

중합효소 연쇄반응 기반의 코로나19 바이러스 검출법에 대한 국가별 목표 유전자 및 프로토콜 비교 연구

Comparative Study of Target Genes and Protocols by Country for Detection of SARS-CoV-2 based on Polymerase Chain Reaction (PCR)

김진희

청주대학교 보건의료대학 임상병리학과

Jin-Hee Kim(jinheekim@cju.ac.kr)

요약

'심각한 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스 2(SARS-CoV-2)'에 의한 질병인 코로나-19는 2020년 3월 세계 보건기구에서 세계적인 전염병 대유행으로 선언되었고, 대부분의 나라에서 선별 및 확진을 위한 진단검사법으로 실시간 중합효소 연쇄반응 검사를 시행한다. 그러나 국가별 목표유전자 및 프로토콜이 다를 뿐만 아니라 진단결과와 판독절차도 다양해서 국가별로 확진자의 기준 역시 다르다. 이에 본 중설에서는 세계보건기구에서 고시한 국가별 목표유전자 및 검사기법, 진단기준을 비교하였고, 검사의 특이도와 민감도, 최소검출한계, 양성 및 음성 대조군, 교차반응 후보군, 검체 대조군 설정 등의 특이사항도 함께 살펴보았다. 또한 각국의 검사기법과 한국의 검사기법의 특징을 고찰하였다. 마지막으로 향후 전세계가 '심각한 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스 2'에 대한 동일한 진단결과를 얻기 위하여 코로나-19 진단에 대한 표준화된 진단방법 및 결과판독 등을 제언하였다.

■ 중심어 : | 코로나-19 | 진단검사 | 실시간 중합효소 연쇄반응 | 심각한 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스 2 |

Abstract

Corona-19, a disease caused by 'Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)', was declared a global pandemic by the World Health Organization (WHO) in March 2020, and a real-time polymerase chain reaction test is performed as a diagnostic test for screening and confirmation in most countries. However, not only the target genes and protocols differ by countries, but also the procedures for reading the diagnosis results are diverse, so the criteria for confirmed patients differ by country. Therefore, in this review, we discussed the target genes, test techniques, and diagnostic criteria for each country notified by WHO. And the specificity and sensitivity, limits of detection, positive and negative controls, false positive bacteria candidates, and specimens, and the specifics of the control setting were also described. In addition, the characteristics of Korea's test were compared to each country's one. Finally, in order to obtain the same diagnosis result for SARS-CoV-2 in the future, standardized diagnosis methods and result interpretations for Corona-19 diagnosis were proposed.

■ keyword : | COVID-19 | Diagnostic Test | Real-Time PCR | SARS-CoV-2 |

* 이 논문은 2019-2020학년도에 청주대학교 보건의료과학연구소가 지원한 학술연구조성비(특별연구과제)에 의해 연구되었습니다.

접수일자 : 2020년 09월 22일

심사완료일 : 2020년 10월 06일

수정일자 : 2020년 10월 05일

교신저자 : 김진희, e-mail : jinheekim@cju.ac.kr

I. 서론

1. 코로나-19 개요

2019년 12월 31일, 중국 보건당국(保健當局)은 세계 보건기구(World Health Organization, 이하 WHO)에 중국 호북성 우한시에서 발생한 ‘알려지지 않은 병인의 폐렴’에 대해 경고했다[1]. 그리고 2020년 1월 7일, WHO에서 2019-nCoV로 약칭한 새로운 코로나 바이러스를 환자의 목구멍(구인두, oropharynx)에서 분리했다[2]. 이 병원체는 이후에 코로나 바이러스 연구 그룹에 의하여 ‘심각한 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스 2(이하 SARS-CoV-2)’로 이름이 바뀌었고, WHO는 이 질병을 코비드-2019(COVID-19, 이하 코로나-19)로 명명했다[3].

