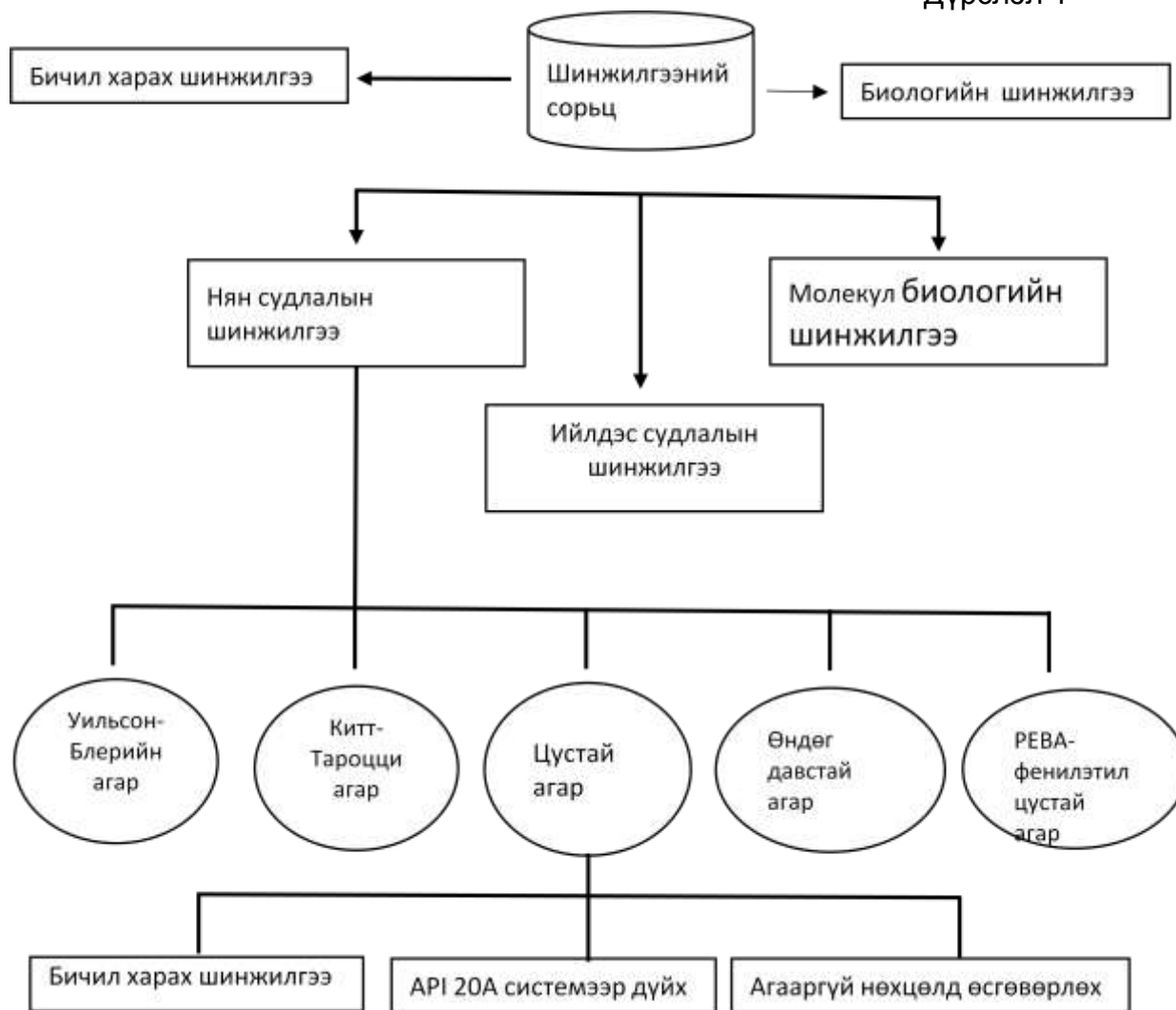
Сорьцыг хадгалах, зөөвөрлөх, шилжүүлэх, тээвэрлэхэд био аюулгүй ажиллагааны журам, халдвар хамгааллын дэглэмийг баримтална.

#### 5. Шинжилгээний аргачлал

### 5.1. Шинжилгээний дараалал (дүрслэл 1-д харуулав)

- Бичил харах шинжилгээ
- Ийлдэс судлалын шинжилгээ
- Нян судлалын шинжилгээ
- Биологийн шинжилгээ
- Молекул биологийн шинжилгээ

Дүрслэл 1



### 5.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл:

Биологийн аюулгүй ажиллагааны II зэрэглэлийн лабораторид ажиллана. Шинжилгээнд ирүүлсэн сорьцыг гадна сав баглаанаас гаргах, бичил харах, хурдавчилсан сорил, ийлдэс судлал, нян судлалын шинжилгээ, сорьцоос ДНХ ялгах үйл ажиллагааг биоаюулгүй ажиллагааны 2-р зэргийн лабораторид биоаюулгүй ажиллагааны II кабинетад гүйцэтгэнэ.

Идэвхгүйжүүлсэн материалд полимеразын гинжин урвал (ПГУ) тавих, электрофорез гүйлгэх, үр дүнг тооцох зэрэг үйл ажиллагааг биоаюулгүй кабинетын гадна цэвэр бокс, ширээн дээр хийх ба нүдний хамгаалалтын шил, нүүрний халхавч, бээлий өмсөж ажиллана.

### 5.3. БИЧИЛ ХАРАХ ШИНЖИЛГЭЭ

#### 5.3.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, будаг урвалж

- Бичил харуур

- Тавиур шил
- Бүрхүүл шил
- Грамын будаг, урвалж
- Наац бэхжүүлэх холимог
- Иммерсоны тос

#### 5.3.2. Бичил харах шинжилгээ

Шинжилгээнд цуглуулсан сорьцоос наац бэлтгэн Грамын аргаар будаж харна.

Грамын аргаар будах:

- Бэхжүүлсэн наацыг генцианвиолетын будгаар 1 минут будна.
- Усаар угаана.
- Люголын уусмалаар 30 секунд будна.
- Этилийн 96<sup>0</sup>-ийн спиртээр 20 секунд зайлна.
- Усаар угаана.
- Фуксины будгаар 1 минут будна.
- Усаар угааж, агаарт хатаагаад бичил харуураар харж дүгнэнэ.

#### 5.3.3. Чанарын хяналт

Будаг урвалжын үйлдвэрлэгчээс заасан болон найруулсан хугацаа

#### 5.3.4. Шинжилгээний үр дүн

Грам эерэг, мөлгөр төгсгөлтэй, бөмбөрийн дохиур шиг хэлбэртэй, 4-8 мкм урттай, 0.3-0.8 мкм өргөн нэгээрээ эсвэл гинжилж байрласан савханцар харагдана. Залуу өсгөврүүд утаслаг хэлбэртэй байж болно.

### 5.4. **ИЙЛДЭС СУДЛАЛЫН ШИНЖИЛГЭЭ:**

#### 5.4.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, оношлуур

- Урвалын хавтан
- Бичил хавтан уншигч
- Бичил хавтан угаагч
- Дулаан тогтоогуур
- Автомат дусаагуур\5-50мкл, 20-200мкл, 50-300мкл, 1000мкл\
- Автомат дусаагуурын хошуу
- Усан ванн

#### **Оношлуур:**

- Бичил нүхнүүдэд *C. tetani* хорны эсрэгтөрөгч суулгасан хавтан
- Эерэг болон сөрөг хяналт
- Коньюгат (anti human IgG, IgA, IgM)
- Стандарт ийлдэс
- Субстрат
- Сорьц шингэлэгч
- Угаагч уусмал
- Зогсоох уусмал

#### 5.4.2. Ийлдэс судлалын шинжилгээ

Өвчтөний цусны ийлдсэнд өвөрмөц эсрэгбие *tetanus IgG* илрүүлэх фермент холбоот урвал тавина.

#### **Эсгэг холбоост урвал: / ELISA урвал/**

Эсгэг холбоост урвалыг оношлуурын зааварт заасны дагуу урвалжыг найруулан тавина. Сорьцыг цомгийн сорьц шингэлэгчээр шингэлнэ.

### 5.5. **НЯН СУДЛАЛЫН ШИНЖИЛГЭЭ**

#### 5.5.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, тэжээлт орчин

- Дулаан тогтоогуур
- Бичил харуур
- Биологийн аюулгүй ажиллагааны кабинет

- Цахилгаан хурилдуур
- Анаэрастат \агааргүй бокс 2.5-3литрийн багтаамжтай\
- Гогцоо шатаагч
- Хөргөгч
- Хуруу шил
- Петрийн аяга
- Нянгийн гогцоо
- Пастерийн дусаагуур
- Хайч
- Хямсаа
- Хамгаалах өмсгөл

*Тэжээлт орчин:*

- Clostridium selective agar (Clostrisel agar)
- Анаэроб цустай агар \витамин К нэмсэн\
- Тиоглюколатын шөл
- Чанасан махтай орчин
- Эндо агар
- Өндөг давстай агар
- РЕВА-фенилэтил цустай агар
- Китт-Тароцци агар
- Уилсона-Блера агар
- API 20A ялган дүйх сорил

#### 5.5.2. Нян судлалын шинжилгээ:

Шинжилгээнд цуглуулсан сорьцыг хатуу ба шингэн тэжээлт орчинд тарина. Сорьцыг аль болох түргэн хугацаанд тэжээлт орчинд суулгац хийх хэрэгтэй. Цустай агарын суулгацыг CO<sub>2</sub>-той дулаан тогтоогуурт өсгөвөрлөнө. Чанасан махтай суулгац хийхдээ пастерийн дусаагуураар сорьцыг соруулан авч тэжээлийн гүнд хий оруулалгүй суулгана. Хатуу тэжээлт орчинд жигд тараан суулгана.

Эд эрхтэнээс нухаж булинга бэлтгэн тэжээлт орчнуудад суулгана. Бүх суулгацуудыг 37<sup>0</sup>С-д агааргүй нөхцөлд 24-72 цаг, 14 хоног хүртэл өсгөвөрлөнө.

*C. tetani*-ийн ургах тохиромжтой рН 7.2-7.4, хэм нь 37<sup>0</sup>С.

#### 5.5.3. Чанарын хяналт

- Тэжээлт орчны үйлдвэрлэгчээс заасан хугацаа
- Тэжээлт орчин бэлтгэсэн хугацаа
- Тэжээлт орчны ариун чанар

#### 5.5.4. Шинжилгээний хариуг дүгнэх:

Хатуу тэжээлт орчны гадаргууд маш жижиг тунгалаг, өнгөгүй, шүүдрийн дусал мэт, заримдаа нүдэнд харагдахгүй, торлог өнгөр мэт, үл мэдэг колони ургаж томорсоор сааралдуу өнгөтэй захаараа тэгш биш, төв хэсэгт гадаргуу нь барзгар мөхлөгсөг болж, зах руугаа утаслаг мэт салаалсан унжлага үүсгэн мөлхөж ургана. Аажимдаа хүрэн шардуу өнгөтэй болно. Шингэн тэжээлт орчинд хий үүсгэж, уураг задарснаас хуршмал, ялзарсан үнэр, аммиак ялгаруулдаг. Хар колони тэжээлийн гүнд ургаж 1-2 хоногийн дараа буурцаг буюу гацуур мод шиг хэлбэртэй хөвсгөр хөвөн байдалтай ургана.

Цустай агарт маш нимгэн өд шиг ургалттай ба жигд тархсан байдаг. Ургалтыг энгийн нүдээр харахад бэрхшээлтэй учир бичил харуураар харна. Шинэхэн цустай агарт задрал өгнө.

Хэрэв ургалттай бол цустай агарын дээгүүр антитоксиноор жигд бүрхээж дараа нь шилжүүлэн суулгалт хийнэ. *C.tetani*-ийн үүсгэх цус задрал антитоксиноор дарангуйлагдана.

Робертсон чанасан махтай орчинд нянгийн ургалт байвал Грамын будгаар будаж шалгана. Өсгөвөрийг *C.tetani* нь уураг задлах идэвхи сул. Өсгөвөрийг 2 хувааж талыг нь 80°C –д 30 минут байлгасны дараа хөргөнө. Халаасан халаагаагүй өсгөвөр тус бүрийг шинэ цустай агар дээр суулгаж анаэроб нөхцөлд ургуулна.

*C. tetani* нь индол эерэг, түүнийг цустай агар дээр антитоксин сорилоор ялгаж болно. Сэжигтэй колониос сонгон авч:

- Наац бэлтгэн грамын аргаар будаж харна.
- Хатуу тэжээлд сэлгүүлэн тарина.
- Цэвэр өсгөвөр гаргана.
- Биохимийн шинжээр ялган дүйнэ /бүдүүвчийг үзнэ үү/.
- API 20A-агааргүйтэн системд дүйнэ.

#### *C. tetani* ялган дүйх бүдүүвч

Хүснэгт 1

Сорил	Хүхэрт устөрөгч	Казеин	Сүгү	Индол	Мальтоз	Нитрат	Уреаза	Хөдөлгөөн	Неомицин, элэгтэй агар
<i>C. tetani</i>	+-	-	+-	+-	-	-	-	+	+

#### **БИОЛОГИЙН ШИНЖИЛГЭЭ**

5.5.5. Шаардлагатай амьтны зүйл:

Цагаан хулгана, усан гахай

5.5.6. Биологийн шинжилгээ:

*Clostridium tetani* нь лабораторийн амьтанд хоруу чанартай. Лабораторийн амьтдаас цагаан хулгана, усан гахайд нэлээд мэдрэг.

Цагаан хулгана, усан гахайн нүдний салстад 1 дуслыг дусаан халдварлуулна. Эсвэл арьсан дор 0.5мл-ээр халдварлуулна. Туршилтын амьтныг кортизоноор мэдрэгжүүлэх нь ач холбогдолтой бөгөөд халдвар хийхээс 4 цагийн өмнө 4-5 мл-ээр булчинд тарина. Халдвар хийсэн амьтныг 6 хоног хүртэл хугацаагаар ажиглана.

#### **Татрангийн хор тодорхойлох сорил**

Шинжлэх материалыг ариун шил сав, нухуурт нухаж, нэгэн жигдийн булинга болгоод шүүнэ. Шүүгдсэн шингэнээс 0,5 мл-ийг цагаан хулганы сүүлний доод вен, эсвэл гуяны булчинд тарина.

#### **Сорилын үр дүн:**

Сорил эерэг тохиолдолд 18 цагаас 24 цагийн дараа хулганы үс босч, сүүл нь бага зэрэг эргэж, хэт мэдрэг, хөдөлгөөн нь ихэссэн, хойт хоёр хөлийн булчин хатуурч, цаашид бүх мөчний булчин хөшиж ар тийшээ гэдийж, нуруугаараа хотойн нумлана. Гэдсээр нь эргүүлж тавихад нумалсан хэвээр байна. Сөрөг үед ийм шинж илрэхгүй.

5.5.7. Чанарын хяналт

Туршилтын амьтан эрүүл байх

5.5.8. Шинжилгээний хариуг дүгнэх



Ажиглалтын хугацаа дууссан эсвэл амьтныг үхсний дараа бүх эрхтэнээс бичил харах, нян судлалын шинжилгээ хийнэ. Амь сорьцын амьтан хоолонд дүргүй болж, хөдөлгөөн муудаж, таталт өгөн, 2-оос 6 хоногт амьтан үхнэ.

#### 5.6. МОЛЕКУЛ БИОЛОГИЙН ШИНЖИЛГЭЭ

##### 5.7.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл, урвалж бодис, праймер

- Биоаюулгүй ажиллагааны 2-р зэрэглэлийн кабинет
- Холигч
- Бичил хурилдуур
- ПГУ-ын олшруулагч машин
- Хүчдэл тохируулагч
- Электрофорезийн аппарат
- Гель хайлуулагч
- Электрон жин
- ПГУ-ын үр дүнг хэт ягаан туяаны тусламжтайгаар дүрслэн харж дүгнэх систем
- Эппендорфийн хуруу шил /1,5-2 мл, 0,2 мл, 0,5мл/
- Эппендорфийн хуруу шилний тавиур
- Автомат дусаагуур /20-200мкл, 1000мкл, 0,5-10мкл, 2-20мкл/
- Шүүлтүүртэй ариун хошуу
- Шилний маркер үзэг
- Урвалж: ДНХ ялгах ажиллагаанд: Задлагч уусмал (нэрмэл ус, Трис, Твин 20, протейназа К, лизоцим, ЭДТА), фенолхлорформ, 96% , 70% этилийн спирт, давхар нэрсэн ус
- ПГУ-д: ПГУ-ын цомог, өвөрмөц праймер, ионгүйжүүлсэн ус, ДНХ-ийн молекул жингийн маркер (хүснэгт 2)

#### C. tetani үүсгэгчийн ДНХ илрүүлэх өвөрмөц праймерийн дараалал

Хүснэгт 1

Бай ген	Праймерын нэр	Праймерийн дараалал 5'..... 3'	Молекул жин (bp)
	<i>Clostridium tetani</i> тодорхойлох		
tetX gene	tet-F	CTGGAT TGT TGG GTT GAT AAT G	1354bp
	tet-R	ATT TGT CCATCC TTC ATC TGT AGG	

Агарозын гель электрофорезэд: Трис-боратын буфер pH=8.3 (5xTBE) (89 mM Трис, 89 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2mM ЭДТА), 1xTBE (5x буфер 100 мл, нэрсэн ус 400 мл), 1.5% агароз гель, этидиум бромидын 0,001%-ийн уусмал (250 мл нэрсэн усанд 2,5 мг этидиум бромид)

##### 5.7.2. Молекул биологийн шинжилгээ

ДНХ ялгах:

Фенол хлороформын аргаар ДНХ ялгах:

- Задлагч уусмалаа бэлтгэж (5мл ариун нэрмэлд: трис 30мг, ЭДТА 15мг, твин 20 15мкл, протейназа К 15мкл, лизоцим 10мг), 37°-д 30 мин тавьна.

- Сорьцноос 100 мкл-ийг авч эппендорфийн хуруу шилэнд хийж, 100 хэмийн усан баннд 15 минут тавьж идэвхигүйжүүлнэ
- Сорьцийг усан баннаас гаргаад дээр нь 100 мкл задлагч уусмал нэмж 37°С хэмд 1 цаг тавина
- Задлагч уусмал нэмсэн сорьцон дээр 200 мкл фенол: хлорформ (1:1) нэмж сайтар холиод 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулна
- Дээд шингэнийг соруулан авч, хаяг бүхий шинэ хуруу шилэнд хийж, 2 эзэлхүүн 96% спирт нэмээд -20°С 1 цаг тавина
- 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана.
- 70%-ийн этилийн спирт нэмж 14000 эрг.мин хурдаар 10 мин хурилдуулаад дээд шингэнийг асгана
- 60° С хэмд 15 мин тавьж спиртийг ууршуулна.
- Хатаасан ДНХ-г ойролцоогоор 30 мкл нэрмэл усаар шингэлж авна.

*ДНХ ялгах цомог ашиглан ДНХ ялгах:*

Цус, эдээс ДНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан сорьцноос ДНХ ялгаж болох ба үйлдвэрлэгчийн дагалдуулсан зааврын дагуу ялгана.

*ПГУ тавих:*

ПГУ-ын холимгийг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу бэлтгэнэ. *Clostridium tetani* тодорхойлох ПГУ-ыг **tet-F/tet-R** праймераар: 95° хэмд 10 минут, 25 цикл (94° хэмд 60 сек, 52° хэмд 60 сек, 72° хэмд 90 сек), 72° хэмд 3 минутаар гүйцэтгэнэ.

*Гель электрофорез тавих:*

1.5%-ийн агароз гель бэлтгэж, 1µg/ml этидиум бромид нэмж электрофорезийн аппаратанд цутган зохих саамаа байрлуулж царцаана.

ПГУ бүтээгдэхүүн тус бүрээс 8-10 мкл соруулан авч, 3 мкл хүндрүүлэгч уусмалтай холин 1,5%-ийн агарозийн гелийн үүрэнд хийнэ. 100х.н ДНХ стандарт жишигчээс 8мкл соруулан гелийн нөгөө үүрэнд хийнэ. 1х Трис-боратын буфер ашиглан 100 вольт хүчдэлээр 30 минут электрофорез тавина.

5.7.3. Чанарын хяналт:

- Эерэг хяналтанд листериоз өвчний үүсгэгчийн ДНХ-ийг авна.
- Сөрөг хяналтанд ариун нэрмэл ус юмуу ТВЕ буфер авна.
- Урвалж, оношлуур, праймерын хадгалалтын горимыг чанд мөрдөх ба праймер, урвалж бодисын хүчинтэй хугацаанд байнга хяналт тавьна.

5.7.4. Шинжилгээний үр дүнг дүгнэх

Электрофорез дууссаны дараа гель детекцийн аппарат DijiDoc-It Image System ашиглан үр дүнг авна. *C. tetani* тодорхойлох урвалын эерэг хяналт болон *C. tetani* бүхий дээжинд 1354bp бүхий толбо үүсэх ба сөрөг хяналтанд толбо үүсэхгүй.

## Хавсралт

1. Лабораторийн шинжилгээний гарын авлага. 2003 он
2. Байгалийн голомтот халдварт өвчний лабораторийн оношлогооны протокол. 2010 он
3. Handbook of Microbiological Media 4<sup>th</sup> edition. 2010 Ronald.M.Atlas
4. Development Biology Protocols Volume 2, Rocky.S Tuan
5. Molecular Characterization of *Clostridium tetani* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Colony PCR. Lucile Plourde-Owobi et al. ASM journal 2005.71(9):5064
6. Lucile Plourde-Owobi., Delphine Seguin., Marie-Anne Baudin., Catherine Moste and Bachra Rokbi. Molecular Characterization of *Clostridium tetani* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Colony PCR //APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 2005, p. 5604–5606



**КРЫМ КОНГИЙН ЦУСАРХАГ ЧИЧРЭГ ӨВЧНИЙ ЛАБОРАТОРИЙН  
ШИНЖИЛГЭЭНИЙ СТАНДАРТ АЖЛЫН ЗААВАР**

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Крым Конгийн цусархаг чичрэг өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 16
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- А98.5	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил
Зориулалт: Крым Конгийн цусархаг чичрэг өвчний оношлогоонд	
Хэрэглэх хүрээ: Крым Конгийн цусархаг чичрэг өвчний шинжилгээ, оношлогоо, судалгааны лабораториуд	
Боловсруулсан: Б. Байгалмаа, Х.Тунгалаг Огноо: 2015 он	Баталсан, зөвшөөрсөн актын дугаар: ЗӨСҮТөвийн захирлын А/44 тоот тушаалын арван нэгдүгээр хавсралт Огноо: 2015.06.25
Хэвлүүлсэн: Мэргэжлийн тусламжын алба, Лавлагаа лабораторийн тасаг	

<b>Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв</b>	
Нэр: Крым Конгийн цусархаг чичрэг өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 16
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- А98.5	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил

**1. Зорилго, зарчим**

Крым Конгийн цусархаг чичрэг (ККЦЧ) өвчний үүсгэгчийг лабораторийн шинжилгээгээр тодорхойлж, эмнэлзүйн оношийг баталгаажуулахад оршино.

**2. Хамрах хүрээ**

Эмнэлзүйн сорьц, байгалийн голомтын хяналт, тандалтын шинжилгээ хийх эрх бүхий зооноз өвчин судлалын төвийн вирус судлалын BSL 2, BSL 3-р зэргийн лабораторит мөрдөгдөнө

**3. Тодорхойлолт**

Крым Конгийн цусархаг чичрэг (ККЦЧ) өвчний үүсгэгч нь *Bunyaviridae Nairovirus* нь бөмбөлөг хэлбэртэй, 80-120нм хэмжээтэй, PHX полимераз хамааралт L, гликопротеин (GN, GC) бүхий M, nucleocapsid (N) уураг бүхий S гэсэн дан гинжилсэн сегментэт 3 нуклеокапсид бүхий сөрөг PHX агуулсан вирус юм. L сегмент 6.8 - 12 kb, M 3.2 - 4.9 kb, S сегмент нь 1-3 kb, кодлогддоггүй 6 уурагаас тогтоно. Физик, хими бодисд – 7 хоног, тасалгааны хэмд 72 цаг, UV гэрэл – 15 мин, хлорформ, спирт, риванол, формалин, 30% эфирт тэсвэргүй. 1% гипохлорид, 2% глутаральдегид уусмалаар халдваргүйтгэл хийх ба 56 °C-д 30 минут идэвхигүйждэг.

**4. Сорьц цуглуулах хадгалах, тээвэрлэх**

4.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, тэжээлт орчин

- -18 - 20 °C зөөврийн хөргөгч
- Сорьц зөөвөрлөх сав
- Мөсөн элемент, хуурай мөс
- Дюар шингэн азот (10 – 20 л )
- Хурилдуур 1000-5000 эрг/мин
- Ариун сав (50, 80 мл)
- Вакуум хуруу шил (5-10 мл)
- Эппиндорфийн хуруу шил / 1.5-2.0мл/
- Автомат дусаагуур /100-1000, 20-200, 10-100мкл/
- Автомат дусаагуурын нэг удаагийн хошуу /20-200мкл, 200-1000мкл /
- Шилний харандаа
- Хайч
- Хямсаа
- Спиртэн дэн
- Ариутгасан хөвөн
- Чангалуур
- Шархны лент
- Этилийн спирт - 70%
- Вирконы уусмал 1%

4.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл

- Хүний эмнэл зүйн сорьц, хачиг үе хөлтнөөс дээжилсэн шинжлэгдэхүүнийг II зэрэглэлийн биологийн аюулгүйн кабинетэд шинжилнэ.
- Вирус өсгөвөрлөх, туршилтын амьтан, дамжуулагчийн судалгааг III зэрэглэлийн биологийн аюулгүйн кабинетэд гүйцэтгэнэ.
- Лабораторийн ажилтнууд тусгай хамгаалалтын хувцас (халат, малгай, хулдаасан хормогч, нүдний шил, бээлий, N95 амны хаалт) өмсөх шаардлагатай.
- Ажилласан талбай болон бохирдсон зүйлийг халдваргүйтгэх бодисоор /Этанол 70%, Виркон, Хлор агуулсан халдваргүйтэлийн уусмал/ арчиж цэвэрлэх
- Лабораторит орохыг зөвхөн төлөвлөгөөт ажлаа гүйцэтгэгч болон түүнд гардан туслах хүмүүст зөвшөөрөх

#### 4.3 Шинжлэх сорьцын төрөл

Сорьцын төрөл	Сорьц авах хугацаа	Хэмжээ
Өвчтөний цус	Шинж тэмдэг эхэлснээс 7-14 хоногт	5-8 мл
Өвчтөний цусны ийлдэс		2 мл
Өвчтөн нас барсан тохиолдолд тархи, элэг, дэлүү, зүрх, уушиг, бөөр, ясны чөмөг	Хугацаа хамаарахгүй	Эрхтний хэрчим 3x3-5x5см
Байгалийн голомтоос хачиг		>1000
Өвчтөний цус, ийлдэс (хос ийлдэс)	эдгэрэх үе >15 хоног	1-2.0 мл

##### 4.3.1 Сорьцод боловсруулалт хийх

Оношлуурын зааварт заагдсны дагуу шинжлэх сорьцонд боловсруулалт хийгдэнэ.

