

COVID-19

분자진단검사 Q&A 제5판

I. 검체

01. COVID-19 검사를 위한 검체는 어떤 것이 있으며, 반드시 검사해야 하는 검체는 무엇입니까?
02. 선별진료소에서 nasopharyngeal swab 채취 시 주의점에 대해 알려주십시오.
03. 객담 전처리가 어렵습니다. 간편하면서도 교차오염 없이 객담을 전처리하는 방법이 있을까요?

II. 핵산 추출

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

III. 시약

05. COVID-19 진단을 위한 식약처 정식허가 시약은 어떤 것이 있습니까?

IV. 검사 과정

06. 검사 시약이나 검사 과정에서 위양성 결과가 나올 수 있는 경우를 알고 싶습니다.
07. 검사 과정에서 주의해야 할 점은 무엇입니까?

V. 결과 해석

08. 미결정 결과의 원인은 어떤 것이 있습니까?
09. 음성대조웰에서 PCR 반응 마지막에 증폭이 있습니다. 증폭 곡선은 정상적인 지수 증가 모양입니다. 원인과 해결 방안은 무엇입니까?
10. 결과 보고 시 오류의 원인과 해결 방안을 알고 싶습니다.

VI. 참고문헌

VII. 코로나-19 진단검사관리위원회

I 검체

01 COVID-19 검사를 위한 검체는 어떤 것이 있으며, 반드시 검사해야 하는 검체는 무엇입니까?

- 1) 상기도 검체를 기본으로 하며, 가능하다면 하기도 검체를 동시에 검사합니다. 상기도 검체에는 비인두 도말[nasopharyngeal (NP) swab], 비인두 흡인액(NP aspirates), 구인두 도말[oropharyngeal (throat) swab] 등이, 하기도 검체에는 객담(sputum), 기관 흡인액(endotracheal aspirates), 기관지 흡인액(endobronchial aspirates), 기관지폐포세척액[bronchoalveolar lavage (BAL) fluids] 등이 있습니다.
- 2) 상기도 검체는 민감도를 높이기 위해 NP swab과 throat swab을 하나의 universal transport medium (UTM)에 넣는 것을 추천합니다. Copán 제품은 한 개의 UTM과 한 개의 flocked swab으로 포장되어 있으므로, NP swab과 throat swab을 하나의 UTM에 넣으려면 두 세트의 swab을 사용해야 합니다. 이 경우 상대적으로 바이러스 농도가 높은 NP swab만 채취할 수도 있지만(그림 1), NP swab 검체 채취 원칙을 잘 지키도록 안내해야 합니다(Q&A 02번 문항 참조). eNAT (Copán, Brescia, Italy)이나 GeneTM Set (SG Medical, South Korea) 제품은 배지 내 핵산 분해를 억제하는 guanidine-thiocyanate (chaotropic agent)가 들어 있어서 SARS-CoV-2 분자진단 검사처럼 미생물 핵산 검사만을 시행할 때에 유용하지만, 배양이나 항원 검사에는 사용할 수 없고 배지 양이 적어 재검 시 검체 양이 모자랄 수 있습니다.

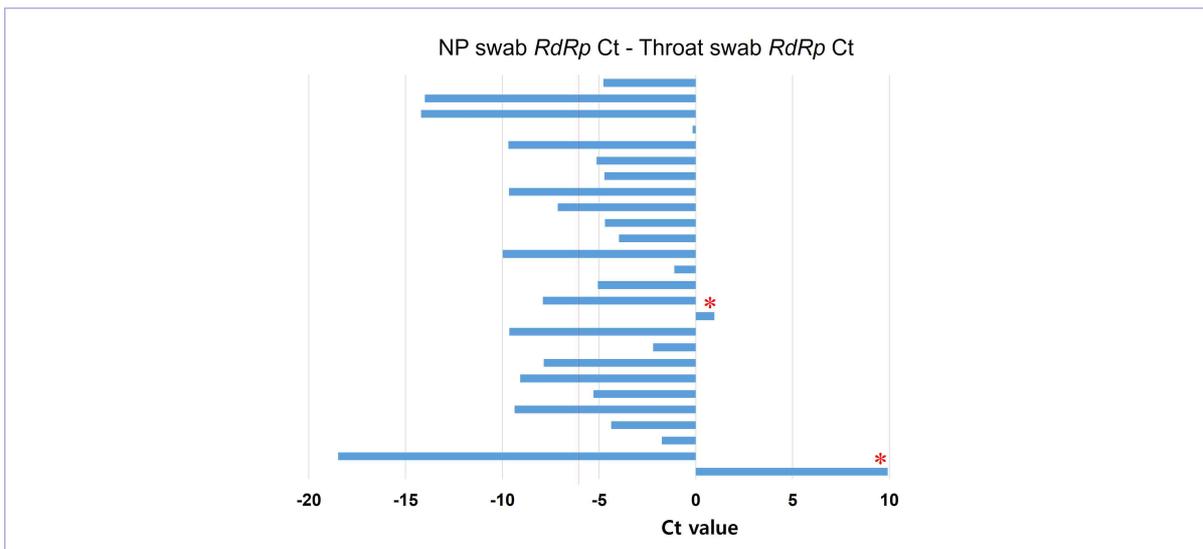


그림 1 NP swab의 RdRp Ct값에서 throat swab의 RdRp Ct값을 뺀 값. NP swab의 Ct값이 대부분 낮지만, 일부(*) 검체의 경우 throat swab의 Ct값이 더 낮음. 이 경우 NP swab을 제대로 채취하지 못했을 수 있음.

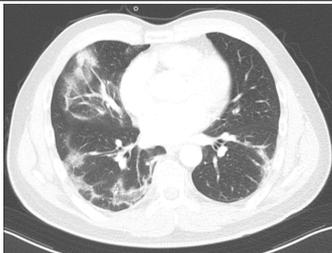
- 3) 국산 flocked swab 중 swab의 대 shaft가 잘 부러지지 않는 경우가 있습니다. 제품 설명서를 참고하면 뚜껑과 튜브의 rim 사이에 shaft 홈 부위를 끼우고 부러뜨리는 것을 추천합니다(그림 2). UTM 내에 glass bead가 없어 swab에서 세포를 떨어뜨리기 위해 vortexing을 꼼꼼히 해야 합니다.



그림 2 국내에서 사용되고 있는 flocked swab 제품. 왼쪽 그림: eNAT (Copán, Brescia, Italy)과 FLOQSwabs (Copán), 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.

4) 폐렴이 있는 환자에서 “제대로” 채취된 하기도 검체(예, 객담)의 Ct (cycle threshold) 값은 일반적으로 상기도 검체보다 낮습니다. 또한 코로나19 폐렴 환자 중 객담에서만 SARS-CoV-2 양성일 수 있습니다(그림 3). 객담이 제대로 채취되지 않았거나 균질화를 위해서 PBS를 많이 넣어 희석할 경우 객담의 Ct값이 상기도 검체 Ct값보다 더 높은 경우도 있습니다. 폐렴이 있는 경우 상기도와 하기도 검체를 동시에 검사하는 것이 좋습니다. 객담이 없거나 객담 배출이 어려운 경우 객담 유도 등은 금기이며, 상기도 검체만 검사하는 것이 좋습니다.

