

COVID-19* 검사 Q&A

* SARS-CoV-2 또는 2019-nCoV

목차

검체	01	검사를 시행해야 할 검체는 어떤 것이 있으며, 반드시 검사해야 되는 검체는 무엇입니까? 2
	02	객담 전처리가 힘듭니다. 간편한 방법이 있을까요? 3
	03	객담 전처리 시 교차오염을 방지하기 위해 주의할 점은 무엇인가요? 3
핵산 추출	04	국내에서 사용되는 핵산 추출 시약 또는 장비의 특성에 대해서 알고 싶습니다. 4
시약	05	COVID-19 진단을 위한 긴급사용승인 시약은 어떤 것이 있습니까? 5
	06	사용하는 긴급사용승인 시약을 다른 시약으로 변경하거나 확진용 또는 추적 관찰용으로 추가하려고 합니다. 어떤 평가를 해야 합니까? 6
검사 과정	07	Allplex 2019-nCoV 키트를 사용할 때 내부대조물질(internal control)이 음성이어서 재검하는 경우가 있는데, 원인과 해결 방법은 무엇입니까? 7
	08	재검할 때 “input” RNA를 더 많이 넣어 주어서 민감도를 높일 수 있을까요? 7
	09	DiaPlexQ 2019-nCoV 키트를 사용하여 ABI 7500 (또는 ABI 7500 Fast) 장비를 사용하여 증폭하였는데, 증폭 곡선이 이상하게 나옵니다. 7
결과 해석	10	상기도 검체와 하기도 검체 결과가 다른 경우 판정은 어떻게 하나요? 8
	11	<i>E</i> gene만 증폭되고 <i>RdRp</i> gene은 증폭되지 않았는데, SARS coronavirus (SARS-CoV) 또는 박쥐유래 베타코로나바이러스 양성으로 해석해야 되나요? 9
	12	Allplex 2019-nCoV 키트를 사용하는데, 씨젠 뷰어에서 <i>E</i> gene만 Ct (cycle threshold)값 20대로 양성입니다. 어떻게 판독해야 합니까? 9
	13	음성대조웰에서 PCR 반응 마지막에 증폭이 있습니다. 증폭 곡선은 정상적인 지수 증가 모양입니다. 원인과 해결 방안은 무엇입니까?	... 10
	14	SARS-CoV-2 real-time RT-PCR 결과 각 유전자의 양성, 음성을 결정하는 Ct 값과 최종 판정을 제조사 지시대로 따를 수 있을까요?	... 10
	15	이미 확진된 환자에서 격리 해제를 위해 추적 검사를 실시한 경우, 결과 판정 기준에 대해 알고 싶습니다.	... 11

검체

01

검사를 시행해야 할 검체는 어떤 것이 있으며, 반드시 검사해야 되는 검체는 무엇입니까?

- 1) 상기도 검체와 하기도 검체를 동시에 검사할 것을 추천합니다. Nasopharyngeal (NP) swab, NP aspirates, oropharyngeal (throat) swab, sputum, endotracheal aspirates, endobronchial aspirates, bronchoalveolar lavage (BAL) 등의 검체가 있습니다.
- 2) 상기도 검체는 민감도를 높이기 위해 NP swab과 oropharyngeal swab을 하나의 universal transport medium (UTM)에 넣는 것을 추천하기도 합니다. Copan 제품의 경우 하나의 flocced swab이 한 개의 UTM에 들어 있기 때문에 NP swab과 oropharyngeal swab을 하나의 UTM에 넣으려면 두 세트의 swab을 사용해야 합니다. 현재 flocced swab 공급이 원활하지 않은 상황을 고려하여, 상대적으로 바이러스 농도가 높은 NP swab만 채취할 수도 있습니다. eNAT (Copan) 제품은 배지 내 핵산 분해를 억제하는 guanidine-thiocyanate (chaotropic salt의 일종)가 들어 있어서 SARS-CoV-2 검사처럼 미생물 핵산 검사만을 시행할 때에 유용합니다.



그림 1. 국내에서 사용되고 있는 flocced swab 제품. 왼쪽 그림: eNAT과 FLOQSwabs (Copán, Brescia, Italy), UTM™과 FLOQSwabs (Copán), UTM™ (Copán)과 HydraFlocked (Diagnostic Hybrids, Athens, OH, USA), REST™ UTM과 NFS-Swab Applicators (Noble Bio, Hwaseong, Korea) (왼쪽에서 오른쪽 순). 오른쪽 그림: Swab을 부러뜨리는 방법. Reprinted from Ann Lab Med 2020;40:439-47 with permission.

- 3) 국산 flocced swab 중 swab의 대(shaft)가 잘 부러지지 않는 경우가 있습니다. 제품 설명서를 참고하면 뚜껑과 튜브의 rim 사이에 shaft 홈 부위를 끼우고 부러뜨리는 것을 추천합니다(그림 1). UTM 내에 glass bead가 없어 swab에서 세포를 떨어뜨리기 위해 vortexing을 꼼꼼히 해야 합니다.
- 4) 폐렴이 있는 환자에서 “제대로” 채취된 하기도 검체(예, 객담)의 Ct (cycle threshold)값은 일반적으로 상기도 검체보다 낮습니다. 객담이 제대로 채취되지 않았거나 균질화를 위해서 PBS를 많이 넣어 희석할 경우 객담의 Ct값이 상기도 검체 Ct값보다 더 높은 경우도 있습니다. 원칙은 상기도와 하기도 검체를 동시에 검사하는 것이지만, 객담이 없는 경우 상기도 검체만 검사하는 것이 바람직합니다.