- Улаан эсийн задрал болсон, липид ихтэй, олон удаа хөлдөөж гэсгээсэн ийлдсийг шинжлэхгүй
- Цусны ийлдэс аль болохоор шинэхэн байх ба 2-8 °C-д 5 хоног хадгалсан эсвэл -20 °C-д 2 сараас дээшгүй хугацаагаар хадгалсан байх
- Тунадас агуулсан ийлдэс буруу үр дүн өгч болох тул шинжлэхийн өмнө 1500-2000 мянга эр/мин-ын хурдаар 5-10 минут хурилдуурдах

*Эмнэлзүйн сорьцийг эсд халдаахад бэлтгэх:*

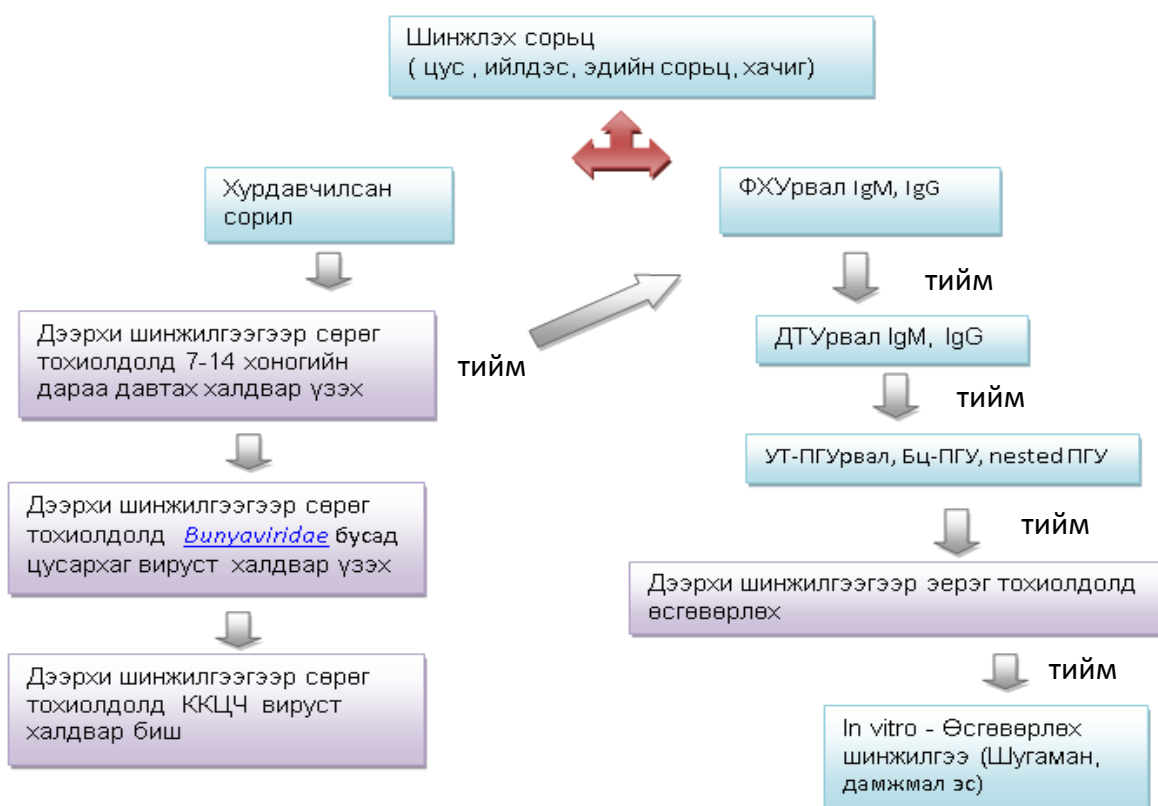
ККЦЧ өвчний сэжигтэй нас барсан хүний эд эрхтнээс авсан сорьц (тархи, элэг, дэлүү, зүрх, уушиг, бөөр, чөмөг), тандалт судалгаагаар цуглуулсан хачиг зэрэг сорьцонд боловсруулалт хийнэ. Үүнд:

- Эд эрхтний сорьцыг задлахын тулд шилэн бөмбөлөг бүхий тубанд хийж сайтар холино.
- 1мл/0,1мл-ээр тооцон гентамицин нэмнэ.
- 10000 эрг/мин 5-10минут хурилдуурдан тундасны дээд хэсгээс авч халдаана.
- Үлдсэн хэсгийг 2 эппендорфийн хуруу шилэнд хийж, хаяглан -80°C –д хадгална.

##### 4.3.2 Сорьц хадгалах, тээвэрлэх

- ККЦЧ өвчний сэжиг бүхий сорьцыг 24 цаг дотор 2-8 °С, 2 сар -20°С, 3 сараас дээш хадгалах тохиолдолд -70 °С-д эсвэл шингэн азот бүхий дюарт хадгална.
- Тархвар судлалын холбогдлоор цуглуулсан хачигийг амьд, үхсэнээр нь ялган амьд тохиолдолд уламжлалт аргаар марльд ороох эсвэл 10-50 мл –ийн тубанд чийглэг үүсгэн хийх бөгөөд тубены таганд агаар оруулах зорилгоор нүхэлж -2-4 °С хэмд 3 сар хүртэл хугацаатай хадгална. Хадаглалтын явцад чийг өгөх шаардлагатай.
- Сорьцыг тээвэрлэхдээ гурван суурьт савлалтын системийг баримтлан тээвэрлэнэ.

## 5. Шинжилгээний аргачлал



### 5.1 Шинжилгээний төрөл, арга

Шинжилгээний төрөл	Шинжилгээний арга	Шинжлэх сорьц
Өвчтөний сорьц		
Вирус өсгөвөрлөх, ийлдэс хүрээг ялгах	- Эсэд өсгөвөрлөх	Цус, тархи, элэг, дэлүү, зүрх, уушиг, бөөр, ясны чөмөг

Өвөрмөц илрүүлэх	ДНХ	- Полимеразын гинжин урвал	
Эсрэгтөрөгч илрүүлэх		- Фермент холбоот урвал - Хурдавчилсан сорил	
Эсрэгбие (IgM,G) илрүүлэх		- Фермент холбоот урвал - Дархан туяаралт урвал - Хурдавчилсан сорил - Цус наалдалтыг саатуулах урвал	Ийлдэс
<b>Тархвар судлалын холбогдол бүхий сорьц</b>			
Өвөрмөц илрүүлэх	ДНХ	- Полимеразын гинжин урвал	Хачиг
Вирус өсгөвөрлөх		- Эсэд өсгөвөрлөх	
Эсрэгтөрөгч илрүүлэх		- Фермент холбоот урвал - Хурдавчилсан сорил	

### 5.2 Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл

- Хурдавчилсан сорил – ЗӨСҮТөв, аймаг, нийслэлийн ЗӨСТөвүүд (**BSL 2**)
- Ийлдэс судлал (ФХУ, ДТУ, Иммуноблотинг) – ЗӨСҮТөв, аймаг, нийслэлийн ЗӨСТөвүүд (**BSL 2**)
- Молекул биологи (УТ-ПГУ, ПГУ) - ЗӨСҮТөв (**BSL 2**)

### 5.3 Вирус өсгөвөрлөх (in vivo, in vitro) - ЗӨСҮТөв (**BSL 3**) Ийлдэс судлалын шинжилгээний заавар:

#### 5.3.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, оношлуур

- БАК II А
- ELISA уншигч
- Дархан туяаралт бичил харуур
- Холигч /Vortex/
- Дулаан тогтоогуур 37 °C/±3°C/
- Хурилдуур 1000-5000 эрг/мин
- Автомат дусаагуур 100-1000, 20-200, 2-20 мкл
- Олон сувагт автомат дусаагуур /8-12сувагтай/
- Автомат дусаагуурын нэг удаагийн хошуу /2-20мкл, 20-200мкл, 200-1000мкл/
- 20, 250, 1000мл хэмжүүр бүхий шилэн сав
- Бүрхүүл шил
- Завь



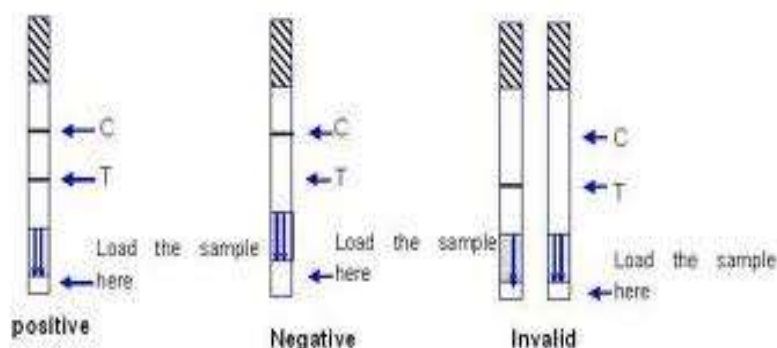
- Anti Crimean Congo Virus Rapid test (вирус Eurasia төрлийн эсрэгтөрөгч бичил хавтангийн үүрэнд суулгасан)
- Anti Crimean Congo Virus ELISA (Eurasia) IgM, IgG
- IIFT Crimean Congo viruses Mosaic 1' /IgM, IgG/
- Фосфатийн буферийн уусмал pH-7,2
- Нэрмэл ус /давхар нэрсэн, ионгүйжүүлсэн, ариун/
- Шүүгч цаас
- Цаг
- Вирконы уусмал 1%
- Этилийн спирт - 70%

### 5.3.2. Хурдавчилсан сорил:

Оношлуурын зааврын дагуу хэрэглэнэ.

Сорилын үр дүн:

Үр дүнг 20-25 минутын дараа дүгнэнэ.



### 5.3.3. Фермент холбоот урвал /ФХУ/

Крым Конгийн цусархаг чичрэг өвчний халдварын сэжигтэй хүний ийлдсэнд IgM, IgG илрүүлэх зориулалтай цомгийг зааврын дагуу хэрэглэнэ.

Шинжлэх ийлдсийг оношлуурын зааварт заасны дагуу урьдчилан шингэлэн бэлэн болгоно.

Урвалын үр дүн:

Урвалын дүнг спектофотометрийн долгионы 450 нм урт дээр Гэрлийн хугарлын нягт /ГХН/-ыг хэмжиж тодорхойлно. Тухайн цомгийн зааврын дагуу тооцож дүгнэнэ.

$$\text{/Ratio /} = \text{Сорьц ГХН / Cal 2 ГХН}$$

Харьцуулсан үзүүлэлт (Ratio)	Дүн
< 0.8	сөрөг
≥ 0.8 < 1.1	эргэлзээтэй
≥ 1.1	ээрэг

*Чанарын хяналт*

Сөрөг (K<sup>-</sup>) шалгуурын үзүүлэлт 0,8 о.е-ээс ихгүй

Эерэг (K<sup>+</sup>) шалгуурын үзүүлэлт 1.5-3.0 их үед л урвалын дүнг тооцно.

### 5.3.4. Дархан туяарах урвал /ДТУ/

Крым Конгийн цусархаг чичрэг өвчний халдварын сэжигтэй хүний ийлдсийг шинжлэх зориулалттай ДТУ-ын цомгийг зааврын дагуу хэрэглэж дүгнэнэ.

**Бэлтгэл ажил :**

Урвалын самбараа шалга: Самбарын гадна тал ус нэвчсэн болон гоожсон эсэхийг шалгаад, хэрэв норсон бол чийгтэй алчуур болон угаалгийн нунтаг бүхий уусмалаар арчин халдваргүйтгэх хэрэгтэй. Тусдаа салангид уутанд байгаа хавтанг тасалгаанд байлгасаны дараа нээнэ. Бичил хавтанд хүрч болохгүй. Бичил хавтан дээрхи тэмдэглэгдсэн талбай нь маш мэдрэг тул онцгой анхаарч, сэвтээхээс болгоомжил. Тэмдэглэгээг шилний харандаагаар хийнэ.

**Шингэлэлт:**

Оношлуурын зааврын дагуу шинжлэх дээж болон оношлуурыг шингэлнэ. Оношлуур нэг бүрд эерэг болон сөрөг хяналтын багтаасан байдаг. Хяналтын ийлдсээ хэрэглэхээс өмнө сайн сэгсэрнэ.



Шингэлсэн ийлдсээ бичил хавтангийн талбайд дусаахдаа хийн бөмбөлөг үүсгэхгүй байх. Дээж нэг бүрийг автомат дусаагуур хэрэглэн дусаана.

Автомат дусаагуурын хэмжээ:

10 µl (3 x 3 mm талбайд)

25 µl (5 x 5 mm талбайд)

70 µl (7 x 9 mm талбайд)

Бичил хавтанг чийглэг талбай үүсгэн тавиур шилэн дээр тавьж өрөөний хэмд 30 минут өсгөвөрлөнө. Бичил хавтанд буй шинжлэгдэхүүн тус бүр холилдохоос зайлсхийн болгоомжтой ажиллана.

**Угаалга:**

Бичил хавтанг Твинтэй ФБУусмалаар зайлсны дараа ариун завь бүхий Твинтэй ФБУусмалд 5 минут байлган цаг болмогц авч зориулалтын шүүгч цаасыг болгоомжтой тавьж хавтангийн зах ирмэгийн шингэнийг уусган авах ба гол талбайд хүрэхээс зайлсхийнэ.

Хуурайшсан бичил хавтангийн үүр бүрд Конъюгат /fluorescein-labelled anti-human immunoglobulin / уусмалыг зааврын дагуу шингэлэн дусаан өрөөний хэмд 30 минут тавина.

Угаалт:

Бичил хавтанг Твинтэй ФБУУсмалаар зайлсны дараа ариун завь бүхий Твинтэй ФБУУсмалд 5 минут байлган цаг болмогц авч хуурайшуулна. Зориулалтын шүүгч цаасыг болгоомжтой тавьж хавтангийн зах ирмэгийн шингэнийг уусган авах ба гол талбайд хүрэхээс зайлсхийнэ.

Нэг дусал Дако эсвэл Глицерол дусаан дээр нь бүрхүүл шил тавина. Бүрхүүл шилийг бичил хавтангийн гадаргатай хүрэлцүүлэн тавих, зах ирмэгийг тэнцүүлэн тавина.

**Чанарын хяналт:**

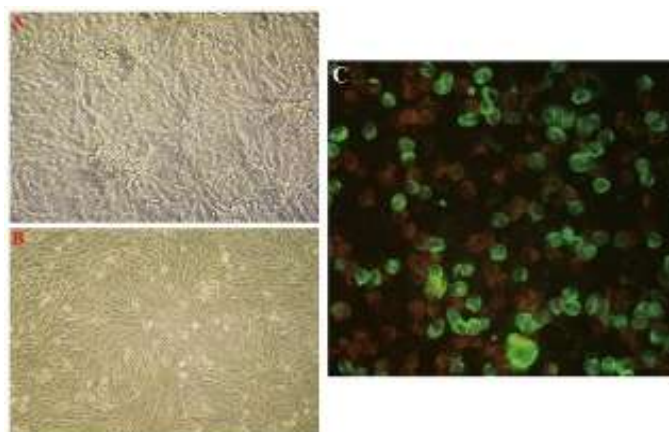
Оношлуур урвалжийн хадгалалтын горимыг чанд мөрдөнө. Урвалж бодисын хүчинтэй хугацаанд хяналт тавина.

Субстрат	Сорьц шингэлэлт		Үнэлгээ	
	Стандарт	Зөвлөсөн	Сөрөг	Эерэг
IgM, IgG	1:10	1:10	Гэрэлтэх эрчим /-/	Гэрэлтэх эрчим сул, хүчтэй

**Шинжилгээний хариуг дүгнэх**

Иммунофлуоресцентийн 40X объективаар харж гэрэлтэлтийн эрчмээр дүгнэнэ.\Зураг 1\

	Гэрэлтэх эрчим				Эсрэгбиеийн
	1:10	1:100	1:1000	1:10000	таньц
Сул	-	-	-	-	1:10
Дунд	-	-	-	-	1:32
Хүчтэй	Сул	-	-	-	1:100
Хүчтэй	Дунд	-	-	-	1:320
Хүчтэй	Хүчтэй	Сул	-	-	1:1000
Хүчтэй	Хүчтэй	Дунд	-	-	1:3200
Хүчтэй	Хүчтэй	Хүчтэй	Сул	-	1:10000



Зураг 1

#### 5.4. Молекул-биологийн шинжилгээ:

5.4.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл, урвалж бодис

**Тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл:** Биоаюулгүйн 2-р зэрэглэлийн кабинет, ПГУ-ын олшруулагч машин, дулаан тогтоогуур, бичил хурилдуур, хүчдэл тохируулагч, электрофорезийн аппарат, холигч, гель хайлуулагч, электрон жин, ПГУ-ын үр дүнг хэт ягаан туяаны тусламжтайгаар дүрслэн харж дүгнэх систем, -20-70°C гүн хөлдөөгч, лабораторийн цаг, нэг удаагийн бээлий, эппендорфийн хуруу шил (1,5-2 мл, 0,2 мл, 0,5мл), эппендорфийн хуруу шилний тавиур, автомат дусаагуур, фильтртэй ариун хошуу (20-200мкл, 1000мкл, 0,5-10мкл, 2-20мкл), 100мл, 250мл, 500мл, 1000мл хэмжүүр бүхий шилэн сав, шилний харандаа, хаягдал хийх сав

**Урвалж: РНХ ялгах ажиллагаанд:** Trizol урвалж, изоамилийн спирт, фосфатийн буферийн уусмал pH=7.2, нэрмэл ус (давхар нэрсэн, ионгүйжүүлсэн, ариун), 96%, 70% этилийн спирт, фирмийн цомгийн бүрэлдэхүүн (QIA amp Viral RNA Mini Kit, түүнтэй адилтгах цомог), хуурай мөс

**УТ-ПГУ-д:** УТ-ПГУ-ын цомгийн бүрэлдэхүүн, өвөрмөц праймерууд (хүснэгт 1), ионгүйжүүлсэн ус, ДНХ-ийн молекул жишигч

ККЦЧ өвчний үүсгэгчийн РНХ илрүүлэх өвөрмөц праймерийн дараалал

Хүснэгт 1

Бай ген	Праймерын нэр	Праймерийн дараалал 5'..... 3'	Молеку л жин (bp)
S segment	CCHF-F2	TGG ACA CCT TCA CAA ACT C	536
	CCHF-F2C	TGG ATA CTT TCA CAA ACT C	
	CCHF-R3	GAC AAA TTC CCT GCA CCA	
	CCHF-F3	GAA TGT GCA TGG GTT AGC TC	260
	CCHF-F3C	GAA TGT GCA TGG GTT AGC TC	
	CCHF-R2	GAC ATC ACA ATT TCA CCA GG	
	CCHF-R2C	GAC ATT ACA ATT TCG CCA GG	

**Агарозын гель электрофорезэд:** Трис-боратын буфер pH=8.3 (5xTBE) (89 mM Трис, 89 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2mM ЭДТА), 1xTBE (5x буфер 100 мл, нэрсэн ус 400 мл), 1.5% агароз гель, этидиум бромидын 0,001%-ийн уусмал (250 мл нэрсэн усанд 2,5 мг этидиум бромид)

5.4.2. Молекул биологийн шинжилгээ:

**РНХ ялгах:**

**TRizol ашиглан РНХ ялгах:**

Дээжинд боловсруулат хийнэ. Эд: 1мл TRIZOL урвалжинд 50-100МБТ эд авч нухна. Шинжлэгдэхүүний хэмжээ TRIZOL урвалжийн 10%-иас хэтрэхгүй байх ёстой. **Нэг давхрагат эсийн ургалт:** Нэг давхаргат эсийг хөргөсөн PBS-ээр угаана. Эсийн өсгөврийн саванд савны 3.5см диаметр бүрт 1мл TRIZOL урвалж нэмж, эс хусагчаар хусна. Эсийн лизатыг дусаагуураар хэд хэдэн сайтар удаа холино. **Суслензэд өсгөвөрлөсөн эс:** Эсийн өсгөврийг хурилдуурдана. Шингэн

орчныг асгаж, хөргөсөн ФБУ-д булингальна. 300 эрг/мин хурдаар 5 минут хурилдуурдаж, эсийг тунгаана.  $5-10 \times 10^6$  эс бүрт 1 мл TRIZOL урвалж нэмнэ.

*Ажилбар:* TRIZOL урвалжинд гомогиназ болгосон дээжнүүдийг нуклей уургууд бүрэн задартал өрөөний хэмд 5 минут байлгана. Эсийн задарсан хэсгийг хурилдуурдаж тунгаана. Супернатантыг шинэ хуруу шилэнд зөөж хийнэ.

1мл TRIZOL урвалжинд 0.2мл хлорформ тооцож нэмнэ. Дээжний тагийг сайтар таглаад 15 секунд холиод өрөөний хэмд 2-3 минут байлгана. 2-8°C-д 12000 эрг/мин-аас ихгүй хурдаар 15 минут хурилдуурдана. Хурилдуурдсаны дараа доод хэсэгт фенол:хлорформ бүхий улаан давхрага, дээд хэсэгт өнгөгүй усан давхрага үүснэ. РНХ нь зөвхөн өнгөгүй усан хэсэгт үлддэг тул энэ хэсгийг маш болгоомжтой соруулан авч, хаяг бүхий шинэ хуруу шилэнд хийнэ.

Соруулж авсан шингэнийг хэмжих ба энэ нь гомогиназ хийсэн TRIZOL урвалжийн 60 орчим хувь нь байдаг. Изопропил спирт ашиглан усан шингэнээс РНХ-г тунадасжуулдаг. 1мл TRIZOL урвалж бүрт 0.5мл изопропил спирт нэмж, 15-30°C-д 10 минут байлгаж, 2-4°C-д 12000 эрг/мин-аас ихгүй хурдаар 10 минут хурилдуурдана. Тунадасжуулсан РНХ нь хуруу шилний ёроол болон хананд харагдахгүй.

Хурилдуурдсан супернатантыг бүрэн асгана. РНХ-ийн мөхлөгийг 1мл TRIZOL урвалж бүрт 1мл 75%-ийн этанол нэмж нэг удаа угаана. Дээжийг холигчоор холиж, 2-8°C-д 7500 эрг/мин-аас ихгүй хурдаар 5 минут хурилдуурдана. Дээрх угаалтыг дахин нэг удаа давтах ба үлдэгдэл этанолыг бүгдийг асгана.

РНХ-ийн мөхлөгийг 5-10 минут агаарт юмуу вакуумдан хатаана. РНХ-г DEPC усанд уусгана.

39 мкл DEPC усанд 1 мкл РНХ уусгаж (1:40), спектрофотометрийн анализ хийнэ. 10 мкл-ийн микрокувет хэрэглэж буй үед, 260, 280 нм-т 1 OD тавина.  $A_{260}/A_{280}$  үнэлгээ нь 1.6-аас дээш байх ёстой.

*РНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан РНХ ялгах:*

Цус, эдээс РНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан сорьцноос РНХ ялгаж болох ба үйлдвэрлэгчийн дагалдуулсан зааврын дагуу ялгана.

*УТ-ПГУ тавих:*

Хоёр болон нэг алхамт УТ-ПГУ-ын холимгийг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу бэлтгэнэ. ККЦЧ өвчний үүсгэгчийн РНХ тодорхойлох УТ-ПГУ-ыг **CCHF-F2/CCHF-F2C/CCHF-R3** *праймераар:* 42° хэмд 30 минут, 94° хэмд 5 минут, 5 цикл (94° хэмд 30 сек, 37° хэмд 30 сек, 72° хэмд 30 сек), 72° хэмд 2 минут, 30 цикл (94° хэмд 30 сек, 52° хэмд 30 сек, 72° хэмд 30 сек), 72° хэмд 5 минутаар гүйцэтгэнэ. ККЦЧ өвчний үүсгэгчийн РНХ тодорхойлох үүрэн ПГУ-ыг **CCHF-F3/F3C; CCHF-R2/R2C** *праймераар:* 94° хэмд 5 минут, 30 цикл (94° хэмд 30 сек, 52° хэмд 30 сек, 72° хэмд 30 сек), 72° хэмд 5 минутаар гүйцэтгэнэ.

*Гель электрофорез тавих:*

1.5%-ийн агароз гель бэлтгэж, 1µg/ml этидиум бромид нэмж электрофорезийн аппаратанд цутган зохих саамаа байрлуулж царцаана.

УТ-ПГУ бүтээгдэхүүн тус бүрээс 8-10 мкл соруулан авч, 3 мкл хүндрүүлэгч уусмалтай холин 1,5%-ийн агарозийн гелийн үүрэнд хийнэ. 100х.н ДНХ стандарт жишигчээс 8мкл соруулан гелийн нөгөө үүрэнд хийнэ. 1х Трис-боратын буфер ашиглан 100 вольт хүчдэлээр 30 минут электрофорез тавина.

#### 5.4.3. Оношилгооны хариуг дүгнэх:

Электрофорез дууссаны дараа гель детекцийн аппарат DijiDoc-It Image System ашиглан үр дүнг авна. ККЦЧ өвчний үүсгэгчийн S сегмент тодорхойлох урвалаар эерэг хяналт болон эерэг дээжинд 536bp болон 260bp хэмжээ бүхий толбо үүсэх ба сөрөг хяналтанд толбо үүсэхгүй.

#### 5.4.5. Чанарын хяналт:

- Эерэг хяналтанд ККЧХ өвчний үүсгэгчийн РНХ-ийг авна.
- Сөрөг хяналтанд нуклейн хүчил ялгах, Мастер микс бэлтгэх, ПГУ-ын өрөө тус бүрээсариун нэрмэл ус юмуу TBE буфер авна.
- Олон улсын стандартад нийцсэн ISO-9001 сертификаттай бүтээгдэхүүнийг сонгож хэрэглэнэ.
- Урвалж, оношлуур, праймерын хадгалалтын горимыг чанд мөрдөх ба праймер, урвалж бодисын хүчинтэй хугацаанд байнга хяналт тавьна.

#### 5.5. Вирус өсгөвөрлөх шинжилгээ

ККЧичрэг өвчний сэжигтэй болон эерэг дүн өгсөн шинжлэгдэхүүнийг эсийн өсгөөрт халдаан эс эмгэгшүүлэн, ДТУ, УТ-ПГУрвалаар таньцыг шалган, 2-3 удаа зорчуулан таньц өссөн үед вирүст материалыг хураан авна. Вирус өсгөвөрлөх шинжилгээний давуу тал нь вирүсийн эсрэгтөрөгчийн болон генетикийн хэв шинжийг тодорхойлох, шаардлагатай үед эмэнд мэдрэг чанарыг үнэлэх боломжийг олгодог. ККЧичрэг өвчний вирүс нь сонгомлоор ВНК 21 (baby hamster kidney) эсд үржин олшрох чадвартайг харгалзан уг эсд өсгөвөрлөдөг.

##### 5.5.1 *Шаардлагатай, тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, тэжээлт орчин:*

- Биоаюулгүйн кабинет II
- -20-80°C гүн хөлдөөгч
- Лабоаторийн хөргөгч
- Термостат /CO<sub>2</sub> 5%/
- Хурилдуур 5000-10000 эрг/мин
- Инверт микроскоп
- Вакуум соруур
- Усан банн
- Dulbecco's modified Eagle medium
- 2% үхрийн хээлийн ийлдэс (2% heat-inactivated fetal calf serum-FCS)
- Трипсин-ЭДТА
- ТРСК- трипсин
- 100 mg penicillin, streptomycin /1 ml
- Фосфатын буферийн уусмал ариун 500мл
- Дусаагуур 1-20мл
- Т-25см<sup>2</sup>, Т-75см<sup>2</sup> хэмжээтэй эсийн өсгөврийн сав /Фласк /
- Автомат дусаагуур /25-50мл /
- Автомат дусаагуур /8-12 сувагтай/
- Автомат дусаагуур 10-100мкл
- Ариун хошуу 10-100мкл
- Ариун завь
- Маркер
- Этанол 70°C
- Вирконы уусмал 1%

### 5.5.2 Эс өсгөвөрлөх шинжилгээ

Шинжилгээний явц:

T-25см<sup>2</sup> фласканд ойролцоогоор 10<sup>7</sup> буюу харах талбайд ВНК 21 эсийн ургалт 80-85% байх

- Эсийн тэжээлийг асгаад, 2-4 мл фосфатын буферийн уусмалаар 2 дахин зайлна.
- 5 мл Трипсин-ЭДТА хийж шугаман эсийн дээгүүр зөөлөн бүрхээж зайлаад дусаагуураар соруулан авна.
- Дахин 1 мл Трипсин-ЭДТА хийгээд 37 °С термостатанд 10-20 минут байлгана.
- Эсийг салгахын тулд фласкийг зайлах буюу зөөлөн цохиж болно.
- Трипсинийг саармагжуулахын тулд 1 мл үхрийн хээлийн ийлдэс нэмнэ.
- Эсийн өсгөврийн тэжээл 8 мл-ийг нэмж дусаагуураар соруулж гаргах маягаар эсийг нэг нэгээр нь салгаж суспенз бэлтгэнэ.
- 10л цийдмэгийг 10% үхрийн хээлийн ийлдэс байхаар эсийн өсгөврийн тэжээл нэмнэ. Энэ цийдмэгийн 1мл-т ойролцоогоор 10<sup>5</sup> эс байна.
- Тус бүрдээ 4 мл эсийн өсгөврийн тэжээл бүхий 3 ширхэг T-25см<sup>2</sup> фласканд бэлтгэсэн эсийн цийдмэгээс 2, 2 мл-ийг нэмнэ.
- Үлдсэн 4 мл цийдмэгийг 20 мл эсийн тэжээл бүхий T-75см<sup>2</sup> фласканд хийнэ.
- Фласкуудыг сайтар таглан 37° С термостатанд тавина.
- Эсийн ургалтыг Инверт микроскопоор өдөр бүр харж шалгана.

#### **Эсийн өсгөвөрт шинжлэгдэхүүн халдаах (T25 см<sup>2</sup>)**

Биоаюулгүйн II зэрэглэлийн кабинетэд хийж гүйцэтгэнэ.

##### *Фласкийг тэмдэглэх*

- Шинжлэгдэхүүний дугаар, сэлгүүлэлтийн тоо, халдаасан он, сар, өдөр
- Хяналтын фласк дээр халдаасан он сар өдөр тэмдэглэнэ.

##### *Эсийг халдаахад бэлтгэх*

Сорьц халдаахаас өмнө эсийн өсгөвөрийг микроскопын 40X өсгөлтөөр харж ургалт 75-100% болсон эсэхийг шалган тэмдэглэнэ.

- Эсийн өсгөврийн тэжээлийг асгана
- T25 см<sup>2</sup> фласкийг 5мл ариун фосфатийн буферийн уусмалаар 2 удаа зайлна./ФБУ-ыг эсрүү шууд хийж болохгүй/
- Вирус өсгөвөрлөх тэжээлээс 5мл хийж термостатанд 5-10 минут байлгана.

##### *Шинжлэгдэхүүн халдаах*

- 5мл тэжээлийг фласкаас соруулж авна.
- Шинжлэгдэхүүнээс 0.2мл авч дан үет эсийн дээгүүр урсгах маягаар хийж фласкийг бөглөн 35С °-т 30минут байлгана.
- 1 фласканд 6мл тэжээл хийхээр бодно
- ТРСК- трипсинээс 1мл-д 1микролитр байхаар нэмнэ.
- Бэлтгэсэн тэжээлээс 6 мл-ээр шинжлэгдэхүүн халдаасан фласкуудад хийнэ.
- Фласкийг сайтар бөглөн 33-35° С термостатанд тавина.
- Эс гэмтэх үйлдэл /ЭГҮ/-ийг микроскопт өдөр бүр ажиглан тэмдэглэнэ.