코로나-19의 병원체인 SARS-CoV-2는 코로나 바이러스(Coronaviridae) 과(科) 니도바이러스(Nidovirales) 목(目)에 속한다. 코로나 바이러스과는 아과(亞科)인 베타 코로나 바이러스(Betacoronavirus)에 속하는데, 사스 바이러스(이하, SARS-CoV)와 메르스 바이러스(이하, MERS-CoV)가 여기에 속한다[4]. 코로나 바이러스는 조류나 박쥐 등에게 발병하는 병원체라 생각되다가 2017년에 Menchery 등이 사람에게도 교차감염 가능한 인수공통감염체로 보고했다[5]. 계통분류학적 측면에서 SARS-CoV-2의 유전자는 2018년 중국 동부에서 수집된 박쥐 유래 SARS 유사 코로나 바이러스(bat-SL-CoVZC45 및 bat-SL-CoVZXC21)와 88% 상동성이 있는 반면 SARS-CoV와 79%, MERS-CoV와 50% 상동성을 가진다고 보고하여[6], SARS-CoV-2가 SARS-CoV나 MERS-CoV의 변종이라고 보지 않았고 새로운 종류의 코로나 바이러스로 분류되었다. 2020년 3월 12일 WHO는 코로나-19를 세계적 대유행, 즉 팬데믹(pandemic)으로 선언하였고 2020년 9월말 기준으로 코로나-19 국내 확진자 수는 23,812명이며, 전세계 확진자 수는 3,350만명에 달한다.

2. SARS-CoV-2의 형태구조 및 유전자서열

SARS-CoV-2는 코로나 바이러스의 전형적 형태로 핵산단백이 RNA 유전체를 둘러싸인 코일관나선

(coiled tubular helix) 구조이며, 지질이 포함된 작은 외피에 둘러싸여 있다. 세부형태로 핵산단백(nucleocapsid, N), 매트릭스(matrix, M), 작은 외피(small envelope, E), 표면돌기(spike, S) 등의 구조 단백질을 가진다[그림 1][7]. 먼저, 핵산단백(N)은 바이러스 RNA 유전체에 결합하여 바이러스 입자 조립과 외피 형성에 관여하여 RNA 합성 과정에서 유전체를 안정화하고 포장하는데 중요한 역할을 수행한다. 그리고 외피에 있는 꽃잎 모양의 표면돌기 당단백질(spike glycoprotein)은 숙주세포 수용체와 결합 시 필수적으로 작용하여 숙주의 감염범위를 결정한다[8]. 특이사항으로 첫째, 코로나 바이러스 중 가장 큰 유전체로서 약 30 kb 길이의 단일 가닥 RNA이다. 둘째, 바이러스 유전체인 RNA 자체가 전사체로 작용하는 양성 가닥(positive-strand) RNA형이다. 셋째, 헤마글루티닌 에스테라제(hemagglutinin-esterase, HE) 단백질이 있어서 바이러스 입자가 세포표면의 부착 및 유리가 용이하다[9].

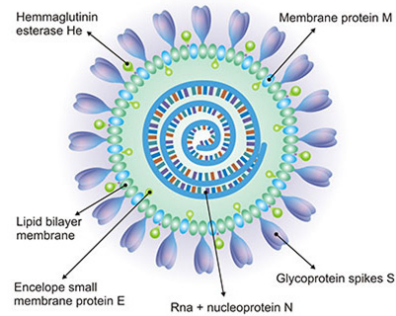


그림 1. SARS-CoV-2의 형태

한편, 세계 최초로 차세대 염기서열분석법을 활용하여 SARS-CoV-2의 RNA 전사체를 분석한 연구팀은 대한민국 김빛내리 교수팀이며, SARS-CoV-2의 유전체뿐만 아니라 숙주세포로 침투해 생산한 RNA 전사체 및 후성전사체(epitranscriptome)를 모두 분석했다[그림 2][10]. SARS-CoV-2 유전체는 9,860개의 아미노산을 암호화하는 29,891개의 뉴클레오티드를 가지고 있고 양 끝에 5'-캡(cap) 구조와 3'-폴리A꼬리(염기서열, AAGAA)를 가지고 있다[11][12]. 나노공 염기분석법(nanoball sequencing)에서 9개의 비연속 전사

체(S, 3a, E, M, 6, 7a, 7b, 8, N, 10)를 확인했고, 나노 구멍 염기분석법(nanopore direct RNA sequencing)에서 41개의 RNA 변형(후성전사체)이 가능한 위치를 확인했다[10].

3. SARS-CoV-2의 진단검사법

WHO에서 권고하는 코로나-19 검사는 유전자증폭 검사와 면역항체검사이다. 면역항체검사는 사람의 혈액에서 SARS-CoV-2에 대한 항체를 검사하는 것이며, 감염이후 항체가 형성되기까지 보통 1~3주 소요되기 때문에 항체검사로 초기 감염여부를 파악하기 어려워 국제적으로 진단검사로 사용하지 않는다. 반면 중합효소 연쇄반응 기반 유전자증폭검사는 SARS-CoV-2의 핵산을 주형으로 목표유전자를 증폭하여 실시간 바이러스 감염여부를 확인할 수 있어서 검체 수집 및 검사법에 대한 임시 지침을 공시하여 각 국가에서 검사에 참조가 될 수 있도록 했다[13].