표 1 코로나19 폐렴 환자에서 객담과 비인두 도말 검체의 SARS-CoV-2 검사 결과

54/M	Sputum			Nasopharyngeal swab		
	<i>E</i>	<i>RdRp</i>	<i>N</i>	<i>E</i>	<i>RdRp</i>	<i>N</i>
	22.80	22.56	27.21	Negative	Negative	Negative

02 Nasopharyngeal swab 채취 과정 중 주의해야 될 점에 대해 알려주십시오.

- 1) NP swab 채취 방법에 대해서는 다음 동영상을 참고하시기 바랍니다: NEJM Procedure, “Collection of Nasopharyngeal Specimens with the Swab Technique”¹⁾, 대한진단검사의학회 “구인두 도말과 비인두 도말 채취 방법”²⁾
- 2) 선별진료소에서 NP swab을 채취할 때는 환자마다 장갑을 교체하는 것이 원칙입니다. 검체를 채취할 때 swab을 부러뜨리면, UTM이 검사자의 장갑, 가운 소매, 토시에 될 수 있습니다. 장갑은 접히는 부분이 있기 때문에 장갑 위에 손위생을 하더라도 오염된 UTM이 다른 환자 검체 튜브를 오염시킬 수 있습니다. 장갑의 접히는 부분을 최소화하기 위해 손에 꼭 맞는 장갑을 착용해야 합니다. 감염병 대유행 상황에서 라텍스 또는 니트릴 실험장갑 공급이 원활하지 못할 때에는 장갑 위에 손소독을 시행하는 경우가 있지만, 이 경우에도 손에 꼭 맞는 장갑을 착용해야 하며, 접히는 부분의 소독과 눈에 보이지 않는 찢어짐 등에 대해 주의해야 합니다.
- 3) 워크스루 부스(walk-through booth)에 부착된 장갑은 손의 움직임이 자유롭지 못하기 때문에 검체 채취, UTM 튜브 조작 등이 힘들고, 이로 인해 교차오염 가능성이 있습니다. 워크스루 부스를 사용할 경우 부착된 장갑의 세척 및 소독에 유의하시기 바랍니다.
- 4) 선별진료소에서 한 사람이 검체를 채취한다면, 환자 확인, 검체 채취, 검체 튜브에 표기(튜브에 표기해야 하며, 뚜껑에 marking하는 것은 부적절함), 1차 포장 등의 시간에 최소한 3분 정도를 배정하는 것이 좋습니다. 검체 채취자의 집중력 유지를 위해 적당한 간격으로 휴식 및 교대 근무를 권장합니다. 실제 국내에서도 채취 과정 중 오염이 의심되는 사례가 있었으며, 한 명의 인원이 한꺼번에 많은 환자 검체를 채취한 것이 원인일 것으로 추정되었습니다.

¹⁾<https://www.youtube.com/watch?v=DVJNWefmHjE>

²⁾<https://www.youtube.com/watch?v=pXC-m0gsyzM>

03 객담 전처리가 힘듭니다. 간편하면서도 교차오염이 없이 객담을 전처리 할 수 있는 방법이 있을까요?

객담 검체는 액화 과정을 필요로 하므로, 액화 과정에서 교차오염이 발생할 수 있습니다. 다음의 증례는 액화 시약이 SARS-CoV-2 유전자로 오염된 경우입니다(그림 3).

당일 첫 번째 검사 batch					당일 두 번째 검사 batch						
검사일자	진료과	SARS-CoV-2 (QI)(Real time)	Nasopharyngeal swab	SARS-CoV-2 (QI)(Real time PCR)	Sputum	검사일자	진료과	SARS-CoV-2 (QI)(Real time PCR)	Nasopharyngeal swab	SARS-CoV-2 (QI)(Real time PCR)	Sputum
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	INF	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	INF	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	INF	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	INF	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	INF	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	INF	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	EM	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	RM	Negative	5		
2021-02-03	SCO	Negative	5			2021-02-03	RM	Negative	5		
2021-02-03	EM	Negative	5			2021-02-03	RM	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	RM	Negative	5		
2021-02-03	PLM	Negative	5			2021-02-03	OS	Negative	5		
2021-02-03	PLM	Negative	5			2021-02-03	URO	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	URO	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	URO	Negative	5		
2021-02-03	LTS	Negative	5			2021-02-03	URO	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	INF	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	EM	Negative	5		
2021-02-03	GI	Negative	5			2021-02-03	INF	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	PLM	Negative	5		
2021-02-03	PLM	Negative	5			2021-02-03	EM	Negative	5		
2021-02-03	EM	Negative	5			2021-02-03	INF	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	INF	Negative	5		
2021-02-03	GI	Negative	5			2021-02-03	INF	Negative	5		
2021-02-03	ACS	Negative	5			2021-02-03	INF	Negative	5		
2021-02-03	URO	Negative	5			2021-02-03	INF	Negative	5		
2021-02-03	CMC	Negative	5			2021-02-03	EM	Negative	5		
2021-02-03	CS					2021-02-03	EM	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	EM				
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	CS	Negative	5		
2021-02-03	HEM	Negative	5			2021-02-03	CS	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	CS	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	CS	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	CS	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	CS	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	INF	Negative	5		
2021-02-03	INF	Negative	5			2021-02-03	INF	Negative	5		

그림 3 첫 번째 검사 batch와 두 번째 검사 batch에서 서로 다른 환자의 객담 검체에서만 약양성 결과를 얻음. 이 환자들의 재검체와 항체 검사는 모두 음성이었음.

위는 양성 검체로부터 객담 점액용해제(*N*-acetyl-*L*-cysteine, sodium citrate 용액)가 오염된 후, 그 다음 환자들의 객담이 교차오염으로 양성이 나온 경우입니다. 객담 검체를 검사하는 검사실의 경우 객담을 flocced swab으로 취한 후 1 mL SL solution (sputum liquefying solution) 튜브(Copan)³⁾에 넣어 vortexing 후⁴⁾ 사용하는 것을 추천합니다.

³⁾https://www.interpath.com.au/product/copan/sl-solutions/097CE_1103

⁴⁾<https://www.youtube.com/watch?v=Odcglf2qVl0>

II 핵산추출

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 내부대조 물질의 Ct값을 비교합니다. 사용하고자 하는 추출 시약의 양성률과 Ct값(확실한 기준은 없지만 대개 정량 PCR에서 사용하는 $0.5 \log_{10}$ 이내, Ct값으로 환산하면 약 1.66 이내면 차이가 없다고 판정함)을 비교하시기 바랍니다.
- 2) 자동화 추출 장비는 장비 내에서 교차오염 가능성이 있습니다. 자동화 피펫에서 검체나 핵산을 취할 때 micro-drop으로 인해 교차오염의 위험성이 있는지, 장비를 처음 사용할 때 및 사용하면서 주기적으로 확인하시기 바랍니다. 자동화 추출 장비의 검체 간 교차오염은 전혀 없어야 합니다. 따라서 CLSI EP10-A3 지침을 수정 적용하여, “Ct값 15 이하의 고농도 검체(H)”와 “음성 검체(N)”를 교대로 “H-N-H-N-H-N-H-N” 순으로 검사하여, 음성 검체 결과값이 모두 음성으로 나오는지 확인하시기 바랍니다. 교차오염의 양상은 자동화 추출 장비의 로봇팔이 몇 개의 피펫팁을 취하는지에 따라 다를 수 있습니다. 사용하는 장비의 로봇팔이 동시에 취하는 피펫팁의 수와 위치를 숙지하시기 바랍니다.
- 3) 일부 자동화 liquid handler는 핵산 추출과 PCR set-up을 동시에 하거나, PCR set-up 전용으로 사용할 수 있습니다. Liquid handler는 반복 사용시 양성 대조물질이나 양성 검체로 인한 오염 가능성이 있습니다. 탈오염을 위해서는 1% sodium hypochlorite solution으로 닦은 후 알코올과 멸균증류수로 차례로 닦아내기 바랍니다. Liquid handler의 교차오염 여부 평가도 04-2)번과 같은 과정으로 수행하기 바랍니다.
- 4) ThermoFisher의 KingFisher, 바이오세움의 Real-Prep, Genolution 장비 등은 모두 마그네틱 봉에 플라스틱 덮개(sheath)를 씌웁니다. 마그네틱 덮개에 미세 균열(micro-crack)이 있는 경우 마그네틱 봉에 마그네틱 비드가 붙게 되어 교차오염의 위험성이 있습니다(그림 4). 추출 전 마그네틱 봉에 마그네틱 비드가 묻어 있는지 셀로판 테이프 등으로 확인하면서 사용해야 합니다.



