

상기도 검체의 혼합 검체를 이용한 코로나바이러스 감염증-19 분자 검사 프로토콜

The Protocol for COVID-19 Molecular Testing with
Pooled Upper Respiratory Specimens

2020. 5. 1.

대한진단검사의학회

신종코로나바이러스 대책위원회

김소연 | 국립중앙의료원 진단검사의학과

성홍섭 | 울산의대 진단검사의학과

이재현 | 전북의대 진단검사의학과

이혁민 | 연세의대 진단검사의학과

홍기호 | 서울의료원 진단검사의학과

1 배경

현재 우리나라의 코로나바이러스 감염증-19 (이하 코로나-19) 검사의 표준은 real-time RT-PCR 기반의 분자 진단 검사이다. 2020년 4월 28일 기준으로 약 60만 명에게 검사를 시행하였으며, 이 중 1만 명 이상이 확진되었다. 검사하는 검체는 의심환자 1인마다 상기도 검체(구인두도말과 비인두도말 혼합), 하기도 검체를 가능한 모두 채취한 후에, 검체마다 검사를 시행하는 것을 원칙으로 하고 있다.

2020년 4월 28일 현재 국내의 신규 환자 발생 건수는 유행 초기에 비해 감소하였으나, 집단시설, 해외입국자, 요양병원 등에서 신규 감염이 증가하면서, 집단의 구성원 전체를 대상으로 하는 대규모 검사의 필요성이 제기되고 있다. 단시간에 많은 검사를 시행하는 방법 가운데 하나로, 혼합 검체(pooled specimen)를 이용한 검사가 있다. 이 방법은 헌혈 혈액에 대한 바이러스 검사에서 널리 사용되고 있으며, 코로나-19에 대해서도 해외 일부 국가에서 시도된 바 있고, 국내에서도 특정 집단을 대상으로 시도된 바 있다.

현재까지 알려진 과학적 지식과 임상 검체를 사용한 연구 결과를 근거로 하여 대한진단검사의학회 신종코로나바이러스 대책위원회와 질병관리본부 감염병분석센터는 상기도 검체를 혼합한 검체에 대한 코로나-19 분자 진단검사 프로토콜을 제안한다. 이 프로토콜은 공공기관 검사실과 의료기관의 검사실에서 사용하기 위한 용도이다. 이 프로토콜의 내용은 추가적인 연구 결과나 지식에 따라 개정할 수 있다.

2 프로토콜

대한진단검사의학회 신종코로나바이러스 대책위원회와 질병관리본부 감염병분석센터는 이상의 결과를 바탕으로 다음과 같이 상기도 검체의 혼합 검체를 이용한 분자 진단검사를 제안한다. 이 프로토콜은 증상이 있는 의심환자의 검사와 같은 통상적인 상황에는 권장되지 않으며, 다음과 같은 상황에서 민감도의 손실을 최소화하면서 효율적으로 검사를 진행하는 것을 목적으로 한다.

- 1) 검사 대상자가 많은 집단에서, 빠르게 양성 선별 또는 음성 배제를 해야 하는 경우
- 2) 검사 자원이 제한적인 경우

이 프로토콜을 사용하거나, 변경하여 사용할 때에는, 반드시 검체 채취, 핵산 추출, 검사 시약에 따른 차이를 검증하여 충분한 성능을 입증한 후에 사용해야 한다.

가 ㉡ 검체 종류

상기도 검체인 비인두도말 또는 구인두도말 검체에만 적용하는 것을 권장한다.

- 상기도와 하기도 검체가 모두 필요할 것으로 판단되는 환자는 혼합 검체가 아닌 개별 검체로 검사하는 것을 권장한다.

나 ㉡ 검체 용기

- 바이러스 수송 배지(Virus transport media, 예: UTM)
- 바이러스 분자진단검사 전용 용기(예: Copan eNAT 등의 guanidinium-based buffer 기반)을 모두 사용할 수 있다.

분자진단검사 전용 용기는 바이러스 불활화(inactivation) 성분이 첨가되어 검체 취급 시 더 안전하다는 장점이 있다. 희석에는 반드시 동일한 종류의 검체 용기에 채취한 검체만을 사용할 것을 권장한다.

다 ㉡ 검체 채취, 이송, 일반적인 생물안전

상기도 검체 채취의 내용은 대한진단검사의학회 또는 질병관리본부의 지침을 참조한다.

라 ㉡ 검체의 혼합

1) 검체 혼합 개수 및 혼합량의 결정

검체 혼합 개수를 결정하고, 핵산 추출에 사용되는 용량을 확인한다. 핵산 추출에 사용할 최종 용량은 제조사 권장을 따른다. 일반적으로 검체를 혼합한 후 핵산 추출에 사용하는 검체량이 많을수록, 혼합 검체에서 양성을 검출할 확률이 높아진다.

