Шүлсэнд SARS-CoV-2-ийг илрүүлэх *in-house* real-time quantitative RT-PCR оношлуурыг эмнэлзүйн сорьцод туршин, баталгаажуулсан дүн

Г.Чимэдлхамсүрэн[1], Т.Балжинням[2*], М.Батхишиг[2*], Ж. Жамбалдорж[1], Ч.Гансүх[1], Л.Дэлгэрзул[1], Н.Амарбаясгалан[3], Б.Болдбаатар[4], Д.Ганзориг[5], Г.Батбаатар[1], Д.Нямбаяр[1,6,7,8]*

[1]Анагаахын Шинжлэх Ухааны Үндэсний Их Сургууль
[2]Анагаахын Шинжлэх Ухааны Үндэсний Их Сургууль, Анагаах Ухааны Хүрээлэн
[3]Халдварт Өвчин Судлалын Үндэсний Төв
[4]Хөдөө Аж Ахуйн Их Сургууль, Мал Эмнэлгийн Хүрээлэн
[5]Эрүүл Мэндийн Даатгалын Ерөнхий Газар
[6]Каназава Их Сургууль, Япон улс
[7]Мюнхений Техникийн Их Сургууль, Холбооны Бүгд Найрамдах Герман Улс
[8]Хариуцлагатай зохиолч, Цахим хаяг: d.nyambayar@med.kanazawa-u.ac.jp, Утас: 99139520
**Тэгш эрхтэй зохиогчид*