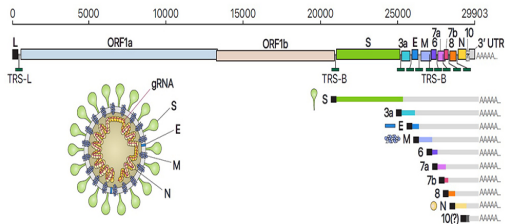


그림 2. SARS-CoV-2의 유전자 구조[10]

II. 국가별 SARS-CoV-2 검출을 위한 실시간 중합효소 연쇄반응 기반 유전자 증폭 검사

SARS-CoV-2의 유전자 증폭검사에 대한 검사 프로토콜(protocol)을 지정한 국가는 총 7국가이며 각 나라의 목표 유전자는 모두 상이했다[표 1]. II에서는 각 국가의 목표 유전자와 검사방법, 결과 판독을 비교하였다.

표 1. 국가별 중합효소연쇄반응법의 목표 유전자

국가, 기관	목표유전자
중국, 질병관리통제센터(CDC)	ORF1ab and N
프랑스, 파스퇴르 연구소	Two targets in RdRP
미국, 질병관리통제센터(CDC)	Three targets in N gene
일본, 국립전염병센터	Pancorona and multiple targets, Spike protein
독일,사리데 (베를린 대학)	RdRP, E, N
홍콩, 홍콩대학교	ORF1b-nsp14, N
태국, 국립보건원	N

1. 중국, 질병관리통제센터(이하 CDC)

중국 CDC의 바이러스 질병 연구소에서 2020년 1월 21일 검사법을 공시하여 WHO에서 2020년 1월 24일 공개하였다[13].

검사방법은 실시간(real time) 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, 이하 RT-PCR)방법으로 바이러스 핵산을 이용하였다. 목표 유전자는 오픈 리딩 프레임 1ab(ORF1ab) 및 핵 단백질(N) 유전자 영역에 프라이머와 프로브를 사용하였고 염기서열을 [표 2]와 같다.

표 2. 중국 목표유전자의 프라이머 및 프로브 염기서열

프라이머 및 프로브 이름	염기서열
ORF1ab 정방향 프라이머(F)	CCCTGTGGGTTTACACTTAA
ORF1ab 역방향 프라이머(R)	ACGATTGTGCATCAGCTGA
ORF1ab 형광 프로브(P)	FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAA GGTTATGG-BHQ1
N 정방향 프라이머(F)	GGGGAACCTCTCCTGCTAGAAT
N 역방향 프라이머(R)	CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG
N 형광 프로브(P)	FAM-TTGCTGCTGCTTACAGATT- TAMRA

F: Forward primer, R: Reverse primer, P: Probe

핵산 추출 및 실시간 RT-PCR 검사법의 표준운영절차(standard operating procedure, 이하 SOP)는 공시하지 않았으며, 제조업체 키트의 검사지침을 참조에 명시하였으나 추천하는 제조업체는 없다.

검사결과 판독은 음성과 양성으로 규정했으며, 음성은 역치 사이클(cycle threshold, 이하 Ct)값이 없거나 40이상인 경우이다. 양성은 Ct가 37보다 작을 때 확진하며, Ct값이 37과 40사이일 때는 반복검사를 권했다. 반복실험 결과, 뚜렷한 증폭 곡선과 피크(peak)가 있는 경우는 양성으로 판단할 수 있다.

2. 프랑스, 파스퇴르 연구소

파리(Paris)에 있는 파스퇴르 연구소의 호흡기 바이러스 국가기준센터에서 2020년 1월 11일 목표유전자(RdRp) 2곳(IP2 and IP4)을 설정하였는데, 유전체 번호 NC_004718 기준으로 IP2는 nt12621-12727, IP4는14010-14116에서 프라이머와 프로브를 제작하였다. 확진검사는 독일 사르테 프로토콜에서 E 유전자를 함께 사용했다. 목표 유전자의 프라이머와 프로브 염기서열은 [표 3]에 정리하였다.