02

객담 전처리가 힘듭니다. 간편한 방법이 있을까요?

- 1) 객담 전처리 방법 중 지금까지 알려진 좋은 방법은 proteinase K를 사용하여 점액용해와 균질화하는 것입니다. 그러나 이 방법은 proteinase K의 활성온도(65℃ 30분-최적, 또는 50-55℃ 30분 가능)를 맞추어주어야 하기 때문에 현실적으로 사용하기가 힘듭니다.
- 2) N-acetyl-L-cysteine (NALC)을 sodium citrate 용액에 녹여 사용할 수 있지만, 상대적으로 고가이고 만든 후 하루 이내에 사용해야 하는 단점이 있습니다.
- 3) 일반적으로 사용하는 PBS 용액을 넣은 후 물리적인 방법(vortexing)으로 균질화하는 경우 과도한 PBS 용액 사용으로 검체가 과도하게 희석되지 않게 주의해야 합니다.

전문가 의견(expert opinion)

2 mL 마이크로튜브에 객담을 500 μ L 덜고(swab 또는 면봉으로 따서 넣음), 동량의 PBS 또는 UTM을 섞은 후(UTM 이용시 UTM 배지 내 glass bead를 같이 넣어 줌), 충분히 vortexing하고 원심분리한 후 상청액만 추출에 사용한 경우 결과가 잘 나온다고 합니다(호흡기 바이러스 검사를 위해 객담 검체 400예로 실험한 결과).

- 4) Liquillizer (MetaSystems) 동량을 섞은 후 균질화시킨 검체는 분자진단 및 객담 배양용으로 사용 가능합니다. 시약이 고가이고 국내에 널리 보급되어 있지 않기 때문에 구입에 어려움이 있지만 점액용해와 균질화 성능은 우수합니다.

03

객담 전처리 시 교차오염을 방지하기 위해 주의할 점은 무엇인가요?

- 1) 사용하는 객담 용기를 통일해야 합니다. 50 mL conical tube를 원 검체 용기로 사용하면 옮겨 담지 않아도 되기 때문에 교차오염을 줄일 수 있습니다.
- 2) 객담 전처리를 위해 PBS를 첨가할 경우 분주기(dispenser)를 사용해서는 안 되며, 소분한 PBS를 사용해야 합니다. PBS 첨가한 검체를 옮겨 담을 경우 장갑 또는 생물학적 안전상자 표면이 오염될 위험이 있으며, 그 다음에 전처리하는 검체들을 무작위로 오염시킬 수 있습니다.
- 3) 검체 전처리 과정에서 균질화된 검체를 옮겨 담는 작업이 불가피할 경우 용기끼리 맞대고 따르지 말고 적절한 분주 도구(예, 일회용 dropper, 125 mm 피펫 팁 등)를 이용합니다. PBS를 첨가한 객담 검체를 vortexing할 때는 에어로졸이 가라앉도록 10분 정도 기다린 후 뚜껑을 열도록 합니다.

핵산 추출

04

국내에서 사용되는 핵산 추출 시약 또는 장비의 특성에 대해서 알고 싶습니다.

- 1) 핵산 추출 시약을 선택하여 검사실에서 사용할 때에는 호흡기 검체에 대한 핵산추출 성능평가가 선행되어야 합니다. 검사실에서 사용하는 핵산 추출 시약을 manual 시약인 QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen)와 비교 평가하는 것을 권장합니다. 호흡기 바이러스 양성 검체 10개 이상을 포함하여 30개 이상의 호흡기 바이러스 의뢰 검체를, 사용하고자 하는 추출 시약과 QIAamp Viral RNA Mini kit 추출 시약으로 동시에 추출한 후, 호흡기 바이러스 multiplex PCR을 시행하여 표적 유전자와 내부대조물질의 Ct값을 비교합니다. 사용하고자 하는 추출 시약의 양성률과 Ct값(확실한 기준은 없지만 정량 PCR에서 사용하는 0.5 log₁₀ 이내, Ct값으로 환산하면 약 1.66 이내면 차이가 없다고 판정함)을 비교하시기 바랍니다.
- 2) 미국 CDC에서는 Qiagen QIAamp DSP Viral RNA Mini kit, Qiagen EZ1 Advanced XL 등을 추천하고 있습니다. Qiagen의 전자동 QIASymphony 장비는 자동화 피펫팅을 사용할 때 피펫팅 밑에 교차오염을 방지하기 위한 protection guard가 있습니다. 수입 시약으로 시약 공급 문제를 고려하시기 바랍니다.
- 3) Roche의 MagNA Pure 96 장비도 교차오염을 방지하기 위한 protection guard가 있으며, 사용 시 시약 공급 문제를 고려하시기 바랍니다.
- 4) bioMeriux easyMAG 장비는 검체에 magnetic bead를 수기로 분주하는 과정이 있어 전자동 장비는 아니지만, 추출 효율은 뛰어납니다. easyMAG의 자동화 version이 eMAG이며, 안전성이 확보된 장비입니다. 장비는 오른쪽, 왼쪽이 각기 작동되는데 왼쪽 추출창의 검체 번호는 1-24인데 비해, 오른쪽 추출창은 → 8-1번, 16-9번, 24-17번 순서이기 때문에 검체 라벨링에 각별한 주의가 필요합니다.
- 5) 씨젠에서 공급하는 liquid handler인 Hamilton STARlet 장비는 추출과 PCR set-up을 동시에 하거나, PCR set-up 전용으로 사용할 수 있습니다. 검체를 원래 튜브에서 덜 때 피펫팅의 suction/blow-out 과정이 있기 때문에 음압 시설 내의 추출방에서 검사자 개인보호장비를 잘 착용하여 사용하기를 권장합니다.
- 6) ThermoFisher의 KingFisher, 바이오세움의 Real-Prep, Genolution 장비는 모두 마그네틱 봉에 플라스틱 덮개(sheath)를 씌우게 되어 있습니다. 마그네틱 덮개에 미세 균열(micro-crack)이 있는 경우 마그네틱 봉에 마그네틱 비드가 붙게 되어 교차오염의 위험성이 있습니다. 추출 전 마그네틱 봉에 마그네틱 비드가 묻어 있는지 스카치 테이프 등으로 확인하면서 사용해야 합니다.
- 7) 만약 마그네틱 비드가 묻어 나온다면 스카치 테이프로 제거 후 희석된 락스로 닦아야 합니다. 시약 패널 중에 lysis buffer가 분주되어 있으므로 검체를 먼저 분주한 다음 내부대조물질(Allplex 2019-nCoV 시약 또는 Standard M nCoV 시약의 경우)을 첨가하십시오. 지속적인 사용 시 장비 효율이 떨어질 수 있으므로 내부대조물질 Ct값 변화를 잘 관찰하시기 바랍니다. Real-Prep이나 Genolution 장비는 소형으로 생물학적 안전상자 내에도 들어가지만, 세포 용해 단계에서 진동이 심하기 때문에 생물학적 안전상자의 작업대가 진동을 흡수하기 힘들 수 있습니다.