그림 4 마그네틱 봉에 씌우는 플라스틱 덮개가 손상되어 마그네틱 봉에 핵산추출용 마그네틱 비드가 오염됨

- 5) 만약 마그네틱 비드가 묻어 나온다면 셀로판 테이프로 제거 후 희석된 락스로 닦아야 합니다. 시약 패널 중에 lysis buffer가 분주되어 있으므로 검체를 먼저 분주한 다음 내부대조물질(내부대조물질의 양이 적기 때문)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.

III 시약

05 COVID-19 진단을 위한 식약처 정식 승인 시약은 어떤 것이 있습니까?

- 1) 2021년 5월 27일 기준으로 국내 정식허가를 받은 코로나19 분자진단시약은 총 22개입니다.⁵⁾ 정식허가를 받은 코로나19 분자진단 시약을 사용할 경우 제조사의 지시에 따라 검사 및 결과 해석을 권장합니다.

그러나 정식허가를 받은 코로나19 분자진단시약으로 제조사의 지시에 따라 결과를 판정하더라도, 다양한 원인으로 위양성 결과가 나올 수 있습니다(06번 참조). 따라서 이전 코로나19 확진력이 없는 환자에서 유전자 Ct값 30 이상(또는 제조사의 cut-off Ct와 5 cycles 이내의 차이를 보일 때)의 약양성 결과를 보일 경우에는 위양성 가능성을 배제하기가 어렵습니다. 이 경우 적극적으로 재검체를 얻어 검사할 것을 권고합니다. 재검체를 요청할 때에는 다음과 같은 comment를 추가하기 바랍니다. “코로나19 확진력이 없는 환자에서 약양성 결과를 보입니다. 환자의 정확한 진단을 위해 새로 채취한 검체로 재검사가 필요합니다(검체 채취 시각 기록).” 처음 검체의 결과는 “잠정 보고 약양성, 재검체 재검 필요” 등으로 보고한 후, 재검체 결과에 따라 수정할 수 있습니다.

표 2 코로나19 신환에서 시간에 따른 Ct값 변화

	검체 시간	<i>E</i> gene	<i>RdRp</i> gene	<i>N</i> gene	비고
환자 1	5월 11일 15:00	ND	ND	ND	취합검사
	5월 14일 06:00	37.87	35.85	38.67	Standard M
	5월 14일 14:00	18.99	17.50		
환자 2	12월 10일 10:00	ND	ND	34.42	노출 후 전수조사
	12월 10일 21:00	23.24	25.33	27.21	
환자 3	11월 28일 07:00	ND	ND	ND	
	12월 1일 08:00	ND	ND	36.83	노출 후 전수조사
	12월 1일 20:00	26.86	29.17	31.39	
	12월 2일 09:00	23.79	26.20	26.27	

약어: ND, not detected.

- 2) 대한진단검사의학회 COVID-19 검사실 진단 지침⁶⁾에서는 코로나19의 진단을 위한 유전자 검사로 역전사 중합효소연쇄반응법(real-time RT-PCR)을 권장하고 있습니다.
- 3) 국내 정식허가를 받은 시약 중 유전자 증폭 시간을 단축한 일부 제품의 경우 사용 전 자체평가(시약 간 평가)를 통해 동등 이상의 성능을 확인한 후 사용할 것을 권장합니다. 평가를 위해 30개 이상의 양성 검체를 사용하고, 양성 검체 중 10개 이상은 Ct값 30 이상에서 cut-off Ct값까지 고르게 분포된 검체를 선택하도록 합니다.

- 4) 취합검사(pooling test)를 실시하는 기관은 Ct값 30 이상의 검체 20개(Ct값 30에서 cut-off Ct까지 다양한 검체를 포함)를 선택하여, 각각 음성 검체 4개와 혼합한 후 취합검사를 실시하여, 사용하는 핵산 추출 시약과 코로나19 진단시약 조합에서의 취합검사의 민감도를 평가하기 바랍니다.^{7,8,9)}
- 5) 취합검사를 실시할 때는 사용하는 진단시약 선택 시 주의가 필요합니다. 정식허가 제품을 사용 하되, “응급용 선별검사 목적 코로나19 진단시약” 으로 긴급사용 승인을¹⁰⁾ 받은 후 정식허가 제품으로 등록된 제품 등 유전자 증폭 시간이 단축된 제품은 현재까지는 취합검사 적용에 대한 충분한 검증이 이루어졌다고 보기 어려워 취합검사용으로는 권고하지 않습니다.

⁵⁾https://www.mfds.go.kr/brd/m_74/view.do?seq=44074

⁶⁾대한진단검사의학회, 질병관리청. 코로나바이러스감염증-19 검사실 진단 지침. 제4판. 2020년 12월 3일

⁷⁾Mahmoud SA, *et al.* BMC Infect Dis. 2021;21:360. doi: 10.1186/s12879-021-06061-3.

⁸⁾대한진단검사의학회, 질병관리청. 상기도 검체의 혼합 검체를 이용한 코로나바이러스 감염증-19 분자 검사 프로토콜. 제1판. 2020년 5월 1일

⁹⁾Kim SY *et al.* Emerg Infect Dis. 2020 Oct;26(10):2469-2472. doi: 10.3201/eid2610.201955.

¹⁰⁾https://www.mfds.go.kr/brd/m_99/view.do?seq=44341

IV 검사과정

06 검사 시약이나 검사 과정에서 위양성 결과가 나올 수 있는 경우는 어떤 것이 있습니까?

1) 양성대조물질에 의한 오염

아래 그림에서 16번째는 환자 SARS-CoV-2 검사 결과로 *E* gene 26.11, *RdRp* gene 28.87, *N* gene 28.86으로 양성이었습니다(그림 5). 환자 검체를 재검했을 때 음성, 1번부터 22번까지 검체를 모두 재검한 결과는 모두 음성, 환자의 재검체에서도 음성이었습니다. 따라서 양성대조물질에 의한 오염이 의심되었던 경우였습니다. 이 경우 양성대조물질을 첨가할 때 주의해야 합니다(PCR 플레이트에서 양성대조물질을 제외한 환자 검체 웰은 모두 뚜껑을 닫은 후 양성대조물질을 첨가하도록 합니다).