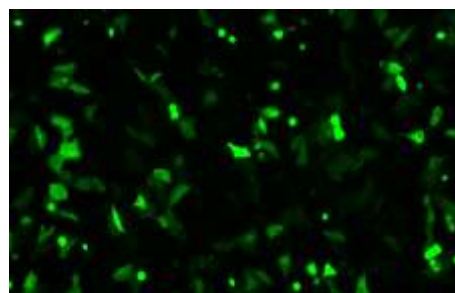
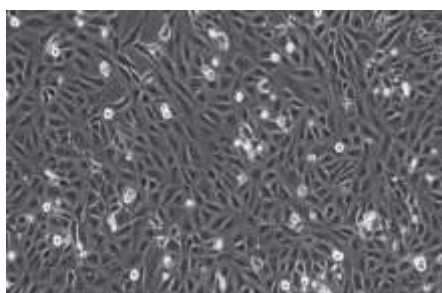
### **Чанарын хяналт**

Эсийн өсгөвөрт хэрэглэгдэх оношлуур урвалж хадгалалтын горимыг мөрдөн ажиллахаас гадна халдвар хамгааллын дэглэм баримтлан ажиллана.

### **Шинжилгээний хариуг дүгнэх**

**Халдварлагдсан эсийн өсгөврийн шингэнийг хураан дүгнэх**  
(Зураг 2, 3)

- Эсийн 50-75% нь ЭГҮ-д орж хуурсан бол өсгөврийн шингэнийг хурааж 0.5% глицерол эсвэл үхрийн альбумин уураг нэмнэ.
- ЭГҮ илрэхгүй байсан ч 6-7 хоногийн дараа хураана.
- Хураасан эсийн өсгөврийн шингэнийг +4° С-д хадгалж ДТУ урвал тавина. ДТУрвал сөрөг бол дахин 2 удаа сэлгүүлэн халдаана.
- Шаардлагатай гэж үзвэл өсгөврийн шингэнийг 3000 эрг/мин хурдтай 5 минут хурилдуурдан эсээс нь ялгана.
- ДТУ эерэг өсгөвөрт УТ-ПГУрвалаар вирүс ялган дүйх шинжилгээ хийнэ
- Вирүсийн өсгөврийг 2 хоногийн дотор -80° С-д хадгална



Зураг 2. Бүрэн ургалттай Vero E6 эс    Зураг 3. Халдварлагдсан эсийн өсгөвөр  
ДТУрвалаар илэрсэн эерэг сорьц

## **6. Илэрсэн үл тохирлыг залруулах ажиллагаа**

*Урвалд нөлөөлөх хүчин зүйл:*

- Соруурын тохируулгын алдаа
- Урвалын шингэнийг соруулж авах, юүлэх үед гарсан алдаа
- Урвалын хугацаа
- Урвалж бодисуудын идэвхи төвшрүүлэг
- Урвалж бодисуудын рН, урвалж бодисуудын хэмжээ эзлэхүүн
- Хавтангийн угаалгын тоо
- Урвалын хэм
- Урвалжуудын хэм
- Урвал унших шүүлтүүрийн гэрлийн дохионы урт
- Коньюгат, өнгө олгогчийн төрөл
- Шинжлэгчийн дадлагажсан байдал

*Ийлдэс судлалын шинжилгээ хийхэд гарах нийтлэг алдаа:*



- Коньюгат, бусад урвалжын шингэлэлт болон коньюгат өөр нэгдэлтэй харилцан үйлчилсэний улмаас хавтан бүхэлдээ жигд нэг өнгө үзүүлэх
- Бэхлэгч уусмалыг жигд бус хийсэнээс хавтангийн өнгө алаг цоог өгөх
- Аль нэг урвалжын шингэлэлт буруу, угаалтын техник алдаанаас өнгө хурдан, эсвэл удаан тодрох
- Оношлуурын зааварт заагдсан хэмээс бага хэмд инкубацлах

*Ийлдэс судлалын шинжилгээнд гарах нийтлэг алдааг шийдвэрлэх*

- Коньюгат, бусад урвалжуудын шингэрүүлэлтийг шалгах
- Коньюгат (өнгө илтгэгч, урвал зогсоогч, бусад урваж) хэмжээг шалган хавтанд жигд хийх, хавтангийн үүрэнд хошууг хүргэхгүй байх
- Угаалгыг зөв технологиор хийх дадал эзэмших
- Дадлага хийх

**Анхаарах зүйлс**

- Урвал тавихын өмнө оношлуур урвалж, шинжлэх ийлдсийг тасалгааны хэмд 15-20 минут тавина
- Хэрэв ийлдэс нь үндсэн өнгөө алдсан, цусны хольцтой тохиолдолд үр дүнд нөлөөлөх тул шинжлэхгүй
- Ийлдсийг 3-аас илүү удаа гэсгээхгүй бөгөөд цуснаас ийлдэс ялгасны дараа ийлдсийг 3 хувааж  $-20^{\circ}\text{C}$  хэмд 1 сар, цаашид шингэн азот,  $-70^{\circ}\text{C}$  хэмд хадгална.
- Угаагч уусмалыг найруулахын өмнө талст үүссэн тохиолдолд  $37^{\circ}\text{C}$  хэмд талст үгүй болтол байлгасны дараа угаагч уусмалыг хавтанг угаахаас 10 минутын өмнө найруулсан байх шаардлагатай
- Урвалын хавтангийн уутыг зориулалтын хэсгээр онгойлгох, шаардлагатай хавтанг авсаны дараа амыг сайтар хаах, шаардлагатай бус бол олон удаа онгойлгохгүй байх
- Хавтангийн ёроолд хүрэхгүй байх, шүүлтүүр цаасан дээр тавих
- Анхлан тавьж байгаа тохиолдолд урвалж дусаахдаа үүр бүрд нэг хошуу ашиглах
- Урвалж бодис, угаагч уусмалыг хавтанд дусаахдаа хийн бөмбөлөг үүсгэхээс зайлсхийх
- Хавтангийн үүр бүрийг угаах хугацаанд анхаарах, угаасны дараа шүүлтүүр цаас ашиглан сайтар хуурайшуулах гэвч хавтанг хэтэрхий хатаахаас зайлсхийх
- Шинжилгээнд аль болох нэг удаагийн хошуу, шилэн сав ашиглах
- Лабораторийг үүсгэгчийн онцлогоос хамаарч зохих ариутгалын бодис ашиглан урьдчилан сайн ариутган бэлтгэсэн байх

## Хавсралт

### Ашигласан ном, хэвлэл

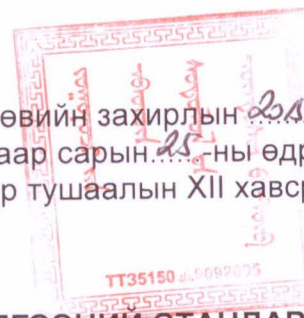
1. Cell culture manual WHO 2003
2. “Фермент холбоот урвал, ДТУрвал тавих аргачлал зарчим” Ж.Бэх-Очир 2006
3. Биобэлдмэл үйлдвэрлэлийн анхан шатны гарын авлага 2006
4. П. Нямдаваа, Бүтээлийн товчоон, IV боть “Вирүс судлалын шинжилгээний аргууд ” УБ, 2007
5. “Халдварт өвчний эрт сэрэмжлүүлэх хариу арга хэмжээний тогтолцоо” 2007
6. “Халдварт өвчний эрт сэрэмжлүүлэх хариу арга хэмжээний тогтолцоо” Лабораторийн оношлогооны протокол хуудас 2007
7. “Халдварт өвчний эрт сэрэмжлүүлэх хариу арга хэмжээний тогтолцоо” Лабораторийн оношлогооны протокол 2007
8. Байгалийн голомтот халдварт өвчний халдвар хамгааллын дэглэмийн заавар 2008
9. Ц. Базарцэрэн, Б. Болдбаатар “Вирүс судлалын үндэс I-I боть” Улаанбаатар 2009 он
10. Халдварт өвчний хяналтын лавлах 18 Улаанбаатар 2010
11. Лабораторийн биоаюулгүй ажиллагааны гарын авлага 2010 Улаанбаатар
12. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Chapter
13. Stephen D. Carter “Structure, Function, and Evolution of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Nucleocapsid Protein”
14. Altaf A, Luby S, Ahmed AJ (1998) Outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Quetta, Pakistan: contact tracing and risk assessment. Trop Med Int Health 3: 878–882.
15. Burt FJ, Paweska JT, Ashkettle B, Swanepoel R (2009) Genetic relationship in southern African Crimean-Congo haemorrhagic fever virus isolates: evidence for occurrence of reassortment. Epidemiol Infect 137: 1302–1308. doi:
16. Chamberlain J, Cook N, Lloyd G, Mioulet V, Tolley H, et al. (2005) Co-evolutionary patterns of variation in small and large RNA segments of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. J Gen Virol 86: 3337–3341. doi: [10.1099/vir.0.81213-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.81213-0).
17. Serological evidence of Crimean-Congo haemorrhagic fever viral infection among camels imported into Egypt. J Trop Med Hyg 93: 201–204.
18. “Crimean-Congo Haemorrhagic fever” OIE August, 2009
19. “Crimean-Congo Haemorrhagic fever” WHO 2003
20. Salikh Ahmeti “Crimean-Congo Haemorrhagic fever in Cosova: a fatal case report” Virology journal, 2006
21. Lyudmila Yashina, Irina Petrova “Genetic variability of Crimean-Congo Haemorrhagic fever virus in Russia and Central Asia” Journal of General Virology 2003
22. QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (100) Catology# 210212 цомгийн протокол. 2006
23. QIA amp Viral RNA Mini Kit (50) Catology# 52904 цомгийн протокол, 2005
24. [http://www.virology.net/Big\\_Virology](http://www.virology.net/Big_Virology)
25. [http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/TP47\\_anx5.pdf](http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/TP47_anx5.pdf)

## Нэр томъёоны тайлбар

### Товчилсон үгийн жагсаалт

дНТФ	дезоксинуклеотидтрифосфат
ДНХ	Дизоксирибонуклейн хүчил
РНХ	Рибонуклейн хүчил
ПГУ	Полимеразын гинжин урвал
УТ-ПГУ	Урвуу транскриптазын полимеразын гинжин урвал
rRNA	рибосомын РНХ
V	вольт
ELISA/ ФХУ	Фермент холбоот урвал
ГХН	Гэрлийн хугарлын нягт
ДТУ	Дархан туяарах урвал
ЦНСУ	Цус наалдах саатуулах урвал
In vivo	Тахианы үр хөврөл
In vitro	Эсийн өсгөвөр
БАК	Био аюулгүй ажиллагааны кабинет
BSLab 3	Biosafety laboratory 3
BCC	Вирус саармагжуулах сорил
BHK 21	Baby hamster kidney
ЭГҮ	Эс гэмтээх үйлдэл
ККЦЧ	Крым Конгийн цусархаг чичрэг
FCS	(2% heat-inactivated fetal calf serum-FCS)
ЗӨСҮТ	Зоонозын өвчин судлалын үндэсний төв
ЗӨСТ	Зоонозын өвчин судлалын төв

Төвийн захирлын 24-оны  
06 дугаар сарын 25-ны өдрийн  
04/11 дугаар тушаалын XII хавсралт



## ДЕНГИЙН ЧИЧРЭГ ӨВЧНИЙ ЛАБОРАТОРИЙН ШИНЖИЛГЭЭНИЙ СТАНДАРТ АЖЛЫН ЗААВАР

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Денгийн чичрэг өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо-18
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- А90	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил
Зориулалт: Денгийн чичрэг өвчний оношлогоонд	
Хэрэглэх хүрээ: Вирус судлалын лабораторийн шинжилгээ, оношлогоо, судалгаанд	
Боловсруулсан: Б.Байгалмаа, Х.Тунгалаг Огноо: 2015 он	Баталсан, зөвшөөрсөн актын дугаар: ЗӨСҮТөвийн захирлын А/44 тоот тушаалын арван хоёрдугаар хавсралт Огноо: 2015.06.25
Хэвлүүлсэн: Мэргэжлийн тусламжийн алба, Лавлагаа лабораторийн тасаг	

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Денгийн чичрэг өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 18
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- А90	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил

### 1. Зорилго, зарчим

Денгийн чичрэг өвчний вирус, вирусын нуклейн хүчил, DEN- I-IV ийлдэс хүрээг тогтоох өвөрмөц эсрэгбие, эсрэгтөрөгч илрүүлэн, лабораторийн шинжилгээний оношийг баталгаажуулахад оршино. Денгийн чичрэг өвчний вирусын гадаргуугийн тогтвортой NS1 эсрэгтөрөгч уураг дээр суурилан эсрэгбие, эсрэгтөрөгч, нуклейн хүчил илрүүлэх, Денгийн вирус өсгөвөрлөнө.

### 2. Хамрах хүрээ

Эмнэлзүйн сорьц, байгалийн голомтын хяналт, тандалтын шинжилгээ хийх эрх бүхий зооноз өвчин судлалын төвийн вирус судлалын BSL 2, BSL 3-р зэргийн лабораторит мөрдөгдөнө.

### 3. Тодорхойлолт

*Flaviviridae* овог *flavivirus* төрөл болох Денгийн чичрэг нь шумуулаар дамжин хүнд халдварладаг зоонозын халдварт өвчин. Денге вирус нь бөмбөлөг хэлбэртэй, 50 нм, бүтцийн 3 уураг бүхий +РНХ агуулсан. Бүтцийн 3, бүтцийн бус 7 уургаас тогтсон. Денгийн чичрэгийн вирус нь 4 серовартай ба Азид DEN-II, DEN- III генотип нь зонхилон тохиолддог. Биоаюулгүйн II түвшинд хамаарна.

### 4. Сорьц цуглуулах хадгалах, тээвэрлэх

Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, тэжээлт орчин

- 4 - 20°C зөөврийн хөлдөөгч
- Дюар бүхий шингэн азот (10 – 15 л)
- Хурилдуур 1000-5000 эрг/мин
- Ариун сав (50, 80 мл)
- Вакуум хуруу шил (5-10 мл)
- Эппиндорфын хуруу шил (1.5-2.0мл)
- Эппиндорфын тавиур
- 100 үүр бүхий сорьц хадгалах хайрцаг
- Шумуул баригч (CO<sub>2</sub>)
- Автомат дусаагуур:100-1000, 20-200мкл
- Автомат дусаагуурын хошуу /20-200мкл, 200-1000мкл/
- Сорьц зөөвөрлөх сав, мөсөн элемент, хуурай мөс (пролон, хөвөн)
- Хайч
- Хямсаа
- Спиртэн дэн
- Ариутгасан хөвөн
- Чангалуур
- Шархны лент
- Шилний харандаа
- Этилийн спирт - 70%

#### 4.1. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл

Халдвартай болон сэжигтэй сорьцтой ажиллах үед хувийн хамгаалах хувцас хэрэглэлийг иж бүрэн (халад, малгай, бээлий, нүдний шил, хормогч, гутал, N95 амны хаалт, хамгаалах шил) өмссөн байна.

- Халдварын сэжигтэй шинжлэгдэхүүнийг амьтанд халдаах, халдвартай амьтныг задлах, вирүс өсгөвөрлөх ажиллагаа халдварын эрсдэл өндөр тул биоаюулгүй ажиллагааны 2-р зэргийн (БАК II) кабинетад гүйцэтгэнэ.
- Онош тодруулах, байгалийн голомт хяналтын шинжилгээг БАК II –д гүйцэтгэнэ.
- Шинжилгээнд ирүүлсэн шинжлэгдэхүүн дээжийг гадна сав баглаанаас гаргах, дезоксирибонуклейн хүчил (ДНХ) ялгах үйл ажиллагааг БАК II –д гүйцэтгэнэ.
- Идэвхгүйжүүлсэн материалд полимерадын гинжин урвал (ПГУ) тавих, электрофорез гүйлгэх, үр дүнг тооцох зэрэг үйл ажиллагааг цэвэр бокс, ширээн дээр хийх ба нүдний хамгаалалтын шил, нүүрний халхавч, 2 давхар бээлий өмсөнө.
- Халдвартай материал цацагдахаас сэргийлэхийн тулд хурилдуурын ротор болон шинжлэгдэхүүнтэй хуруу шилийг таглах ба тагийг зөвхөн аюулгүй ажиллагааны кабинетэд онгойлгох
- Ажилласан талбай болон бохирдсон эд зүйлийг халдваргүйтгэх бодисоор /этанол 70%, виркон, хлор агуулсан халдваргүйтгэлийн уусмал/ цэвэрлэх, UV ламп асаах
- Лабораторит орохыг зөвхөн төлөвлөгөөт ажлаа гүйцэтгэгч мэргэжилтэн болон түүнд гардан туслах мэргэжитэнд зөвшөөрөх, лабораторид орсон, гарсан хөдөлгөөнийг бүртгэх
- Хурдавчилсан сорил – ЗӨСҮТөв, аймаг, нийслэлийн ЗӨСТөвүүд (**BSL 2**)
- Ийлдэс судлал (ФХУ, ДТУ) – ЗӨСҮТөв, аймаг, нийслэлийн ЗӨСТөвүүд (**BSL 2**)
- Молекул биологи (УТ-ПГУ, ПГУ) - ЗӨСҮТөв (**BSL 2**)
- Вирүс өсгөвөрлөх (in vivo, in vitro) - ЗӨСҮТөв (**BSL 3**)

#### 4.2. Шинжлэх сорьцын төрөл

Сорьцын төрөл	Сорьц авах хугацаа	Хэмжээ
Өвчтөний цус	Шинж тэмдэг эхэлсэнээс хойш 1-5 хоног	5-8 мл
Өвчтөний цусны ийлдэс		1-2.0 мл
Өвчтөн нас барсан тохиолдолд элэг, уушиг, сэрээ булчирхай зэрэг эрхтний хэрчим, ясны чөмөг	Хугацаа хамаарахгүй	3x3 - 5x5 см
<i>Aedes</i> төрлийн шумуул		>1000
Өвчтөний цус, ийлдэс (хос ийлдэс)	эдгэрэх үе >15 хоног	1-2.0 мл

##### 4.2.1. Сорьцод боловсруулалт хийх

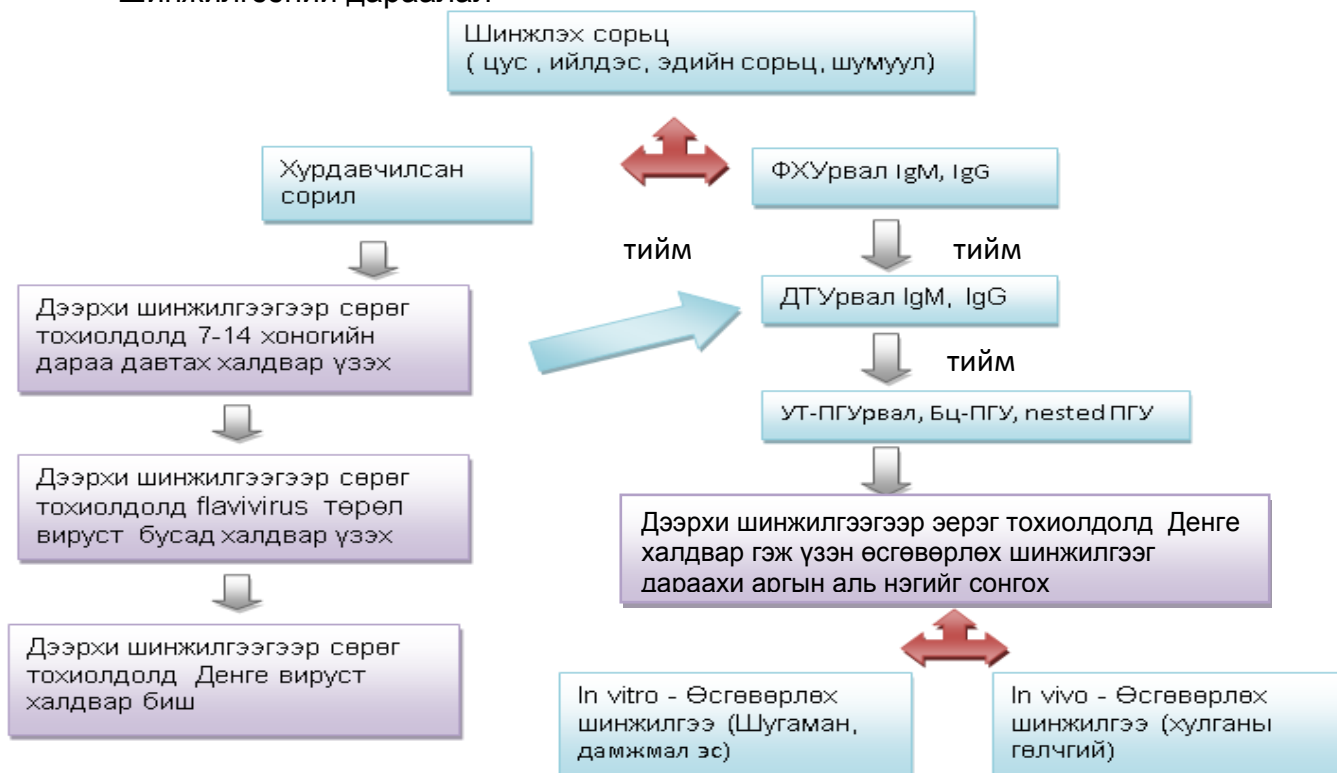
Оношлуурын зааварт заагдсны дагуу шинжлэх сорьцонд боловсруулалт хийгдэнэ.

##### 4.2.2. Сорьцийг хадгалах, тээвэрлэх

- Сорьцыг 24 цаг дотор 2-8<sup>0</sup>С-д, 2 сар хүртэл -20<sup>0</sup>С-д, 3 сараас дээш хадгалах тохиолдолд -80<sup>0</sup>С-д эсвэл шингэн азот бүхий саванд хадгална.
- Сорьцыг тээвэрлэхдээ гурван суурьт савлалтын системийг баримтлан тээвэрлэнэ.

## 5. Шинжилгээний аргачлал

### Шинжилгээний дараалал



### 5.1. Шинжилгээний төрөл, арга

Шинжилгээний төрөл	Шинжилгээний арга	Шинжлэх сорьц
Вирус өсгөвөрлөх, ийлдэс хүрээг ялгах	- Эсэд өсгөвөрлөх - Дархан туяаралт урвал	Цус, элэг, уушиг, булчирхай, сэрээ булчирхай, ясны чөмөг
Өвөрмөц ДНХ илрүүлэх	- Полимеразын гинжин урвал	Цус, элэг, уушиг, булчирхай, сэрээ булчирхай, ясны чөмөг
Эсрэгтөрөгч илрүүлэх	- Фермент холбоот урвал - Хурдавчилсан сорил	Цус, элэг, уушиг, булчирхай, ясны чөмөг, сэрээ булчирхай
Эсрэгбие (IgM,G) илрүүлэх	- Фермент холбоот урвал - Дархан туяаралт урвал - Хурдавчилсан сорил - Цус наалдалтыг саатуулах урвал	Ийлдэс
<b>Тархвар судлалын холбогдол бүхий сорьц</b>		

Өвөрмөц ДНХ илрүүлэх	- Полимеразын гинжин урвал	Шумуул
Вирус өсгөвөрлөх	- Эсэд өсгөвөрлөх	Шумуул
Эсрэгтөрөгч илрүүлэх	- Фермент холбоот урвал - Хурдавчилсан сорил	Шумуул

### 5.3 Ийлдэс судлалын шинжилгээ:

5.3.1. Шинжилгээнд шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, оношлуур

- БАК II А
- Бичил хавтан уншигч
- Дархан туяаралт бичил харуур
- Холигч
- Дулаан тогтоогуур \37 °C\
- Хурилдуур \1000-5000 эрг\мин\
- Нэг болон олон сувагт автомат дусаагуур: 100-1000, 20-200, 2-20 мкл
- Автомат дусаагуурын нэг удаагийн хошуу /2-20мкл, 20-200мкл, 200-1000мкл/
- 20, 40, 100, 250,500, 1000мл хэмжүүс бүхий шилэн сав
- Бүрхүүл шил
- Ариун завь
- Шүүгч цаас
- Лабораторийн дохиотой цаг
- Шилний харандаа
- Dengue IgM, IgG Rapid test (Денге вирус NS1 эсрэгтөрөгч type I-IV – ийг бичил хавтангийн үүрэнд суулгасан)
- Anti Dengue Virus IgM, IgG ELISA (Денге вирус NS1 эсрэгтөрөгч type II – ийг дээд зэргээр цэвэршүүлэн хавтангийн үүрэнд суулгасан)
- Dengue Virus Mosaic I-IV type IgM, IgG IIFA (Денге вирус NS1 эсрэгтөрөгч type I-IV – ийг бичил хавтангийн үүрэнд суулгасан)
- Flavivirus Profile 2 IgM, IgG IIFA (дээд эгнээнд ХЭФ, ӨНЧ, Шар чичрэг, Япон энцефалитын вирус, доод эгнээнд Денге вирус type I-IV- ийг бичил хавтангийн үүрэнд суулгасан)
- Фосфатийн буферийн уусмал pH-7,2
- Нэрмэл ус /давхар нэрсэн, ионгүйжүүлсэн, ариун/
- Вирконы уусмал 1%
- Этанол - 70%

5.3.2. Хурдавчилсан сорил:

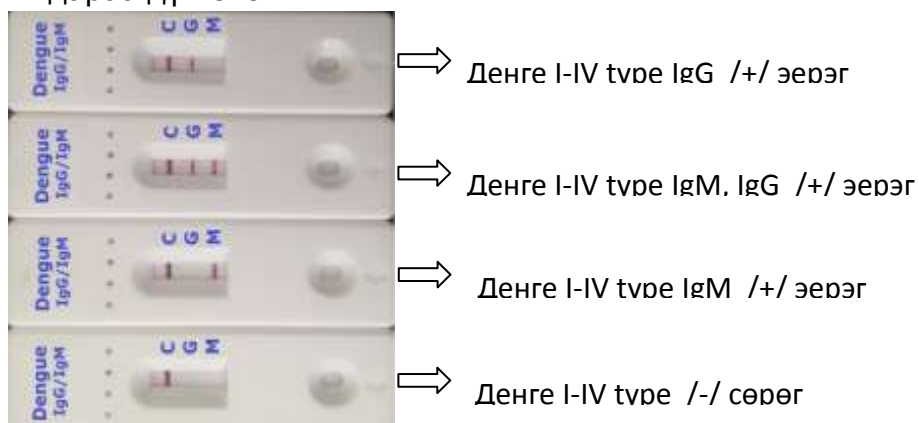
Оношлуур үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу хэрэглэнэ.





### Сорилын үр дүн:

Үр дүнг 20-25 минутын дараа дүгнэнэ.



### Чанарын хяналт:

- Эргэлзээтэй (Borderline) тохиолдолд урвалыг давтан тавих
- Урвалын хугацааг хэтрүүлэхгүй байх
- Дуслын хэмжээг зааварт заагдсан хэмжээнээс бага эсвэл ихээр дусаахгүй байх
- Оношлуурын хадгалалтын хугацааг анхаарах
- Шинжлэх сорьцыг зааврын дагуу шингэлэх, буруу шингэлсэнээс (өтгөрүүлэг их) эерэг хяналт цагаас хожуу илрэх
- Тухайн цомог үйлдвэрлэсэн компаниас **Borderline** хавсаргасан оношлуурын чанарын хяналтын хуудасыг үндэслэн шинжилгээний үр дүнгийн баталгаажилт, чанарын хяналтад хяналт тавина.

### 5.3.3 Фермент холбоот урвал:

Денгийн халдварын сэжигтэй өвчтөний цусны ийлдсэнд IgM, IgG илрүүлэх зориулалтай цомгийг зааврын дагуу хэрэглэнэ.

Шинжлэх сорьцыг шинж тэмдэг эхэлсэнээс 6 ба түүнээс дээш хоногт авч шинжлэх нь оношлогооны ач холбогдолтой. Өвчтөн болон сэжигтэй хүнээс авсан цусны ийлдэс, цус болон шүлс шингээсэн цаас зэрэг сорьцонд DEN 1-4 ийлдэс хүрэнээс гарган авсан Денге өвөрмөц эсрэгтөрөгч ашиглан Денгийн вирусын өвөрмөц моно, поликлонол эсрэгбие бүхий коньюгат ашиглан өвөрмөц эсрэгбие IgM, IgG-г шууд, шууд бус ELISA урвалаар илрүүлдэг. Ихэнхи тохиолдолд Денгийн вирусын бүрхүүлийн уургаас гарган авсан эсрэгтөрөгч хавтангийн ёроолд бэхэлсэн байдаг. Шинжлэх ийлдсийг оношлуурын зааврын дагуу урьдчилан шингэлэгчээр 1:100 -1:200 шингэлдэг.

### Урвалын үр дүн:

Шинжилгээний дүнг оношлуурын зааврын дагуу тооцож дүгнэнэ.