시약

05

COVID-19 진단을 위한 긴급사용승인 시약은 어떤 것이 있습니까?

1) 현재 7종의 긴급사용승인 시약이 있습니다. 그 중 6종의 긴급사용승인 시약의 특징은 표와 같습니다.

표 1. 긴급사용승인된 6종의 특징 및 판독 기준

EUA assay	Target gene	Tubes/ sample	RNA/each tube (μL)	IC	IC addition to	Instrument used	Indicating COVID-19
PowerChek 2019-nCoV (Kogenebiotech, Seoul, Korea)	<i>E, RdRp</i>	2	5	Recombinant plasmid DNA	PCR mixture	Applied Biosystems 7500 FAST and 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), CFX96 Real-Time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)*	<i>E</i> Ct ≤ 35 and <i>RdRp</i> Ct ≤ 35
Allplex 2019-nCoV (Seegene, Seoul, Korea)	<i>E, RdRp, N</i>	1	8	Bacteriophage	Sample	CFX96 Real-Time Detection System	<i>E</i> Ct ≤ 40, <i>RdRp</i> Ct ≤ 40, and <i>N</i> Ct ≤ 40
Standard M nCoV Real-Time Detection (SD Biosensors, Suwon, Korea)	<i>E, ORF1ab (RdRp)</i>	1	10	Lentivirus	PCR mixture (0.5 μL) or sample (5 μL)	Applied Biosystems 7500 FAST and 7500 Real-Time PCR System, CFX96 Real-Time Detection System†	<i>E</i> Ct ≤ 36 and <i>ORF1ab</i> Ct ≤ 36
DiaPlexQ 2019-nCoV (Solgent, Daejeon, Korea)	<i>N, ORF1a</i>	1	5	Rice phosphoglycerate kinase gene, mRNA	PCR mixture	Applied Biosystems 7500 FAST and 7500 Real-Time PCR System, CFX96 Real-Time Detection System	<i>N</i> Ct ≤ 40 or <i>ORF1a</i> Ct ≤ 40
Real-Q 2019-nCoV (BioSewoom, Seoul, Korea)	<i>E, RdRp</i>	1	5	Human <i>RNase P</i> gene (intrinsic)	-	Applied Biosystems 7500 FAST and 7500 Real-Time PCR System, CFX96 Real-Time Detection System	<i>E</i> Ct < 38 and <i>RdRp</i> Ct < 38
BioCore 2019-nCoV Real Time PCR (BioCore, Seoul, Korea)	<i>N, RdRp</i>	1	5	Human <i>β-globin</i> gene (intrinsic)	-	Applied Biosystems 7500 FAST and 7500 Real-Time PCR System, CFX96 Real-Time Detection System†	<i>N</i> Ct ≤ 40 and <i>RdRp</i> Ct ≤ 40

주) 제조회사에서는 PowerChek 2019-nCoV 시약은 Gentier 96E Real-Time PCR System (Tianlong), Standard M nCoV Real-Time Detection 시약은 LightCycler 480 (Roche), BioCore 2019-nCoV Real Time PCR 시약은 SLAN 96P Real Time PCR System (Sansure Biotech)에서 검사가 가능하다고 주장합니다. 그러나 학회와 질병관리본부에서는 긴급사용승인 시약은 모두 CFX96 장비와 ABI7500 장비에서만 평가하였습니다. 해당 기기에 적용할 때에는 자체적으로 기존 평가된 기기와 비교 평가 후 사용하시기 바랍니다. Reprinted from Ann Lab Med 2020;40:439-47 with permission.