Түлхүүр үг:
Вирус
SARS-CoV-2
Шүлс
RT-qPCR
Молекул биологийн оношилгоо

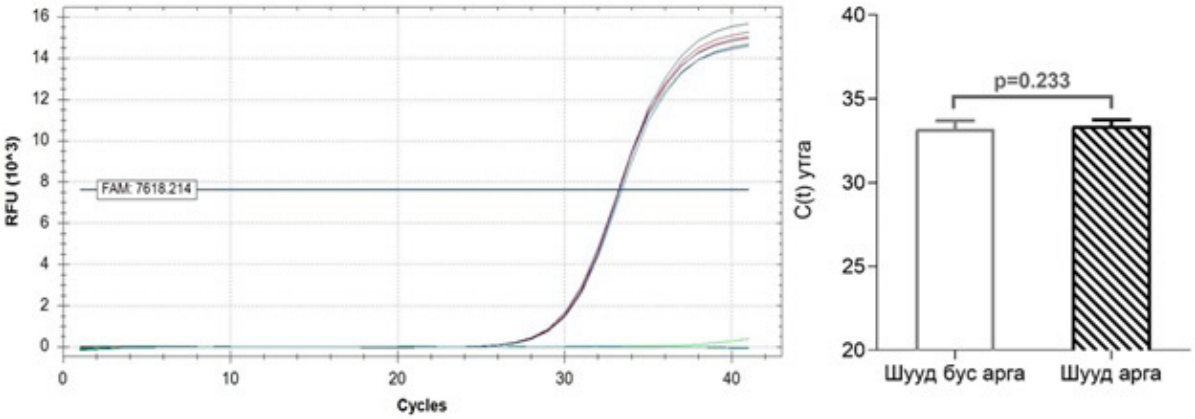
Товч утга: Дэлхийн Эрүүл Мэндийн Байгууллага (ДЭМБ), Америкийн Нэгдсэн Улс (АНУ)-ын Өвчний Хяналт, Урьдчилан Сэргийлэлтийн Төвөөс гаргасан удирдамжаар Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)-ийн халдварыг илрүүлэхэд амьсгалын замын дээд ба доод хэсгээс авсан сорьцуудыг ашиглах боломжтой. Дэлхийн улс орнуудад хамар залгиурын арчдас, залгиурын арчдас, шүлснээс SARS-CoV-2-ийн халдварыг илрүүлж, баталгаажуулах real-time quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)-ын аргыг ашиглаж байна. Ялангуяа сүүлийн хагас жилийн хугацаанд шүлснээс SARS-CoV-2-ийн халдварыг илрүүлэх RT-qPCR-ын аргууд олноор боловсруулагдаж, эмнэлзүйн туршилт судалгаа цөөнгүй хийгдсэн бөгөөд АНУ, Япон, Филиппин зэрэг орнуудад хэрэглээнд нэвтрээд байна. Бид эх орондоо шүлснээс нуклейн хүчил ялгалгүйгээр шууд SARS-CoV-2 вирусийг RT-qPCR-аар илрүүлэх *in-house* оношлуурын технологийг боловсруулаад байна. Энэхүү оношлуурыг Монгол улсад ашиглаж буй гадаад орноос авсан худалдааны цомогтой харьцуулан судлахаар энэхүү судалгааны ажлыг хийлээ. **Зорилго:** Шүлснээс SARS-CoV-2 вирусийг илрүүлэх *in-house* оношлуурыг одоогоор манай оронд оношилгоонд ашиглаж буй худалдааны цомогтой харьцуулах, өвөрмөц болон мэдрэг чанарыг тодорхойлох. **Арга аргачлал:** Судалгааг аналитик судалгааны нэг агшингийн загвараар хийж гүйцэтгэв. Судалгаанд оролцогчдыг түүвэрлэхдээ зорилтот түүврийн аргыг ашиглав. Энэхүү туршилт судалгаанд SARS-CoV-2 вирусийн халдвар батлагдан Халдварт Өвчин Судлалын Үндэсний Төв (ХӨСҮТ)-д хэвтэн эмчлүүлж байсан 41 хүн оролцсон. Мөн SARS-CoV-2 вирусийн халдвар авсан тодорхойгүй 19 хүнийг судалгаанд оролцуулав. **Үр дүн:** Энэ судалгаанд нийт 60 хүн хамрагдсан. Эдгээр оролцогчдын дундаж нас 39.56 (95% CI, 33.7-45.4) байв. Тэдний 63.3% (n=38)-ийг эмэгтэйчүүд эзэлж байлаа. ХӨСҮТ-д хэвтэн эмчлүүлж байсан 41 хүний хувьд онош батлагдсанаас хойших хугацаа дунджаар 4.88 (IQR, 3-7.5) хоног байлаа. Шинжилгээний үр дүнгээр судалгаанд оролцогчдын 66.7% (n=40) SARS-CoV-2-ийн халдвартай, 33.3% (n=20) халдваргүй тохиолдлууд байлаа. **Дүгнэлт:** Судалгааны үр дүнгээр өвчтний шүлснээс SARS-CoV-2 вирусийг илрүүлэх *in-house* оношлуур хамар залгиурын арчдасны сорьцонд Allplex™ 2019-nCoV оношлууруар хийсэн шинжилгээний хариутай 100% нийцэж байна. *In-house* оношлуурын сөрөг хариуны нийцэл 100% (83.2-100), эерэг хариуны нийцэл 100% (91.2-100) байгааг тогтоолоо. Энэхүү үр дүн нь шинээр боловсруулсан in-house оношлуурыг хэрэглээнд нэвтрүүлэх бүрэн боломжтой болохыг харуулж байна.