/Ratio / = Сорьц ГХН / Cal 2 ГХН

ГХН-Гэрлийн хугарлын нягт

Харьцуулсан үзүүлэлт (Ratio)	Дүн
< 0.8	сөрөг
≥0.8<1.1	эргэлзээтэй
≥ 1.1	эерэг

### 5.3.4. Дархан туяарах урвал:

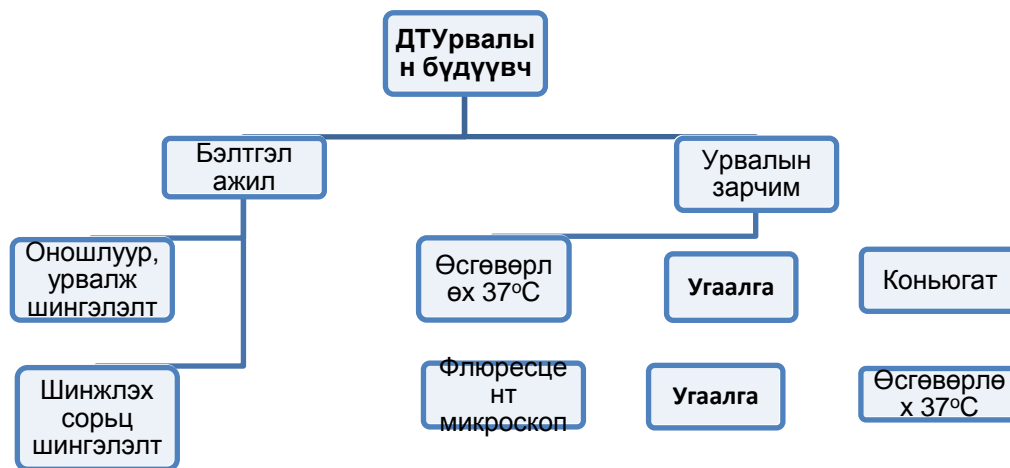
Денгийн чичрэгийн халдварын сэжигтэй хүний цусны ийлдсэнд IgM, IgG илрүүлэх зориулалтай цомгийг зааврын дагуу хэрэглэнэ.

**Денге чичрэгийн вирусын эсрэгбие IgM, IgG илрүүлэх дархан туяарах урвалын заавар**

Илрүүлэх эсрэгбие	Субстрат	Зүйл	Хэмжээ
Денгийн вирусийн эсрэг үүссэн өвөрмөц эсрэгбие IgM, IgG	Денгийн вирус цэвэршүүлсэн I-IV type – ийг бичил хавтангийн үүр бүхий эсд бэхэлсэн	EU 14	5*10 (50)

*Урвалын ерөнхий зарчим:*

Урвалын цомогоор хүний цусны ийлдсэнд *in vitro* орчинд вирусын эсрэг үүссэн эсрэгбиеийг тоо болон чанарын аргаар илрүүлдэг. Урьдчилан шингэлсэн өвчтний сорьцыг Денгийн вирусээр халдварлагдсан хавтанд оруулна. Эерэг сорьц байвал өвөрмөц эсрэгбие хавтан дахь эсрэгтөрөгчтэй холбогдоно. Энэхүү нэгдэл дараагийн шатанд fluorescein-labelled anti-human antibody-тай холбогдосныг флюоресцент микроскопоор харж дүгнэнэ.



*Цомогт агуулагдах зүйлс:*

№	Бүрэлдэхүүн хэсэг	Хэмжээ	Тэмдэглэгээ
1	Денгийн вирус халдварлуулсан болон халдварлуулаагүй эс бэхлэгдсэн 5x2 бүхий слайд	10 слайд	SLIDE
2	Fluorescein-labelled anti-human IgG (ямаа) шууд хэрэглэнэ	1x 1.5 мл	Conjugate
3	Эерэг хяналт (IgM, IgG, хүний) шууд	1x 0.1 мл	Pos control

	хэрэглэнэ		
4	Сөрөг хяналт (IgM, IgG, хүний) шууд хэрэглэнэ	1x 0.1 мл	Neg control
5	Дээж шингэлэгч шууд хэрэглэнэ	2x 4.5мл	Sample buffer
6	Фосфатын буферын уусмал pH- 7.2	2 уут	PBS
7	Твин 20	2x 2.0мл	TWEEN 20
8	Тодотгогч тос	1x 3.0мл	GLYCEROL
9	Бүрхүүл шил (62мм x 23мм)	12ш	COVERGLASS
10	Цомгийн заавар	1ш	

**Хадгалалт, тогвортой байдал:**

Энэүү цомгийг +2 °C +8 °C хэмд хадгална. Цомог нь үйлдвэрлэсэнээс хойш 18 сарын хугацаанд хадгалах шаардлагатай.

**Анхааруулга:**

Өвчтний сорьц, калибратор, хяналтууд мөн ашигласан урвалын хавтан нь халдвартай тул болгоомжтой харьцах шаардлагатай. Бүх урвалжуудтай зааврын дагуу болгоомжтой ажиллана.

**Бэлтгэл ажил:**

1. Урвалын самбараа шалгасан байна: Самбарын гадна тал ус нэвчсэн болон гоожсон эсэхийг шалгаад, Т салангид уутанд байгаа хавтанг тасалгаанд байлгасаны дараа нээнэ. Бичил хавтан дээрхи тэмдэглэгдсэн талбай нь маш мэдрэг тул онцгой анхаарч, сэвтээхээс болгоомжилон тэмдэглэгээг шилний харандаагаар хийнэ.
2. Шинжлэх ийлдэс, сорьц, оношлуур урвалжуудыг урвал тавихаас 30 минутын өмнө тасалгааны хэмд тавина.
3. Био-Аюулгүйн кабинетын бэлэн байдал хангаж шинжилгээ эхлэхээс 30 минутын өмнө UV ламп асааж ариутгана.

**Шингэлэлт:**

Оношлуурын зааварт заасны дагуу шинжлэх дээж болон оношлуурыг шингэлнэ. Оношлуур нэг бүрд эерэг болон сөрөг хяналтын багтаасан байдаг. Хяналтын ийлдсээ хэрэглэхээс өмнө сайн сэгсэрнэ. Тухайлбал ийлдсийг 1:10 хүртэл шингэлнэ. Жнь: 11.1мкл ийлдэс + 100мкл шингэлэгч уусмал (1:10), шингэлсэн ийлдсээ сайтар хольж, тасалгаанд 10 минут тавина.

**Урвалын явц:**

1. Бичил хавтангийн үүр бүрд урьдчилан шингэлсэн ийлдэс, эерэг хяналт, сөрөг хяналт тус бүрээс 30мкл-ыг дарааллын дагуу дусаан тасалгааны хэмд \18-25°C\ 30 минут тавина.
2. Шингэлсэн ийлдсээ бичил хавтангийн талбайд хийн бөмбөлөг үүсгэхгүйгээр дусаана.
3. Бичил хавтанд буй шинжлэгдэхүүн тус бүр холилдохоос зайлсхийн болгоомжтой ажиллана.
4. Дээж нэг бүрийг автомат дусаагуур хэрэглэн дусаана.

**Угаалга:**

Угаагч уусмалыг зааврын дагуу найруулна. Үүнд: Цомогт агуулагдах хуурай ФБУ (PBS Ph = 7.2), Tween 20 –с 2 мл –ийг тус бүр 1 литр ариун нэрмэл усанд уусган нэгэн жигд уусмал болгоно.

Бэлэн болсон угаагч уусмалаар 3 удаа 5 минутын турш бичил хавтанг угааж, хатаана. Зориулалтын шүүгч цаасыг болгоомжтой тавьж хавтангийн зах ирмэгийн шингэнийг уусган авах ба гол талбайд хүрэхээс зайлсхийнэ.

*Коньюгат:*

Хуурайшсан бичил хавтангийн үүр бүрд коньюгатаас 25 мкл-ыг дусаан чийглэг орчинд 18-23°C хэмд 30 минут гэрлээс далд тавина.

*Угаалга:*

Угаагч уусмалаар 3 удаа 5 минутын турш бичил хавтанг угааж, хатаана. Зориулалтын шүүгч цаасыг болгоомжтой тавьж хавтангийн зах ирмэгийн шингэнийг уусган авах ба гол талбайд хүрэхээс зайлсхийнэ.

*Урвалын үр дүн:*

Хавтан дээр глицеролоос дусаан дээр нь бүрхүүл шил тавина. Бүрхүүл шилийг бичил хавтангийн гадаргатай хүрэлцүүлэн, зах ирмэгийг тэнцүүлэн тавина. Иммунофлюоресцент бичил харуурын 40X объективоор харж гэрэлтэлтийн эрчмээр дүгнэнэ.

#### Дархан туяарах урвал чанарын хяналт:

№	Гэрэлтэлтийн эрчим				Эсрэгбиеийн таньц
	1:10	1:100	1:1000	1:10000	
1	сул	сөрөг	сөрөг	сөрөг	1:10
2	дунд	сөрөг	сөрөг	сөрөг	1:32
3	хүчтэй	сул	сөрөг	сөрөг	1:100
4	хүчтэй	дунд	сөрөг	сөрөг	1:320
5	хүчтэй	хүчтэй	сул	сөрөг	1:1000
6	хүчтэй	хүчтэй	дунд	сөрөг	1:3200
7	хүчтэй	хүчтэй	хүчтэй	сул	1:10000
8	....	....	.....	.....	....

#### 5.4. Биологийн шинжилгээ:

Денгийн чичрэг өвчний шинжилгээ, оношлогоонд 2-3 хоногтой, эрүүл хулганын гөлчгийг сонгоно. Ажилбарыг халдвар хамгааллын дэглэм баримтлан гүйцэтгэнэ.

##### 5.4.1. Туршилтын хулганы гөлчгийн тархинд халдвар хийх:

- Гөлчгийг лаборант зүүн талаар нь хэвтүүлж хойд 2 хөлийг эмчийн талруу татаж өгнө.
- Эмч зүүн гарын хуруугаар амьтныхаа доод эрүүнээс барьж долоовор хуруугаа дагзны ард байрлуулна
- Баруун гартаа тариураа хэвтээ байрлалтай, ширээний гадаргуутай зэрэгцээ барина.
- Харин гөлчгийн толгойтой тэгш өнцөг үүсгэн, зүүний ховилыг өөр лүүгээ харуулан гөлчгийн баруун нүд, баруун чихний хоорондох урьдчилан тэмдэглэсэн цэгт хатгана.
- Зүүний үзүүрийг гавлын ясыг зөөлөн нэвтрүүлээд цааш 0,1-0,2 см явуулж тархины эдэд ормогц тариурын бүлүүрийг аажим шахаж 0,02 мл булинга хийнэ. \Зураг 1\
- Халдвар хийж дуусаад лаборант амьтныг хоривчинд болгоомжтой хийж, халдваргүйтгэлийн уусмалд бээлийтэй гараа дүрж халдваргүйтгэнэ.



Зураг 1 Халдвар хийх

#### 5.4.2. Халдварлуулсан амьтныг ажиглах:

- Халдварлуулсан амьтныг хоривчинд хийж, амь сорьцийн лабораторит зориулалтын тавиур дээр байрлуулна.
- Туршилтын амьтныг 14 хоног хүртэл ажиглана. Өдөр бүр биеийн байдлын тэмдэглэл хөтлөнө.
- Ажиглалтын хугацаанд амьтны үс өрвийх, сүүлний үзүүрээс хямсаагаар агаарт барихад чичрэх, хойд хөл саажих, туйлдан ядрах, арьс хөхрөх, хөхөө хөхөж чадахгүй болох зэрэг шинж тэмдэг илэрч байгааг ажиглана.
- Ажиглалтын хугацаанд халдварлуулсан амьтныг хооллох, арчлахдаа өөр хоривчинд түр хийж, хоривчийг халдваргүйтгэж цэвэрлэсний дараа уг амьтнаа хийнэ. Түр хэрэглэсэн хоривчийг дор бүр нь халдваргүйтгэнэ.

#### Шинжилгээний үр дүн:

Халдвар хийсэн гөлчгийнд өвчний шинж тэмдэг илэрсэн болон үхсэн тохиолдолд гөлчгийн гавлын ясыг нээж тархийг халдвар хамгааллын дэглэм баримтлан ариун саванд авч ДТУ, ВСС, УТ-ПГУ-аар шинжилнэ.

Халдвар хийсэн амьтан ажиглалтын хугацаанд үхээгүй тохиолдолд алж шинжилнэ.

Сорьцыг  $-70^{\circ}\text{C}$ -ын хөргөгчинд хадгална.

#### Чанарын хяналт:

Халдвар хийх гөлчгий нь нэг шугамын 1-3 хоногтой ямар нэг суулгах шинж үгүй, эрүүл байх

### 5.5. Молекул-биологийн шинжилгээ:

#### 5.5.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл, урвалж бодис,

*Тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл:* Биоаюулгүйн 2-р зэрэглэлийн кабинет, ПГУ-ын олшруулагч машин, дулаан тогтоогуур,  $-20-80^{\circ}\text{C}$  гүн хөлдөөгч, бичил хурилдуур, хүчдэл тохируулагч, электрофорезийн аппарат, холигч, гель хайлуулагч, электрон жин, ПГУ-ын үр дүнг хэт ягаан туяаны тусламжтайгаар дүрслэн харж дүгнэх систем, нэг удаагийн бээлий, РНХ/ДНХ –гүйжүүлсэн эппендорфийн хуруу шил /1,5-2 мл, 0,2 мл, 0,5мл/, эппендорфийн хуруу шилний тавиур, автомат дусаагуур, фильтртэй ариун хошуу /20-200мкл, 1000мкл, 0,5-10мкл, 2-20мкл/, шилний харандаа, хаягдал хийх сав

*Урвалж:*

*РНХ ялгах ажиллагаанд:* Trizol, изоамилийн спирт, 96% , 70% этилийн спирт, давхар нэрсэн ус, фосфатын буферийн уусмал рН-7,2, фирмийн РНХ ялгах цомгийн бүрэлдэхүүн, 1%-ийн вирконы уусмал, РНХ – гүйжүүлэгч (RNA AWAY WIPES)

*УТ-ПГУ-д:* УТ-ПГУ-ын цомгийн бүрэлдэхүүн, өвөрмөц праймер (хүснэгт 1), ионгүйжүүлсэн ус, ДНХ-ийн молекул жингийн маркер, хуурай мөс,

Денгийн чичрэг өвчиний вирусын РНХ илрүүлэх өвөрмөц праймерийн дараалал

Бай ген	Праймерийн нэр	Праймерийн дараалал (5` - 3`)	Молекул жин (bp)
<b>Денгийн вирус бүх ийлдэс хэв (Dengue 1, 2, 3, 4)</b>			
capsid and premembrane genes	Den 1F	TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G	511
	Den 2R	TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC	
<b>Денгийн вирусийн ийлдэс хэв 1</b>			
capsid and premembrane genes	Den 1F	TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G	482
	TS15	CGT CTC AGT GAT CCG GGG G	
<b>Денгийн вирусийн ийлдэс хэв 2</b>			
capsid and premembrane genes	Den 1F	TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G	119
	TS25	CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG	
<b>Денгийн вирусийн ийлдэс хэв 3</b>			
capsid and premembrane genes	Den 1F	TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G	290
	TS35	TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C	
<b>Денгийн вирусийн ийлдэс хэв 4</b>			
capsid and premembrane genes	Den 1F	TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G	392
	TS45	CTC TGT TGT CTT AAA CAA GAG A	

*Агарозын гель электрофорезэд:* Трис-боратын буфер рН=8.3 (5хТВЕ) (89 мМ Трис, 89 мМ Н<sub>3</sub>ВО<sub>3</sub>, 2мМ ЭДТА), 1хТВЕ (5х буфер 100 мл, нэрсэн ус 400 мл), 1.5% агароз гель, этидиум бромидын 0,001%-ийн уусмал (250 мл нэрсэн усанд 2,5 мг этидиум бромид)

5.5.2. Молекул биологийн шинжилгээ:

*РНХ-г ялгах ажиллагаа*

*TRizol ашиглан РНХ ялгах:*

- Дээжинд боловсруулат хийнэ. Эд: 1мл TRIZOL урвалжинд 50-100МБТ эд авч нухна. Шинжлэгдэхүүний хэмжээ TRIZOL урвалжийн 10%-иас хэтрэхгүй байх ёстой. *Нэг давхрагат эсийн ургалт:* Нэг давхаргат эсийг хөргөсөн PBS-ээр угаана. Эсийн өсгөврийн саванд савны 3.5см диаметр бүрт 1мл TRIZOL урвалж нэмж, эс хусагчаар хусна. Эсийн лизатыг дусаагуураар хэд хэдэн сайтар удаа холино. *Суспензэд өсгөвөрлөсөн эс:* Эсийн өсгөврийг хурилдуурдана. Шингэн орчныг асгаж, хөргөсөн ФБУ-д булингална. 300

эрг/мин хурдаар 5 минут хурилдуурдаж, эсийг тунгаана.  $5-10 \times 10^6$  эс бүрт 1 мл TRIZOL урвалж нэмнэ.

- **Ажилбар:** TRIZOL урвалжинд гомогиаз болгосон дээжнүүдийг нуклей уургууд бүрэн задартал өрөөний хэмд 5 минут байлгана. Эсийн задарсан хэсгийг хурилдуурдаж тунгаана. Супернатантыг шинэ хуруу шилэнд зөөж хийнэ.
- 1мл TRIZOL урвалжинд 0.2мл хлорформ тооцож нэмнэ. Дээжний тагийг сайтар таглаад 15 секунд холиод өрөөний хэмд 2-3 минут байлгана. 2-8°C-д 12000 эрг/мин-аас ихгүй хурдаар 15 минут хурилдуурдана. Хурилдуурдсаны дараа доод хэсэгт фенол:хлорформ бүхий улаан давхрага, дээд хэсэгт өнгөгүй усан давхрага үүснэ. РНХ нь зөвхөн өнгөгүй усан хэсэгт үлддэг тул энэ хэсгийг маш болгоомжтой соруулан авч, хаяг бүхий шинэ хуруу шилэнд хийнэ.
- Соруулж авсан шингэнийг хэмжих ба энэ нь гомогиаз хийсэн TRIZOL урвалжийн 60 орчим хувь нь байдаг. Изопропил спирт ашиглан усан шингэнээс РНХ-г тунадасжуулдаг. 1мл TRIZOL урвалж бүрт 0.5мл изопропил спирт нэмж, 15-30°C-д 10 минут байлгаж, 2-4°C-д 12000 эрг/мин-аас ихгүй хурдаар 10 минут хурилдуурдана. Тунадасжуулсан РНХ нь хуруу шилний ёроол болон хананд харагдахгүй.
- Хурилдуурдсан супернатантыг бүрэн асгана. РНХ-ийн мөхлөгийг 1мл TRIZOL урвалж бүрт 1мл 75%-ийн этанол нэмж нэг удаа угаана. Дээжийг холигчоор холиж, 2-8°C-д 7500 эрг/мин-аас ихгүй хурдаар 5 минут хурилдуурдана. Дээрх угаалтыг дахин нэг удаа давтах ба үлдэгдэл этанолыг бүгдийг асгана.
- РНХ-ийн мөхлөгийг 5-10 минут агаарт юмуу вакуумдан хатаана. РНХ-г DEPC усанд уусгана.
- 39 мкл DEPC усанд 1 мкл РНХ уусгаж (1:40), спектрофотометрийн анализ хийнэ. 10 мкл-ийн микрокувет хэрэглэж буй үед, 260, 280 нм-т 1 OD тавина.  $A_{260}/A_{280}$  үнэлгээ нь 1.6-аас дээш байна.

*РНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан РНХ ялгах:*

Цус, эдээс РНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан сорьцноос РНХ ялгаж болох ба үйлдвэрлэгчийн дагалдуулсан зааврын дагуу ялгана.

*УТ-ПГУ тавих:*

УТ-ПГУ-ын холимгийг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу бэлтгэнэ. Денгийн вирусын бүх ийлдэс хэв (Dengue 1, 2, 3, 4) тодорхойлох УТ-ПГУ-ыг **Den 1F/Den 2R праймераар:** 50° хэмд 45 минут, 94° хэмд 5 минут 40 цикл (94° хэмд 30 сек, 55° хэмд 60 сек, 68° хэмд 60 сек), 68° хэмд 10 минутаар; ийлдэс хэв тодорхойлох үүрэн ПГУ-ыг **Den 1F/TS15, Den 1F/TS25, Den 1F/TS35, Den 1F/TS45 праймеруудаар:** 94° хэмд 5 минут, 30 цикл (94° хэмд 30 сек, 55° хэмд 60 сек, 72° хэмд 120 сек), 72° хэмд 5 минутаар тус тус гүйцэтгэнэ.

*Гель электрофорез тавих:*

1.5%-ийн агароз гель бэлтгэж, 1µg/ml этидиум бромид нэмж электрофорезийн аппаратанд цутган зохих саамаа байрлуулж царцаана.

УТ-ПГУ бүтээгдэхүүн тус бүрээс 8-10 мкл соруулан авч, 3 мкл хүндрүүлэгч уусмалтай холин 1,5%-ийн агарозийн гелийн үүрэнд хийнэ. 100х.н ДНХ

стандарт жишигчээс 8мкл соруулан гелийн нөгөө үүрэнд хийнэ. 1х Трис-боратын буфер ашиглан 100 вольт хүчдэлээр 30 минут электрофорез тавина.

#### 5.5.3. Шинжилгээний үр дүнг дүгнэх:

Электрофорез дууссаны дараа гель детекцийн аппарат DijiDoc-It Image System ашиглан үр дүнг авна. Денгийн вирус бүх ийлдэс хэв (Dengue 1, 2, 3, 4) тодорхойлох урвалын эерэг хяналт болон Денгийн вирус бүх ийлдэс хэв (Dengue 1, 2, 3, 4) бүхий дээжинд 511bp бүхий толбо үүснэ. Денгийн вирусын ийлдэв хэв 1 бүхий дээжинд 482bp, Денгийн вирусын ийлдэв хэв 2 бүхий дээжинд 119bp, Денгийн вирусын ийлдэв хэв 3 бүхий дээжинд 290bp, Денгийн вирусын ийлдэв хэв 4 бүхий дээжинд 392bp бүхий хэмжээтэй толбо тус тус үүсэх ба сөрөг хяналтанд толбо үүсэхгүй.

#### 5.5.4. Чанарын хяналт:

- Эерэг хяналтанд денгийн чичрэг өвчний вирус, Денгийн вирусын ийлдэв хэв 1, 2, 3, 4 вирусын РНХ – г авна.
- Сөрөг хяналтанд нуклейн хүчил ялгах, Мастер микс бэлтгэх, ПГУ-ын өрөө тус бүрээс ариун нэрмэл ус юмуу TBE буфер авна.
- Олон улсын стандартад нийцсэн ISO-9001 сертификаттай бүтээгдэхүүнийг сонгож хэрэглэнэ.
- Урвалж, оношлуур, праймерын хадгалалтын горимыг чанд мөрдөх ба праймер, урвалж бодисын хүчинтэй хугацаанд байнга хяналт тавьна.

#### 5.6. Вирус өсгөвөрлөх шинжилгээ:

Денгийн чичрэг өвчний сэжигтэй болон эерэг дүн өгсөн шинжлэгдэхүүнийг эсийн өсгөвөрт халдаан эс эмгэгшүүлэн, ЦНУрвалаар таньцыг шалган, 2-3 удаа зорчуулан таньц өссөн үед вируст материалыг хураан авна. Вирус өсгөвөрлөх шинжилгээний давуу тал нь вирусийн эсрэгтөрөгчийн болон генетикийн хэв шинжийг тодорхойлох, шаардлагатай үед эмэнд мэдрэг чанарыг үнэлэх боломжийг олгодог. Денгийн чичрэг өвчний вирус нь сонгомлоор Vero E6 cell /Ногоон сармагчны бөөрний эпители эсээс гаралтай/, VHK 21 cell эсд үржин олшрох чадвартайг харгалзан уг эсд өсгөвөрлөдөг.

##### 5.6.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, тэжээлт орчин:

- Био-аюулгүйн кабинет II
- -70°C гүн хөлдөөгч
- Хөргөгч
- Термостат /CO<sub>2</sub> 5%/
- Хурилдуур 5000-10000 эрг/мин
- Инверт микроскоп
- Вакуум соруур
- Усан банн
- Dulbecco's modified Eagle medium
- 2% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) – 2%-ийн үхрийн хээлийн ийлдэс
- Трипсин- ЭДТА
- 100 mg penicillin /1 ml
- 100 mg streptomycin /1ml
- 100 mg gentomycin / 1 ml



- Дусаагуур 1-20мл
- Т-25см<sup>2</sup>, Т-75см<sup>2</sup> хэмжээтэй эсийн өсгөврийн сав /Флак /
- Автомат дусаагуур /25-50мл /
- Автомат дусаагуур 10-100мкл
- Ариун хошуу 10-100мкл
- 2 дахин нэрсэн ионгүйжүүлсэн ариун нэрмэл 500 мл
- Шилэн бөмбөлөг бүхий холигч
- Маркер
- Этанол 70<sup>0</sup>С
- Вирконы уусмал 1%

#### 5.6.2. Эмнэлзүйн сорьцийг халдаахад бэлтгэх

Денгийн чичрэг өвчнөөр нас барсан хүний эд эрхтнээс авсан /элэг, уушиг, сэрээ булчирхай, ясны чөмөг/ болон шумуулаас авсан сорьцонд боловсруулалт хийнэ. Үүнд:

- Эд эрхтний сорьцыг задлахын тулд шилэн бөмбөлөг бүхий холигч холино.
- 1мл/0,1мл-ээр гентомицин нэмнэ.
- 10000эрг/мин 5-10минут хурилдуурдан тундасны дээд хэсгээс авч халдаана.
- Үлдсэн хэсгийг 2 эппендорпд хуваан хийж, хаяглан -70<sup>0</sup>С –д хөлдөөнө.

#### 5.6.3. Шинжилгээний явц:

Бүрэн ургалттай (Эс өсгөвөрдөх зориулалтын фласкан дахь эсийн ургалт 10<sup>7</sup> (85%) дээш байх) Vero E6 эс бүхий Т-25см<sup>2</sup> фласканд ойролцоогоор 10<sup>7</sup> зэрэгт эс ургах бөгөөд өөр хэмжээтэй фласк хэрэглэвэл тэжээлийн эзлэхүүнийг тохируулна.

- Эсийн тэжээлийг асгаад, 2-4 мл фосфатийн буферийн уусмалаар 2 дахин зайлна.
- 5 мл Трипсин-ЭДТА хийж шугаман эсийн дээгүүр зөөлөн бүрхээж зайлаад дусаагуураар соруулан авна.
- Дахин 1 мл Трипсин-ЭДТА хийгээд 37 °С термостатанд 10-20 минут байлгана. Эсийг салгахын тулд фласкийг зайлах буюу зөөлөн цохиж болно.
- Трипсинийг саармагжуулахын тулд 1 мл үхрийн хээлийн ийлдэс нэмнэ.
- Эсийн өсгөврийн тэжээл 8 мл-ийг нэмж дусаагуураар соруулж гаргах маягаар эсийг нэг нэгээр нь салгаж цийдмэг бэлтгэнэ.
- 10 мл цийдмэгийг 10% үхрийн хээлийн ийлдэс байхаар эсийн өсгөвөрийн тэжээл нэмнэ. Энэ цийдмэгийн 1мл-т ойролцоогоор 10<sup>5</sup> эс байна.
- Тус бүрдээ 4 мл эсийн өсгөврийн тэжээл бүхий 3 ширхэг Т-25см<sup>2</sup> фласканд бэлтгэсэн эсийн цийдмэгээс 2, 2 мл-ийг нэмнэ.
- Үлдсэн 4 мл цийдмэгийг 20 мл эсийн тэжээл бүхий Т-75см<sup>2</sup> фласканд хийнэ.
- Фласкуудыг сайтар таглан 37<sup>0</sup> С термостатанд тавина.
- Эсийн ургалтыг Инверт микроскопоор (200х) өдөр бүр харж шалгана.

#### 5.6.4 Эсийн өсгөвөрт шинжлэгдэхүүн халдаах (Т25 см<sup>2</sup>)

Биоаюулгүйн II зэрэглэлийн кабинетэд хийж гүйцэтгэнэ.

1. Фласкийг тэмдэглэх

- Шинжлэгдэхүүний дугаар, сэлгүүлэлтийн тоо, халдаасан он, сар, өдөр
- Хяналтын флак дээр халдаасан он сар өдөр тэмдэглэнэ.

2. Эсийг халдаахад бэлтгэх

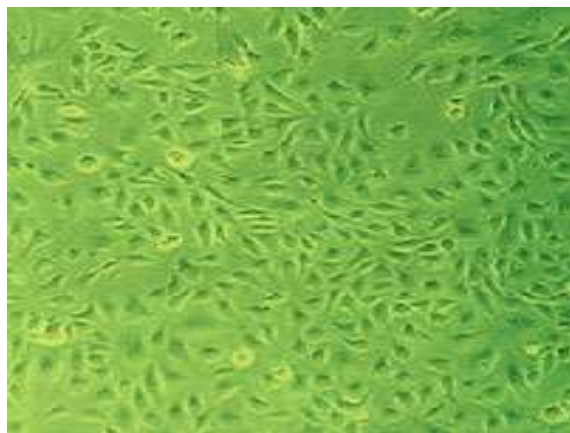
Сорьц халдаахаас өмнө эсийн өсгөврийг микроскопын 100 -200X өсгөлтөөр харж ургалт 80-100% болсон эсэхийг шалган тэмдэглэнэ.