2) DiaPlexQ 2019-nCoV 키트는 1 튜브로 표적유전자는 *N* gene과 *ORF1a* gene (*RdRp* gene region 아님)이며, 제품설명서에는 두 유전자 중 하나만 양성인 경우 COVID-19 감염으로 진단할 수 있다고 되어 있습니다. 현재 대부분의 진단 제품들이 2개의 유전자 양성일 경우 확진하게 되어 있으며, WHO protocol에서도 두 유전자가 모두 양성이어야 확진할 수 있기 때문에, DiaPlexQ 2019-nCoV 키트를 사용하실 경우 이 점을 유의하시기 바랍니다.

3) 긴급사용승인 시약 중 대한임상검사정도관리협회에서 질병관리본부로부터 받아서 배포한 *E* gene과 *RdRp* gene 신빙도조사 물질(1-3차)은 PowerChek 2019-nCoV 키트와 Allplex 2019-nCoV 키트의 *E* gene, *RdRp* gene 부분에서만 증폭됩니다. 나머지 키트들은 표적 유전자가 다르거나 *E* gene과 *RdRp* 유전자의 검출 부위가 달라 신빙도조사 물질이 검출되지 않습니다.

- 4) 가장 최근에 긴급사용승인된 careGENE N-CoV RT-PCR (Wells Bio, Seoul, Korea)은 *E* gene과 *RdRp* gene을 각각 별도의 튜브에서 증폭하며, 각각의 튜브에 10 μ L의 RNA를 첨가합니다. 유전자 Ct값이 45 미만일 때 양성으로 판독하고, 두 유전자 모두 양성일 때 COVID-19으로 진단합니다. 내부대조물질은 사람 유전자를 사용하기 때문에 별도 첨가하지 않고, ABI 7500과 CFX96 장비를 이용합니다.

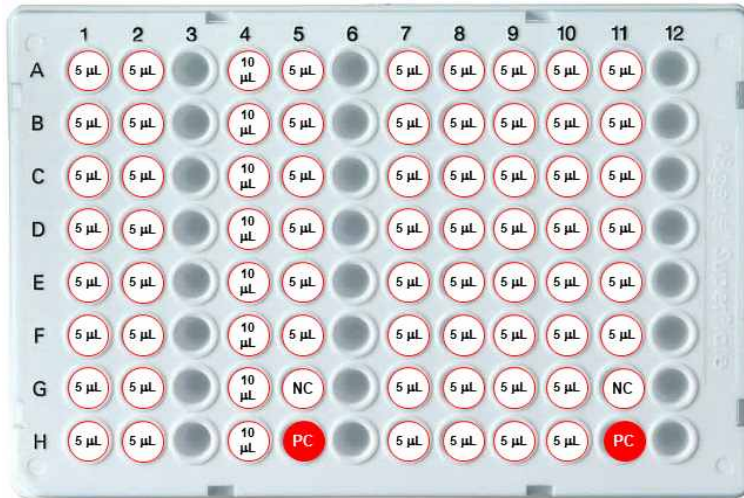


그림 2. 내부대조물질을 PCR mixture에 첨가하는 시약(예를 들면, PowerChek 2019-nCoV 시약)을 사용할 경우 multi-pipette으로 분주하여 그림의 열 3에 검체 RNA를 분주하지 않은 오류가 있더라도 내부대조물질에 대한 PCR 반응은 정상적으로 일어남.

06

사용하는 긴급사용승인 시약을 다른 시약으로 변경하거나 확진용 또는 추적 관찰용으로 추가하려고 합니다. 어떤 평가를 해야 하나요?

- 1) 긴급사용승인 시약을 변경 또는 추가하려고 하면, 최소 양성 10검체, 음성 10검체를 parallel test하시고, 결과를 검사실 책임자가 검토하시기 바랍니다.
- 2) 4차 신빙도 조사사업은 불활성화된 배양 SARS-CoV-2로 진행됩니다. 해당 검체를 parallel test 용으로 사용하셔도 됩니다.
- 3) 긴급사용승인 시약은 lot마다 차이가 있을 수 있습니다. 시약의 lot-to-lot parallel test를 반드시 시행하시고 기록을 남기시기 바랍니다.

검사 과정

07

Allplex 2019-nCoV 키트를 사용할 때 내부대조물질(internal control)이 안 나와서 재검하는 경우가 있는데, 원인과 해결 방법은?

- 1) Allplex 2019-nCoV 키트는 핵산 추출 전, 검체에 직접 내부대조물질을 넣어 주기 때문에 핵산 추출이 잘 되었는지, PCR 억제제의 영향이 있었는지, 핵산증폭이 제대로 일어났는지 전 과정을 살펴 볼 수 있는 장점이 있습니다. PCR mixture에 내부대조물질을 넣어 주는 시약의 경우 핵산 추출 과정이 제대로 되었는지는 알 수 없습니다.
- 2) Allplex 2019-nCoV 키트 내의 내부대조물질은 박테리오파지(bacteriophage) 입자입니다. 핵산추출 시약 중 lysis buffer에 검체를 넣어 주는 제품의 경우(예, 바이오세움 Real-Prep), lysis buffer에 검체를 첨가한 후 내부대조물질을 첨가합니다. Lysis buffer 내 detergent인 SDS의 경우 음성 전하이기 때문에 같은 음성 전하를 띤 핵산(DNA, RNA)에 미치는 영향은 거의 없으나, 내부대조물질 10 μ L를 lysis buffer 다량에 넣어줄 경우 bacteriophage RNA 손상 가능성을 배제할 수 없기 때문에 위의 순서를 지킬 것을 권장합니다. 내부대조물질은 10 μ L로 소량이기 때문에 검체에 제대로 첨가되었는지 잘 확인해야 합니다. 반응튜브(또는 반응웰)의 위쪽(rim)에 넣어 줄 경우 검체와 잘 섞이지 않아 내부대조물질이 증폭되지 않을 수 있습니다. “Positive Control” 내에 포함된 내부대조물질은 plasmid DNA입니다. 시약을 얼렸다 녹였다 할 때 “Positive Control”의 내부대조물질 Ct값의 편차가 큰 경우가 있습니다. Plasmid DNA의 안정성이 bacteriophage의 안정성보다 떨어질 수 있습니다.
- 3) 내부대조물질 증폭이 없는 경우는 재추출 재검을 시행해야 합니다. 재추출 재검에서도 내부대조물질 증폭이 없으면 재검체 재검이 바람직합니다.
- 4) 수탁 기관이나 선별진료소 방문자와 같이 재검체를 채취할 수 없는 경우, 내부대조물질 증폭이 없을 때에는 추출한 핵산 중의 PCR 억제제 존재를 의심하여, 추출한 핵산을 10배 희석하여 재검하는 것을 추천합니다.