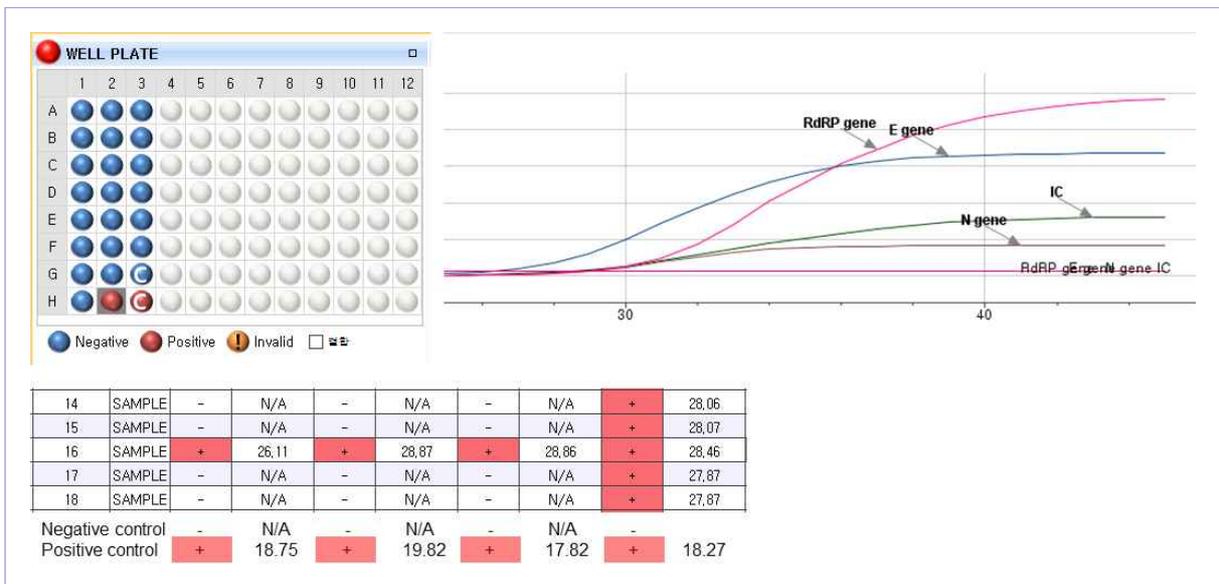


그림 5 양성대조물질에 의한 오염이 의심된 증례

▶ 교차오염의 평가

- (1) 다른 검체로 인한 교차오염 가능성이 낮은 경우: 해당 검사 batch에서, 해당 검체의 반응 웰 위치가 양성 대조와 떨어져 있는 경우(예, 그림 6. a 위치)
- (2) 다른 검체로 인한 교차오염 가능성이 높은 경우: 해당 검체의 Ct값이 인접한 양성대조 또는 인접한 양성 검체의 Ct값보다 높은(그림 6. b 위치)
- (3) 검체와 RNA를 분주할 때 filter tip을 사용하고, 파이펫팅을 천천히 해서 미세하게 검체나 RNA가 튀는 것을 방지합니다.

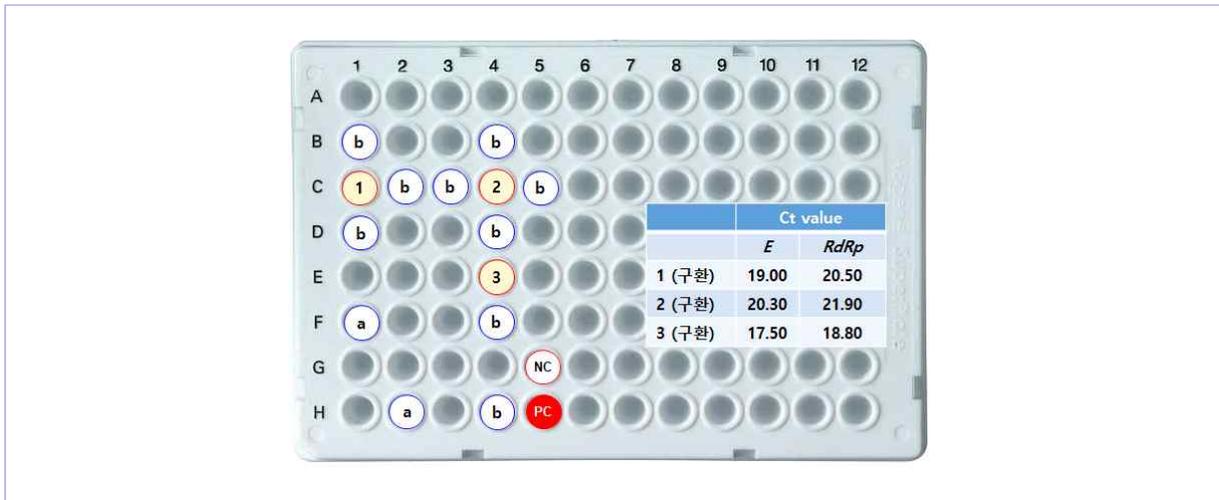


그림 6 교차오염 여부의 평가

2) Xpert Xpress SARS-CoV-2 위양성

Xpert Xpress SARS-CoV-2의 경우 *N2* gene 단독 양성일 경우 위양성 가능성이 높으며(그림 7), *E* gene Ct 값이 40 이상일 경우에도 위양성일 수 있습니다. 이 경우 반드시 정식허가 시약으로 재검하시기 바랍니다.

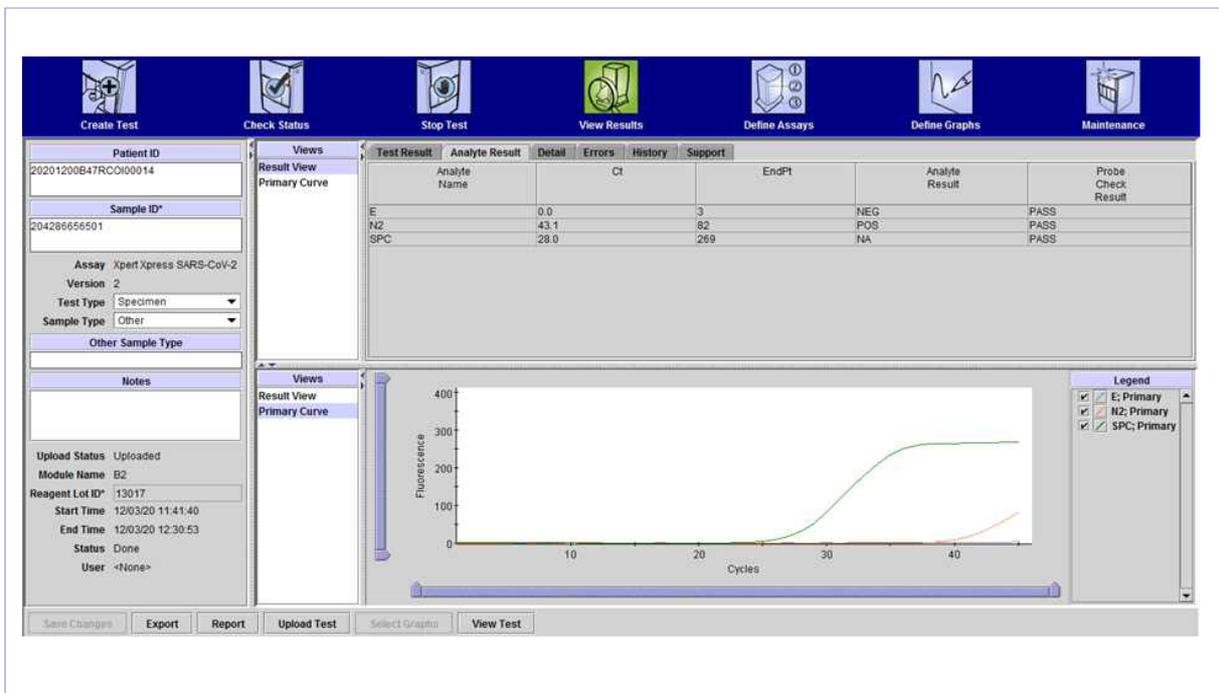


그림 7 Xpert Xpress SARS-CoV-2의 경우 *N2* gene AND/OR *E* gene Ct값이 40 이상일 경우 위양성 가능성이 있음