- Эсийн өсгөврийн тэжээлийг асгана
- T25 см<sup>2</sup> фласкийг 5мл ариун фосфатийн буферийн уусмалаар 2 удаа зайлна./ФБУ-ыг эсрүү шууд хийж болохгүй/
- Вирус өсгөвөрлөх тэжээлээс 5мл хийж термостатанд 5-10 минут байлгана.

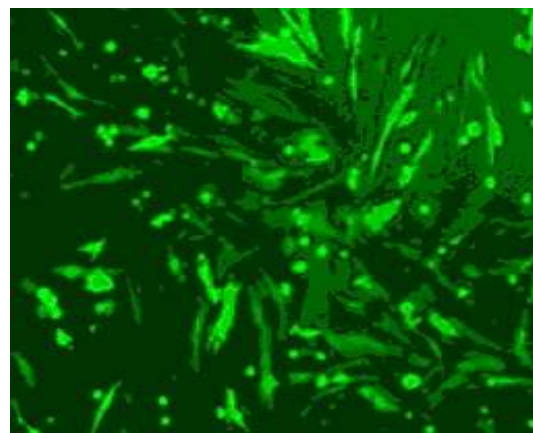
3. Шинжлэгдэхүүн халдаах

- 5 мл тэжээлийг флаксаас соруулж авна.
- Шинжлэгдэхүүнээс 0.2 мл авч дан үет эсийн дээгүүр урсгах маягаар хийж фласкийг бөглөн 35C<sup>0</sup>-т 30 минут байлгана.
- 1 флаксанд 6мл тэжээл хийхээр бодно
- ТРСК- трипсинээс 1мл-д 1 микролитр байхаар нэмнэ.
- Бэлтгэсэн тэжээлээс 6 мл-ээр шинжлэгдэхүүн халдаасан флаксуудад хийнэ.
- Фласкийг сайтар бөглөн 33-35<sup>0</sup> C дулаан тогтоогуурт тавина.
- Эс гэмтэх үйлдэл /ЭГҮ/-ийг микроскопт өдөр бүр ажиглан тэмдэглэнэ.

ДТУрвалаар



Зураг 2. Бүрэн ургалттай ВНК 21 эс (1x100)



Зураг 3. ВНК 21 халдварласан эсийн өсгөвөр (1x40)

*Шинжилгээний үр дүн:*

Халдварлагдсан эсийн өсгөврийн шингэнийг хураан дүгнэнэ.

- Эсийн 50-75% нь ЭГҮ-д орж хуурсан бол өсгөврийн шингэнийг хурааж 0.5% глицерол эсвэл үхрийн альбумин уураг нэмнэ.
- ЭГҮ илрэхгүй байсан ч 6-7 хоногийн дараа хураана.
- Хураасан эсийн өсгөврийн шингэнийг +4<sup>0</sup> C-д хадгалж цус наалдуулах урвал тавина. ЦНУрвал сөрөг бол дахин 2 удаа сэлгүүлэн халдаана.

- Шаардлагатай гэж үзвэл өсгөврийн шингэнийг 3000 эрг/мин хурдтай 5минут хурилдуурдан эсээс нь ялгана.
- ЦНУ эерэг өсгөвөрт ЦНСУрвалаар вирус ялган дүйх шинжилгээ хийнэ
- Вирусийн өсгөврийг 2 хоногийн дотор -70° С-д хадгална

*Чанарын хяналт:*

Эсийн өсгөвөрт хэрэглэгдэх оношлуур урвалж хадгалалтын горимыг мөрдөн ажиллахаас гадна халдвар хамгааллын дэглэм баримтлана.

**6.Илэрсэн үл тохирлыг залруулах ажиллагаа**

*Урвалд нөлөөлөх хүчин зүйл:*

- Соруурын тохируулгын алдаа
- Урвалын шингэнийг соруулж авах, юүлэх үед гарсан алдаа
- Урвалын хугацаа
- Урвалж бодисуудын идэвхи төвшрүүлэг
- Урвалж бодисуудын рН, урвалж бодисуудын хэмжээ эзлэхүүн
- Хавтангийн угаалгын тоо
- Урвалын хэм
- Урвалжуудын хэм
- Урвал унших шүүлтүүрийн гэрлийн дохионы урт
- Коньюгат, өнгө олгогчийн төрөл
- Шинжлэгчийн дадлагажсан байдал

*Ийлдэс судлалын шинжилгээ хийхэд гарах нийтлэг алдаа:*

- Коньюгат, бусад урвалжын шингэлэлт болон коньюгат өөр нэгдэлтэй харилцан үйлчилсэний улмаас хавтан бүхэлдээ жигд нэг өнгө үзүүлэх
- Бэхлэгч уусмалыг жигд бус хийсэнээс хавтангийн өнгө алаг цоог өгөх
- Аль нэг урвалжын шингэлэлт буруу, угаалтын техник алдаанаас өнгө хурдан, эсвэл удаан тодрох
- Оношлуурын зааварт заагдсан хэмээс бага хэмд инкубацлах

*Ийлдэс судлалын шинжилгээнд гарах нийтлэг алдааг шийдвэрлэх*

- Коньюгат, бусад урвалжуудын шингэрүүлэлтийг шалгах
- Коньюгат (өнгө илтгэгч, урвал зогсоогч, бусад урваж) хэмжээг шалган хавтанд жигд хийх, хавтангийн үүрэнд хошууг хүргэхгүй байх
- Угаалгыг зөв технологиор хийх дадал эзэмших
- Дадлага хийх

*Анхаарах зүйлс:*

- Урвал тавихын өмнө оношлуур урвалж, шинжлэх ийлдсийг тасалгааны хэмд 15-20 минут тавина
- Хэрэв ийлдэс нь үндсэн өнгөө алдсан, цусны хольцтой тохиолдолд үр дүнд нөлөөлөх тул шинжлэхгүй
- Ийлдсийг 3-аас илүү удаа гэсгээхгүй бөгөөд цуснаас ийлдэс ялгасны дараа ийлдсийг 3 хувааж -20 °С хэмд 1 сар, цаашид шингэн азот, -70 хэмд хадгална.

- Угаагч уусмалыг найруулахын өмнө талст үүссэн тохиолдолд 37°C хэмд талст үгүй болтол байлгасны дараа угаагч уусмалыг хавтанг угаахаас 10 минутын өмнө найруулсан байх шаардлагатай
- Урвалын хавтангийн уутыг зориулалтын хэсгээр онгойлгох, шаардлагатай хавтанг авсаны дараа амыг сайтар хаах, шаардлагатай бус бол олон удаа онгойлгохгүй байх
- Хавтангийн ёроолд хүрэхгүй байх, шүүлтүүр цаасан дээр тавих
- Анхлан тавьж байгаа тохиолдолд урвалж дусаахдаа үүр бүрд нэг хошуу ашиглах
- Урвалж бодис, угаагч уусмалыг хавтанд дусаахдаа хийн бөмбөлөг үүсгэхээс зайлсхийх
- Хавтангийн үүр бүрийг угаах хугацаанд анхаарах, угаасны дараа шүүлтүүр цаас ашиглан сайтар хуурайшуулах гэвч хавтанг хэтэрхий хатаахаас зайлсхийх
- Шинжилгээнд аль болох нэг удаагийн хошуу, шилэн сав ашиглах
- Лабораторийг үүсгэгчийн онцлогоос хамаарч зохих ариутгалын бодис ашиглан урьдчилан сайн ариутган бэлтгэсэн байх

--oOo--

## **Хавсралт**

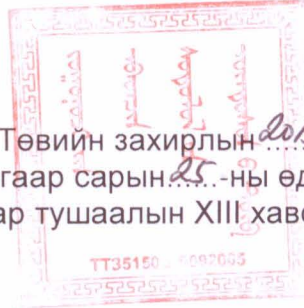
### Ашигласан ном, хэвлэл

- “Cell culture manual” WHO 2003
- “Фермент холбоот урвал, ДТУрвал тавих аргачлал зарчим” Ж.Бэх-Очир 2006
- Биобэлдмэл үйлдвэрлэлийн анхан шатны гарын авлага 2006
- П. Нямдаваа, Бүтээлийн товчоон, IV боть “Вирүс судлалын шинжилгээний аргууд” УБ, 2007
- “Халдварт өвчний эрт сэрэмжлүүлэх хариу арга хэмжээний тогтолцоо” 2007
- “Халдварт өвчний эрт сэрэмжлүүлэх хариу арга хэмжээний тогтолцоо” Лабораторийн оношлогооны протокол 2007
- Virus manual OIE 2008
- Байгалийн голомтот халдварт өвчний халдвар хамгааллын дэглэмийн заавар 2008
- Ц. Базарцэрэн, Б. Болдбаатар “Вирүс судлалын үндэс I-I боть” Улаанбаатар 2009 он
- Халдварт өвчний хяналтын лавлах 18 Улаанбаатар 2010
- Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control WHO 2009 Chapter 4 х 91-106

- **Dongmei Hu<sup>1</sup>, Biao Di<sup>2</sup>, Xixia Ding<sup>1</sup>, Yadi Wang<sup>1</sup>, Yue Chen<sup>1</sup>, Yuxian Pan<sup>1</sup>** “Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection” *Virology Journal* 2011, doi:10.1186/1743-422X-8-47
- Лабораторийн биоаюулгүй ажиллагааны гарын авлага 2010 Улаанбаатар
- Б. Ганбаатар Анагаах ухааны бичил амь судлал Улаанбаатар 2012
- Laboratory Guidance and Diagnostic Testing CDC 2012
- Criteria for the processing of dengue samples at the CDC Dengue Branch San Juan, Puerto Rico CDC Dengue Branch Division of Vector- Born Diseases 2010
- **Xiaofang Guo<sup>12</sup>, Qiumin Zhao<sup>1</sup>, Chao Wu<sup>2</sup>, Shuqing Zuo<sup>1</sup>** “First isolation of dengue virus from Lao PDR in a Chinese traveler” *Virology Journal* **2013** doi:10.1186/1743-422X-10-70
- QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (100) Catalog# 210212 цомгийн протокол. 2006
- QIA amp Viral RNA Mini Kit (50) Catalog# 52904 цомгийн протокол, 2005
- P. Philip Samuel B.K Tyagi Diagnostic methods for detection isolation of dengue viruses from vector mosquitoes May 2006, pp 615-628
- [http://www.virology.net/Big\\_Virology](http://www.virology.net/Big_Virology)
- [http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/TP47\\_anx5.pdf](http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/TP47_anx5.pdf)

### Товчилсон үгийн жагсаалт

дНТФ	дезоксинуклеотидтрифосфат
ДНХ	Дезоксирибонуклейн хүчил
РНХ	Рибонуклейн хүчил
ПГУ	Полимеразын гинжин урвал
УТ-ПГУ	Урвуу транскриптазын полимеразын гинжин урвал
rRNA	рибосомын РНХ
V	вольт
ELISA/ ФХУ	Фермент холбоот урвал
ДТУ	Дархан туяарах урвал
ЦНСУ	Цус наалдах саатуулах урвал
In vivo	Тахианы үр хөврөл
In vitro	Эсийн өсгөвөр
ББАЗ II	Бичил биетний аюулгүйн зэргийн ангилал II
BSLab III	Biosafety laboratory III
БАК II	Био- Аюулгүйн кабинет
BCC	Вирус саармагжуулах сорил
ЭГҮ	Эс гэмтээх үйлдэл
ВНК 21	Baby hamster kidney cell
BERO	African green monkey <i>Chlorocebus</i> kidney <i>epithelial</i> cell line


  
 Төвийн захирлын 2015 оны  
 06 дугаар сарын 25-ны өдрийн  
 944 дугаар тушаалын XIII хавсралт

**БӨӨРНИЙ ХАМ ШИНЖИТ ЦУСАРХАГ ЧИЧРЭГ ӨВЧНИЙ ЛАБОРАТОРИЙН ШИНЖИЛГЭЭНИЙ СТАНДАРТ АЖЛЫН ЗААВАР**

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Бөөрний хам шинжит цусархаг чичрэг өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 18
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- А98.5	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил
Зориулалт Бөөрний хам шинжит цусархаг чичрэг өвчний лабораторийн шинжилгээ, оношлогоо, судалгаа	
Хэрэглэх хүрээ: Вирус судлалын лабораторийн шинжилгээ, оношлогоо, судалгаанд	
Боловсруулсан: Б. Байгалмаа, Х.Тунгалаг Огноо: 2015 он	Баталсан, зөвшөөрсөн актын дугаар: ЗӨСҮТөвийн захирлын А/44 тоот тушаалын арван гуравдугаар хавсралт Огноо: 2015.06.25
Хэвлүүлсэн: Мэргэжлийн тусламжийн алба, Лавлагаа лабораторийн тасаг	

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Бөөрний хам шинжит цусархаг чичрэг өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 18
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- А98.5	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил

### 1. Зорилго, зарчим

Бөөрний хам шинжит цусархаг чичрэг (БХШЦЧ) өвчний үүсгэгчийг лабораторийн шинжилгээгээр тодорхойлж, эмнэлзүйн оношийг баталгаажуулахад оршино.

### 2. Хамрах хүрээ

Эмнэлзүйн сорьц, байгалийн голомтын хяналт, тандалтын шинжилгээ хийх эрх бүхий зооноз өвчин судлалын төвийн вирус судлалын BSL 2, BSL 3-р зэргийн лабораторит мөрдөгдөнө.

### 3. Тодорхойлолт

Бөөрний хам шинжит цусархаг чичрэг (БХШЦЧ) нь өндөр халууралт, ерөнхий хордлого, цусархаг хамшинж болон бөөрний гэмтлээр илэрдэг байгалын голомтот вирүсын шалтгаант цочмог халдварт өвчин. Бөөрний хам шинжит цусархаг чичрэг (БХШЦЧ) өвчний үүсгэгч *Hantaan* вирүс нь овог *Bunyaviridae*, төрөл *Hantavirus*, *Hanta* нь бөөрөнхий хэлбэртэй, 85-110нм голчтой, L, M, ба S дан гинжилсэн сегментэт 3 нуклеокапсид бүхий РНХ-тэй вирүс юм. Хантавирүс нь 4 ийлдэс хүрээтэй бөгөөд I хэв шинж нь Европ, Азид өргөн тархсан. Хантавирүс нь 4-20С° хэмд амьдрах чадвараа хадгална, амьдрах тохиромжтой орчин нь 37С° хэмийн шүлтлэг /рН 5>/ , +60С°-д 30 минут, -40С°-д 12 цаг амьдрах чадвартай, 2% содын гипохлорид, 70% этанол хлорамин, хлорын шохой, хлороформ, эфирт мэдрэг болно, амьтаны зэм, сэгэнд удаан хугацаагаар хадаглагддаг тул хлорамин болон хлорын шохойн уусмалаар халдваргүйтгэх шаардлагатай.

### 4. Сорьц цуглуулах хадгалах, тээвэрлэх

4.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, тэжээлт орчин

- -18 - 20 °С зөөврийн хөргөгч
- Сорьц зөөвөрлөх сав (Гадна талд нь биологийн аюултай гэсэн тэмдэг, “БИО-АЮУЛТАЙ ИЛГЭЭМЖ” гэсэн бичиг байна)
- Мөсөн элемент , хуурай мөс (пролон, хөвөн)
- Дюар шингэн азот (10 – 20 л )
- Мэрэгч барих хавх, занга
- Хурилдуур 1000-5000 эрг/мин
- Ариун сав (50, 80 мл)
- Улаан тагтай (red-top) tybe, (tiger top) тубе, Ягаан тагтай (violet –top with EDTA) (5-10 мл)
- RT-PCR оношлогоонд шар тагтай (yellow-top with citrate)- цитрат, ногоон тагтай (green-top with heparin) - гепаринтай тубе (5-10 мл)
- Ариун эргэдэг, дардаг тагтай сав /эппиндорф 1.5-2.0мл/
- Автомат дусаагуур /100-1000 мкл/
- Автомат дусаагуурын нэг удаагийн хошуу /200-1000мкл/
- Шилний харандаа
- Хайч

- Хямсаа
- Спиртэн дэн
- Ариутгасан хөвөн
- Чангалуур
- Шархны лент
- Этилийн спирт - 70%
- Вирконы уусмал 1%

#### 4.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл

- Лабораторийн дотоод халдвар тэмдэглэгдэж байсан ба мэрэгчдийн ялгадас, шээс, шүлс зэрэгт БХШЦЧ өвчний вирус агуулагддаг тул аюулгүй ажиллагааг хангах шаардлагатай.
- Халдварын сэжигтэй шинжлэгдэхүүнийг амьтанд халдаах, халдвартай амьтныг задлах ажиллагаа халдварын эрсдэл өндөртэй.
- Хүний эмнэл зүйн сорьц, мэрэгчдээс дээжилсэн шинжлэгдэхүүнийг II зэрэглэлийн биологийн аюулгүйн кабинетэд шинжилнэ.
- Вирус өсгөвөрлөх, туршилтын амьтан, дамжуулагчийн судалгааг III зэрэглэлийн биологийн аюулгүйн кабинетэд гүйцэтгэнэ.
- Хурдавчилсан сорил – ЗӨСҮТөв, аймаг, нийслэлийн ЗӨСТөвүүд (**BSL 2**)
- Ийлдэс судлал (ФХУ, ДТУ, Иммуноблотинг) – ЗӨСҮТөв, аймаг, нийслэлийн ЗӨСТөвүүд (**BSL 2**)
- Молекул биологи (УТ-ПГУ, ПГУ) - ЗӨСҮТөв (**BSL 2**)
- Вирус өсгөвөрлөх (in vivo, in vitro) - ЗӨСҮТөв (**BSL 3**)

#### Шинжлэгдэхүүнтэй ажиллахдаа дараахи зарчмуудыг баримтлан ажиллана.

- Аль ч ажилбарын үед шинжлэгдэхүүн агаар дуслын замаар халдварлаж болох тул аюулгүй ажиллагааны кабинетэд ажиллах
- Лабораторийн ажилтнууд тусгай хамгаалалтын хувцас (халат, малгай, хулдаасан хормогч, нүдний шил, бээлий, N95 амны хаалт) өмсөх шаардлагатай.
- Халдвартай материал цацагдахаас сэргийлэхийн тулд хурилдуурын ротор болон шинжлэгдэхүүнтэй хуруу шилийг таглах ба тагийг зөвхөн аюулгүй ажиллагааны кабинетэд онгойлгох
- Аюулгүй ажиллагааны кабинетын гадна ажиллахдаа халдвар үүсгэгчид санаандгүй өртөхөөс болгоомжлох
- Ажилласан талбай болон бохирдсон зүйлийг халдваргүйтгэх бодисоор /Этанол 70%, Виркон, Хлор агуулсан халдваргүйгэлийн уусмал/ арчиж цэвэрлэх
- Лабораторит орохыг зөвхөн төлөвлөгөөт ажлаа гүйцэтгэгч болон түүнд гардан туслах хүмүүст зөвшөөрөх

#### 4.3 Шинжлэх сорьцын төрөл

Оношлогоо	Шинжлэгдэхүүн	Хэмжээ	Лабораторийн шинжилгээн ий сонголт	Анхаарах зүйл	Шинж тэмдэг эхэлсэн ээс хойш
-----------	---------------	--------	------------------------------------	---------------	------------------------------



					сорьц авах хугацаа
<b>Эсрэгтөрөгч илрүүлэх</b>	- Нас барсан тохиолдолд (уушиг, элэг, дэлүү, зүрх, бөөрний эд)	Эрхтний хэрчим 3x3 см 5x5см	ФХУ ДТУ Вирус өсгөвөрлөх	Халдвар хамгаалын дэглэм баримтлан ажиллах	2-14 хоногт
	Шээс	50.0 мл			
	Цус	5-8 мл			
<b>Эсрэгбие хайх шинжилгээ (IgM, IgG)</b>	Ийлдэс, сийвэн	2 мл	ФХУ, ДТУ, Westren bloting	<i>Bunyaviridae</i> овог, Хантаан төрлийн вирусүүдийн хооронд эсрэгтөрөгчийн солбицол илэрдэг	7-14 хоногт
<b>Нуклейн хүчил илрүүлэх</b>	Нас барсан тохиолдолд (уушиг, элэг, дэлүү, зүрх, бөөрний эд)	Эрхтний хэрчим 3x3 см 5x5см	RT-PCR	Халдвар хамгаалын дэглэм баримтлан ажиллах	2-8 хоног
	Шээс	50.0 мл			
	Цус	5-8 мл			

Мэрэгч амьтдаас шинжлэгдэхүүн цуглуулах:

Хантавирус тээгч байж болох хээрийн хулгана (*Apodemus agrarius*), Азийн хулгана (*A.peninsulae*), бор саарал харх (*Rattus norvegicus*), үлийн цагаан огтоно (*Microtus branditi*) зэрэг мэрэгчдээс 3-4-р улиралд хавх, зангны тусламжтай барьж, цус, ийлдэс -4 °C-20 °C хэм, эдийн дээж (уушиг, бөөр, зүрх, дэлүү, элэг, өтгөн) шингэн азотод тус тус тээвэрлэн вирус судлалын лабораторид хүргэнэ.

**4.3.1 Сорьцод боловсруулалт хийх**

Оношлуурын зааварт заагдсны дагуу шинжлэх сорьцонд боловсруулалт хийгдэнэ

- ФХУ-д улаан эсийн задрал болсон, липид ихтэй, олон удаа хөлдөөж гэсгээсэн ийлдсийг шинжлэхгүй
- Цусны ийлдэс /сийвэн/ аль болохоор шинэхэн байх ба 2-8°C-д 5 хоног хадгалсан эсвэл хасах /-20°C/-д 2 сараас дээшгүй хугацаагаар хадгалсан байх
- Тунадас агуулсан ийлдэс буруу үр дүн өгч болох тул шинжлэхийн өмнө 1500-2000 мянга эр/мин-ын хурдаар 5-10 минут хурилдуурдах
- Цомгийн иж бүрдлийг шинжилгээ эхлэхээс 30 минутын өмнө тасалгааны хэмд байлгах

- Иммуноблотинг урвалд шинжлэх ийлдсийг /1:100/ шингэлэлтээр буюу эппиндорфын хуруу шилэнд 15 мкл ийлдэс хийж дээр нь 1,5 мл универсал уусмал (Universal solution) нэмж дахин 5 минут холино.

*Эмнэлзүйн сорьцийг эсэд халдаахад бэлтгэх:*

БХШЦХ өвчнөөр нас барсан хүний эд эрхтнээс дээжилсэн сорьц /уушиг, бөөр, шээс/болон мэрэгч амьтдаас дээжилсэн сорьцонд боловсруулалт хийнэ. Үүнд:

- Эд эрхтний сорьцыг задлахын тулд шилэн бөмбөлөг бүхий холигч дээр холино.
- 1мл/0,1мл-ээр гентамицин нэмнэ.
- 10000 эрг/мин 5-10минут хурилдуурдан тундасны дээд хэсгээс авч халдаана.
- Үлдсэн хэсгийг 2 эппендорпд хуваан хийж, хаяглан -70°C –д хөлдөөнө.

#### 4.3.2 Сорьцийг хадгалах

БХШЦЧ өвчний сэжигтэй өвчтнөөс цусны ийлдэс, сийвэн, шээс, нас барсан тохиолдолд эдийн сорьц (элэг, уушиг, дэлүү, зүрх, бөөр) авна. Сорьцыг 24 цаг дотор (2-8 °C), 2 сар - (-20°C), 3 сараас дээш хадгалах тохиолдолд (-70 °C) хэмд эсвэл шингэн азот бүхий дьюарт хадгална.

## 5. Шинжилгээний аргачлал

### 5.1 Шинжилгээний дараалал



Шинжилгээний төрөл:

Оношлогоо	Халдварын хурц үед	Үр дүн үзүүлэх хугацаа	Сорьц	Оношлогооны критер
Вирус өсгөвөрлөх, ийлдэс хүрээг ялгах	батлах	1-2 долоо хоног	- цус, ийлдэс	Эсд өсгөвөрлөх, ДТУ, Молекул биологийн шинжилгээг BSL/2, BSL/3 лабораторид гүйцэтгэнэ
			- Элэг дэлүү, уушиг, зүрх, бөөрний эд шээс	
			- шумуулын булинга	
			- цус, ийлдэс шээс	
Нуклейн хүчил илрүүлэх	батлах	2 хоног	- Элэг дэлүү, уушиг, зүрх, бөөрний эд	Молекул биологийн шинжилгээг BSL/2- т гүйцэтгэнэ.
			- шумуул	
			- цус, ийлдэс шээс	
Эсрэгтөрөгч илрүүлэх	тандалт	1-2 хоног	- ийлдэс	ELISA BSL/2
	батлах	>1 хоног	- иммухимийн эд	Гистологи BSL/2
IgM ELISA	магадгүй	1-2 хоног	- цус - ийлдэс	ELISA BSL/2
IgM Rapid test		30 мин		Rapid test BSL/2
IgG (хос ийлдэс) ELISA	батлах	>7 хоног	- цус - ийлдэс	ELISA, Иммуноблотинг BSL/2 лабораторид гүйцэтгэнэ.
Нуклейн хүчил илрүүлэх	батлах	-	- Мэрэгчийн цус, ийлдэс элэг дэлүү, уушиг, зүрх, бөөрний эд, өтгөн	Молекул биологийн шинжилгээг BSL/2- т гүйцэтгэнэ.
Эсрэгтөрөгч илрүүлэх	тандалт	-	-	ELISA BSL/2

5.2 Ийлдэс судлалын шинжилгээ

5.2.1 Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, оношлуурууд

- БАК II А,В (аль нэг нь)
- ELISA reader
- Дархан туяаралт бичил харуур
- Hanta virus IgM, IgG Rapid test (Hanta вирус Eurasia төрөлийн эсрэгтөрөгч бичил хавтангийн үүрэнд суулгасан)
- Anti Hanta Virus Pool 1 (Eurasia) ELISA IgM, IgG (Hanta вирус L эсрэгтөрөгч type I – ийг цэвэршүүлэн хавтангийн үүрэнд суулгасан)
- IIFT 'Hanta viruses Mosaic 1' Hantaan, Sin Nombre, Seoul, Saaremaa, Puumala, Dobrava /IgM, IgG/ (1-3-т Hantaan, Sin Nombre, Seoul вирус, 4-6-д Saaremaa,

Puumala, Dobrava вирус төрлүүдийг тус тус бичил хавтангийн үүрэнд суулгасан)

- Hanta Virus IgM, IgG Westren blotting
- Холигч /Vortex/
- Дулаан тогтоогуур 37 °C/±3°C/
- Хурилдуур 1000-5000 эрг/мин
- Фосфатийн буферийн уусмал рН-7,2
- Нэрмэл ус /давхар нэрсэн, ионгүйжүүлсэн, ариун/
- Автомат дусаагуур /100-1000 мкл, 20-200мкл, 2-20 мкл /
- Олон сувагт автомат дусаагуур /8-12сувагтай/
- Автомат дусаагуурын нэг удаагийн хошуу /2-20мкл, 20-200мкл, 200-1000мкл/
- 20, 40, 100, 250,500, 1000мл хэмжүүр бүхий шилэн сав
- Бүрхүүл шил
- Ариун завь
- Шүүгч цаас
- Цаг
- Шилний харандаа
- Вирконы уусмал 1%
- Этилийн спирт - 70%

### 5.3.2 Ийлдэс судлалын шинжилгээ

#### 5.3.2.1 Хурдавчилсан сорил:

Оношлуурын зааврын дагуу хэрэглэнэ.



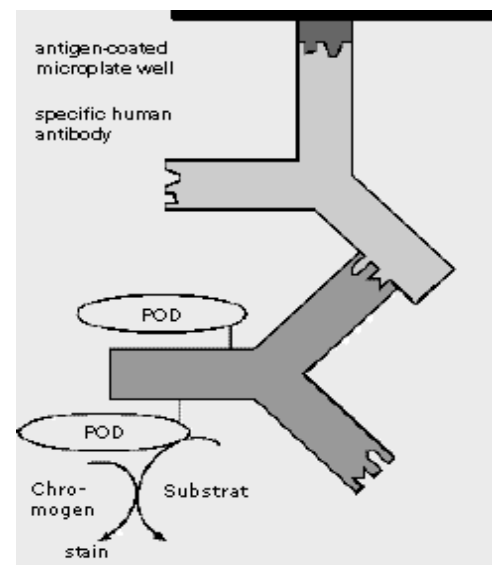
Зураг 1

#### 5.3.2.2 Фермент холбоот урвал / ФХУ/

Бөөрний хам шинжит цусархаг чичрэг өвчний халдварын сэжигтэй хүний ийлдсийг шинжлэх зориулалттай ФХУ-ын цомгийг зааврын дагуу хэрэглэж, дүгнэнэ.

Урвалын зарчим

- Эсрэгтөрөгч бэхлэгдэх шат
- Шинжилж буй дээжинд агуулагдах өвөрмөц эсрэгбиеийг нэмэх шат



- Эсрэгтөрөгч, өвөрмөц эсрэгбиеийн хооронд урвал явагдах шат
- Эсрэг эсрэгбиетэй холбосон фермент буюу конъюгатыг нэмэх шат
- Эсрэгтөрөгч, эсрэгбие, конъюгатын хооронд урвал явагдан комплекс үүсэх шат /сөрөг дээжинд ийм комплекс үүсэхгүй/
- Өнгө олгогч системийг нэмэхэд эерэг урвалд өнгө үүсч, харин сөрөг урвалд өнгө үүсэхгүй
- Зогсоох уусмал нэмснээр эерэг урвалын өнгө өөрчлөгдөн урвал цаашид явагдахгүй.