08

재검할 때 “input” RNA를 더 많이 넣어 주어서 민감도를 높일 수 있을까요?

- 1) PCR reaction volume을 맞추기 위해서 넣어 주는 “DNase-, RNase-free D.W.” 대신 추출된 RNA를 넣어 주어 “input” RNA 양을 늘리면 민감도가 높아질 가능성도 있지만, 그만큼 PCR 억제제도 많이 들어가기 때문에 일반적으로 추천되지 않습니다.
- 2) 내부대조물질이 증폭되지 않을 때는 오히려 RNA를 10배 희석하여 넣어 주는 것을 고려할 수 있습니다.

09

DiaPlexQ 2019-nCoV 키트를 사용하여 ABI7500 (또는 ABI7500 Fast) 장비를 사용하여 증폭하였는데, 증폭 곡선이 이상하게 나옵니다.

- 1) 시약 회사에서 기기 세팅을 도와주겠지만, ABI7500은 “Passive Reference Dye”를 선택하게 되어 있습니다. “Default” setting인 “ROX”를 그대로 둔 경우 증폭 곡선이 이상할 수 있습니다.
- 2) 시약 회사에 문의 후 “Default” setting을 “none”으로 바꾼 후 검사하시기 바랍니다.

결과해석

10

상기도 검체와 하기도 검체 결과가 다른 경우 판정은 어떻게 하나요?

- 1) 먼저 검체의 clerical error (환자명 표기 오류, 라벨 오류, 검사시 검체 뒤바뀜 등)가 없는지 확인합니다.
- 2) 같은 환자에서 두 검체의 적절성을 고려해야 합니다. 객담인지 침인지 확인하시기 바랍니다. 다음으로 객담의 전처리(점액 용해 및 균질화) 시 과도한 PBS를 첨가하지는 않았는지 확인합니다.
- 3) 전처리 시 교차오염 가능성에 대해 해당 날짜의 양성률, 해당 양성 검체와 다른 양성 검체의 위치 등을 확인하여 종합적으로 판단합니다(그림 3).
- 4) “제시된 판정 기준”에 따라 두 검체 중 하나라도 판정 기준 내에 위치한다면 한 검체의 결과만으로도 확신 가능합니다. 단, 현재까지 신환에서 상기도 음성/하기도 양성인 경우는 약 1% 정도이기 때문에, 하기도만 양성인 경우 검체 전처리 과정에서 교차오염 위험이 없는지 평가하시기 바랍니다.
- 5) PCR mixture에 내부대조물질을 첨가하는 PowerChek nCoV-2019 시약을 이용하여 multi-pipette으로 RNA를 첨가하는 경우는 그림 2와 같이 하나의 열(3열)을 건너 띄고 다음 열(4열)에 RNA를 두 번 첨가할 경우에도 내부대조물질에 대한 PCR 반응은 일어나기 때문에, 검사 중의 오류를 방지하기 위해서 되도록 liquid handler를 사용하는 것을 추천합니다.

【교차오염 여부의 평가】

- 1) 다른 검체로 인한 교차 오염 가능성이 낮은 경우
 - 해당 검사 배치에서 해당 검체가 유일한 양성 검체이고, 해당 검체의 반응 웰(well) 위치가 양성 대조와 떨어져 있음(예, 그림 3. a” 위치)
- 2) 다른 검체로 인한 교차 오염 가능성이 높은 경우
 - 해당 검체의 Ct값이 인접한 양성 대조 또는 인접한 검체의 Ct값보다 높음(그림 3. “b” 위치).

