



УДИРДАГЧ:
Ж.Зандраа
АУ-ны доктор, Чорос-Онош
ХХК-ний ерөнхий захирал

СУДАЛГААНЫ БАГИЙН ГИШҮҮД: Г.
Жамба, АУ-ны доктор, зөвлөх С.
Золзаяа, Чорос-Онош ХХК-ний
менежер

Оношлуур, эм биобэлдмэл ба хэрэглүүр

SARS-CoV-2 RT- qPCR илрүүлэх

ЦОМОГ ОНОШЛУУРЫН СУДАЛГАА, ТУРШИЛТ



SARS-CoV-2 ЦОМОГ ОНОШЛУУР

Тээвэрлэлтийн хувьд хялбар, чанартай, өртөг бага оношлуур дотооддоо үйлдвэрлэснээр гадны үйлдвэрлэгч, импортоос хараат бус байж аливаа болзошгүй нөхцөлд бэлтгэлтэй байна. Улаанбаатар хотоос гадна орон нутагт хэрэглэж буй нээлттэй системтэй ПГУ-ийн багаж, төхөөрөмжид нийцэх оношлуурыг гарган авах нь маш их ач холбогдолтой юм.

ҮНДЭСЛЭЛ

SARS-CoV-2 нь титэмт вирус гэж нэрлэгддэг вирусийн өргөн хүрээний бүлэгт багтдаг. Энэ бол эерэг утгат дан утаслаг PHX (+ ss-RNA) агуулсан вирус юм. Коронавирусийг түргэн хугацаанд найдвартай оношлох нь уг өвчнийг хянах тулгуур юм. Халдварыг түргэн хугацаанд зөв бодитой тогтоосноор халдварын тархалтыг тогтоон барих, өвчнийг бүрэн хяналтанд байлгах, эмчилгээний явц болон үр дүнг тооцох зэрэг чухал ач холбогдолтой. Өөрөөр хэлбэл цар тахлын үед халдвар үүсгэгчийг илрүүлэх, оношлох, эмчилгээний үр дүнг хянах үүднээс манай улсын хувьд чанартай оношлуур үйлдвэрлэх хэрэгцээ шаардлага зүй ёсоор урган гарч байна.

Дотооддоо үйлдвэрлэн нэвтрүүлэх оношлуур гадаадын үнэтэй оношлууртай эн зэрэгцэх сайн чанартай байхаас гадна үнийн хувьд хэд дахин хямд байх боломжтой. Түүнчлэн оношлуурыг дотооддоо үйлдвэрлэснээр цаг алдахгүй байж, олон тоогоор үйлдвэрлэн оношлогоонд зарцуулах зардлыг бууруулахад түлхэц болно.

ЗОРИЛГО

SARS-CoV-2 илрүүлэх нуклеин хүчилд тулгуурсан оношлуур үйлдвэрлэх технологи боловсруулж туршин, үйлдвэрлэл явуулах, оношлуурыг хэрэглээнд нэвтрүүлэх

ЗОРИЛТ

1. Оношлуур үйлдвэрлэх технологи боловсруулж туршилт судалгаа явуулах
2. Судалгааны үр дүнд оношлуурыг туршин үйлдвэрлэх, хэрэглээнд нэвтрүүлэх

CHOROS SARS-CoV-2 RT-qPCR илрүүлэх цомгийн судалгааны мэдээллийг тусгав. Энэ цомгийг (оношлуур) ПГУ-ын оношлуур гаргаж авах стандартын дагуу хийсэн. CHOROS SARS-CoV-2 RT-qPCR илрүүлэх цомог нь SARS-CoV-2 вирусийн нуклеин хүчлийг бодит хугацааны-урвуу транскриптазат-полимеразын гинжин урвал (БХ-УТ-ПГУ)-аар амьсгалын замын сорьцоос илрүүлэхэд зориулагдсан. Энэхүү цомгийг SARS-CoV-2 вирусийн PHX-г илрүүлэхэд ашиглана.