#### 5.3.2.2.1 Чанарын хяналт

Сөрөг (K<sup>-</sup>) шалгуурын үзүүлэлт 0,8 о.е-ээс ихгүй

Эерэг (K<sup>+</sup>)шалгуурын үзүүлэлт 1.5-3.0 их үед л урвалын дүнг тооцно.

#### 5.3.2.2.2 Шинжилгээний хариуг дүгнэх

Гэрэл шингээлтийг 450 нм долгионы уртад уншуулна. Урвалын дүнг спектофотометрийн долгионы 450 нм урт дээр Гэрлийн хугарлын нягт /ГХН/-ыг хэмжиж тодорхойлно. Тухайн цомгийн зааврын дагуу дүгнэнэ.

**/Index value = Cut off calibrator/ сорьц ГХН/**

ГХН-Гэрлийн хугарлын нягт

#### 5.3.2.3 Дархан туяарах урвал /ДТУ/

Бөөрний хам шинжит цусархаг чичрэг өвчний халдварын сэжигтэй хүний ийлдсийг шинжлэх зориулалттай ДТУ-ын цомгийг зааврын дагуу хэрэглэж, дүгнэнэ.

*Урвалын зарчим*

**Бэлтгэл ажил :**

Урвалын самбараа шалга: Самбарын гадна тал ус нэвчсэн болон гоожсон эсэхийг шалгаад, хэрэв норсон бол чийгтэй алчуур болон угаалгийн нунтаг бүхий уусмалаар арчин халдваргүйтгэх хэрэгтэй. Тусдаа салангид уутанд байгаа хавтанг тасалгаанд байлгасаны дараа нээнэ. Бичил хавтанд хүрч болохгүй. Бичил хавтан дээрхи тэмдэглэгдсэн талбай нь маш мэдрэг тул онцгой анхаарч, сэвтээхээс болгоомжил. Тэмдэглэгээг шилний харандаагаар хийнэ.

**Урвал дүгнэх**

Иммунофлюоресцентийн 40X объективаар харж, гэрэлтэлтийн эрчмээр дүгнэнэ. \Зураг 2-5\

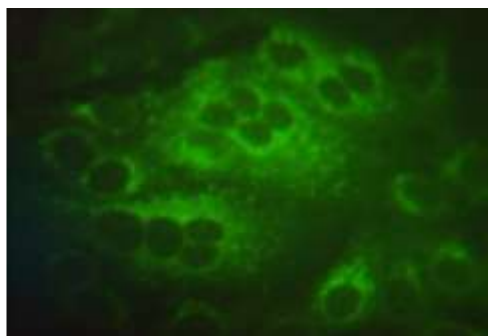
Субстрат	Сорьц шингэлэлт		Үнэлгээ		
	Стандарт	Зөвлөсөн	Сөрөг		Эерэг
Hantaan IgM, IgG	1:10	1:10	Гэрэлтэх эрчим /-/		Гэрэлтэх эрчим сул, хүчтэй
Sin Nombre IgM, IgG	1:10	1:10	Гэрэлтэх эрчим /-/		Гэрэлтэх эрчим сул, хүчтэй
Puumala IgM, IgG	1:10	1:10	Гэрэлтэх эрчим /-/		Гэрэлтэх эрчим сул, хүчтэй
Dobrava IgM, IgG	1:10	1:10	Гэрэлтэх эрчим /-/		Гэрэлтэх эрчим сул, хүчтэй
Seoul IgM, IgG	1:10	1:10	Гэрэлтэх эрчим /-/		Гэрэлтэх эрчим сул, хүчтэй
Saaremaa IgM, IgG	1:10	1:10	Гэрэлтэх эрчим /-/		Гэрэлтэх эрчим сул, хүчтэй

### 5.3.2.3.3 Шинжилгээний хариуг дүгнэх

Гэрэлтэх эрчим				Эсрэгбиеийн таньц
1:10	1:100	1:1000	1:10000	
Сул	-	-	-	1:10
Дунд	-	-	-	1:32
Хүчтэй	Сул	-	-	1:100
Хүчтэй	Дунд	-	-	1:320
Хүчтэй	Хүчтэй	Сул	-	1:1000
Хүчтэй	Хүчтэй	Дунд	-	1:3200
Хүчтэй	Хүчтэй	Хүчтэй	Сул	1:10000

#### 5.3.2.3.2 Чанарын хяналт:

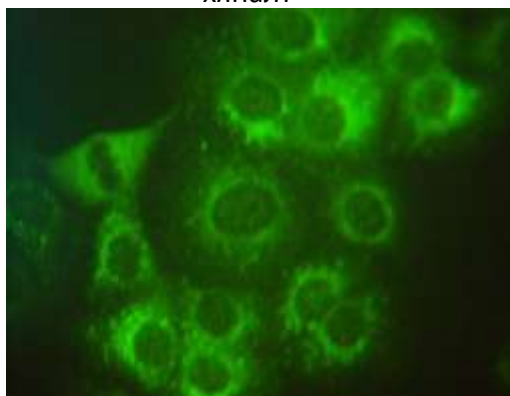
Оношлуур урвалжийн хадгалалтын горимыг чанд мөрдөнө. Урвалж бодисын хүчинтэй хугацаанд хяналт тавина.



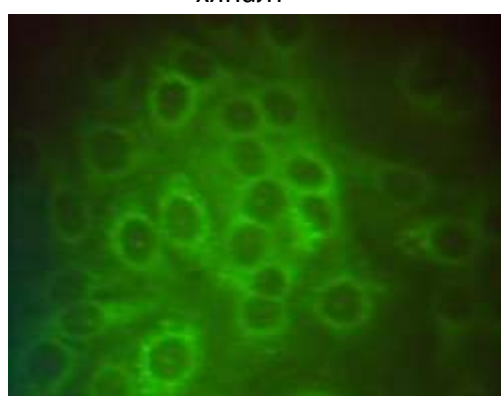
Зураг 2 Ханта вирус эерэг хяналт



Зураг 3 Ханта вирус сөрөг хяналт



Зураг 4 Hanta вирус эерэг дүн 40x өсгөлт



Зураг 5 Seoul вирус эерэг дүн 40x өсгөлт

### 5.3.2.4 Иммуноблотингийн урвал

Иммуноблотингийн урвал тавих явц

1. Шинжилгээ эхлэхээс 60 минутын өмнө цомгийг хөргөгчнөөс гарган тасалгааны хэмд тавина.
2. Блотинг хийх танкны үүр бүрт 2 мл Универсал уусмал (Universal solution) хийнэ.

3. Шинжилж буй шинжлэгдэхүүний тоо, эерэг, сөрөг шалгуурыг оролцуулан тооцож WB strip-ийг (антиген агуулсан зурвас) блотинг хийх универсал уусмалтай танкны үүр тус бүрд хийнэ. WB strip нь универсал уусмалд сайн дүрэгдсэн байх ёстой бөгөөд танкыг тасалгааны хэмд сэгсрэгч дээр 10 минут тавина.
4. Үүний дараа танкнаас универсал уусмалыг асгана.
5. Танкны үүр тус бүрт 1,5 мл урьдчилан шингэлсэн ийлдэс болон эерэг, сөрөг шалгууруудыг хийж, сэгсрэгч дээр 1 цаг тасалгааны хэмд тавина. (эерэг, сөрөг шалгууруудыг шингэлэхгүйгээр хэрэглэнэ.)
6. Хугацаа дууссаны дараа танкнаас ийлдсийг асгана.
7. Сэгсрэгч дээр танкны үүр тус бүрийг 1 удаад 1,5 мл универсал уусмалаар 5 минутын турш нийт 3 удаа угаана.
8. Танкны үүр бүрийг угаасны дараа универсал уусмалыг асгаж, урвал тавьсан бүх үүрэнд конъюгатын уусмалаас 1,5 мл-ийг хийж сэгсрэгч дээр тасалгааны хэмд 30 минут тавина.
9. Хугацаа дууссаны дараа танкнаас конъюгатыг асгана.
10. Сэгсрэгч дээр танкны үүр тус бүрийг 1 удаад 1,5 мл универсал уусмалаар 5 минутын турш нийт 3 удаа угаана.
11. Танкны үүр бүрийг угаасны дараа универсал уусмалыг асгаж, урвал тавьсан бүх үүрэнд субстратын уусмалаас 1,5 мл-ийг хийж сэгсрэгч дээр тасалгааны хэмд 15 минут тавина.
12. Хугацаа дууссаны дараа танкнаас субстратыг асгаж сэгсрэгч дээр WB strip бүрийг 1 удаад 2 мл ариун нэрмэл усаар 5 минутын турш нийт 2 удаа угаана.
13. WB strip бүрийг танкнаас гаргаж, transparent self-adhesive folio (толбо буулгагч цаас) дээр тавина. Илүүдэл шингэнийг шүүгч цаасанд шингээж авна.



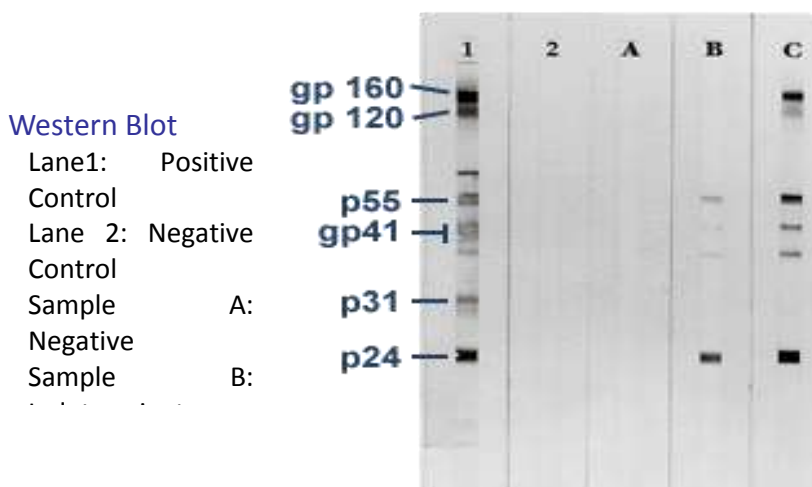
Өвөрмөц толбуудыг үнэлэх		Өвөрмөц эсрэгтөрөгчийн толбууд:			
		2-оос дээш хүчтэй толбо	2 хүчтэй толбо	1 хүчтэй, 2 сул толбо	толбо үүсээгүй эсвэл 1 сул толбо
Дүн	хүчтэй	эерэг	эерэг	эерэг	эргэлзээтэй
	сул	эерэг	эерэг	эргэлзээтэй	сөрөг
	толбо үүсгээгүй	эерэг	эргэлзээтэй	сөрөг	сөрөг

#### 5.3.2.4.1 Чанарын хяналт:

Оношлуур урвалжийн хадгалалтын горимыг чанд мөрдөнө. Урвалж бодисын хүчинтэй хугацаанд хяналт тавина.

### 5.3.2.4.3 Шинжилгээний хариуг дүгнэх:

Урвалын үр дүнг нүдээр харж болох ба мөн компьютерийн программ хангамжийн тусламжтайгаар үнэлнэ. \Зураг 6\



Зураг 6

## 5.4 Молекул-биологийн оношилгоо

### 5.4.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл, урвалж бодис

**Тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл:** Биоаюулгүйн 2-р зэрэглэлийн кабинет, ПГУ-ын олшруулагч машин, дулаан тогтоогуур, -20-80°C гүн хөлдөөгч, бичил хурилдуур, хүчдэл тохируулагч, электрофорезийн аппарат, холигч, гель хайлуулагч, электрон жин, ПГУ-ын үр дүнг хэт ягаан туяаны тусламжтайгаар дүрслэн харж дүгнэх систем, нэг удаагийн бээлий, РНХ/ДНХ –гүйжүүлсэн эппендорфийн хуруу шил /1,5-2 мл, 0,2 мл, 0,5мл/, эппендорфийн хуруу шилний тавиур, автомат дусаагуур, фильтртэй ариун хошуу /20-200мкл, 1000мкл, 0,5-10мкл, 2-20мкл/, шилний харандаа, хаягдал хийх сав

**Урвалж: РНХ ялгах ажиллагаанд:** Trizol, изоамилийн спирт, 96%, 70% этилийн спирт, давхар нэрсэн ус, фосфатын буферийн уусмал рН-7,2, фирмийн РНХ ялгах цомгийн бүрэлдэхүүн, 1%-ийн вирконы уусмал

**УТ-ПГУ-д:** УТ-ПГУ-ын цомгийн бүрэлдэхүүн, өвөрмөц праймер, ионгүйжүүлсэн ус, ДНХ-ийн молекул жингийн маркер, хуурай мөс, РНХ – гүйжүүлэгч (RNA AWAY WIPES)

Бөөрний хам шинжит цусархаг чичрэг өвчний үүсгэгчийн РНХ илрүүлэх өвөрмөц праймерийн дараалал

Бай ген		Праймерын нэр	Праймерийн дараалал (5` - 3`)	Молекул жин (bp)
Hantaavirusын М сегмент	Үүрэн ПГУ	HTM1F	AAA GTA GGT GTT AYA TCY TTA CAA TGT GG	455bp
		HTM1R	GTA CAT CCT GTR CCT ACC CC	
		HTM2F	GAA TCG ATA CTG TGG GCT GCA AGT GC	383bp
		HTM2R	GGA TTA GAA CCC CAG CTC GTC TC	
Seoul вирусын М		SEM2F	GTG GAC TCT TCT TCT CAT TAT T	418bp



сегмент	SEM2R	TGG GCA ATC TGG GGG GTT GCA TG	
	Si1 (Hantaan_F)	CACCAGACCGTTGTCCACCAACATG	1000bp
	Sa2 (Hantaan_R)	TTCAAAGGCTCTTGGTTGGAGATTTC	

Агарозын гель электрофорезэд: Трис-боратын буфер pH=8.3 (5xTBE) (89 мМ Трис, 89 мМ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2мМ ЭДТА), 1xTBE (5x буфер 100 мл, нэрсэн ус 400 мл), 1.5% агароз гель, этидиум бромидын 0,001%-ийн уусмал (250 мл нэрсэн усанд 2,5 мг этидиум бромид)

#### 5.4.2. Молекул биологийн шинжилгээ:

##### РНХ-г ялгах ажиллагаа

##### Trizol ашиглан РНХ ялгах:

- Дээжинд боловсруулат хийнэ. Эд: 1мл TRIZOL урвалжинд 50-100МБТ эд авч нухна. Шинжлэгдэхүүний хэмжээ TRIZOL урвалжийн 10%-иас хэтрэхгүй байх ёстой. *Нэг давхрагат эсийн ургалт:* Нэг давхаргат эсийг хөргөсөн PBS-ээр угаана. Эсийн өсгөврийн саванд савны 3.5см диаметр бүрт 1мл TRIZOL урвалж нэмж, эс хусагчаар хусна. Эсийн лизатыг дусаагуураар хэд хэдэн сайтар удаа холино. *Суспензэд өсгөвөрлөсөн эс:* Эсийн өсгөврийг хурилдуурдана. Шингэн орчныг асгаж, хөргөсөн ФБУ-д булингална. 300 эрг/мин хурдаар 5 минут хурилдуурдаж, эсийг тунгаана. 5-10 x 10<sup>6</sup> эс бүрт 1 мл TRIZOL урвалж нэмнэ.
- *Ажилбар:* TRIZOL урвалжинд гомогиназ болгосон дээжнүүдийг нуклей уургууд бүрэн задартал өрөөний хэмд 5 минут байлгана. Эсийн задарсан хэсгийг хурилдуурдаж тунгаана. Супернатантыг шинэ хуруу шилэнд зөөж хийнэ.
- 1мл TRIZOL урвалжинд 0.2мл хлорформ тооцож нэмнэ. Дээжний тагийг сайтар таглаад 15 секунд холиод өрөөний хэмд 2-3 минут байлгана. 2-8°C-д 12000 эрг/мин-аас ихгүй хурдаар 15 минут хурилдуурдана. Хурилдуурдсаны дараа доод хэсэгт фенол:хлорформ бүхий улаан давхрага, дээд хэсэгт өнгөгүй усан давхрага үүснэ. РНХ нь зөвхөн өнгөгүй усан хэсэгт үлддэг тул энэ хэсгийг маш болгоомжтой соруулан авч, хаяг бүхий шинэ хуруу шилэнд хийнэ.
- Соруулж авсан шингэнийг хэмжих ба энэ нь гомогиназ хийсэн TRIZOL урвалжийн 60 орчим хувь нь байдаг. Изопропил спирт ашиглан усан шингэнээс РНХ-г тунадасжуулдаг. 1мл TRIZOL урвалж бүрт 0.5мл изопропил спирт нэмж, 15-30°C-д 10 минут байлгаж, 2-4°C-д 12000 эрг/мин-аас ихгүй хурдаар 10 минут хурилдуурдана. Тунадасжуулсан РНХ нь хуруу шилний ёроол болон хананд харагдахгүй.
- Хурилдуурдсан супернатантыг бүрэн асгана. РНХ-ийн мөхлөгийг 1мл TRIZOL урвалж бүрт 1мл 75%-ийн этанол нэмж нэг удаа угаана. Дээжийг холигчоор холиж, 2-8°C-д 7500 эрг/мин-аас ихгүй хурдаар 5 минут хурилдуурдана. Дээрх угаалтыг дахин нэг удаа давтах ба үлдэгдэл этанолийг бүгдийг асгана.
- РНХ-ийн мөхлөгийг 5-10 минут агаарт юмуу вакуумдан хатаана. РНХ-г DEPC усанд уусгана.
- 39 мкл DEPC усанд 1 мкл РНХ уусгаж (1:40), спектрофотометрийн анализ хийнэ. 10 мкл-ийн микрокувет хэрэглэж буй үед, 260, 280 нм-т 1 OD тавина.  $A_{260}/A_{280}$  үнэлгээ нь 1.6-аас дээш байх ёстой.

*РНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан РНХ ялгах:*

Цус, эдээс РНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан сорьцноос РНХ ялгаж болох ба үйлдвэрлэгчийн дагалдуулсан зааврын дагуу ялгана.

*УТ-ПГУ тавих:*

УТ-ПГУ-ын холимгийг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу бэлтгэнэ. Hantaа вирусын М сегмент тодорхойлох УТ-ПГУ-ыг НТМ1F/НТМ1R **праймераар:** 45° хэмд 35 минут, 95° хэмд 5 минут, 35 цикл (94° хэмд 30 сек, 56° хэмд 30 сек, 72° хэмд 30 сек), 72° хэмд 10 минутаар; үүрэн ПГУ-г НТМ2F/НТМ2R **праймераар** 95° хэмд 5 минут, 35 цикл (94° хэмд 30 сек, 52° хэмд 30 сек, 72° хэмд 30 сек), 72° хэмд 10 минутаар тус тус гүйцэтгэнэ.

Seoul вирусын М сегмент тодорхойлох УТ-ПГУ-ыг SEM2F/SEM2R **праймераар:** 45° хэмд 35 минут, 95° хэмд 5 минут, 35 цикл (94° хэмд 30 сек, 52° хэмд 30 сек, 72° хэмд 30 сек), 72° хэмд 10 минутаар тус тус гүйцэтгэнэ.

*Гель электрофорез тавих:*

1.5%-ийн агароз гель бэлтгэж, 1µg/ml этидиум бромид нэмж электрофорезийн аппаратанд цутган зохих саамаа байрлуулж царцаана.

УТ-ПГУ бүтээгдэхүүн тус бүрээс 8-10 мкл соруулан авч, 3 мкл хүндрүүлэгч уусмалтай холин 1,5%-ийн агарозийн гелийн үүрэнд хийнэ. 100х.н ДНХ стандарт жишигчээс 8мкл соруулан гелийн нөгөө үүрэнд хийнэ. 1х Трис-боратын буфер ашиглан 100 вольт хүчдэлээр 30 минут электрофорез тавина.

5.4.3. Шинжилгээний үр дүнг дүгнэх:

Электрофорез дууссаны дараа гель детекцийн аппарат DijiDoc-It Image System ашиглан үр дүнг авна. Ханта вирусын М сегмент тодорхойлох урвалын эерэг хяналт болон эерэг дээжинд 455bp (НТМ1F/НТМ1R), 383bp (НТМ2F/НТМ2R), Seoul вирусын М сегмент тодорхойлох урвалын эерэг хяналт болон эерэг дээжинд 418bp (SEM2F/SEM2R) бүхий толбо тус тус үүснэ.

5.4.4. Чанарын хяналт:

- Эерэг хяналтанд хантавирусын РНХ – г авна.
- Сөрөг хяналтанд нуклейн хүчил ялгах, Мастер микс бэлтгэх, ПГУ-ын өрөө тус бүрээс ариун нэрмэл ус юмуу ТВЕ буфер авна.
- Олон улсын стандартад нийцсэн ISO-9001 сертификаттай бүтээгдэхүүнийг сонгож хэрэглэнэ.
- Урвалж, оношлуур, праймерын хадгалалтын горимыг чанд мөрдөх ба праймер, урвалж бодисын хүчинтэй хугацаанд байнга хяналт тавьна.

**5.5. Вирус өсгөвөрлөх шинжилгээ**

БХШЦЧ өвчний сэжигтэй болон эерэг дүн өгсөн шинжлэгдэхүүнийг эсийн өсгөвөрт халдаан эс эмгэгшүүлэн, ДТУ, УТ-ПГУрвалаар таньцыг шалган, 2-3 удаа зорчуулан таньц өссөн үед вирүст материалыг хураан авна. Вирус өсгөвөрлөх шинжилгээний давуу тал нь вирүсийн эсрэгтөрөгчийн болон генетикийн хэв шинжийг тодохойлох, шаардлагатай үед эмэнд мэдрэг чанарыг үнэлэх боломжийг олгодог. БХШЦЧ өвчний вирүс нь сонгомлоор Vero E6 cell /Ногоон сармагчны бөөрний эпители эсээс гаралтай/ эсд үржин олшрох чадвартайг харгалзан уг эсд өсгөвөрлөдөг.

5.5.1 *Шаардлагатай, тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, тэжээлт орчин*

- Биоаюулгүйн кабинет II
- -20-80°C гүн хөлдөөгч
- Хөргөгч

- Термостат /CO<sub>2</sub> 5%/
- Хурилдуур 5000-10000 эрг/мин
- Инверт микроскоп
- Вакуум соруур
- Усан банн
- Dulbecco's modified Eagle medium
- 2% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) – 2%-ийн үхрийн хээлийн ийлдэс
- Трипсин- ЭДТА
- 100 mg penicillin, streptomycin /1 ml
- Дусаагуур 1-20мл
- Т-25см<sup>2</sup>, Т-75см<sup>2</sup> хэмжээтэй эсийн өсгөврийн сав /Фласк /
- Автомат дусаагуур /25-50мл /
- Автомат дусаагуур /8-12 сувагтай/
- Автомат дусаагуур 10-100мкл
- Ариун хошуу 10-100мкл
- Ариун завь
- Этанол
- Вирконы уусмал 1%
- Маркер

#### 5.5.2 Эс өсгөвөрлөх

Шинжилгээний явц:

Бүрэн ургалттай Vero E6 эс бүхий Т-25см<sup>2</sup> фласканд ойролцоогоор 10<sup>7</sup> зэрэгт эс ургах бөгөөд өөр хэмжээтэй фласк хэрэглэвэл тэжээлийн эзлэхүүнийг тохируулна.

- Эсийн тэжээлийг асгаад, 2-4 мл фосфатийн буферийн уусмалаар 2 дахин зайлна.
- 5 мл Трипсин-ЭДТА хийж шугаман эсийн дээгүүр зөөлөн бүрхээж зайлаад дусаагуураар соруулан авна.
- Дахин 1 мл Трипсин-ЭДТА хийгээд 37 °С термостатанд 10-20 минут байлгана. Эсийг салгахын тулд фласкийг зайлах буюу зөөлөн цохиж болно.
- Трипсинийг саармагжуулахын тулд 1 мл үхрийн хээлийн ийлдэс нэмнэ.
- Эсийн өсгөврийн тэжээл 8 мл-ийг нэмж дусаагуураар соруулж гаргах маягаар эсийг нэг нэгээр нь салгаж суспенз бэлтгэнэ.  
10 мл цийдмэгийг 10% үхрийн хээлийн ийлдэс байхаар эсийн өсгөвөрийн тэжээл нэмнэ. Энэ цийдмэгийн 1мл-т ойролцоогоор 10<sup>5</sup> эс байна.
- Тус бүрдээ 4 мл эсийн өсгөврийн тэжээл бүхий 3 ширхэг Т-25см<sup>2</sup> фласканд бэлтгэсэн эсийн цийдмэгээс 2, 2 мл-ийг нэмнэ.
- Үлдсэн 4 мл цийдмэгийг 20 мл эсийн тэжээл бүхий Т-75см<sup>2</sup> фласканд хийнэ.
- Фласкуудыг сайтар таглан 37° С термостатанд тавина.
- Эсийн ургалтыг Инверт микроскопоор өдөр бүр



харж шалгана.

### **Эсийн өсгөвөрт шинжлэгдэхүүн халдаах (T25 см<sup>2</sup>)**

Биоаюулгүйн II зэрэглэлийн кабинетэд хийж гүйцэтгэнэ.

#### 1. Фласкийг тэмдэглэх

- Шинжлэгдэхүүний дугаар, сэлгүүлэлтийн тоо, халдаасан он, сар, өдөр
- Хяналтын фласк дээр халдаасан он сар өдөр тэмдэглэнэ.

#### 2. Эсийг халдаахад бэлтгэх

Сорьц халдаахаас өмнө эсийн өсгөвөрийг микроскопын 40X өсгөлтөөр харж ургалт 75-100% болсон эсэхийг шалган тэмдэглэнэ.

- Эсийн өсгөврийн тэжээлийг асгана
- T25 см<sup>2</sup> фласкийг 5мл ариун фосфатийн буферийн уусмалаар 2 удаа зайлна./ФБУ-ыг эсрүү шууд хийж болохгүй/
- Вирус өсгөвөрлөх тэжээлээс 5мл хийж термостатанд 5-10 минут байлгана.

#### 3. Шинжлэгдэхүүн халдаах

- 5 мл тэжээлийг флаaskaас соруулж авна.
- Шинжлэгдэхүүнээс 0.2мл авч дан үет эсийн дээгүүр урсгах маягаар хийж фласкийг бөглөн 35C °-т 30минут байлгана.
- 1 фласканд 6мл тэжээл хийхээр бодно
- ТРСК- трипсинээс 1мл-д 1микролитр байхаар нэмнэ.
- Бэлтгэсэн тэжээлээс 6 мл-ээр шинжлэгдэхүүн халдаасан фласкуудад хийнэ.
- Фласкийг сайтар бөглөн 33-35<sup>0</sup> C термостатанд тавина.
- Эс гэмтэх үйлдэл /ЭГҮ/-ийг микроскопт өдөр бүр ажиглан тэмдэглэнэ.



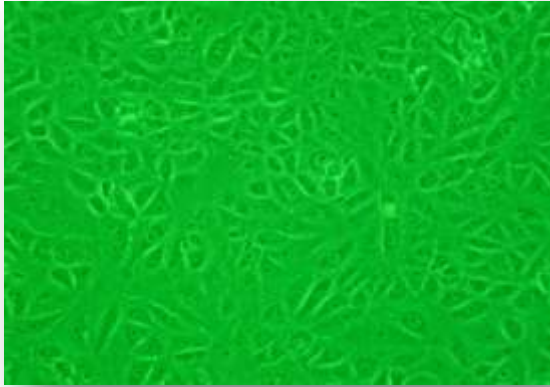
#### 5.5.3 Чанарын хяналт

Эсийн өсгөвөрт хэрэглэгдэх оношлуур урвалж хадгалалтын горимыг мөрдөн ажиллахаас гадна халдвар хамгааллын дэглэм баримтлан ажиллана.