권장 희석 배수는 적용하는 대상 집단의 특성을 고려하여 신중하게 적용해야 하며, 본 프로토콜은 4-10개의 혼합을 권장한다.

- 역학적으로 유사한 집단(예: 요양병원 환자)에서의 혼합은 최대 10개 검체의 혼합을 기본으로 권장한다. 10개 이하의 검체는 편의에 따라 자유롭게 혼합해서 사용할 수 있다.
- 역학적으로 차이를 보이는 집단(예: 해외입국자)에서의 희석은 4개 검체의 혼합을 권장한다. 편의에 따라 5-6개 검체까지 혼합할 수 있다.

2) 검체의 혼합 절차

- 가) 검체를 혼합하는 검사자는 적절한 개인보호장비(N95, KF94 또는 동급 이상의 호흡 보호구, 전신보호복, 일회용 장갑 등)를 착용하고 생물안전 2등급(BL2) 수준의 검사실 안에서 Class II 이상의 생물안전작업대(BSC)에서 검체를 처리하는 것을 권장한다. 불활화 성분이 첨가된 분자진단검사 전용용기 검체의 경우에도, 가능한 이 원칙을 준수한다. 생물안전작업대 밖에서 검체를 처리해야 한다면 N95 이상의 호흡 보호구를 포함한 개인보호장비를 필수적으로 착용하고 작업 종료 후 검사대를 70% 알코올 등 적절한 방법으로 소독한다.
- 나) 검체 혼합 전 뚜껑이 밀봉된 상태에서 최소 30초 이상 검체를 보텍스 교반기(vortex mixer)를 이용하여 잘 섞어준다(vortexing).
- 다) 혼합 검체로 사용하기 위한 새로운 검체 용기에, 각 검체를 같은 양으로 멸균 dropper 또는 멸균 팁과 피펫을 이용하여 넣는다. 사용하는 검체 용기는 “나. 검체 용기” 항의 검체 용기와 동일하다. 원검체의 용기 뚜껑을 열 때에는 주변이 면봉으로 오염되지 않도록 주의한다.
- 라) 혼합 검체의 총량은 희석 배율과 검체 개수를 고려하여, 혼합 후의 총 검체량이 용기 용량의 60%를 넘지 않도록 한다.
- 마) 분주(aliquoting)을 통한 검체 혼합에는 dropper (1회용 투명 피펫) 또는 피펫을 사용한다.
- 바) Dropper를 사용하면 피펫에 비해 팁을 교체할 필요가 없어 간편하며, 교차오염의 가능성을 줄여준다. 따라서 대량의 검사를 시행할 때 유용하다. 사용하는 dropper는 ethylene oxide 가스 등으로 멸균한 제품만을 사용한다. Dropper로 분주하는 양은 500 μ L를 권장한다. 옮기는 용기로는 15 mL conical tube 등을 사용할 수 있으며, 라)항에서 기술한 대로 용량에 유의한다. 검체를 모두 분주한 후에는 보텍스 교반기로 10초 이상 잘 섞어준 다음, 다시 추출에 필요한 양을 채취한다.
- 사) 피펫으로 분주(aliquoting)하여 혼합할 때에는 개별 검체로부터 같은 양을 채취하여 새로운 검체 용기에서 혼합한다. 검체마다 또는 각 단계마다 모든 피펫 팁은 1회만 사용한다. 피펫은 정확한 검체량 채취가 가능하지만, 혼합 배수가 늘어날수록 1개당 채취할 검체량이 적어져 오차의 가능성이 생긴다. 따라서 10% 이상 넉넉한 양을 계산하여 혼합 검체를 만드는 것이 좋다. 표1은 추출 장비에 넣는 검체량 200 μ L 기준으로 혼합 검체를 만들기 위해 피펫으로 분주할 경우 혼합하는 검체량의 예시이다. 다른 양의 혼합 검체를 만들 때는 표1의 내용을 변경하여 사용할 수 있다.

[표 1] 혼합할 검체 수에 따른 검체량 예시

1개당 모을 검체량은 20 μ L 이상으로 하며, 최종 volume은 항상 핵산 추출을 위한 검체량보다 10% 이상 넉넉하게 계산하여 혼합검체를 만들 것을 권장한다.

핵산 추출을 위한 검체량	혼합할 검체 수	원검체 1개당 채취할 검체량	최종 검체량
200	2	110	220
200	4	60	240
200	6	40	240
200	8	30	240
200	10	25	250

마 ㉡ 핵산 추출

- 혼합 검체의 핵산 추출은 추출 시약, 장비, PCR 시약 제조사의 권장사항에 따른다.
- 추출 효율이 높은 장비를 사용하고 많은 검체량을 사용하면 혼합 검체에서 핵산 검출 가능성이 높다. 따라서 추출하기 전에 사용하는 검체의 양과, 추출 후 용출되는 핵산의 양과 농도의 정보를 명확히 확인해야 한다.
- 자동화 추출 장비를 이용하면 대량의 검체를 효율적으로 추출할 수 있다.