SARS-CoV-2 вирусийн PHX гол төлөв халдварын хурц үед илэрдэг. Сөрөг шинжилгээний хариуг халдваргүй гэж дүгнэж болохгүй бөгөөд эмнэлзүйн үзүүлэлт, өвчний түүх болон тархвар судлалын асуумжтай хавсран эцсийн дүгнэлтийг гаргана.

Зах зээл дээр байгаа оношлуурууд өөр хоорондоо өвөрмөц болон мэдрэг чанараараа ялгардаг. Бидний гарган авсан оношлуур коронавирусийн мутацад бага өртдөг, хоёр бай ген ашигласан, өвөрмөц мэдрэг чанар сайн. Дараах хүснэгтэд манай улсад хэрэглэж буй зарим SARS-CoV-2 вирусийн оношилгооны цомгуудыг харьцуулан харуулав.

Манай улсад хэрэгдэж буй зарим SARS-CoV-2 вирусийн оношилгооны цомгуудын харьцуулалт
Хүснэгт 1.

Компани	Цомог, нэр	Бай ген	Сорьц/ Холимог хэмжээ	LOD
Sansure	Novel Coronavirus(2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)	N, ORF1ab	30/20uL	200 хувилбар/мл
Seegene	Allplex SARS-CoV-2 Assay	E, RdRP/S,N	5/15uL	50 хувилбар/мл
Orient gene	SARS-CoV-2 Detection Kit	N, ORF1ab	15/35uL	200 хувилбар/мл
Runmei	New Coronavirus КОВИД-19 Nucleic Acid Detection kit (Fluorescent RT-PCR Method)	N, ORF1ab	5/20uL	100 хувилбар/мл
Zybio	Molaccu КОВИД-19 Detection Kit	N, RdRP, E	10/10	100 хувилбар/мл

СУДАЛГААНЫ АРГА ЗҮЙ

Уг шинжилгээг бодит хугацааны-урвуу транскриптазат-полимеразын гинжин урвал (БХ-УТ-ПГУ)-ын аргыг ашиглан гүйцэтгэдэг. Энэхүү шинжилгээ нь тусгайлан тохируулсан урвалж бодисуудыг хэрэглэн нэг шаттай явагддаг (One-Step RT-qPCR). Эмнэлзүйн сорьцоос ялгасан PHX-г урвуу транскриптазын урвалд оруулсны дараа нэг шаттай олшруулах урвалд оруулна. Оношлуурт 2 бай генийг сонгосон болно. Хадгалагдсан дараалалтай генийг сонгон авсан. Тодруулбал, Orf1ab болон N ген дээр праймер проб загварчилснаар SARS-CoV-2 вирусийн геномыг олшруулан амьсгалын замын сорьцноос илрүүлэх боломжтой болсон. Бидний бүтээсэн оношлуурт хүний PHX задлах эсгэг болох RNase P генийг дотоод болон PHX ялгах хяналт болгон ашигласан. Өөрөөр хэлбэл, сорьцоос PHX ялгах процессыг шалгахгаас гадна УТ-ПГУ-г хэвийн явагдсан эсэхийг хянах боломжтой. Оношлуур нь мультиплекс бодит хугацааны-урвуу транскриптазат-полимеразын гинжин урвал (БХ-УТ-ПГУ)-ын цомог бөгөөд вирусийн 2 бай (Orf1ab, N) болон хяналтын 1 генийн проб праймерын хослолуудаас бүрдсэн. Мультиплекс шинжилгээний давуу тал болох хэрэглэхэд хялбар, 3 ген нэгэн зэрэг илрүүлэх гэх зэрэг онцлогтой.

ҮР ДҮН

CHOROS SARS-CoV-2 RT-qPCR илрүүлэх цомгийн зааврын дагуу хяналтуудаа шалгасны дараа сорьцуудаа шалгаж үзнэ. Цомгийн эерэг сөрөг болон дотоод хяналтууд Хүснэгт 2-ын шаардлагыг хангасан байна. Ийм нөхцөлд шинжилгээг хүчинтэй гэж тооцно. Хэрвээ хяналтуудын үзүүлэлт хангалтгүй байвал шинжилгээг давтана. Хяналтууд хэвийн явагдсан тохиолдолд шинжилгээний хариуг бататгана.