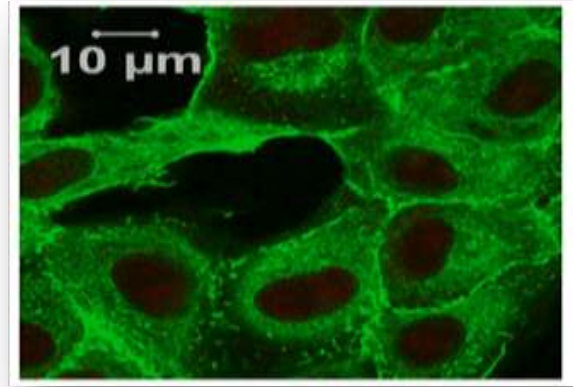
#### 5.5.4 Шинжилгээний хариуг дүгнэх

### **Халдварлагдсан эсийн өсгөврийн шингэнийг хураан дүгнэх**

- Эсийн 50-75% нь ЭГҮ-д орж хуурсан бол өсгөврийн шингэнийг хурааж 0.5% глицерол эсвэл үхрийн альбумин уураг нэмнэ.
- ЭГҮ илрэхгүй байсан ч 6-7 хоногийн дараа хураана.
- Хураасан эсийн өсгөврийн шингэнийг +4<sup>0</sup> C-д хадгалж ДТУ урвал тавина. ДТУрвал сөрөг бол дахин 2 удаа сэлгүүлэн халдаана.
- Шаардлагатай гэж үзвэл өсгөврийн шингэнийг 3000 эрг/мин хурдтай 5минут хурилдуурдан эсээс нь ялгана.
- ДТУ эерэг өсгөвөрт УТ-ПГУрвалаар вирус ялган дүйх шинжилгээ хийнэ
- Вирусийн өсгөврийг 2 хоногийн дотор -70<sup>0</sup> C-д хадгална



Зураг 6. Бүрэн ургалттай Vero E6 эс өсгөвөр (40х)



Зураг 7. Халдварлагдсан эсийн ДТУрвал (400х)

#### 5.8. Илэрсэн үл тохирлыг залруулах ажиллагаа

Урвалд нөлөөлөх хүчин зүйл:

- Соруурын тохируулгын алдаа
- Урвалын шингэнийг соруулж авах, юүлэх үед гарсан алдаа
- Урвалын хугацаа
- Урвалж бодисуудын идэвхи төвшрүүлэг
- Урвалж бодисуудын рН, урвалж бодисуудын хэмжээ эзлэхүүн
- Хавтангийн угаалгын тоо
- Урвалын хэм
- Урвалжуудын хэм
- Урвал унших шүүлтүүрийн гэрлийн дохионы урт
- Коньюгат, өнгө олгогчийн төрөл
- Шинжлэгчийн дадлагажсан байдал

Ийлдэс судлалын шинжилгээ хийхэд гарах нийтлэг алдаа:

- Коньюгат, бусад урвалжын шингэлэлт болон коньюгат өөр нэгдэлтэй харилцан үйлчилсэний улмаас хавтан бүхэлдээ жигд нэг өнгө үзүүлэх
- Бэхлэгч уусмалыг жигд бус хийсэнээс хавтангийн өнгө алаг цоог өгөх
- Аль нэг урвалжын шингэлэлт буруу, угаалтын техник алдаанаас өнгө хурдан, эсвэл удаан тодрох
- Оношлуурын зааварт заагдсан хэмээс бага хэмд инкубацлах

**Ийлдэс судлалын шинжилгээнд гарах нийтлэг алдааг шийдвэрлэх**

- Коньюгат, бусад урвалжуудын шингэрүүлэлтийг шалгах
- Коньюгат (өнгө илтгэгч, урвал зогсоогч, бусад урвалж) хэмжээг шалган хавтанд жигд хийх, хавтангийн үүрэнд хошууг хүргэхгүй байх
- Угаалгыг зөв технологиор хийх дадал эзэмших
- Дадлага хийх

## **Анхаарах зүйлс**

1. Урвал тавихын өмнө оношлуур урвалж, шинжлэх ийлдсийг тасалгааны хэмд 15-20 минут тавина
2. Хэрэв ийлдэс нь үндсэн өнгөө алдсан, цусны хольцтой тохиолдолд үр дүнд нөлөөлөх тул шинжлэхгүй
3. Ийлдсийг 3-аас илүү удаа гэсгээхгүй бөгөөд цуснаас ийлдэс ялгасны дараа ийлдсийг 3 хувааж  $-20^{\circ}\text{C}$  хэмд 1 сар, цаашид шингэн азот,  $-80^{\circ}\text{C}$  хэмд хадгална.
4. Угаагч уусмалыг найруулахын өмнө талст үүссэн тохиолдолд  $37^{\circ}\text{C}$  хэмд талст үгүй болтол байлгасны дараа угаагч уусмалыг хавтанг угаахаас 10 минутын өмнө найруулсан байх шаардлагатай
5. Урвалын хавтангийн уутыг зориулалтын хэсгээр онгойлгох, шаардлагатай хавтанг авсаны дараа амыг сайтар хаах, шаардлагатай бус бол олон удаа онгойлгохгүй байх
6. Хавтангийн ёроолд хүрэхгүй байх, шүүлтүүр цаасан дээр тавих
7. Анхлан тавьж байгаа тохиолдолд урвалж дусаахдаа үүр бүрд нэг хошуу ашиглах
8. Урвалж бодис, угаагч уусмалыг хавтанд дусаахдаа хийн бөмбөлөг үүсгэхээс зайлсхийх
9. Хавтангийн үүр бүрийг угаах хугацаанд анхаарах, угаасны дараа шүүлтүүр цаас ашиглан сайтар хуурайшуулах гэвч хавтанг хэтэрхий хатаахаас зайлсхийх
10. Шинжилгээнд аль болох нэг удаагийн хошуу, шилэн сав ашиглах
11. Лабораторийг үүсгэгчийн онцлогоос хамаарч зохих ариутгалын бодис ашиглан урьдчилан сайн ариутган бэлтгэсэн байх

--oOo--

## **Хавсралт**

### **Ашигласан ном, хэвлэл**

1. Cell culture manual WHO 2003
2. “Фермент холбоот урвал, ДТУрвал тавих аргачлал зарчим” Ж.Бэх-Очир 2006
3. Биобэлдмэл үйлдвэрлэлийн анхан шатны гарын авлага 2006
4. П. Нямдаваа, Бүтээлийн товчоон, IV боть “Вирус судлалын шинжилгээний аргууд” УБ, 2007
5. “Халдварт өвчний эрт сэрэмжлүүлэх хариу арга хэмжээний тогтолцоо” 2007
6. “Халдварт өвчний эрт сэрэмжлүүлэх хариу арга хэмжээний тогтолцоо” Лабораторийн оношлогооны протокол хуудас 2007
7. “Халдварт өвчний эрт сэрэмжлүүлэх хариу арга хэмжээний тогтолцоо” Лабораторийн оношлогооны протокол 2007
8. Virus manual OIE 2008
9. Байгалийн голомтот халдварт өвчний халдвар хамгааллын дэглэмийн заавар 2008
10. Ц. Базарцэрэн, Б. Болдбаатар “Вирус судлалын үндэс I-I боть” Улаанбаатар 2009 он
11. Халдварт өвчний хяналтын лавлах 18 Улаанбаатар 2010
12. Лабораторийн биоаюулгүй ажиллагааны гарын авлага 2010 Улаанбаатар
13. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Chapter

14. Hantavirus- Wikipedia, the free encyclopedia [http://en.wikipedia.org/wiki/Hemorrhagic\\_fever\\_with\\_renal\\_syndrome](http://en.wikipedia.org/wiki/Hemorrhagic_fever_with_renal_syndrome)
15. Medical Virology “Hemorrhagic fever with renal syndrome and Other Hantavirus Infections” Vol 4 177-184/1994/
16. Hantavirus “Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS), Hemorrhagic Nephrosonephritis, Epidemic Hemorrhagic Fever, Korean Hemorrhagic Fever, Nephropathia Epidemica OIE, Institute for International Cooperation in Animal Biologies September 12, 2008
17. Irina Golovljova, Veera Vasilenko, Bo Settergren “Characterization of Hemorrhagic Fever with Renal syndrome Caused by Hantaviruses, Estonia” 1773-1775 /2007/
18. UMBC an honors university in Maryland “Beginning Molecular Biology Laboratory Manual”
19. Dominic Wichmann, Werner Slenczka, Peter Alter “Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) Journal of Clinical Microbiology Sept. 2001. p. 3414-3416 Vol. 39, No 9
20. Ханта вирусийн халдварын үед “Шинжилгээнд сорьц дээжлэх тээвэрлэх заавар” [www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/shipdir.htm](http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/shipdir.htm)
21. QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (100) Catalog# 210212 цомгийн протокол. 2006
22. QIA amp Viral RNA Mini Kit (50) Catalog# 52904 цомгийн протокол, 2005
23. [http://www.virology.net/Big\\_Virology](http://www.virology.net/Big_Virology)
24. [http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/TP47\\_anx5.pdf](http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/TP47_anx5.pdf)
25. Pragma D Yadav., Martin J Vincent., and Stuart T Nichol. Thottapalayam virus is genetically distant to the rodent-borne hantaviruses, consistent with its isolation from the Asian house shrew (*Suncus murinus*) // *Virology Journal* 2007, 4:80 doi:10.1186/1743-422X-4-80.

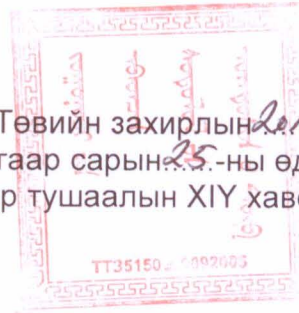
Нэр томъёоны тайлбар

### Товчилсон үгийн жагсаалт

БХШЦЧ	Бөөрний хам шинжит цусархаг чичрэг
дНТФ	дезоксинуклеотидтрифосфат
ДНХ	Дизоксирибонуклейн хүчил
РНХ	Рибонуклейн хүчил
ПГУ	Полимеразын гинжин урвал
УТ-ПГУ	Урвуу транскриптазын полимеразын гинжин урвал
rRNA	рибосомын РНХ
V	вольт
ELISA/ ФХУ	Фермент холбоот урвал
ДТУ	Дархан туяарах урвал
ЦНСУ	Цус наалдах саатуулах урвал
In vivo	Тахианы үр хөврөл
In vitro	Эсийн өсгөвөр
BSLab 3	Biosafety laboratory 3
BCC	Вирус саармагжуулах сорил
ЭГҮ	Эс гэмтээх үйлдэл
BHK 21	Baby hamster kidney cell
BERO	African green monkey <a href="#">Chlorocebus</a> kidney <a href="#">epithelial</a> cell line



Төвийн захирлын *2015* оны  
*06* дугаар сарын *25*-ны өдрийн  
*0111* дугаар тушаалын XIУ хавсралт



## ЯПОН ЭНЦЕФАЛИТ ӨВЧНИЙ ЛАБОРАТОРИЙН ШИНЖИЛГЭЭНИЙ СТАНДАРТ АЖЛЫН ЗААВАР

Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Япон энцефалит өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 15
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- А83.0	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил
Зориулалт: Япон энцефалит өвчний лабораторийн шинжилгээ, оношлогоо, судалгаа	
Хэрэглэх хүрээ: Вирус судлалын лабораторийн шинжилгээ, оношлогоо, судалгаанд	
Боловсруулсан: Б. Байгалмаа, Х.Тунгалаг Огноо: 2015 он	Баталсан, зөвшөөрсөн актын дугаар: ЗӨСҮТөвийн захирлын А/44 тоот тушаалын арван дөрөвдүгээр хавсралт Огноо: 2015.06.25
Хэвлүүлсэн: Мэргэжлийн тусламжийн алба, Лавлагаа лабораторийн тасаг	



Эрүүл Мэнд, Спортын Яамны харьяа Зоонозын Өвчин Судлалын Үндэсний Төв	
Нэр: Япон энцефалит өвчний лабораторийн шинжилгээний стандарт ажлын заавар	Хуудасны дугаар/тоо- 15
Баримт бичгийн төрөл, хувилбарын дугаар: Стандарт ажлын заавар- А83.0	Хүчинтэй хугацаа: 5 жил

### 1. Зорилго, зарчим

Япон энцефалит (ЯЭ) өвчний үүсгэгчийг лабораторийн шинжилгээгээр тодорхойлж, эмнэлзүйн оношийг баталгаажуулахад оршино.

### 2. Хамрах хүрээ

Эмнэлзүйн сорьц, байгалийн голомтын хяналт, тандалтын шинжилгээ хийх эрх бүхий зооноз өвчин судлалын төвийн вирус судлалын BSL 2, BSL 3-р зэргийн лабораторит мөрдөгдөнө.

### 3. Тодорхойлолт

Япон энцефалит /ЯЭ/ нь вирусээр үүсгэгдэн Culex төрлийн шумуулаар дамжин халдварлаж төвийн болон захын мэдрэлийн системийг сонгомлоор гэмтээж эмнэл зүйн олон хэлбэр, хүнд явцаар илэрдэг байгалийн голомтот хурц халдварт өвчин.

Япон энцефалит нь зүүн өмнөд Ази болон номхон далайн баруун эргийн бүс нутгийн бага насныханд үхэл өвчлөлд хүргэхэд гол шалтгаан болдог. Энэ бүс нутагт ойроцоогоор 3 тэрбум хүн амьдардаг ба энэхүү өвчнөөр жилд доод тал нь 50 000 тохиолдол бүртгэгдсэнээс 10 000 нь нас бардаг байна. Халдвар дамжуулагч нь Culex төрлийн шумуул Culex tritaeniorhincus юм.

Flaviviridaeовог, Flavivirus төрөл, вирусын вирион нь бөмбөлөг (S/S) хэлбэртэй геном нь мушгиа бүтэцтэй, 40-60 нм диаметртэй, дан утаслагт эерэг утгат РНХ (11kb) агуулсан вирус юм. Вирусын вирионы геном нь липопротеид, гликопротеидийн бүрхүүлтэй нуклеокапсидаас /РНХ/ бүрддэг. РНХ нь С (капсул), РrМ (мембран), Е (гадаргуу) гэсэн коддлогддоггүй бүтцийн 3 уураг, вирусын репликацид шаардагдах бүтцийн бус 7 уургаас тогтоно. Вирус нь 56<sup>0</sup> С хэмд 10 минут, 37<sup>0</sup>С хэмд 7 цаг болоход хагас амьдрах чадвартай, липидийн уусмал, угаалгийн нунтаг, эфир, трипсин, хлорформ, формальдегидаар үйлчлэхэд мэдрэг, рН 3-4 идэвхигүйжүүлэн, хурц гэрлээр үйлчлэхэд халдварын идэвхи нь буурдаг.

### 4. Сорьц цуглуулах хадгалах, тээвэрлэх

4.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, тэжээлт орчин

- -18- 20<sup>0</sup>С зөөврийн хөргөгч
- Сорьц зөөвөрлөх сав (Гадна талд нь биологийн аюултай гэсэн тэмдэг, “БИО-АЮУЛТАЙ ИЛГЭЭМЖ” гэсэн бичиг байна)
- Мөсөн элемент , хуурай мөс (пролон, хөвөн)
- Гомогенизатор
- Хурилдуур 1000-5000 эрг/мин
- Ариун сав (50, 80 мл)
- Улаан тагтай (red-top) tybe, (tiger top) тубе, Ягаан тагтай (violet –top with EDTA)(5-10 мл)
- RT-PCR оношлогоонд шар тагтай (yellow-top with citrate)- цитрат, ногоон тагтай(green-top with heparin) - гепаринтай тубе (5-10 мл)
- Ариун эргэдэг, дардаг тагтай сав /эппиндорф 1.5-2.0мл/
- Автомат дусаагуур /100-1000 мкл/
- Автомат дусаагуурын нэг удаагийн хошуу /200-1000мкл/
- Шилний харандаа
- Хайч
- Хямсаа
- Спиртэн дэн

- Ариутгасан хөвөн
- Чангалуур
- Шархны лент
- Этилийн спирт - 70%
- Вирконы уусмал 1%

#### 4.2. Аюулгүй ажиллагааны нөхцөл

- Хүний эмнэл зүйн сорьц, шумуул, үе хөлтнөөс дээжилсэн шинжлэгдэхүүнийг II зэрэглэлийн биологийн аюулгүйн кабинетэд шинжилнэ.
- Вирус өсгөвөрлөх, туршилтын амьтан, дамжуулагчийн судалгааг III зэрэглэлийн биологийн аюулгүйн кабинетэд гүйцэтгэнэ.
- Лабораторийн ажилтнууд тусгай хамгаалалтын хувцас (халат, малгай, хулдаасан хормогч, нүдний шил, бээлий, N95 амны хаалт) өмсөх шаардлагатай.
- Лабораторит орохыг зөвхөн төлөвлөгөөт ажлаа гүйцэтгэгч болон түүнд гардан туслах хүмүүст зөвшөөрөх
- Ажилласан талбай болон бохирдсон зүйлийг халдваргүйтгэх бодисоор /Этанол 70%, Виркон зэрэг халдваргүйтэлийн уусмал/ арчиж цэвэрлэх
- Хурдавчилсан сорил – ЗӨСҮТөв, аймаг, нийслэлийн ЗӨСТөвүүд (**BSL 2**)
- Ийлдэс судлал (ФХУ, ДТУ, Иммуноблотинг) – ЗӨСҮТөв, аймаг, нийслэлийн ЗӨСТөвүүд (**BSL 2**)
- Молекул биологи (УТ-ПГУ, ПГУ ) - ЗӨСҮТөв (**BSL 2**)
- Вирус өсгөвөрлөх (in vivo, in vitro) - ЗӨСҮТөв (**BSL 3**)

#### 4.3 Шинжлэх сорьцын төрөл

Оношлогоо	Шинжлэгдэхүүн	Хэмжээ	Лабораторийн шинжилгээн ий сонголт	Шинж тэмдэг эхэлсэнэ эс хойш сорьц авах хугацаа
Эсрэгбие хайх шинжилгээ (IgM, IgG)	Ийлдэс, сийвэн	2 мл	ФХУ, ДТУ	5-14 хоногт
	Тархи нугасны шингэн®	2мл		10-12 хоногт
Нуклейн хүчил илрүүлэх	Нас барсан тохиолдолд (hypothalamus, hippocampus, substantia nigra and medulla oblongata regions of brain)	Эдийн хэрчим 3x3 см - 5x5см	RT-PCR	2-8 хоног
	Тархи нугасны шингэн®	2мл		
	Цус	2-5 мл		
	Шумуул	2000-4000 ш		

®Тархи нугасны шингэн авснаас хойш 1 цагийн дотор лабораторид хүргэх (Боломжгүй тохиолдолд 4° С хэмд 2-3 хоног)

### Сорьцод боловсруулалт хийх

Оношлуурын зааварт заагдсны дагуу шинжлэх сорьцонд боловсруулалт хийгдэнэ.

- Улаан эсийн задрал болсон, липид ихтэй, 3-аас дээш удаа хөлдөөж гэсгээсэн ийлдсийг шинжлэхгүй
- Цусны ийлдэс /сийвэн/ аль болохоор шинэхэн байх ба 2-8°C-д 5 хоног хадгалсан эсвэл хасах /-20°C/-д 2 сараас дээшгүй хугацаагаар хадгалсан байх

Эмнэлзүйн сорьцийг Эсд халдаахад бэлтгэх:

Япон энцефалит өвчнөөр нас барсан хүний эд эрхтнээс дээжилсэн сорьц (тархи эд) тандалтаар цуглуулсан шумуул зэрэг сорьцонд боловсруулалт хийнэ. Үүнд:

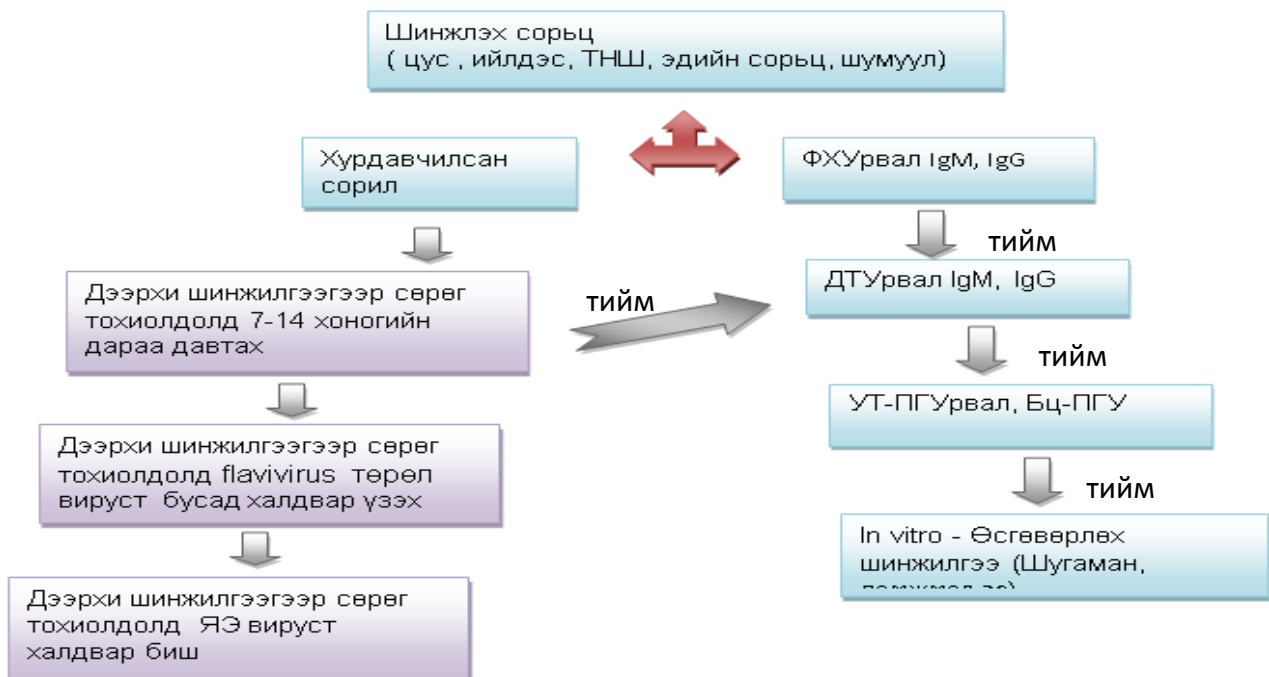
- Эд эрхтний сорьцыг задлахын тулд гомогенизатор ашиглан булинга бэлдэнэ.
- 1мл/0,1мл-ээр бодож гентамицин нэмнэ.
- 10000эрг/мин 5-10минут хурилдуурдан тундасны дээд хэсгээс авч халдаана.
- Үлдсэн хэсгийг 2 эппендорпд хуваан хийж, хаяглан шинжлэх хүртэл -80°C хэмд хадгална.

#### 4.3.1 Сорьц хадгалах, тээвэрлэх

1. ЯЭ өвчний сэжиг бүхий сорьцматериалыг 2-8 °С хэмд 7 хоног, -20°C хэмд 30 хоног, сараас дээш хадгалах тохиолдолд (-70 °С) хэмд хадгална.
2. Тархвар судлалын холбогдлоор цуглуулсан шумуулын төрөл, зүйл, хүйс зэргийг биологичоор тодорхойлуулна. Цуглуулсан шумуулыг -2-4 °С хэмд 3 сар хүртэл хугацаатай хадгална. Хадаглалтын явцад чийг өгөх шаардлагатай.
3. Эрүүл мэндийн сайдын 2006 оны 403 тоот тушаалын хоёрдугаар хавсралт, Зам тээвэр аялал жуучлалын сайдын 2006 оны 05 дугаар сарын 05-ны өдрийн 70 тоот тушаалын хавсралт I-IV зэрэглэлийн эмгэг төрөгч бичил биетэн, биоаюултай илгээмж, биобэлдмэл тээвэрлэх журам бүхий 3 суурьт савалгааг баримтлан тээвэрлэнэ.

## 5. Шинжилгээний аргачлал

### 5.1 Шинжилгээний дараалал



## 5.2 Шинжилгээний аргачлал

Оношлогоо	Халдварын хурц үед	Үр дүн үзүүлэх хугацаа	Сорьц	Оношлогооны критер
Вирус өсгөвөрлөх, ийлдэс хүрээг ялгах	батлах	1-2 долоо хоног	- цус, ийлдэс - Тархи эд - Шумуул булинга	Эсд өсгөвөрлөх, ДТУ, Молекул биологийн шинжилгээг BSL/2, BSL/3 лабораторид гүйцэтгэнэ
Нуклейн хүчил илрүүлэх	батлах	2 хоног	- цус, ийлдэс, ТНШ - Тархины эд - Шумуул	Молекул биологийн шинжилгээг BSL/2-т гүйцэтгэнэ.
IgM ELISA, IFA	магадгүй	1-2 хоног	- цус - ийлдэс	ELISA BSL/2
IgM Rapid test		30 мин	- ТНШ	Rapid test BSL/2
IgG (хос ийлдэс) ELISA, IFA	батлах	>7 хоног	- цус - ийлдэс - ТНШ	ELISA, IFA, BSL/2 лабораторид гүйцэтгэнэ.

## 5.3 Ийлдэс судлалын шинжилгээ

### 1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, оношлуур

- БАК II А,В (аль нэг нь)
- ELISA уншигч
- Дархан туяаралт бичил харуур
- Anti-Japanese encephalitis virus antibody rapid test
- Japanese encephalitis Virus ELISA IgM, IgG
- Japanese encephalitis Virus IIFT /IgM, IgG/
- Холигч /Vortex/
- Дулаан тогтоогуур 37°C/±3°C/
- Хурилдуур 1000-5000 эрг/мин
- Фосфатийн буферийн уусмал рН-7,2
- Нэрмэл ус /давхар нэрсэн, ионгүйжүүлсэн, ариун/
- Автомат дусаагуур 100-1000, 20-200мкл, 2-20 мкл
- Олон сувагт автомат дусаагуур /8-12сувагтай/
- Автомат дусаагуурын нэг удаагийн хошуу /2-20мкл, 20-200мкл, 200-1000мкл/
- 20,250, 1000мл хэмжүүр бүхий шилэн сав
- Бүрхүүл шил
- Ариун завь
- Шүүгч цаас
- Цаг
- Шилний харандаа
- Вирконы уусмал 1%
- Этилийн спирт - 70%

5.3.1 *Ийлдэс судлалын шинжилгээ*

**5.3.1.1. Хурдавчилсан сорил:**

Оношлуурын зааврын дагуу хэрэглэнэ.

**5.3.1.2. Фермент холбоот урвал / ФХУ/**

Оношлуурын зааврын дагуу хэрэглэнэ.

Шинжлэхсөрьцыг (ийлдэс, сийвэн, тархи нугасны шингэн) тасалгааны хэмд байлган, зөөлөн холино.

**Урвалын зарчим**

- Шинжлэх сорьц, эерэг, сөрөг хяналтыг тус бүр 2 хувь, 4 үүрэнд авах бөгөөд нийт 96 үүрээс 22 үүр л сорьц шинжлэхэд ашиглагдана

- Шинжлэх ийлдэс, эерэг, сөрөг хяналтыг Сорьц шингэлэх уусмал ашиглан 1/100 шингэлнэ. Үүнд: 4 мкл ийлдэс + 396 мкл Сорьц шингэлэгч уусмал нэмж холино.

- Урьдчилан шингэлсэн ийлдэс, эерэг, сөрөг хяналт тус бүрээс 50мкл доорхи хүснэгтэд заасны дагуу дусаана.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	JE Negative Control	Sample 1	Sample 3	Sample 5	Sample 7	Sample 9	Sample 11	Sample 13	Sample 15	Sample 17	Sample 19	Sample 21
B	JE Negative Control	Sample 1	Sample 3	Sample 5	Sample 7	Sample 9	Sample 11	Sample 13	Sample 15	Sample 17	Sample 19	Sample 21
C	JE Positive Control	Sample 2	Sample 4	Sample 6	Sample 8	Sample 10	Sample 12	Sample 14	Sample 16	Sample 18	Sample 20	Sample 22
D	JE Positive Control	Sample 2	Sample 4	Sample 6	Sample 8	Sample 10	Sample 12	Sample 14	Sample 16	Sample 18	Sample 20	Sample 22
E	JE Positive Control	Sample 2	Sample 4	Sample 6	Sample 8	Sample 10	Sample 12	Sample 14	Sample 16	Sample 18	Sample 20	Sample 22
F	JE Positive Control	Sample 2	Sample 4	Sample 6	Sample 8	Sample 10	Sample 12	Sample 14	Sample 16	Sample 18	Sample 20	Sample 22

G	JE Negative Control	Sample 1	Sample 3	Sample 5	Sample 7	Sample 9	Sample 11	Sample 13	Sample 15	Sample 17	Sample 19	Sample 21
H	JE Negative Control	Sample 1	Sample 3	Sample 5	Sample 7	Sample 9	Sample 11	Sample 13	Sample 15	Sample 17	Sample 19	Sample 21

- Хавтанг зориулалт бүхий наалддаг туузаар сайтар таглан 37°C хэмд чийглэг үүсгэн 1 цаг тавина. Хавтанг давхарлан тавихыг хориглоно.

- Хавтангийн үүр бүрийг 300 мкл угаагч уусмалдусаан бүгд 6 удаа угааж, хуурайшуулна.

- Хавтангийн А-D үүрэнд 50 мкл JERA; Е-Н үүрэнд 50 мкл NCA дусаана. Доорхи хүснэгтэд заасны дагуу дусаана.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A
B	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A
C	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A
D	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A	JER A
E	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA
F	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA
G	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA
H	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA	NCA

- Хавтанг зориулалт бүхий наалддаг туузаар сайтар таглан 37°C хэмд чийглэг үүсгэн 1 цаг тавина.

- Хавтангийн үүр бүрийг 300 мкл угаагч уусмал дусаан бүгд 6 удаа угааж, хуурайшуулна.

- Конюгатын уусмалаас үүр бүрд 50мкл дусаана.

- Хавтанг зориулалт бүхий наалддаг туузаар сайтар таглан 37°C хэмд чийглэг үүсгэн 1 цаг тавина.

- Хавтангийн үүр бүрийг 300 мкл угаагч уусмал дусаан бүгд 6 удаа угааж, хуурайшуулна.

- En Wash уусмалаас үүр бүрд 150 мкл дусаан тасалгааны хэмд 5 минут тавина.