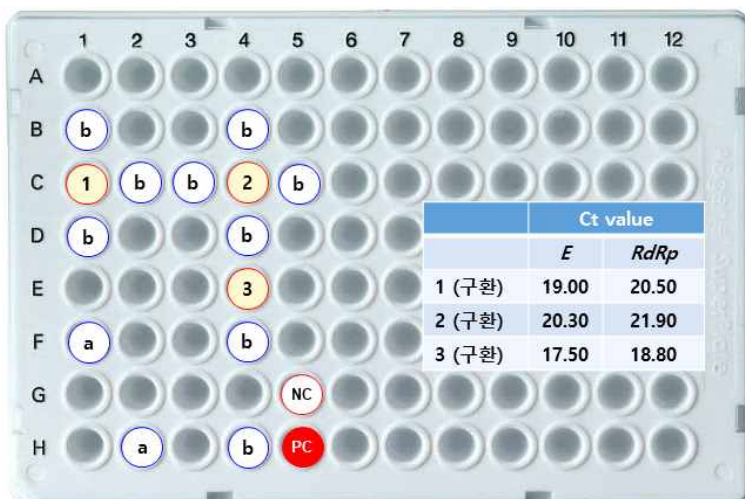


그림 3. 교차오염 여부의 평가

11

***E* gene만 증폭되고 *RdRp* gene은 증폭되지 않았는데, SARS coronavirus (SARS-CoV) 또는 박쥐유래 베타코로나바이러스 양성으로 해석해야 되나요?**

- 1) 박쥐유래 SARS-like 베타코로나바이러스(sarbecovirus) 중 사람 감염이 확인된 것은 현재 유행하고 있는 SARS-CoV-2와 2003년 유행한 SARS-CoV가 있습니다. 현재 SARS-CoV는 다시 출현했다는 증거가 없습니다. Sarbecovirus 외의 베타코로나바이러스(예, OC43, HKU1 등)는 *E* gene에서 증폭이 되지 않습니다.
- 2) *E* gene 양성, *RdRp* 음성일 경우 *E* gene 반응웰(PCR 튜브)의 위치가 양성대조웰 또는 양성 검체 근처인지 확인하여 교차오염 가능성을 평가한 후, 교차오염 가능성이 없으면 재추출 재검하시기 바랍니다.
- 3) 위 경우는 신환자(첫 검체로 초진시)에게만 해당됩니다. 확진자의 후속 검사 시 *E* gene, *RdRp* gene, *N* gene 중 하나만 약하게 양성인 경우가 있습니다.

12

Allplex 2019-nCoV 키트를 사용하는데, 씨젠 뷰어에서 *E* gene만 Ct값 20대로 양성입니다. 어떻게 판독해야 합니까?

→ 원 증폭 곡선을 열어 보셔야 합니다. 해당 channel (FAM)만 남긴 후 증폭 곡선을 살펴보십시오. 아래 그림 4와 같은 경우 비특이 반응입니다.

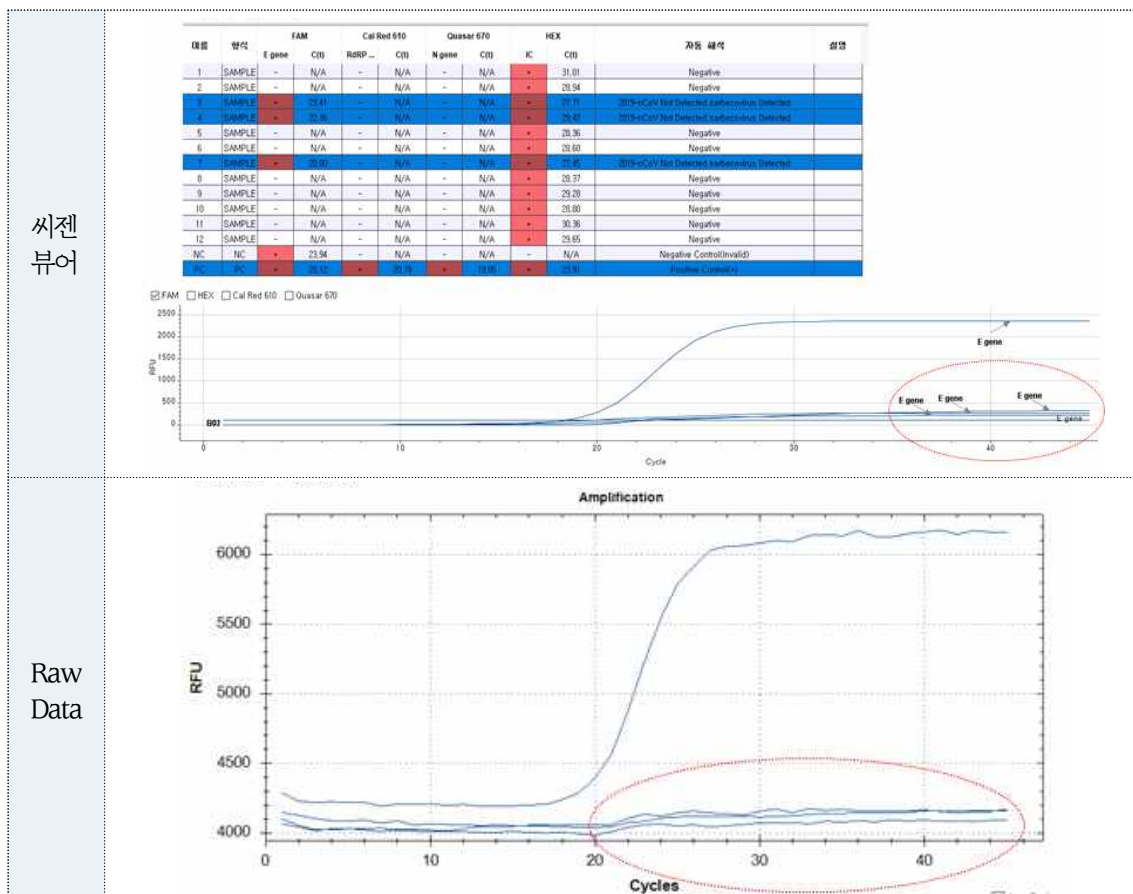


그림 4. CFX96의 증폭곡선(아래)과 씨젠 뷰어의 증폭곡선(위). Reprinted from Ann Lab Med 2020;40:439-47 with permission.