Эерэг сөрөг болон дотоод/ялгах хяналтуудын хүлээн зөвшөөрөгдөх Ct утга.

Хүснэгт 2.

Хяналт	Зөвшөөрөгдөх Ct утга	Шинжилгээ хүчинтэй эсэх
Дотоод/ялгах хяналт	RNase P ген	<38
Эерэг хяналт	Orf1 ab ген	<27
Эерэг хяналт	N ген	<27
Сөрөг хяналт	≥45	≥45

Сорьцны харуиг Ct утгаар нь доорх хүснэгтийн дагуу дүгнэнэ.

Шинжилгээний дүнгийн cutoff утга

Хүснэгт 3.

Target	Cut-Off	Хариу
Бай ген (Orf1 ab)	Cq < 40	Эерэг
Бай ген (Orf1 ab)	Cq ≥ 40	Сөрөг
Бай ген (N)	Cq < 40	Эерэг
Бай ген (N)	Cq ≥ 40	Сөрөг
RNase P (IC/EC)	Cq <38	Ялгасан РНХ хангалттай
RNase P (IC/EC)	Cq ≥38	Ялгасан РНХ хангалтгүй

*IC: Дотоод хяналт; EC: Ялгах хяналт

Цомгийн эерэг, сөрөг болон дотоод/ялгах хяналтуудыг хүснэгт 1, 2 –т зааснаар хийнэ. Эс тэгвээс шинжилгээг хүчингүйд тооцож давтана. Бүх хяналтын утга хэвийн байвал Хүснэгт 4-т зааснаар шинжилгээний хариуг дүгнэж бататгана.

Шинжилгээний хариуг дүгнэх

Хүснэгт 4.

Orf1ab gene	N gene	RNase P (IC/EC)	Байдал	Хариу	Арга хэмжээ
СӨРӨГ	СӨРӨГ	СӨРӨГ	Хүчингүй	Хүчингүй	Шинжилгээг давтана. Адилхан хариу гарсан тохиолдолд сорьцыг дахин авч шинжилгээг давтана.
СӨРӨГ	СӨРӨГ	ЭЕРЭГ	Хүчинтэй	SARS-CoV-2 илрээгүй	Сөрөг гэж бүртгэнэ
ЭЕРЭГ	ЭЕРЭГ	ЭЕРЭГ эсвэл СӨРӨГ	Хүчинтэй	SARS-CoV-2 илэрсэн	Эерэг гэж бүртгэнэ.
ЭЕРЭГ	СӨРӨГ	ЭЕРЭГ эсвэл СӨРӨГ	Хүчинтэй	SARS-CoV-2 илэрсэн	Шинжилгээг давтана. Адилхан хариу гарсан тохиолдолд эерэг гэж бүртгэнэ.
СӨРӨГ	ЭЕРЭГ	ЭЕРЭГ эсвэл СӨРӨГ	Хүчинтэй	SARS-CoV-2 илэрсэн	Шинжилгээг давтана. Адилхан хариу гарсан тохиолдолд эерэг гэж бүртгэнэ.

SARS-CoV-2 илрүүлэх цомгийг Mx3000P qPCR System, Rotor-Gene Q MDX 5plex HRM system, BioRad CFX96 Real-Time PCR System, LightCycler® 480 Real-Time PCR System, MA6000 Real-time quantitative PCR system багажууд дээр шалгасан. Оношлуурын туршилт үйлдвэрлэл, судалгааг 2020 оны 12 сарын 5-наас 2021 оны 6 сарын 20 хүртэлх хугацааг хамран хийв.

CHOROS SARS-CoV-2 RT-qPCR илрүүлэх цомог гаргаж авахдаа нийтэд хүртээмжтэй генийн мэдээллийн сангуудыг ашиглан SARS-CoV-2 вирусийн омог, изолят болон хувилбаруудын РНХ-ийн дарааллыг ашигласан. Үүнд: АНУ-ын Үндэсний биотехнологийн мэдээллийн төвийн (NCBI) сангаас 105, GISAID байгууллагын сангаас 115 үүсгэгчийн дараалал авч харьцуулсан судалгаа хийсэн. SARS-CoV-2 геном дээр өвөрмөц болон хадгалагдсан дараалал сонгож праймер пробын загварчлал хийсэн. Загварчилсан праймер пробын дарааллуудаа 2020 оны 10 сарын 24-ний өдрийн Ген банкны (Genbank) 97, GISAID байгууллагын 1200 SARS-CoV-2 вирусийн дараалалтай харьцуулсан.