- Хавтангийн үүр бүрийг 300 мкл угаагч уусмал дусаан бүгд 6 удаа угааж, хуурайшуулна.

- 75 мкл ТМВ дусаан таглан өрөөний хэмд гэрлээс далд 10 минут тавина.

- 50 мкл Урвал зогсоогч дусаан өрөөний хэмд 1 минут болсоны дараа хавтан уншигч 450 нм дүнг уншуулна.

Дүгнэлт:

Шинжилгээний дүнг оношлуурын зааврын дагуу бодож дүгнэнэ.

Immune Status Ratio(ISR)= Сорьц ГХН дундаж / JERA/NCA ratio (ISR)

## ГХН-Гэрлийн хугарлын нягт

Чанарын хяналт:

ISR	Үр дүн	Тайлбар
< 4.0	Сөрөг	Эсрэгбие илрээгүй
4-6	Эргэлзээтэй	Давтан шинжлэх шаардлагатай
>6.0	Эерэг	Эсрэгбие илэрсэн

### 5.3.1.3. Дархан туяарах урвал /ДТУ/

Япон энцефалит өвчний халдварын сэжигтэй хүний сорьц шинжлэх зориулалттай ДТУ-ынцомгийг зааврын дагуу хэрэглэж дүгнэнэ.

Урвалын ерөнхий зарчим: ФХУрвалын цомогоор хүний цусны ийлдэс, сийвэнд in vitro орчинд вирусын эсрэг үүссэн эсрэгбиеийг тоо болон чанарын аргаар илрүүлдэг. Урьдчилан шингэлсэн өвчтний сорьцыг Япон энцефалит вирусээр халдварлагдсан хавтанд оруулна. Эерэг сорьц байвал өвөрмөц эсрэгбие хавтан дахь эсрэгтөрөгчтэй холбогдоно. Энэхүү нэгдэл дараагийн шатанд fluorescein-labelled anti-human antibody-тай холбогдосныг флуоресцент микроскопоор харж дүгнэнэ.

Хадгалалт, тогтвортой байдал:

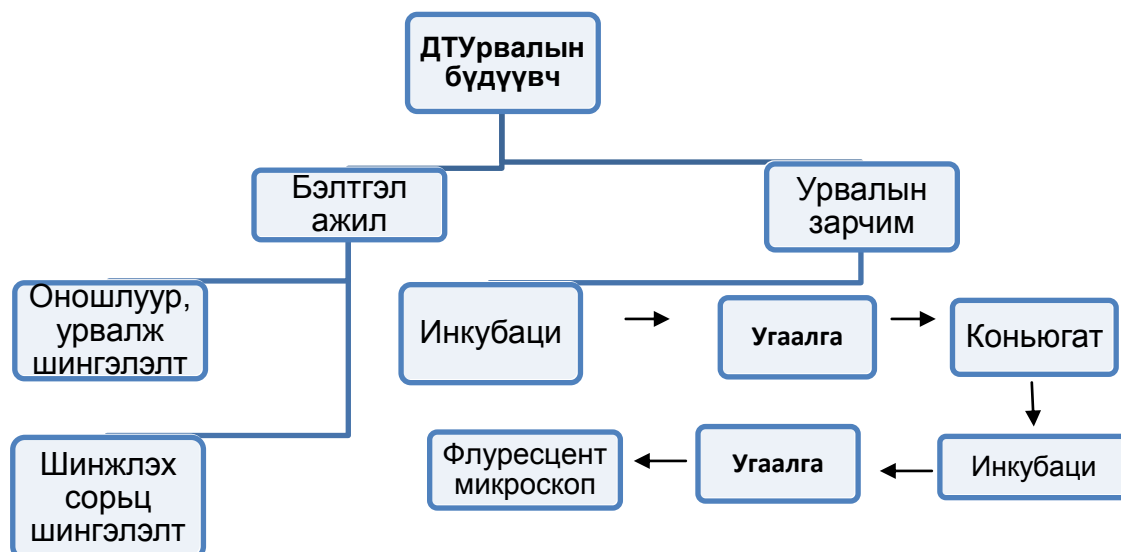
Энэхүү цомгийг +2 °C +8 °C хэмд хадгална. Цомог нь үйлдвэрлэсэнээс хойш 18 сарын хугацаанд хадгалах шаардлагатай.

Анхааруулга:

Өвчтний сорьц, калибратор, хяналтууд мөн ашигласан урвалын хавтан нь халдвартай тул болгоомжтой харьцах шаардлагатай. Бүх урвалжуудтай зааврын дагуу болгоомжтой ажиллана.

Бэлтгэл ажил :

- Урвалын самбараа шалгасан: Самбарын гадна тал ус нэвчсэн болон гоожсон эсэхийг шалгаад, уутанд байгаа хавтанг тасалгаанд байлгасаны дараа нээнэ. Бичил хавтан дээрхи тэмдэглэгдсэн талбай нь маш мэдрэг тул онцгой анхаарч, сэвтээхээс болгоомжилон тэмдэглэгээг шилний харандаагаар хийнэ.
- Шинжлэх ийлдэс, сорьц, оношлуур урвалжуудаа тасалгааны хэмд 30 минут тавина.
- Био-Аюулгүйн кабинетын бэлэн байдал хангаж шинжилгээ эхлэхээс 30 минутын өмнө UV ламп асааж ариутгана.



### Дүгнэх:

Оношлуурын зааврын дагуу дүгнэнэ.

### 5.4. МОЛЕКУЛ БИОЛОГИЙН ШИНЖИЛГЭЭ

#### 5.4.1. Шаардлагатай тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл, урвалж бодис, праймер:

*Тоног төхөөрөмж, багаж хэрэглэл:* Биоаюулгүйн 2-р зэрэглэлийн кабинет, ПГУ-ын олшруулагч машин, дулаан тогтоогуур, -20-80°C гүн хөлдөөгч, бичил хурилдуур, хүчдэл тохируулагч, электрофорезийн аппарат, холигч, гель хайлуулагч, электрон жин, ПГУ-ын үр дүнг хэт ягаан туяаны тусламжтайгаар дүрслэн харж дүгнэх систем, нэг удаагийн бээлий, РНХ/ДНХ –гүйжүүлсэн эппендорфийн хуруу шил (1,5-2 мл, 0,2 мл, 0,5мл), эппендорфийн хуруу шилний тавиур, автомат дусаагуур, фильтртэй ариун хошуу (20-200мкл, 1000мкл, 0,5-10мкл, 2-20мкл), шилний харандаа, хаягдал хийх сав

*Урвалж: РНХ ялгах ажиллагаанд:* Trizol, изоамилийн спирт, 96% , 70% этилийн спирт, давхар нэрсэн ус, фосфатын буферийн уусмал рН-7.2, фирмийн РНХ ялгах цомгийн бүрэлдэхүүн, 1%-ийн вирконы уусмал, РНХ – гүйжүүлэгч (RNA AWAY WIPES)

*УТ-ПГУ-д:* УТ-ПГУ-ын цомгийн бүрэлдэхүүн, өвөрмөц праймер(хүснэгт 1), ионгүйжүүлсэн ус, ДНХ-ийн молекул жингийн маркер, хуурай мөс,

Япон энцефалит өвчний вирусын РНХ илрүүлэх өвөрмөц праймерийн дараалал

Хүснэгт 1

Бай ген	Праймерийн нэр	Праймерийн дараалал (5' - 3')	Молекул жин (bp)
Гадаргуугийн Е уургийн ген	Ea F	ATAGTAGCTATGTGTGCAAACAAGG	1216
	Ea R	GAATTCRGTYGTGCCYTTTCAGAGC	
	Eb F	AGCTCAGTRAAGTTRACATCAGG	1216
	Eb R	GAATTC AATGGCACAKCCWGTGTC	
	PE1 - F	AGTTAACATCAGGCCACCTGA	291
	PE2 - R	GTTCCATCTCGACCAGCAC	
	JS5-1F	CAYGGCATCTTCTGGTATGT	
	JS5-1R	TCCACCACTCCTCCATTGATCT	



*Агарозын гель электрофорезэд:* Трис-боратын буфер рН=8.3 (5хТВЕ) (89 мМ Трис, 89 мМ  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2мМ ЭДТА), 1хТВЕ (5х буфер 100 мл, нэрсэн ус 400 мл), 1.5% агароз гель, этидиум бромидын 0,001%-ийн уусмал (250 мл нэрсэн усанд 2,5 мг этидиум бромид)

5.4.1. Молекул биологийн шинжилгээ:

*РНХ-г ялгах ажиллагаа*

*TRizol ашиглан РНХ ялгах:*

- Дээжинд боловсруулат хийнэ. Эд: 1мл TRIZOL урвалжинд 50-100МБТ эд авч нухна. Шинжлэгдэхүүний хэмжээ TRIZOL урвалжийн 10%-иас хэтрэхгүй байх ёстой. *Нэг давхрагат эсийн ургалт:* Нэг давхаргат эсийг хөргөсөн PBS-ээр угаана. Эсийн өсгөврийн саванд савны 3.5см диаметр бүрт 1мл TRIZOL урвалж нэмж, эс хусагчаар хусна. Эсийн лизатыг дусаагуураар хэд хэдэн сайтар удаа холино. *Суспензэд өсгөвөрлөсөн эс:* Эсийн өсгөврийг хурилдуурдана. Шингэн орчныг асгаж, хөргөсөн ФБУ-д булингална. 300 эрг/мин хурдаар 5 минут хурилдуурдаж, эсийг тунгаана. 5-10 x 10<sup>6</sup> эс бүрт 1 мл TRIZOL урвалж нэмнэ.
- *Ажилбар:* TRIZOL урвалжинд гомогиназ болгосон дээжнүүдийг нуклей уургууд бүрэн задартал өрөөний хэмд 5 минут байлгана. Эсийн задарсан хэсгийг хурилдуурдаж тунгаана. Супернатантыг шинэ хуруу шилэнд зөөж хийнэ.
- 1мл TRIZOL урвалжинд 0.2мл хлорформ тооцож нэмнэ. Дээжний тагийг сайтар таглаад 15 секунд холиод өрөөний хэмд 2-3 минут байлгана. 2-8°C-д 12000 эрг/мин-аас ихгүй хурдаар 15 минут хурилдуурдана. Хурилдуурдсаны дараа доод хэсэгт фенол:хлорформ бүхий улаан давхрага, дээд хэсэгт өнгөгүй усан давхрага үүснэ. РНХ нь зөвхөн өнгөгүй усан хэсэгт үлддэг тул энэ хэсгийг маш болгоомжтой соруулан авч, хаяг бүхий шинэ хуруу шилэнд хийнэ.
- Соруулж авсан шингэнийг хэмжих ба энэ нь гомогиназ хийсэн TRIZOL урвалжийн 60 орчим хувь нь байдаг. Изопропил спирт ашиглан усан шингэнээс РНХ-г тунадасжуулдаг. 1мл TRIZOL урвалж бүрт 0.5мл изопропил спирт нэмж, 15-30°C-д 10 минут байлгаж, 2-4°C-д 12000 эрг/мин-аас ихгүй хурдаар 10 минут хурилдуурдана. Тунадасжуулсан РНХ нь хуруу шилний ёроол болон хананд харагдахгүй.
- Хурилдуурдсан супернатантыг бүрэн асгана. РНХ-ийн мөхлөгийг 1мл TRIZOL урвалж бүрт 1мл 75%-ийн этанол нэмж нэг удаа угаана. Дээжийг холигчоор холиж, 2-8°C-д 7500 эрг/мин-аас ихгүй хурдаар 5 минут хурилдуурдана. Дээрх угаалтыг дахин нэг удаа давтах ба үлдэгдэл этанолыг бүгдийг асгана.
- РНХ-ийн мөхлөгийг 5-10 минут агаарт юмуу вакуумдан хатаана. РНХ-г DEPC усанд уусгана.
- 39 мкл DEPC усанд 1 мкл РНХ уусгаж (1:40), спектрофотометрийн анализ хийнэ. 10 мкл-ийн микрокувет хэрэглэж буй үед, 260, 280 нм-т 1 OD тавина.  $A_{260}/A_{280}$  үнэлгээ нь 1.6-аас дээш байх ёстой.

*РНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан РНХ ялгах:*

Цус, эдээс РНХ ялгах фирмийн цомог ашиглан сорьцноос РНХ ялгаж болох ба үйлдвэрлэгчийн дагалдуулсан зааврын дагуу ялгана.

*УТ-ПГУ тавих:*

УТ-ПГУ-ын холимгийг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу бэлтгэнэ. Япон энцефалитын вирусын Е уураг тодорхойлох УТ-ПГУ-ыг **PE1-F/PE2-R праймераар:** 42° хэмд 60 минут, 94° хэмд 3 минут, 40 цикл (94° хэмд 30 сек, 50° хэмд 60 сек, 72° хэмд 60 сек), 72° хэмд 10 минутаар; **Ea-F/EA R праймераар:** 42° хэмд 60 минут, 94° хэмд 3 минут, 40 цикл (94° хэмд 30 сек,

65° хэмд 60 сек, 72° хэмд 60 сек), 72° хэмд 10 минутаар; **Eb-F/Eb-R праймераар:** 42° хэмд 60 минут, 94° хэмд 3 минут, 40 цикл (94° хэмд 30 сек, 55° хэмд 60 сек, 72° хэмд 60 сек), 72° хэмд 10 минутаар тус тус гүйцэтгэнэ.

*Гель электрофорез тавих:*

1.5%-ийн агароз гель бэлтгэж, 1µg/ml этидиум бромид нэмж электрофорезийн аппаратанд цутган зохих саамаа байрлуулж царцаана.

УТ-ПГУ бүтээгдэхүүн тус бүрээс 8-10 мкл соруулан авч, 3 мкл хүндрүүлэгч уусмалтай холин 1,5%-ийн агарозийн гелийн үүрэнд хийнэ. 100х.н ДНХ стандарт жишигчээс 8мкл соруулан гелийн нөгөө үүрэнд хийнэ. 1х Трис-боратын буфер ашиглан 100 вольт хүчдэлээр 30 минут электрофорез тавина.

5.4.3. Шинжилгээний үр дүнг дүгнэх:

Электрофорез дууссаны дараа гель детекцийн аппарат DijiDoc-It Image System ашиглан үр дүнг авна. Япон энцефалитын вирусын E уураг (PE1-F/PE2-R) тодорхойлох урвалын эерэг хяналт болон эерэг дээжинд 291bp; (Ea-F/EA-R; Eb-F/Eb-R) тодорхойлох урвалын эерэг хяналт болон эерэг дээжинд 1216bp бүхий толбо тус тус үүсэх үүсэх ба сөрөг хяналтанд толбо үүсэхгүй.

5.4.4. Чанарын хяналт:

- Эерэг хяналтанд япон энцефалит өвчний вирусын РНХ – г авна.
- Сөрөг хяналтанд нуклейн хүчил ялгах, Мастер микс бэлтгэх, ПГУ-ын өрөө тус бүрээс ариун нэрмэл ус юмуу ТВЕ буфер авна.
- Олон улсын стандартад нийцсэн ISO-9001 сертификаттай бүтээгдэхүүнийг сонгож хэрэглэнэ.
- Урвалж, оношлуур, праймерын хадгалалтын горимыг чанд мөрдөх ба праймер, урвалж бодисын хүчинтэй хугацаанд байнга хяналт тавьна

5.5. Вирус өсгөвөрлөх шинжилгээ

Япон энцефалитөвчний сэжигтэй болон эерэг дүн өгсөн шинжлэгдэхүүнийг эсийн өсгөвөрт халдаан эс эмгэгшүүлэн , ДТУ, УТ-ПГУрвалаар таньцыг шалган, 2-3 удаа зорчуулан таньц өссөн үед вируст материалыг хураан авна. Вирус өсгөвөрлөх шинжилгээний давуу тал нь вирусын эсрэгтөрөгчийн болон генетикийн хэв шинжийг тодорхойлох, шаардлагатай үед эмэнд мэдрэг чанарыг үнэлэх боломжийг олгодог. Япон энцефалит өвчний вирус нь сонгомлоор ВНК 21 (baby hamster kidney)эсд үржин олшрох чадвартайг харгалзан уг эсд өсгөвөрлөдөг.

5.5.1. Шаардлагатай, тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, тэжээлт орчин

- Биоаюулгүйн кабинет II
- -20-80°С гүн хөлдөөгч
- Лабоаторийн хөргөгч
- Термостат /CO<sub>2</sub> 5%/
- Хурилдуур 5000-10000 эрг/мин
- Инверт микроскоп
- Вакуум соруур
- Усан банн
- Dulbecco's modified Eagle medium
- 2% үхрийн хээлийн ийлдэс(2%heat-inactivated fetal calf serum-FCS)
- Трипсин-ЭДТА
- ТРСК- трипсин
- 100 mg penicillin, streptomycin/1 ml
- Фосфатын буферийн уусмал ариун 500мл

- Дусаагуур 1-20мл
  - Т-25см<sup>2</sup>, Т-75см<sup>2</sup> хэмжээтэй эсийн өсгөврийн сав /Фласк /
  - Автомат дусаагуур /25-50мл /
  - Автомат дусаагуур /8-12 сувагтай/
  - Автомат дусаагуур 10-100мкл
  - Ариун хошуу 10-100мкл
  - Ариун завь
  - Маркер
  - Этанол 70<sup>0</sup>С
  - Вирконы уусмал 1%
- 5.5.2. Эс өсгөвөрлөх

Шинжилгээний явц:

Т-25см<sup>2</sup> фласканд ойролцоогоор 10<sup>7</sup> буюу харах талбайд ВНК 21 эсийн ургалт 80-85% байх

- Эсийн тэжээлийг асгаад, 2-4 мл фосфатын буферийн уусмалаар 2 дахин зайлна.
- 5 мл Трипсин-ЭДТА хийж шугаман эсийн дээгүүр зөөлөн бүрхээж зайлаад дусаагуураар соруулан авна.
- Дахин 1 мл Трипсин-ЭДТА хийгээд 37 °С термостатанд 10-20 минут байлгана.
- Эсийг салгахын тулд фласкийг зайлах буюу зөөлөн цохиж болно.
- Трипсинийг саармагжуулахын тулд 1 мл үхрийн хээлийн ийлдэс нэмнэ.
- Эсийн өсгөврийн тэжээл 8 мл-ийг нэмж дусаагуураар соруулж гаргах маягаар эсийг

нэг нэгээр нь салгаж суспенз бэлтгэнэ.

- 10мл цийдмэгийг 10% үхрийн хээлийн ийлдэс байхаар эсийн өсгөвөрийн тэжээл нэмнэ.

Энэ цийдмэгийн 1мл-т ойролцоогоор 10<sup>5</sup> эс байна.

- Тус бүрдээ 4 мл эсийн өсгөврийн тэжээл бүхий 3 ширхэг Т-25см<sup>2</sup> фласканд бэлтгэсэн

эсийн цийдмэгээс 2, 2 мл-ийг нэмнэ.

- Үлдсэн 4 мл цийдмэгийг 20 мл эсийн тэжээл бүхий Т-75см<sup>2</sup> фласканд хийнэ.
- Фласкуудыг сайтар таглан 37<sup>0</sup> С термостатанд тавина.
- Эсийн ургалтыг Инверт микроскопоор өдөр бүр харж шалгана.

### **Эсийн өсгөвөрт шинжлэгдэхүүн халдаах (Т25 см<sup>2</sup>)**

Биоаюулгүйн II зэрэглэлийн кабинетэд хийж гүйцэтгэнэ.

#### 1. Фласкийг тэмдэглэх

- Шинжлэгдэхүүний дугаар, сэлгүүлэлтийн тоо, халдаасан он, сар, өдөр
- Хяналтын фласк дээр халдаасан он сар өдөр тэмдэглэнэ.

#### 2. Эсийг халдаахад бэлтгэх

Сорьц халдаахаас өмнө эсийн өсгөвөрийг микроскопын 40X өсгөлтөөр харж ургалт 75-100% болсон эсэхийг шалган тэмдэглэнэ.

- Эсийн өсгөврийн тэжээлийг асгана
- Т25 см<sup>2</sup> фласкийг 5мл ариун фосфатийн буферийн уусмалаар 2 удаа зайлна./ФБУ-ыг эсрүү шууд хийж болохгүй/
- Вирүс өсгөвөрлөх тэжээлээс 5мл хийж термостатанд 5-10 минут байлгана.

#### 3. Шинжлэгдэхүүн халдаах

- 5мл тэжээлийг фласкаас соруулж авна.

- Шинжлэгдэхүүнээс 0.2мл авч дан үет эсийн дээгүүр урсгах маягаар хийж фласкийг бөглөн 35C °-т 30минут байлгана.
- 1 фласканд 6мл тэжээл хийхээр бодно
- ТРСК- трипсинээс 1мл-д 1микролитр байхаар нэмнэ.
- Бэлтгэсэн тэжээлээс 6 мл-ээр шинжлэгдэхүүн халдаасан фласкуудад хийнэ.
- Фласкийг сайтар бөглөн 33-35<sup>0</sup> C термостатанд тавина.
- Эс гэмтэх үйлдэл /ЭГҮ/-ийг микроскопт өдөр бүр ажиглан тэмдэглэнэ.

### **Чанарын хяналт**

Эсийн өсгөвөрт хэрэглэгдэх оношлуур урвалж хадгалалтын горимыг мөрдөн ажиллахаас гадна халдвар хамгааллын дэглэм баримтлан ажиллана.

### **Шинжилгээний хариуг дүгнэх**

#### ***Халдварлагдсан эсийн өсгөврийн шингэнийг хураан дүгнэх***

- Эсийн 50-75% нь ЭГҮ-д орж хуурсан бол өсгөврийн шингэнийг хурааж 0.5% глицерол эсвэл үхрийн альбумин уураг нэмнэ.
- ЭГҮ илрэхгүй байсан ч 6-7 хоногийн дараа хураана.
- Хураасан эсийн өсгөврийн шингэнийг +4<sup>0</sup> C-д хадгалж ДТУ урвал тавина. ДТУрвал сөрөг бол дахин 2 удаа сэлгүүлэн халдаана.
- Шаардлагатай гэж үзвэл өсгөврийн шингэнийг 3000 эрг/мин хурдтай 5минут хурилдуурдан эсээс нь ялгана.
- ДТУ эерэг өсгөвөрт УТ-ПГУрвалаар вирүс ялган дүйх шинжилгээ хийнэ
- Вирүсийн өсгөврийг 2 хоногийн дотор -80<sup>0</sup> C-д хадгална.

### **6. Илэрсэн үл тохирлыг залруулах ажиллагаа**

Урвалд нөлөөлөх хүчин зүйл:

- Соруурын тохируулгын алдаа
- Урвалын шингэнийг соруулж авах, юүлэх үед гарсан алдаа
- Урвалын хугацаа
- Урвалж бодисуудын идэвхи төвшрүүлэг
- Урвалж бодисуудын рН, урвалж бодисуудын хэмжээ эзлэхүүн
- Хавтангийн угаалгын тоо
- Урвалын хэм
- Урвалжуудын хэм
- Урвал унших шүүлтүүрийн гэрлийн дохионы урт
- Коньюгат, өнгө олгогчийн төрөл
- Шинжлэгчийн дадлагажсан байдал

Ийлдэс судлалын шинжилгээ хийхэдгарах нийтлэг алдаа:

- Коньюгат, бусад урвалжын шингэлэлт болон коньюгат өөр нэгдэлтэй харилцан үйлчилсэний улмаас хавтан бүхэлдээ жигд нэг өнгө үзүүлэх
- Бэхлэгч уусмалыг жигд бус хийсэнээс хавтангийн өнгө алаг цоог өгөх
- Аль нэг урвалжын шингэлэлт буруу, угаалтын техник алдаанаас өнгө хурдан, эсвэл удаан тодрох
- Оношлуурын зааварт заагдсан хэмээс бага хэмд инкубацлах

#### **Ийлдэс судлалын шинжилгээнд гарах нийтлэг алдааг шийдвэрлэх**

- Коньюгат, бусад урвалжуудын шингэрүүлэлтийг шалгах

- Коньюгат (өнгө илтгэгч, урвал зогсоогч, бусад урваж) хэмжээг шалган хавтанд жигд хийх, хавтангийн үүрэнд хошууг хүргэхгүй байх
- Угаалгыг зөв технологиор хийх дадал эзэмших
- Дадлага хийх

### **Анхаарах зүйлс**

1. Урвал тавихын өмнө оношлуур урвалж, шинжлэх ийлдсийг тасалгааны хэмд 15-20 минут тавина
2. Хэрэв ийлдэс нь үндсэн өнгөө алдсан, цусны хольцтой тохиолдолд үр дүнд нөлөөлөх тул шинжлэхгүй
3. Ийлдсийг 3-аас илүү удаа гэсгээхгүй бөгөөд цуснаас ийлдэс ялгасны дараа ийлдсийг 3 хувааж  $-20^{\circ}\text{C}$  хэмд 1 сар, цаашид шингэн азот,  $-70^{\circ}\text{C}$  хэмд хадгална.
4. Угаагч уусмалыг найруулахын өмнө талст үүссэн тохиолдолд  $37^{\circ}\text{C}$  хэмд талст үгүй болтол байлгасны дараа угаагч уусмалыг хавтанг угаахаас 10 минутын өмнө найруулсан байх шаардлагатай
5. Урвалын хавтангийн уутыг зориулалтын хэсгээр онгойлгох, шаардлагатай хавтанг авсаны дараа амыг сайтар хаах, шаардлагатай бус бол олон удаа онгойлгохгүй байх
6. Хавтангийн ёроолд хүрэхгүй байх, шүүлтүүр цаасан дээр тавих
7. Анхлан тавьж байгаа тохиолдолд урвалж дусаахдаа үүр бүрд нэг хошуу ашиглах
8. Урвалж бодис, угаагч уусмалыг хавтанд дусаахдаа хийн бөмбөлөг үүсгэхээс зайлсхийх
9. Хавтангийн үүр бүрийг угаах хугацаанд анхаарах, угаасны дараа шүүлтүүр цаас ашиглан сайтар хуурайшуулах гэвч хавтанг хэтэрхий хатаахаас зайлсхийх
10. Шинжилгээнд аль болох нэг удаагийн хошуу, шилэн сав ашиглах
11. Лабораторийг үүсгэгчийн онцлогоос хамаарч зохих ариутгалын бодис ашиглан урьдчилан сайн ариутган бэлтгэсэн байх

## Хавсралт

### Ашигласан ном, хэвлэл

1. Байгалийн голомтот халдварт өвчний халдвархамгааллын дэглэмийн заавар 2008
2. Ц. Базарцэрэн, Б. Болдбаатар “Вирус судлалын үндэс I-I боть” Улаанбаатар 2009 он
3. Халдварт өвчний хяналтын лавлах 18 Улаанбаатар 2010
4. Лабораторийн биоаюулгүй ажиллагааны гарын авлага 2010 Улаанбаатар
5. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Chapter
6. QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (100) Catalog# 210212 цомгийн протокол. 2006
7. QIA amp Viral RNA Mini Kit (50) Catalog# 52904 цомгийн протокол, 2005
8. WHO Manual for the Laboratory Diagnosis of Japanese Encephalitis Virus Infection 2007
9. [http://www.virology.net/Big\\_Virology](http://www.virology.net/Big_Virology)
10. [http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/TP47\\_anx5.pdf](http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/TP47_anx5.pdf)
11. Ching-Kai Chuang, Shyan-Song Chiou, Li-Ching Liang and Wei-June. “Short report: Detection of Japanese encephalitis virus in mouse peripheral blood mononuclear cells using in situ reverse transcriptase – polymerase chain reaction”
12. Lei-Ron Jan, Kuang-Lo Chen, Chih-Feng Lu, Ying-Chang Wu AND Chi-Byi Horng. “Complete Nucleotide Sequence of the Genome of Japanese Encephalitis Virus Ling Strain: The Presence of a 25-Nucleotide Deletion in the 3'-Nontranslated Region”
13. Kuo-Chih Lin, Huei-Lan Chang, and Ruey-Yi Chang “Accumulation of a 3'-Terminal Genome Fragment in Japanese Encephalitis Virus-Infected Mammalian and Mosquito Cells”
14. Japanese encephalitis virus (JEV) real time RT-PCR цомгийн протокол Cat.№:ER-0065-02
15. QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (100), / Catalog №210212 цомгийн протокол. 2006
16. QIA amp Viral RNA ялгах Mini kit /50/ Catalog №52904 цомгийн протокол. 2005
17. Euroimmuni оношлуурын заавар

### Товчилсон үгийн жагсаалт

дНТФ	дезоксинуклеотидтрифосфат
ДНХ	Дизоксирибонуклейн хүчил
РНХ	Рибонуклейн хүчил
ПГУ	Полимеразын гинжин урвал
УТ-ПГУ	Урвуу транскриптазын полимеразын гинжин урвал
rRNA	рибосомын РНХ
V	вольт
ELISA/ФХУ	Фермент холбоот урвал
ДТУ	Дархан туяарах урвал
ЦНСУ	Цус наалдах саатуулах урвал
In vivo	Тахианы үр хөврөл
In vitro	Эсийн өсгөвөр
BSLab 3	Biosafety laboratory 3
BCC	Вирус саармагжуулах сорил
BHK 21	Baby hamster kidney
ЭГҮ	Эс гэмтээх үйлдэл
ЯЭЯпон энцефалит	
FCS	(2%heat-inactivated fetal calf serum-FCS)