Үндэслэл: Дэлхийн Эрүүл Мэндийн Байгууллага (ДЭМБ), Америкийн Нэгдсэн Улс (АНУ)-ын Өвчний Хяналт, Урьдчилан Сэргийлэлтийн Төвөөс гаргасан удирдамжаар SARS-CoV-2-ийн халдварыг илрүүлэхэд амьсгалын замын дээд ба доод хэсгээс авсан сорьцуудыг ашиглах боломжтой.[1,2] Дэлхийн улс орнуудад хамар залгиурын арчдас, залгиурын арчдас, шүлснээс SARS-CoV-2-ийн халдварыг илрүүлж, баталгаажуулах RT-qPCR-ын аргыг ашиглаж байна. Ялангуяа сүүлийн хагас жилийн хугацаанд шүлснээс SARS-CoV-2-ийн халдварыг илрүүлэх RT-qPCR-ын аргууд олноор боловсруулагдаж, эмнэлзүйн туршилт судалгаа цөөнгүй хийгдсэн бөгөөд АНУ, Япон, Филиппин зэрэг орнуудад хэрэглээнд нэвтрээд байна.[3-5] Шүлснээс SARS-CoV-2 вирусийг илрүүлэх аргачлал үйлчлүүлэгчээс сорьц авахад зайлшгүй мэргэжлийн ажилтан шаардлагагүй, сорьц тээвэрлэхэд онцгой нөхцөл шаардлагагүй зэрэг давуу талуудтай. Мөн Alvin Kuo Jing Teo нарын судалгаагаар эмнэлзүйн шинж тэмдэггүй эсвэл хөнгөн хэлбэрийн Ковид-19-ийн үед шүлснээс SARS-CoV-2 вирусийг илрүүлэх арга хамар залгиурын сорьцоос илрүүлэх аргатай харьцуулахад мэдрэг чанар өндөртэй байгааг тогтоожээ.[3] Anne L. Wyllie нарын судалгаагаар Ковид-19 оношлогдсоноос хойш эхний 10 хоногт шүлсэнд SARS-CoV-2-ийн агууламж харьцангуй өндөр байгааг тогтоосон. Мөн эмнэлзүйн шинж тэмдэггүй, хөнгөн тохиолдлуудад шүлснээс SARS-CoV-2 вирусийг илрүүлэх арга илүү тохиромжтой байгаа онцолжээ.[6] Бид эх орондоо шүлснээс нуклейн хүчил ялгалгүйгээр шууд SARS-CoV-2 вирусийг RT-qPCR-аар илрүүлэх *in-house* оношлуурын технологийг боловсруулаад байна. Энэхүү оношлуурыг Монгол улсад оношилгоонд ашиглаж буй худалдааны цомогтой харьцуулан судлахаар энэхүү судалгааны ажлыг хийлээ.

Зорилго: Шүлснээс SARS-CoV-2 вирусийг илрүүлэх in-house оношлуурыг одоогоор оношилгоонд ашиглаж буй худалдааны цомогтой харьцуулах, өвөрмөц, мэдрэг чанарыг тодорхойлох

Арга аргачлал: Судалгааг аналитик судалгааны нэг агшингийн загвараар хийж гүйцэтгэв. Судалгаанд оролцогчдыг түүвэрлэхдээ зорилтот түүврийн аргыг ашиглав. Энэхүү туршилт судалгаанд SARS-CoV-2 вирусийн халдвар батлагдан ХӨСҮТ-д хэвтэн эмчлүүлж байсан 41 хүн оролцсон. Мөн SARS-CoV-2 вирусийн халдвар авсан нь тодорхойгүй 19 хүнийг судалгаанд оролцуулав. Энэхүү судалгааг хийхэд АШУҮИС-ийн Ёс зүйн хяналтын хороо, ЭМЯ-ны Анагаах ухааны ёс зүйн хяналтын хорооны зөвшөөрлөөр ёс зүйн хэм хэмжээг баримтлан ажилласан ба судалгаанд оролцогч тус бүрээс таниулсан зөвшөөрлийн хуудсаар судалгаанд оролцох зөвшөөрөл урьдчилан авч гарын үсэг зуруулан баталгаажуулсан. Судалгаанд оролцогчдоос 2021 оны 2-р сарын 21-23-ний өдрүүдэд шүлс болон хамар залгиурын арчдасны сорьцуудыг цуглуулсан. Хамар залгиурын арчдасны сорьцыг ХӨСҮТ-ийн Бэлгийн Замаар Дамжих Халдварын Лабораторит өгч шинжлүүлсэн. Уг шинжилгээ хамар залгиурын арчдасаас стандарт аргачлалаар ялгасан РНХ сорьцод Allplex™ 2019-nCoV (Seegene компани) оношлууураар стандарт ажилбарын зааврын дагуу хийгдсэн. Харин судалгаанд оролцогчдоос авсан шүлсэнд бид in-house RT-qPCR-ын оношлууураар шинжилгээг хийлээ. Шүлснээс шаардлагатай хэмжээгээр авч вирусийг задлах уусмалууд болон дулааны үйлчлэлээр сорьц боловсруулалт хийсэн. Үүний дараа SARS-CoV-2 вирусийг илрүүлэх RT-qPCR-ын шинжилгээг хийсэн. Судалгааны үр дүнд дескриптив үр дүнг тооцоолох, оношлууруудын үр дүнг харьцуулах нарийвчилсан статистик боловсруулалтад STATA 13.0 програмыг ашиглав. ROC муруйн шинжилгээгээр хамар залгиурын арчдас ба шүлсэнд хийгдсэн SARS-CoV-2 вирусийг илрүүлэх шинжилгээний аргуудын үр дүнг харьцуулж, in-house RT-qPCR-ын оношлуурын өвөрмөц, мэдрэг чанарыг тогтоолоо.