3) 비특이적 형광 신호의 축적

(1) Standard M 시약에서 E gene 또는 RdRp gene만 양성이지만, 증폭 곡선이 비특이적인 경우(그림 8)

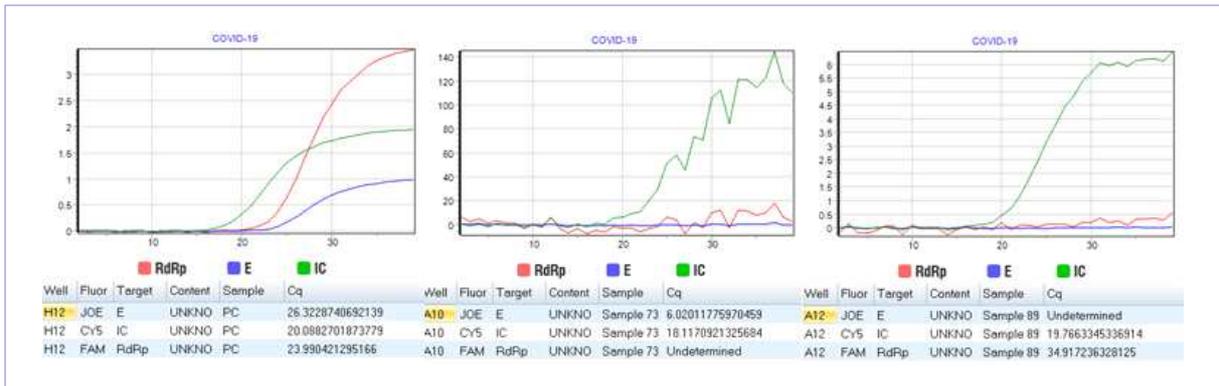


그림 8 ABI7500 (Fast) 결과. (왼쪽) 양성대조물질의 증폭곡선과 형광값(ΔRn), (중간) RdRp gene과 internal control의 비정상적인 증폭(초록색 internal control의 ΔRn 값이 비정상적으로 높음), (오른쪽) RdRp gene의 비정상적인 증폭

(2) Allplex 2019-nCoV 시약(Seegene; 긴급사용승인 시약의 경우에 관찰되었던 문제입니다)에서 비정상적인 증폭곡선을 양성으로 판독한 경우(그림 9)

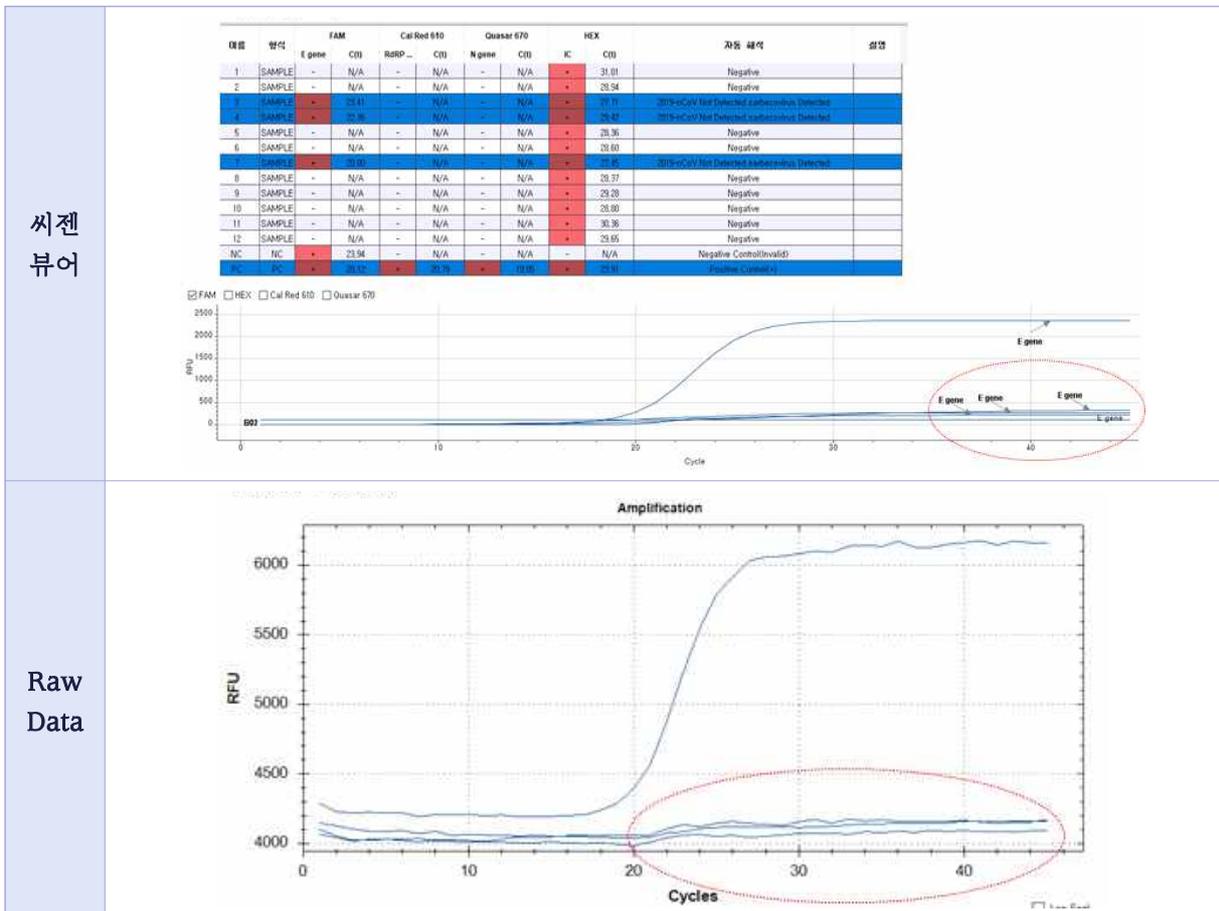


그림 9 CFX96의 증폭곡선(아래)과 씨젠 뷰어의 증폭곡선(위). Reprinted from Ann Lab Med 2020;40:439-47 with permission.

07 검사 과정에서 주의해야 할 점은 무엇입니까?