13

음성대조웰에서 PCR 반응 마지막에 증폭이 있습니다. 증폭 곡선은 정상적인 지수 증가 모양입니다. 원인과 해결 방안은 무엇입니까?

- 1) 가능한 원인 중 하나는 환경 또는 증폭 산물에 의한 오염입니다. 검체를 다루는 생물학적 안전상자, 사용하는 마이크로피펫, 추출 기기, PCR workstation, PCR 기기에 대한 swab test를 실시하십시오. 또는 NP swab 채취용 flocculated swab을 사용해서 장비 표면 면적이 A4 용지 한 장 정도가 되도록 긁어 채취한 후 환자 검체와 동일하게 검사하시기 바랍니다.
- 2) 가능한 다른 원인은 random nonspecific amplification 또는 probe instability 등입니다. 이 경우 환자 검체 반응웰에서도 비슷한 현상이 발생하며, 특징은 재검 시 깨끗하게 음성으로 나오는 경우가 많습니다.

14

SARS-CoV-2 real-time RT-PCR 결과 각 유전자의 양성, 음성을 결정하는 Ct값과 최종 판정을 제조사 지시대로 따를 수 있을까요?

- 1) 현재 시약들은 긴급사용승인 시약으로 결과 판독에 주의를 요합니다.
- 2) 신환자(첫 검체로 초진 시)의 경우, 각 유전자의 양성, 음성을 결정하는 cut-off Ct값은 33.5입니다. Ct값 33.5를 기준으로 한 이유는 아래와 같습니다.
 - (1) 긴급사용승인 시약에서 33.5 cycles 이상에서 증폭된 유전자를 재검했을 때, 양성/음성 및 Ct값의 재현성이 떨어지는 경향이 있습니다.
 - (2) 20 μ L PCR 기준으로 1 copy의 표적유전자가 증폭되는 이론적인 Ct값은 37입니다. 긴급사용승인 시약들의 설명서에 PCR 반응당 표적유전자에 대한 검출한계가 10 copies 정도라고 되어 있으며, 이에 해당하는 Ct값이 33.5 정도입니다.
- 3) 검체에 대한 최종 판정은 다음을 참고하기 바랍니다.
 - (1) 하나의 검체에서 복수의 유전자를 함께 해석하며(예, *E* gene, *RdRp* gene을 동시에 해석), 한 환자에서 채취된 다른 검체를 함께 해석해야 합니다(객담과 NP swab을 함께 해석).
 - (2) 2개의 검체가 동시에 의뢰된 신환자(첫 검체로 초진시)의 경우는, 결과에 따라 재검 없이 판정을 확정할 수 있습니다.
 - (3) 다만, 1개의 검체가 의뢰되어 양성인 신환자(첫 검체로 초진시)의 경우는,
 - ① 병력이나 영상소견과 같은 자세한 임상정보를 바탕으로 진단검사의학과 전문의가 재검여부를 판단할 수 있습니다.
 - ② 임상정보를 확인할 수 없다면, 원검체에서 검체 재추출 및 재검을 권장합니다.
- 4) 다음은 표적 유전자의 양성/음성, 검체에 대한 최종 판정을 위해 유용한 정보들입니다.
 - (1) Allplex 2019-nCoV 키트에서 양성 검체의 *E* gene Ct값이 *RdRp* gene Ct값보다 평균 1.2-1.5 cycle 정도, *RdRp* gene의 Ct값은 *N* gene의 Ct값보다 평균 1.5정도 빠릅니다. 바이러스 배출이 많은 환자 검체에서는 개별 유전자 Ct값이 위와 같은 순서로 증폭되는 경우 확인에 도움이 됩니다. PowerChek 2019-nCoV 키트에서는 양성 검체의 *E* gene Ct값이 *RdRp* gene Ct값보다 빠르며, 차이는 약 2.5정도로 더 큰 편입니다. 이와 달리 STANDARD nCoV Real-Time Detection 키트에서는 *ORF1ab* (*RdRp*) Ct값이 *E* gene Ct값보다 약 1.5 정도 빠릅니다.

(2) PowerChek 2019-nCoV 제품의 경우 *E* gene은 깨끗하게 음성이지만, *RdRp* gene만 증폭 단계의 마지막에 증폭 곡선이 보이는 경우가 있습니다(upward drift). *E* gene 증폭 없이 *RdRp* gene의 upward drift는 음성일 가능성이 높습니다. 반대로 *RdRp* gene 증폭 없이 *E* gene만 upward drift를 보이는 경우도 있습니다.

(3) 비특이 반응(형광 신호의 upward drift)이 잘 나타나는 유전자는 다음과 같습니다.

① PowerChek 2019-nCoV 키트의 경우 비특이 반응은 *RdRp* gene과 *E* gene 웰(튜브)에서 모두 나타날 수 있으며, 대부분 38 cycles 이후 증폭이 있습니다. 재검할 경우 대부분 깨끗하게 음성입니다.

② Allplex 2019-nCoV 키트의 경우 비특이 반응이 나타난 검체들 중 *E* gene 비특이 반응은 약 30%, *RdRp* gene 비특이 반응은 50%, *N* gene 비특이 반응은 20%를 차지합니다.

5) 재추출 재검 결과가 음성이면 음성으로 낼 수 있습니다. 재추출 재검 결과 모든 표적 유전자의 Ct값이 33.5 이하면 양성으로 결과를 낼 수 있습니다. 재추출 재검 결과도 “미결정” 인 경우는 “미결정” 으로 보고하고 재검체 재검을 실시해야 합니다. 어떠한 경우라도 양성/음성/미결정 판정 시 다음 사항을 꼭 확인하시기 바랍니다.