In silico харьцуулалтын үр дүнд CHOROS SARS-CoV-2 RT-qPCR илрүүлэх цомогт хэрэглэх праймер пробуудын дараалал бүх SARS-CoV-2 вирусийн омог, изолят болон

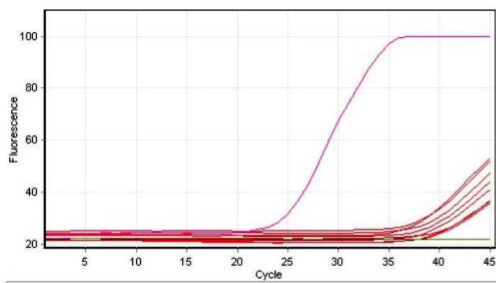
хувилбаруудын дараалалтай 100% адил байгааг тогтоосон.

ӨВӨРМӨЦ ЧАНАР ТОГТООХ СУДАЛГАА

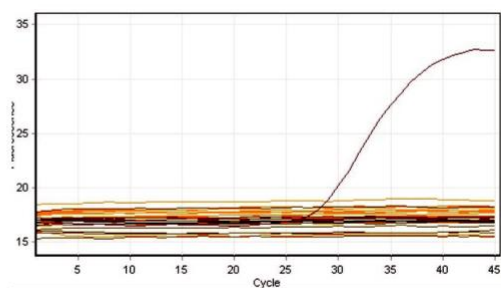
CHOROS SARS-CoV-2 RT-qPCR илрүүлэх цомгогт хэрэглэх праймер пробуудын дарааллыг бүх SARS-CoV-2 вирусийн омог, изолят болон хувилбаруудыг илрүүлэхээр загварчилсан бөгөөд тэр дундаа амьсгалын замд тохиолдох бичил биетний нуклеин хүчилтэй урвалд орохгүй байхаар загварчилсан. Үүнийг эхний шатанд *in silico* анализ хийсний дараа Хүснэгт 4 –т байгаа бичил биетнүүдийн геном агуулсан сорьцуудад туршиж үзсэн. Сорьц болох бичил биетнүүдийн геном агуулсан ДНХ/РНХ-ээс тус бүр 8,0 микролитер авч урвалд оруулсан. Урвалд хийсэн нуклеин хүчлийн хэмжээ ойролцоогоор 10000 геномын хуулбар тус бүр байсан. Хүснэгтэнд бичигдсэн зүйлсийн геномтой олшруулалт явагдаагүй, эерэг дохио өгөөгүй болно. Эерэг, сөрөг болон дотоод хяналтууд хэвийн хэмжээнд дохио өгч, бай ген болох Orf1ab болон N генүүдийн сувагт дохио илрээгүй, сөрөг хариу гарсан (Зураг 1). Энэхүү шинжилгээг зүйл болгон дээр 3 давталттай хийсэн.

Оношлуурын мэдрэг чанарын доод хязгаар болон мэдрэг чанарыг тодорхойлоход (Limit of Detection (LoD)) анализын стандарт шингэрүүлэлтийг ашиглана. Аналитын хамгийн бага шингэрүүлэлтийн 95% -ийг илрүүлэх утгыг LoD буюу мэдрэг чанарын доод хязгаар гэж тодорхойлно.

CHOROS SARS-CoV-2 RT-qPCR илрүүлэх цомгийн мэдрэг чанарын доод хязгаарыг (LoD) тодорхойлоход SeraCare AccuPlex SARS-CoV-2 Reference Material Kit (Cat# 0505-0126) хяналтын материалыг ашигласан. 500 хуулбар/мл хэмжээтэй материалыг цаашид



Зураг 1. Оношлуурын аналитик мэдрэг чанарыг тодорхойлох



Зураг 2. ROX сувгаар SeraCare AccuPlex SARS-CoV-2 хяналтын материалын шингэрүүлэлтүүдийг туршсан байдал. Эерэг хяналтын муруй болон шингэрүүлэлтүүдийн муруй ажиглагдана.