1) 양성대조물질, 음성대조물질, 내부정도관리물질의 사용

- (1) 양성대조물질과 음성대조물질은 반드시 매 검사마다 사용하도록 합니다. 일부 기관에서 양성대조물질에 의한 오염을 방지하기 위한 목적이라고 하면서 음성대조물질만 사용한 경우가 있었습니다. 매 검사마다 반드시 양성 및 음성 대조물질을 사용하기 바랍니다.
- (2) 양성대조물질이 제조사의 Ct값 허용 범위 내 증폭되고, 음성대조물질에서 표적유전자가 증폭되지 않은 경우에만 결과를 보고합니다. 일부 기관에서 양성대조물질 2개, 음성대조물질 2개를 사용한 후 하나만 제대로 나와도 결과를 보고한 경우가 있었습니다. 양성대조물질과 음성대조물질을 각각 2개씩 사용한 경우는 모두 적합한 결과가 나와야만 결과를 보고할 수 있습니다.
- (3) 키트 내 양성/음성 대조물질과 함께 상품화된 정도관리물질 사용을 추천합니다. Seracare사의 Accuplex SARS-CoV-2 molecular controls, Bio-Rad사의 SARS-CoV-2 Positive/Negative Run Control, 한국표준과학연구원의 렌티바이러스 기반 SARS-CoV-2 표준물질 등이 국내에서 사용 가능합니다.

2) 취합검사에서 교차오염을 줄이는 방법

- (1) 취합검사는 5개 검체를 하나의 튜브에 모으는 과정이 있으므로 교차오염의 위험성이 높습니다. 5개 검체를 다음과 같이 VACUETTE TUBE 6 mL Z No Additive white cap tube (Greiner Item No.: 456085) 또는 이와 유사한 튜브에 dropper 또는 extended length pipette tip을 이용하여 취합한 후 vortex mixing할 것을 권장합니다(그림 10). 15 mL conical tube를 사용할 수도 있으나, 뚜껑을 잘 닫은 후 vortex mixing해야 합니다. Vortex mix 후에는 반드시 30초 정도 튜브를 세워 둔 후 뚜껑을 열어야 에어로졸을 최소화할 수 있습니다.¹¹⁾ 취합 검체(자검체)는 반드시 자검체 튜브에 라벨을 합니다.



그림 10 흰색 cap이 있어 열고 닫기가 편하고, 첨가제가 없어 취합검사 검체를 혼합하는 용도로 적당함

(2) 취합을 위한 검체를 검체 rack에 꽂을 때 검체 흡수 열에만 검체를 꽂은 후, 분주한 검체는 다음 열 (찍수 열)의 rack으로 옮기면 오류를 줄일 수 있습니다(그림 11).

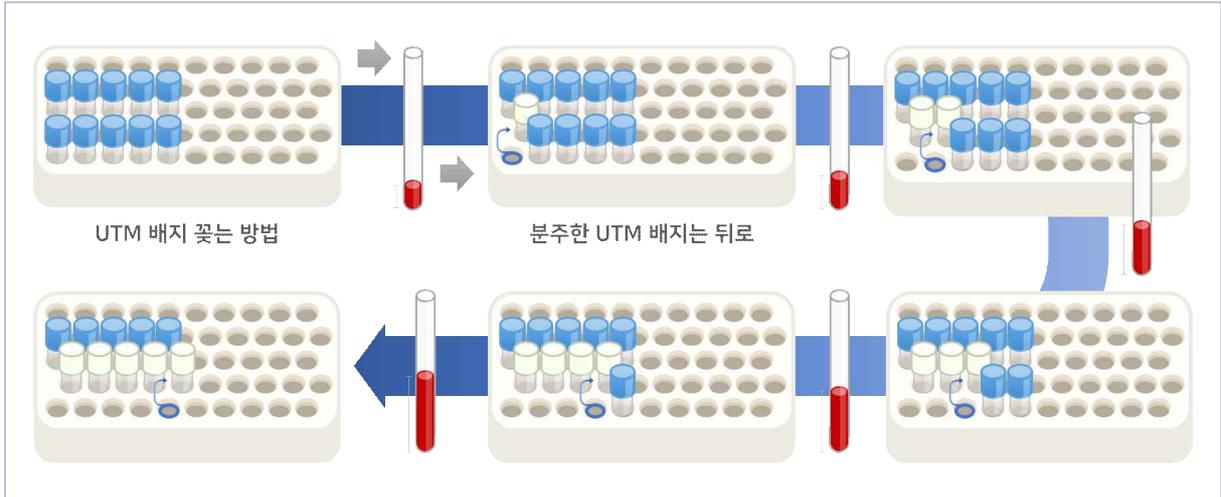


그림 11 5개 검체를 취합하기 위해 UTM 튜브를 꽂는 방법. 하나씩 취합한 튜브는 뒤 열로 이동시킴

(3) 취합을 위한 UTM 튜브는 하나를 연 후 검체를 취하고 뚜껑을 닫고 뒤 열로 이동시키고, 다음 UTM 튜브를 연 후 검체를 취하고 뚜껑을 닫고 뒤 열로 이동시키는 순으로 합니다. 반드시 하나씩 뚜껑을 열어야 하며, 뚜껑에 번호를 기입하면 안 됩니다.

3) 내부대조물질을 PCR mixture에 첨가하는 시약을 사용할 경우

Multi-pipette으로 분주하여 그림의 열 3에 검체 RNA를 분주하지 않고 열 4에 두 번 검체 RNA를 분주하는 경우에도 열 3의 각 웰에서 내부대조물질에 대한 PCR 반응은 정상적으로 일어날 수 있어 음성으로 보고하게 됩니다(그림 12). PCR set-up 과정에 liquid handler 사용을 권장합니다.

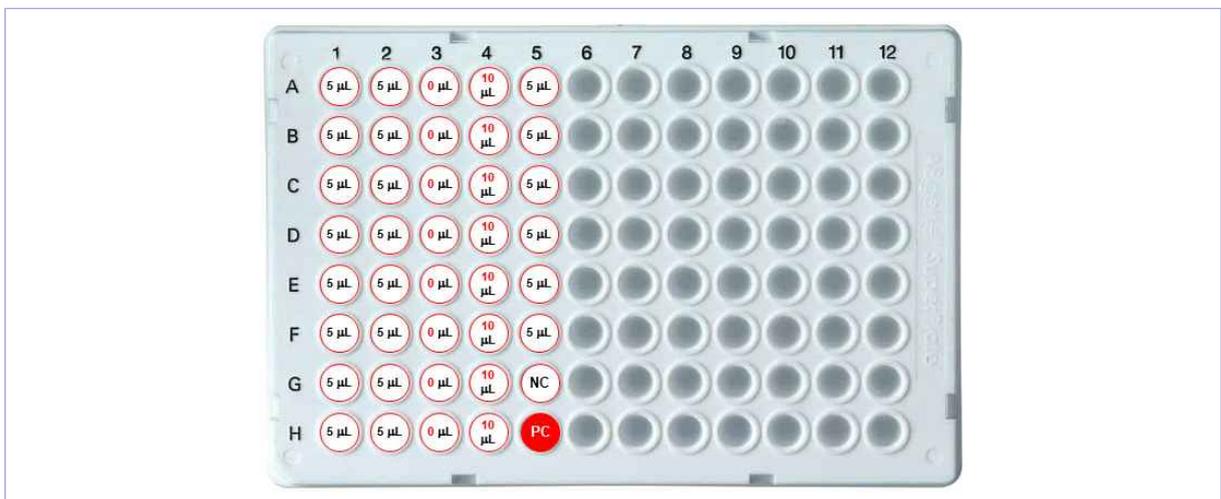


그림 12 Multi-pipette 사용할 때 발생할 있는 수 오류. 내부대조물질을 PCR mixture에 첨가하는 시약의 경우 검체에서 추출한 RNA를 넣지 않더라도 내부대조물질에 대한 PCR 반응이 정상적으로 일어나 최종 음성 결과로 보고될 수도 있음.