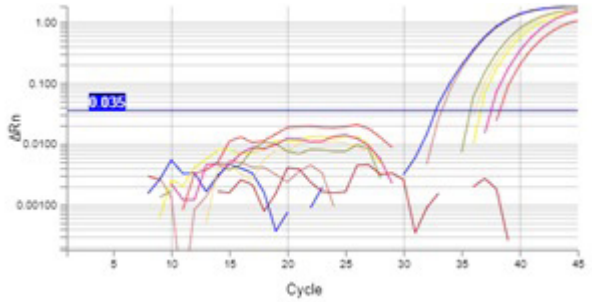
Үр дүн: Шүлснээс вирусийн РНХ-ийг ялгах аргаар вирус илрүүлэх мультиплекс RT-qPCR (шууд бус) болон шүлснээс вирусийн РНХ-ийг ялгахгүйгээр (шууд) шүлсэнд вирус шууд тодорхойлох мультиплекс RT-qPCR-ын аргачлалыг боловсруулж дотоод хяналтын ген болон SARS-CoV-2 вирусийн өвөрмөц дарааллуудыг олшруулав. Зураг 1-д RT-qPCR-ын үр дүнг харуулав. SARS-CoV-2 вирусийн өвөрмөц дарааллыг олшруулах RT-qPCR-ын үр дүнгээр шууд аргын дундаж C(t) утга 33.37±0.3, харин шууд бус аргын дундаж (t) утга 33.19±0.1 байлаа. Өөрөөр хэлбэл шууд ба шууд бус аргаар боловсруулсан сорьцуудад RT-qPCR-аар SARS-CoV-2 вирусийг илрүүлэхэд C(t) утгууд ойролцоо гарсан (p=0.233) ба шууд аргаар боловсруулсан шүлснээс RT-qPCR явуулахад саатуулах нөлөө огт байхгүй байлаа.



Зураг 1. Шууд ба шууд бус аргаар боловсруулсан сорьцуудад SARS-CoV-2 вирусийн РНХ-ийг илрүүлсэн дүн

Тайлбар: Энэхүү зурагт SARS-CoV-2 вирусийн өвөрмөц бай дараалыг илрүүлсэн зураглалыг харуулав. Улаан ба ягаан өнгүүдээр ялгаж цэвэршүүлсэн РНХ сорьцод хийгдсэн RT-qPCR (шууд бус)-ын үр дүн, хөх, саарал өнгүүдээр шүлснээс РНХ ялгахгүйгээр (шууд) RT-qPCR хийсэн үр дүнгүүд харуулав.