шингэрүүлэн (50 хуулбар/мл, 100 хуулбар/мл, 200 хуулбар/мл, 300 хуулбар/мл болон 500 хуулбар/мл) урвалд ашиглан туршсан. Бодит хугацааны урвуу транскриптазаг полимеразын гинжин урвалын (БХ-УТ-ПГУ) туршилтуудыг Mx3000P qPCR System, Ro-to-Gene Q MDX 5plex HRM system багажуудаар гүйцэтгэсэн (Зураг 2).

Мэдрэг чанарын доод хязгаарыг тодорхойлоход вирусийн РНХ-ийн хамгийн бага шингэрүүлэлтийг 20 давтаж (replicate) хийсэн. Мэдрэг чанарын доод хязгаар нь 20 давтамжаас хамгийн бага шингэрүүлэлт (хуулбар/мл) $\geq 95\%$ (19/20) эерэг хариутай байхаар тодорхойлогдоно.

Энэхүү судалгаагаар CHOROS SARS-CoV-2 RT-qPCR илрүүлэх цомгийн мэдрэг чанарын доод хязгаар (LoD) Mx3000P qPCR System багажаар үзэхэд 100 хуулбар/мл гэж тогтоогдсон (Хүснэгт 5).

Мэдрэг чанарын судалгааны үр дүн

Хүснэгт 5.

Бай ген	РНХ (хуулбар/мл)	Нийт	Дундаж Ct	SD	CV	Эерэг	Сөрөг	Нийцэл
N	100 хуулбар/мл	20	36.24	1.46	0.03	20	0	100%
ORF1ab	100 хуулбар/мл	20	36.98	1.59	0.04	20	0	100%

Худалдааны цомгуудтай харьцуулсан судалгаа

Бид CHOROS SARS-CoV-2 RT-qPCR илрүүлэх цомгийг Интермед эмнэлгийн лабораторид өгч Sansure компаний “Novel Coronavirus(2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)” нэртэй ижил төстэй бүтээгдэхүүнтэй харьцуулсан судалгааг хийсэн.

Бидний туршилтын цомгийн урвалын эзлэхүүн 20,0 микролитер (урвалын холимог 12,0 микролитер, сорьцын эзлэхүүн 8,0 микролитер). Энэ нь бидний үйлдвэрлэх гэж буй 30,0 микролитер эзлэхүүн бүхий урвалаас (урвалын холимог 10,0 микролитер, сорьцны эзлэхүүн 20,0 микролитер) сорьцын хэмжээ нь 2,5 дахин бага байсан. Сорьцын хэмжээ хэдий их байна төдий хэмжээгээр мэдрэг чанар ихэсдэгийг анхаарах нь зүйтэй. Эерэг сөрөг хариунууд нийцэж байгааг Хүснэгт 6-д үзүүлэв. Судалгааг хийхдээ BioRad CFX96 Real-Time PCR System, LightCycler® 480 Real-Time PCR System багажуудыг ашигласан болно.

ДҮГНЭЛТ:

CHOROS SARS-CoV-2 RT-qPCR оношлуурын сорьцын эзлэхүүн нэмэгдэхэд Ct утга улам багасах нь тодорхой. Энэ судалгаанд MA6000 Real-time quantitative PCR system багажийг ашигласан. Энэхүү оношлуурын үзүүлэлтүүд Sansure novel CoV-2019 pcr kit оношлууртай нийцэл сайтай байгааг туршилтаар баталсан. Бидний гаргаж авсан оношлуурын мэдрэг чанар 98.25% (95% CI: 90.61–99.96%), өвөрмөц чанар 98.92% (95% CI: 94.15–99.97%) байсан. CHOROS SARS-CoV-2 RT-qPCR оношлуураар хоёр вирусийн генийг илрүүлэх боломжтой. Оношлуурын энэ загвар нь өндөр мэдрэг болон өвөрмөцөөр оношилгоо хийх боломжтойг судалгааны үр дүн батлав.