(1) 첫 검체로 초진인지(이전 결과 및 확진자의 후속 검사인지 먼저 확인)

(2) 동일 환자의 하기도, 상기도 검체를 종합적으로 해석

(3) 반응웰(튜브)의 위치(양성 대조 근처의 검체)

(4) *E* gene, *RdRp* gene, Allplex 2019-nCoV 키트의 경우 *N* gene까지 종합적으로 고려

(5) 재검 시 재추출 재검 및 서로 다른 시약(예를 들면, Allplex 2019-nCoV 키트를 사용하는 경우라면 RNA input volume이 더 많은 Standard M nCoV Real-Time Detection 키트로 재검 등)으로 재검하는 것을 권장합니다.

15

이미 확진된 환자에서 격리 해제를 위해 추적 검사를 실시한 경우 결과 판정 기준에 대해 알고 싶습니다.

1) 참고로 이미 확진된 환자의 결과를 추적 관찰할 때 매일 검사한 결과값을 보시면 다음과 같습니다(예시이며, 일반적인 경우는 아닙니다).

	Sputum			NP swab			BAL		
	<i>E</i>	<i>RdRp</i>	<i>N</i>	<i>E</i>	<i>RdRp</i>	<i>N</i>	<i>E</i>	<i>RdRp</i>	<i>N</i>
Day 14	33.61	34.64	35.73	ND	ND	ND			
Day 15	ND	37.59	37.74	ND	36.81	37.29			
Day 16	33.40	36.85	39.79	ND	ND	37.80			
Day 17	35.96	ND	38.62	37.75	38.15	38.18			
Day 18	37.07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Day 19	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
Day 20	33.07	38.40	36.17	27.68	28.87	30.62			
Day 21	ND	ND	ND	ND	39.40	ND			
Day 22	ND	ND	39.89	26.68	28.74	30.20			
Day 23	ND	ND	ND	35.56	34.69	36.34			
Day 24	ND	ND	ND	ND	ND	ND			

ND, not detected

- 추적관찰 검체를 재검할 경우 어떤 유전자는 검출되고 어떤 유전자는 검출되지 않는 경우를 흔히 관찰할 수 있으며, 재검할 때 검출되는 유전자의 종류가 바뀌는 경우를 흔히 관찰할 수 있습니다. 예를 들면, 동일한 검체의 첫 번째 검사에서 *E gene*, *N gene* 양성이었던 검체를 재검할 경우 *RdRp gene*, *N gene* 양성인 경우도 있을 수 있습니다. 양성자가 많았던 지역 병원의 경우 *N gene*이 가장 늦게까지 나오는 경우가 많았습니다.
 - 환자의 상태에 따라 모든 표적 유전자가 음성이었다가 다음날 양성으로 나오는 경우도 있습니다 (위의 표에서 Day 20).
- 2) 따라서 이미 확진된 환자의 격리 해제를 위해 추적 검사를 실시한 경우에는 결과 해석에 주의가 필요하며, **단순히 제조사에서 제시한 판독 기준을 그대로 적용하면 안 됩니다.**
- 3) 추적 검체에서 해당 키트의 모든 표적 유전자가 증폭될 경우는 Ct값에 상관없이 “양성” 으로 보고하시기 바랍니다. 추적 검체에서 해당 키트의 표적 유전자 중 하나만 검출될 경우 “미결정” 으로 보고하시기 바랍니다.
- PowerChek 2019-nCoV 키트처럼 *E gene* 단독 또는 *RdRp gene* 단독으로 38 cycles 이후 증폭곡선이 약하게 있을 경우 재검하여 증폭곡선이 없어지면 음성으로 보고 가능합니다.
 - 증폭곡선이 지수함수로 증폭될 경우, “**미결정(모호)**” 으로 보고하면서, 임상 의들에게 “**음성**” 이 아님을 설명하시기 바랍니다. 수탁 기관에서도 “**미결정**” 결과의 의미가 음성이 아님을 결과보고서에 명확하게 기재하시기 바랍니다.

참고문헌

1. Sung H, Roh KH, Hong KH, et al. COVID-19 molecular testing in Korea: Practical essentials and answers from experts based on experiences of emergency use authorization assays. Ann Lab Med 2020;40:439-47.
2. Hong KH, Lee SW, Kim TS, et al. Guidelines for laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Korea. Ann Lab Med 2020;40:351-60.
3. Lee YJ, Lim Y, Hur KW, et al. Quality of ribonucleic acid extraction for real-time reverse transcription-PCR (rRT-PCR) of SARS-CoV-2: Importance of internal control. Ann Lab Med 2020;40:490-2.

대한진단검사의학회, 질병관리본부

[코로나-19 진단검사관리위원회]

■ 목적 진단검사 분야 현장에서 발생하는 현안에 대해 민관 전문가들의 검토 및 자문을 통해 해결 방안 제시

■ 명단	민간	울산의대 서울아산병원	성홍섭	팀장
		한림의대 동탄성심병원	김현수	
		계명의대 동산의료원	류남희	
		서울의대 서울대학교병원	성문우	
		국민건강보험 일산병원	노경호	
		서울의료원	홍기호	
		전북의대 전북대학교병원	이재현	
		국립중앙의료원	김소연	
	정부	질병관리본부 바이러스분석과	한명국	간사
		질병관리본부 감염병진단관리과	이상원	