4) 검체 채취 과정 중 오염

하나의 batch 내에서 일련번호 순으로(검체 채취 순으로) 다수의 양성결과가 나오는 경우, 가족이나 직장 내 확진자의 밀접 접촉자 검체에서 다수의 양성이 나오는 경우가 있을 수 있지만, 동일 선별진료소 내 검체 채취 과정에서 교차오염일 수도 있습니다. 교차오염의 경우 연속해서 양성일 수도 있지만, 2-02)에서 설명한 바와 같이 장갑의 접힌 부분에 묻은 UTM이 후속 검체에 random으로 오염되어 비연속적일 수도 있습니다(그림 13). 한 batch 내에서 다수의 양성 검체가 나올 경우 재추출 재검을 시행하고, 재검에서도 동일한 결과일 때는 검사를 의뢰한 곳에 검체 채취 과정에서의 오염 가능성을 설명하고 재검체를 요청해야 합니다.

검사번호	접수번호	등록번호	환자성명	상태	의뢰처	결과
1	6-13566	㉹㉹㉹-511		4	㉹㉹㉹보건소	Negative
2	6-13567	㉹㉹㉹-512		4	㉹㉹㉹보건소	Negative
3	6-13568	㉹㉹㉹-513		4	㉹㉹㉹보건소	Negative
4	6-13569	OO-0088		4	OO보건소	Negative
5	6-13570	OO-0089		4	OO보건소	Negative
6	6-13571	OO-0090		4	OO보건소	Negative
7	6-13572	OO-0091		4	OO보건소	Negative
8	6-13573	OO-0092		4	OO보건소	Negative
9	6-13574	OO-0093		4	OO보건소	Positive
10	6-13575	OO-0094		4	OO보건소	Negative
11	6-13576	OO-0095		4	OO보건소	Negative
12	6-13577	OO-0096		4	OO보건소	Negative
13	6-13578	OO-0097		4	OO보건소	Negative
14	6-13579	OO-0098		4	OO보건소	Positive
15	6-13580	OO-0099		4	OO보건소	Positive
16	6-13581	OO-0100		4	OO보건소	Negative
17	6-13582	OO-0101		4	OO보건소	Negative
18	6-13583	OO-0102		4	OO보건소	Positive
19	6-13584	OO-0103		4	OO보건소	Negative
20	6-13585	OO-0104		4	OO보건소	Negative
21	6-13586	OO-0105		4	OO보건소	Negative
22	6-13587	OO-0106		4	OO보건소	Negative
23	6-13588	OO-0107		4	OO보건소	Positive
24	6-13589	OO-0108		4	OO보건소	Positive
25	6-13590	OO-0109		4	OO보건소	Positive
26	6-13591	OO-0110		4	OO보건소	Positive
27	6-13592	OO-0111		4	OO보건소	Positive
28	6-13593	OO-0112		4	OO보건소	Indeterminate
29	6-13594	OO-0113		4	OO보건소	Negative
30	6-13595	XX-4305		4	XX보건소	Negative
31	6-13596	XX-4306		4	XX보건소	Negative
32	6-13597	XX-4307		4	XX보건소	Negative
33	6-13598	XX-4308		4	XX보건소	Negative

그림 13 검체 채취 과정 중 오염이 의심되었던 경우, 같은 날 접수된 검체 중 OO보건소 검체에서 다수의 양성이 연속적으로(비연속적일 수 있음) 나올 경우, 재추출 재검 결과도 동일하여, 의뢰한 보건소에 검체 채취 과정의 오염 가능성을 설명하고 재검체를 요청하도록 함.

¹¹⁾<https://ehs.utoronto.ca/our-services/biosafety/techniques-for-minimizing-aerosols/>

V 결과해석

08 표적 유전자 중 하나만 양성인 미결정 결과의 원인은 어떤 것이 있습니까?

- 1) 감염 후 회복기 환자의 검체에서 흔히 관찰됩니다. 어떤 유전자가 양성이 오래 유지될지는 시약마다 다를 수 있습니다.

긴급사용승인 시약인 Allplex 2019-nCoV 시약의 경우는 *N* gene이 가장 늦게까지 양성이었습니다. Seegene의 정규 허가시약인 Allplex SARS-CoV-2 시약의 경우는 2개의 유전자를 동시에 검출하는 *RdRp* gene + *S* gene이 가장 늦게까지 양성인 경우가 많습니다(다른 유전자가 더 오래 양성인 경우도 있습니다). 신환에서 미결정 결과인 경우 반드시 재채취한 검체로 재검하기 바랍니다. 이때 항체 검사가 환자 감염의 경과를 이해하는 데에 도움이 됩니다.

- 2) 초기 감염의 경우에도 미결정 결과는 있습니다. 또한 사용하는 시약의 표적 유전자 primers, probe 부위의 변이로 인한 미결정 결과일 수도 있습니다. 예: ThermoFisher TaqPath COVID-19 assay에서 *S* gene “dropout,” Roche cobas SARS-CoV-2의 *E* gene C26340T 변이에 의한 *E* gene “dropout,” Xpert SARS-CoV-2에서 *N2* gene 변이로 인해 *E* gene과 Ct값 차이가 많이 나거나, *N2* gene “dropout”¹²⁾.
- 3) 사용하는 시약의 양성 형광 cut-off 설정 문제: 아래는 긴급사용승인 시약인 Allplex 2019-nCoV 시약에서 관찰된 *N* gene 위음성 증례입니다(그림 14).

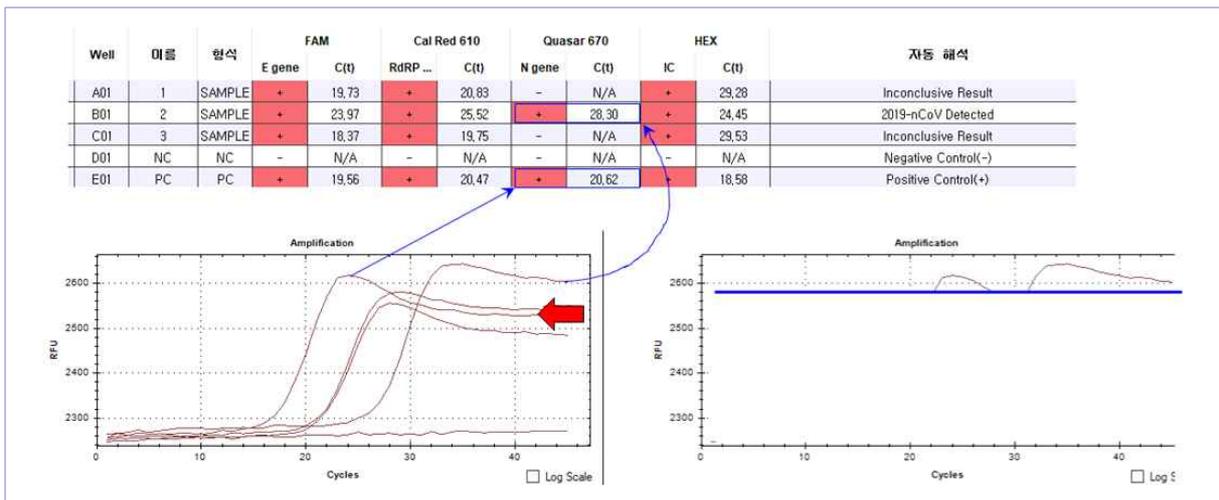


그림 14 *N* gene 위음성. 왼쪽 아래 CFX-96에서는 정상적인 *N* gene 증폭을 관찰할 수 있음 (빨간색 화살표). 형광의 세기(RFU)가 적어서(오른쪽 아래 그림의 파란선은 threshold 설정값), 뷰어 프로그램에서 음성으로 판독함.