Шүлснээс вирусийн РНХ-ийг ялгахгүйгээр SARS-CoV-2-ыг илрүүлэх шууд аргачлалын аналитик мэдрэг чанарыг тодорхойлохын тулд SARS-CoV-2 вирус 6, 12, 25, 50, 100, 250, 1000 хуулбар/урвал агууламжтай сорьцуудыг бэлтгэн туршилтанд ашиглав. Шүлснээс шууд аргаар SARS-CoV-2 вирусийг илрүүлэх аргын ялган дүйх хязгаар (Limit of detection)-ыг тодорхойлоход нэг удаагийн урвалын холимогт 6-12 вирусийн геномын хуулбар байхад илрүүлэх боломжтой байгааг тогтоосон. Энэ нь дээрх аргын аналитик мэдрэг чанар нь одоогоор ашиглагдаж буй SARS-CoV-2 вирусийг илрүүлэх худалдааны цомгуудаас харьцангуй сайн болохыг харуулж байна.



Зураг 2. SARS-CoV-2 вирусийн РНХ-ийг илрүүлэх шууд аргын ялган дүйх хязгаарыг тодорхойлсон дүн

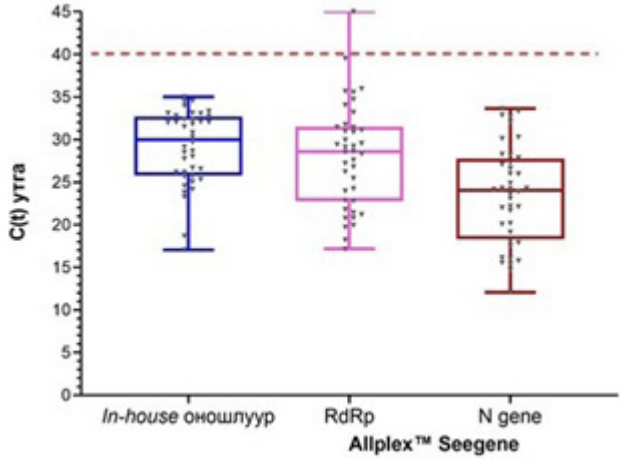
Тайлбар: Энэхүү зурагт SARS-CoV-2 вирусийн хуулбарын тоо өөр өөр агууламжтай сорьцуудад өвөрмөц бай дараалыг илрүүлсэн зураглалыг харуулав. Ягаан өнгөөр 6 хуулбар, улаан өнгөөр 12 хуулбар, ногоон өнгөөр 25 хуулбар, шар өнгөөр 50 ба 100 хуулбар, хөх өнгөөр 250 хуулбар бүхий урвалын холимогт хийгдсэн RT-qPCR (шууд бус)-ын үр дүнг харуулав.

Хүснэгт 1. SARS-CoV-2 вирусийн РНХ-ийг илрүүлэх шууд аргын аналитик өвөрмөц чанарыг судалсан дүн

Үүсгэгчид	Омог	Давталт	Үр дүн
Хүний коронавирус	229E	0/3	Сөрөг
Хүний коронавирус	OC43	0/3	Сөрөг
Хүний коронавирус	NL63	0/3	Сөрөг
Хүний коронавирус	HKU1	0/3	Сөрөг
MERS-коронавирус		0/3	Сөрөг
SARS-коронавирус		0/3	Сөрөг
Bocavirus	-	0/3	Сөрөг
Mycoplasma pneumoniae		0/3	Сөрөг
Streptococcus		0/3	Сөрөг
Influenza A (H1N1)		0/3	Сөрөг
Influenza A (H3N2)		0/3	Сөрөг
Influenza B		0/3	Сөрөг
Хүний аденовирус	Ad71	0/3	Сөрөг
Хүний метапневмовирус	-	0/3	Сөрөг
Respiratory syncytial virus	Long A	0/3	Сөрөг
Риновирус		0/3	Сөрөг
Parainfluenza 1	C35	0/3	Сөрөг
Parainfluenza 2	Greer	0/3	Сөрөг
Parainfluenza 3	C-43	0/3	Сөрөг
Parainfluenza 4	M-25	0/3	Сөрөг