바 ㉡ 검사의 시행

- 혼합 검체로부터 추출한 RNA를 이용하여, 코로나바이러스감염증-19 검사실 진단지침, COVID-19 진단검사관리위원회 Q&A, PCR 시약의 제조사 지침에 따라 검사를 진행한다.
- 본 프로토콜은 PowerCheck 2019 nCoV Real-Time Detection 키트(Kogene Biotech, Seoul, Korea)로 PCR을 시행하는 경우에만 적용된다.
- 다른 추출 시약과 PCR 시약에서는 일부 검출에 문제가 있을 수 있다. 따라서 다른 시약을 사용하는 검사실은, 사용하는 추출 시약과 PCR 시약으로 혼합 검체에 대해 평가하여 충분한 성능을 입증한 후에 사용해야 한다.

사 ㉡ 혼합 검체 검사 결과의 해석

코로나바이러스감염증-19 검사실 진단지침에 따르면, 개별 환자의 진단은 사용하는 진단 키트에서 표적으로 하는 유전자가 모두 검출되었을 때만 양성으로 판독할 수 있다. 그러나 본 프로토콜의 목적은 양성을 확인하는 것이 아니라, 양성을 선별하는 것이다.

따라서 혼합 검체를 이용한 검사에서는, 모든 검사의 개별 유전자의 증폭 곡선을 확인하고, 단 한 개의 유전자라도 제조사가 설정한 최대 cycle 내에서 증폭이 관찰되면 양성 가능성이 있는 것으로 간주하고, 해당 혼합 검체를 만드는데 사용한 모든 개별 검체에 대해 다시 분자진단검사를 실시하여 양성 또는 음성 판정을 각 검체 별로 시행한다.

검체에서 모든 유전자의 증폭이 없으며, 내부정도관리물질의 증폭이 없는 혼합 검체 검사는 무효로 판정하고 개별 검체에 대하여 검사를 실시한다.

아 혼합 검체 검사 결과의 해석

혼합 검체에서 한 개의 유전자라도 제조사가 설정한 최대 cycle 내에서 증폭 곡선이 관찰되는 경우 해당 혼합 검체에 들어있는 개별 검체를 모두 각각 검사해야 한다. 다음은 혼합 검체 검사 결과를 해석하는 예시이다.

[표 2] 혼합 검체 검사 결과 해석의 예시

본 표에서는 E gene과 RdRp gene만을 기준으로 예시를 제시하며, 각 검사 키트의 유전자별로 본 예시를 참고하여 적용해야 함.

E gene Ct value	RdRp gene Ct value	해석 및 조치
cutoff 이하	cutoff 이하	혼합 검체 선별검사 양성 (혼합 검체 안에 SARS-CoV-2 유전자 있음) → 개별 검체의 검사 시행
한 개 이상의 유전자가 제조사가 설정한 최대 cycle 이내에서 증폭이 관찰되지만, 혼합 검체 양성 기준을 만족하지 않는 경우		혼합 검체 선별검사 미결정 (혼합 검체 안에 SARS-CoV-2 유전자가 존재할 가능성 있음) → 개별 검체의 검사 시행
두 유전자 모두 제조사가 설정한 최대 cycle 이내에서 증폭이 전혀 관찰되지 않음		혼합 검체 선별검사 음성 (혼합 검체 안에 SARS-CoV-2 없음)

혼합 검체 검사 결과에 따라 개별 검체 검사가 필요한 것으로 판단하고 시행한 경우, 일반적인 유의사항과 해석에 대해서는 코로나바이러스감염증-19 검사실 진단지침, COVID-19 진단검사관리위원회 Q&A, 사용한 시약의 제조사 지침을 참조한다.

3 참고문헌

1. 중앙방역대책본부. 코로나바이러스감염증-19 확진검사 안내 (2020.2.15.)
2. 중앙방역대책본부. 코로나바이러스감염증-19 검체 채취 안내. 2020년 2월 21일.
3. 중앙방역대책본부. 코로나바이러스감염증-19 대응지침 [지자체용]. 제7-4판. 2020년 4월 2일.
4. 대한진단검사의학회 신종 코로나바이러스 대책위원회, 질병관리본부 감염병 분석센터. 코로나바이러스감염증-19 검사실 진단 지침 제3판. 2020년 3월 11일
5. 대한진단검사의학회 COVID-19 진단검사관리위원회 Q&A. 2020년 3월 25일.