¹²⁾<https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-viral-mutations-impact-covid-19-tests#xpert>

- 4) 미결정 결과가 하나 이상의 표적 유전자의 비정상적인 증폭 때문일 수 있습니다. 시약 lot마다 비정상적인 증폭으로 인한 미결정 결과의 빈도가 다를 수 있습니다. 시약의 보관 조건이나 해동 후 냉장 상태에서 다루어야 되는지, 상온에 맞춘 후 사용해야 하는지는 시약마다 다를 수 있으니, 시약 설명서를 바탕으로 한 검사지침서대로 검사하시기 바랍니다.
- 5) 검체나 증폭 산물의 교차오염에 의해 미결정 결과가 나올 수 있습니다.
- 6) 취합검사의 판독은 개별 검체 판독과 달리, 한 개의 유전자라도 제조사가 설정한 최대 cycle 내에서 증폭 곡선이 관찰되는 경우는 반드시 해당 혼합 검체에 들어 있는 개별 검체를 모두 각각 검사해야 합니다.^{8,9)} 아래 표 3에서 취합검사 결과 미결정일 때, 개별 검사 결과가 어떻게 나오는지 보여주고 있습니다(검체 번호 2, 4-6, 10-11). 취합검사 결과의 해석은 표 4를 참고하시기 바랍니다.⁹⁾

표 3 취합검사와 개별 검사의 Ct값 차이

No.	취합 검체 수	취합 시 결과(Ct)			개별 검체 결과(Ct)		
		E	RdRp	N	E	RdRp	N
1	4	20.52	20.29	18.69	16.98	17.12	16.47
2	5	ND	32.51	ND	37.50	38.98	35.87
3	5	37.78	36.24	35.88	33.71	34.13	33.16
4	5	38.68	ND	37.86	35.49	34.18	35.64
5	5	ND	ND	37.77	35.64	36.22	39.54
6	5	ND	ND	39.81	ND	ND	39.46
7	5	30.44	31.95	34.60	21.71	23.17	25.09
8	5	13.08	16.43	16.78	11.18	14.29	14.33
9	5	29.25	31.08	33.69	28.20	30.51	32.09
10	5	ND	ND	39.95	ND	ND	39.48
11	5	ND	ND	37.80	31.29	34.20	35.24

약어: ND, not detected.

표 4 취합검사 결과의 해석

표적 유전자의 Ct값	해석 및 조치
모두 cut-off Ct값 이하	취합검사 양성 → 개별 검체 검사 시행
한 개 이상의 유전자가 제조사가 설정한 최대 cycle 이내에서 증폭되지만, 취합검사 양성 기준을 만족하지 못하는 경우	취합검사 미결정 → 개별 검체 검사 시행
모두 음성	취합검사 음성 → 개별 검체 음성 보고

⁸⁾대한진단검사의학회. 질병관리청. 상기도 검체의 혼합 검체를 이용한 코로나바이러스 감염증-19 분자 검사 프로토콜. 제1판. 2020년 5월 1일

⁹⁾Kim SY *et al.* Emerg Infect Dis. 2020 Oct;26(10):2469-2472. doi: 10.3201/eid2610.201955.

09 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 표면을 A4 용지 한 장 정도 면적이 되도록 충분히 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.

10 결과 보고 시 오류의 원인과 해결 방안을 알고 싶습니다.

- 1) 코로나19 진단검사 양성 환자는 일정 기간 격리 생활을 하는 점을 고려하여, 신환의 경우 모든 유전자 Ct값이 30 이상의 약양성일 경우는 검체 채취 과정이나 검사 과정에서 발생할 수 있는 교차오염의 가능성을 충분히 검토해야 합니다. 필요시 원래 검체를 재추출하여 검사하거나, 새로운 검체를 채취해서 재검하는 것을 고려해야 합니다. 검사실의 교차오염은 어떤 환경에서도 생길 수 있습니다. 다음은 교차오염으로 인한 위양성 결과를 재검체와 항체 검사를 통해 해결한 사례입니다.

사 례

44세 여자 환자. 병동 소아 환자의 상주 보호자. 병원 상주 전 실시한 코로나19 검사 음성.
상주 4일째 추적 코로나19 검사 양성(Standard M E gene Ct 36.91, ORF1ab Ct 35.97).
→ 동일 검체로 Xpert Xpress SARS-CoV-2 검사 실시: 음성
→ 재검체로 SARS-CoV-2 정식 검사: 음성
→ Liaison TrimericS IgG (Diasorin): 음성

- 2) 정규 시간 이후의 판독: 결과 보고의 인터페이스가 되지 않았을 때, 판독의가 “양성” 을 제대로 확인하지 않고 음성으로 판정한 경우가 있었습니다. 다행히 검사자가 오류를 확인하고 교정한 경우입니다.

해결책

(1) 검사자와 판독의의 double check, (2) 결과 보고 인터페이스 적용

- 3) 결과 보고 인터페이스 후: 한꺼번에 2 batch를 검사하는 경우. 오후 3시에 ABI7500 1번 장비에 94검체를 걸고, 오후 3시 10분에 ABI7500 2번 장비에서 94검체를 걸었음. 오후 3시에 나온 결과를 인터페이스 컴퓨터에서 3시 10분 검사의 결과로 전송.

해결책

(1) 검사자와 판독의의 double check, (2) 검사 리스트 상단에 핵산추출(예, MagNa Pure 1번 장비), 핵산증폭 장비(CFX-96 2번 장비), 검사 시작 시간(시간-분-초로 기록, 17-23-03)을 기록하여 추출부터 핵산 증폭 과정을 추적가능하게 함

VI 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.
4. Kim SY, Lee J, Sung H, *et al.* Pooling upper respiratory specimens for rapid mass screening of COVID-19 by real-time RT-PCR. *Emerg Infect Dis.* 2020;26:2469-72.

VII 코로나-19 진단검사관리위원회

▶ 코로나-19 진단검사관리위원회 목적

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

▶ 민관전문가(위원)

대한진단검사의학회 및 질병관리청

민간	울산의대 서울아산병원	성 흥 섭	위원장
	한림의대 동탄성심병원	김 현 수	
	계명대의대 동산의료원	류 남 희	
	서울의대 서울대학교병원	성 문 우	
	국민건강보험 일산병원	노 경 호	
	연세의대 세브란스병원	홍 기 호	
	전북의대 전북대학교병원	이 재 현	
	국립중앙의료원	김 소 연	
정부	질병관리청 감염병진단관리총괄과	김 갑 정	간사
	질병관리청 신종병원체분석과	김 은 진	

COVID-19 분자진단검사 Q&A 제5판

발행	2021년 6월 22일
제 4 판	2020년 6월 30일
제 3 판	2020년 3월 23일
제 2 판	2020년 3월 17일
제 1 판	2020년 3월 5일

※ 본 안내서에 대한 모든 저작권은 대한진단검사의학회에 귀속되어 있으며, 대한진단검사의학회의 동의 없이 상업적으로 이용할 수 없습니다.