Аналитик өвөрмөц чанарыг тодорхойлохын тулд SARS-CoV-2 вирустэй гомолог дараалал бүхий хүний коронавирусийн бусад төрөл, А, В хүрээний томуугийн вирус болон бусад үүсгэгчид бүхий нийт 20 үүсгэгчийн геномын дарааллыг ашиглан туршилт хийхэд аль ч тохиолдолд бүтээгдэхүүн олшролт тодорхойлогдоогүй (Хүснэгт 1). Өөрөөр хэлбэл бидний ашиглаж буй шууд аргаар SARS-CoV-2 вирусийг илрүүлэх аргачлал

өвөрмөц чанар маш сайн байгааг харуулж байна. Дээрхи туршилтын үр дүнгээр бидний боловсруулсан шүлснээс вирусийн РНХ-ийг ялгахгүйгээр SARS-CoV-2-ыг илрүүлэх шууд аргачлалыг эмнэлзүйн сорьцонд турших бүрэн боломжтой байгааг баталлаа. Эмнэлзүйн сорьцонд хийгдсэн туршилт судалгаанд нийт 60 хүн оролцсон. Оролцогчдын дундаж нас 39.56 (95% CI, 33.7-45.4) байв. Тэдний 63.3% (n=38)-ийг эмэгтэйчүүд эзэлж байлаа. ХӨСҮТ-д хэвтэн эмчлүүлж байсан 41 хүний хувьд оной батлагдсанаас хойших хугацаа дунджаар 4.88 (IQR, 3-7.5) хоног байлаа. Шинжилгээний үр дүнгээр судалгаанд оролцогчдын 66.7% (n=40) SARS-CoV-2-ийн халдвартай, 33.3% (n=20) халдваргүй тохиолдлууд байлаа. SARS-CoV-2-ийн халдвартай 40 хүний сорьцод Allplex™ 2019-nCoV оношлууураар шинжилгээ хийхэд 97.5% (n=39)-д RdRp ген (дундаж C(t)=27.63 [95% CI, 25.9-29.4]) эерэг, 100% (n=40) N ген (дундаж C(t)=23.54 [95% CI, 21.8-25.3]) эерэг байлаа. Харин *in-house* оношлууураар бүх сорьц (дундаж C(t)=29.11 [95% CI, 27.8-30.4]) эерэг тодорхойлогдсон. Зураг 3-т шинжилгээний аргуудын C(t) утгыг харьцуулан харуулав.



Зураг 3. Шинжилгээний аргуудын C(t) утгыг харьцуулсан байдал

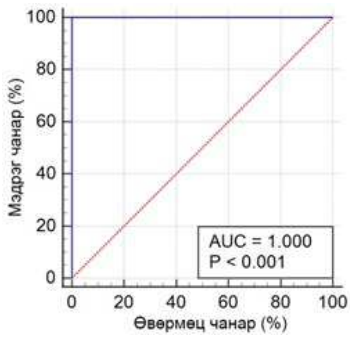
Бид Allplex™ 2019-nCoV оношлуурын үр дүнг стандарт болгон ROC муруй шинжилгээгээр in-house оношлуурын өвөрмөц ба мэдрэг чанарыг тодорхойлов. (Зураг 4) Үр дүнгээр *in-house* шинжилгээний үр ашиг (AUC, 100% [95% CI, 94-100], p<0.0001), эерэг хариуны нийцэл 100% [95% CI, 91.2-100], сөрөг хариуны нийцэл 100% [95% CI, 83.2-100] тодорхойлогдлоо.

Хүснэгт 2. Оношлууруудын үр дүнг харьцуулсан 2x2 хүснэгт

In-house оношлуур	Allplex™ 2019-nCoV (Seegene)		Нийт
	Эерэг (+)	Сөрөг (-)	
Эерэг (+)	40	0	40
Сөрөг (-)	0	20	20
Эерэг хариуны нийцэл	100% (95% CI, 91.2-100)		
Сөрөг хариуны нийцэл	100% (95% CI, 83.2-100)		

Тайлбар: Хувьсагчийг бодит тоо (эзлэх хувь)-оор илэрхийлсэн.

Мөн каппа коэффициент (k=1.0)-оор шинжилгээний аргууд үр дүнгээд хоорондоо 100% тохирсон буюу аргууд хоорондоо маш сайн нийцэмжтэй байлаа.



Зураг 4. ROC муруйн шинжилгээний үр дүн

Хэлцэмж: ДЭМБ-ийн зөвлөмжийн дагуу SARS-CoV-2 вирусын оношлогоонд хамар залгиурын арчдасны дээжээс РНХ ялгаж, түүнийгээ RT-qPCR-ын аргаар олшруулж илрүүлэх шинжилгээг ашигладаг. Уг арга нь дэлхий даяар бүх улс оронд, Монгол улсад ч өргөнөөр ашиглагдаж байгаа билээ. Хамар залгиурын арчдасаас шинжилгээ авах нь шинжлүүлэгчид зовиуртай, шинжилгээний явцад халдвар авах эрсдэл өндөртэй байдаг учраас сүүлийн үед хамар залгиурын арчдасын оронд шүлсийг шинжилгээнд хэрэглэх хандлага дэлхийн хөгжингүй орнуудад бий болж байна. Yale-ийн их сургуулийн судлаачдын мэдээлсэнээр шүлсэнд SARS-CoV-2 вирусын оношлогоог халдвар авсны дараах эхний 10 хоногт хийх нь хамар залгиурын арчдаст тодорхойлсоноос илүү мэдрэг байгаа нь SARS-CoV-2 илрүүлэгт ашиглаж болох давуу талтай юм.[6] Мөн SARS-CoV-2-тэй шүлсийг тасалгааны хэмд 14 хоног хүртэлх хугацаагаар хадгалахад шинжилгээний хариунд нөлөөлдөггүй давуу талтай. Шүлсэнд SARS-CoV-2-ийг тодорхойлох аргыг 1) шүлснээс РНХ ялгаж цэвэршүүлсэний дараа RT-qPCR-аар SARS-CoV-2 тодорхойлох (шууд бус) 2) шүлснээс РНХ ялгалгүйгээр тодорхойлох (шууд) гэж хоёр ангилна. Шууд аргын давуу тал нь РНХ ялгаж цэвэршүүлэх шатыг алгассанаар SARS-CoV-2 тодорхойлох цаг хугацааг ойролцоогоор 2 дахин багасгах мөн оношлогоонд зарцуулагдах өртгийг бууруулдаг. Бидний боловсруулсан шүлснээс шууд аргаар SARS-CoV-2 вирусийг илрүүлэх *in-house* RT-qPCR-ын оношлуур худалдааны цомогтой харьцуулсан туршилтын үр дүнгээр бүрэн нийцэж байгаа энэхүү судалгааны үр дүнгээр нотлогдлоо. Энэхүү оношлуурын технологийг цаашид хэрэглээд нэвтрүүлснээр нь олон талын давуу талууд бий болох боломжтой байна.

Дүгнэлт: Судалгааны үр дүнгээр шүлснээс SARS-CoV-2 вирусийг илрүүлэх *in-house* оношлуур хамар залгиурын арчдасын сорьцод Allplex™ 2019-nCoV оношлууураар хийсэн шинжилгээний хариутай 100% нийцэмж байна. *In-house* оношлуурын сөрөг хариуны нийцэл 100% (83.2-100), эерэг хариуны нийцэл 100% (91.2-100) байгааг тогтоолоо. Энэхүү үр дүн *in-house* оношлуурыг хэрэглээнд нэвтрүүлэх бүрэн боломжтой байгааг харуулж байна.

Талархал: Энэхүү судалгааг хийхэд бидэнтэй хамтран ажиллаж, дэмжлэг туслалцаа үзүүлсэн Д.Наранзул

захиралтай ХӨСҮТ-ийн хамт олонд судалгааны багийн зүгээс гүн талархал илэрхийлье.

Санхүүжилт: Энэхүү судалгаа Боловсрол, Шинжлэх Ухааны Яамны "БШУЯ-2020/32" тоот гэрээний дагуу санхүүжүүлэгдсэн болно.

Номзүй:

1. *Centers for Disease Control and Prevention. Feb 26 2021. In- terim Guidelines for Collecting and Handling of Clinical Speci- mens for COVID-19 Testing. Available at: https://www.cdc.gov/ coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html. Accessed 2 March 2021.*
2. *World Health O. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 19 March 2020. Geneva: World Health Organization; 2020 2020.*
3. *Teo AKJ, Choudhury Y, Tan IB, et al. Saliva is more sensitive than nasopharyngeal or nasal swabs for diagnosis of asymp- tomatic and mild COVID-19 infection. Scientific Reports. 2021;11(1):3134.*
4. *Azzi L, Carcano G, Gianfagna F, et al. Saliva is a reli- able tool to detect SARS-CoV-2. The Journal of infection. 2020;81(1):e45-e50.*
5. *Williams E, Bond K, Zhang B, Putland M, Williamson DA. Saliva as a Noninvasive Specimen for Detection of SARS-CoV-2. J Clin Microbiol. 2020;58(8).*
6. *Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, et al. Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. 2020;383(13):1283-1286.*

Establishment and clinical validation of the *in-house* real-time quantitative RT-PCR method for SARS-CoV-2 detection in saliva

Chimedlkhamsuren G[1], Baljinnyam T[2*], Batkhishig M[2*], Jambaldorj J[1], Gansukh Ch[1], Delgerzul L[1], Amarbayasgalan N[3], Boldbaatar B[4], Ganzorig D[5], Batbaatar G[1], Nyambayar D[1,6,7,8]*

[1]Mongolian National University of Medical Sciences
[2]Mongolian National University of Medical Sciences, Institute of Medical Sciences
[3]Mongolian National Center for Communicable Diseases
[4]Mongolian University of Life Sciences, Institute of Veterinary Medicine
[5]General Authority for Health Insurance of Mongolia
[6]Kanazawa University, Japan
[7]Technical University of Munich, Germany
[8]Corresponding author, Email: d.nyambayar@med.kanazawa-u.ac.jp, Tel: 99139520
**Equal contribution*

Summary

Background: Shortage of reagents and consumables seen globally amid COVID-19 pandemic demands the establishment and implementation of cost-effective, simplified, safe as well as highly sensitive SARS-CoV-2 testing methods to keep the viral transmission under the control. To this end, we developed, tested and validated the *in-house* real-time quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay method for SARS-CoV-2 detection in saliva that we believe will be helpful to increase the testing capacity of clinical laboratories, especially in low-to-mid-income countries with relatively limited resources.

Methods: We used a cross-sectional study design, where saliva and nasopharyngeal swabs were taken from 41 patients hospitalized for an average of 4.88 (IQR, 3-7.5) days since the date of diagnosis at the National Center for Communicable Diseases (NCCD) and 19 healthy individuals whose infection status was unknown at the time of study enrollment and were tested pair-wisely with *in-house* assay method and commercial RT-qPCR kit.

Findings: Results from this paired study demonstrated very high positive agreement (100%) between saliva samples tested by the *in-house* developed assay with nasopharyngeal swabs tested by the Allplex™ 2019-nCoV commercial RT-qPCR kit. Furthermore, our results showed that the in-house developed saliva RT-qPCR method has a low limit of detection (6-12 copies/reaction) and show a high specificity (100%) when tested against a panel of human pathogens such as SARS and MERS.

Conclusions: We demonstrate validation of our *in-house* developed saliva assay method that could be used as an alternative method to conventional nasopharyngeal swab RT-qPCR testing for SARS-CoV-2 screening. Moreover, our results suggest that the *in-house* saliva assay is a sensitive, simplified, safe, cost- and time-saving method that could be widely used in clinical laboratories.

Funding: This study was funded by the Ministry of Education and Science of Mongolia (research grant No. 2020/32).

Keywords: Virus, SARS-CoV-2, RT-qPCR, Molecular biological diagnosis