검사방법에서 핵산 추출 및 실시간 RT-PCR에 사용할 시약 및 기계에 대한 제조사도 권고하였다. 핵산추출키트는 Macherey Nagel사의 740895.50 제품으로, RT-PCR키트는 Invitrogen사의 1732-020 제품, 기계는 LightCycler 480이다. 또한 검사법에 대한 SOP도 명시하였다. 예컨대, 핵산 추출의 경우 용출량(volume)과 RT-PCR 반응액의 RNA양을 제한했다. 실험방법론은 보고서 형태로 출판했다[14].

검사결과 판독에 대한 정의는 없지만 양성대조군과 음성대조군을 함께 검사하여 검사의 신뢰도를 검증한다. 양성대조군은 중국 우한에서 얻은 균종(strain)의 전사체에서 얻어 RdRp와 E 유전자를 증폭하여 사용했다. 모든 실험에는 양성대조군으로 105, 104, 103을 함께 검사하여 결과판독에서 상대정량이 가능하도록 했다.

표 3. 프랑스 목표 유전자의 프라이머 및 프로브 염기서열

프라이머 및 프로브 이름	염기서열
IP2 정방향 프라이머(F)	ATGAGCTTAGTCCTGTG
IP2 역방향 프라이머(R)	CTCCCTTTGTGTGTGT
IP2 형광 프로브(P)	HEX-AGATGTCTTGCTGCCGGT A-BHQ
IP4 정방향 프라이머(F)	GGTAACTGGTATGATTCG
IP4 역방향 프라이머(R)	CTGGTCAAGGTTAATATAGG
IP4 형광 프로브(P)	FAM-TCATACAAACCAGCCAGG- BHQ
E 정방향 프라이머(F)	ACAGGTACGTTAATGTTAATAGC GT
E 역방향 프라이머(R)	ATATTGCAGCAGTACGCACACA
E 형광 프로브(P)	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGC GCTTCG-BHQ

F: Forward primer, R: Reverse primer, P: Probe

3. 미국, 질병관리통제센터(이하 CDC)

미국 CDC의 바이러스 질병부서와 국립면역 및 호흡기질환국에서 2020년 3월 15일 발효한 검사법인 CDC-006-00019 기준으로 조사하였다. 목표 유전자

는 N 유전자로 3개의 위치를 선정하여 2개의 프라이머와 프로브를 제작하였고, 대조군 유전자로 RNase P(이하 RP, 모든 사람은 세포 당 2카피를 가지고 있음)를 선정하여 프라이머와 프로브에 포함시켰다. 해당 염기서열 정보는 [표 4]에 정리하였다.

핵산 추출 및 RT-PCR에 사용할 시약, 장비, 판독 소프트웨어에 대한 제조사를 모두 권고하였다. CDC에서 핵산추출키트 3개 회사(QIAGEN, Roche, bioMerieux)의 10개 제품의 용해완충액이 SARS-CoV-2를 비활성함을 확인하여 명시하였다. RT-PCR키트는 ThermoFisher사의 A15299 및 A15300, 장비는 Applied Biosystems 7500 Fast Dx Real-Time PCR 기기, 판독프로그램은 SDS version 1.4을 권고하였다. 기타 필요한 기기와 장비는 제조사와 제품명 등을 상세히 기술하였고, 시약 및 검체의 저장과 운용, 안정성에 대한 규정은 미국 민간 표준 연구소(Clinical Laboratory Standard Institute, CLSI) 가이드라인 중에서 MM13-A에 준용하도록 하였다. 그리고 검사자의 안전규칙과 및 검사표준운영절차에 대해 함께 명시하였다[그림 3].

표 4. 미국 목표 유전자의 프라이머 및 프로브 염기서열

프라이머 및 프로브 이름	염기서열
N1 정방향 프라이머(F)	GACCCCAAATCAGCGAAAT
N1 역방향 프라이머(R)	TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG
N1 형광 프로브(P)	FAM-ACCCCGATTACGTT TGGTGGACC-BHQ1
N2 정방향 프라이머(F)	TTACAACATTGGCCGCAAA
N2 역방향 프라이머(R)	GCGCGACATCCGAAGAA
N2형광 프로브(P)	FAM-ACAATTTGCCCGCAGCGCTT C AG-BHQ1
N3 정방향 프라이머(F)	GGGAGCCTTGAATACAC0CAAAA
N3 역방향 프라이머(R)	TGTAGCACGATTGCAGCATTG
N3형광 프로브(P)	FAM-AYCACATTGGCACCCGCAAT CCTG-BHQ1
RP 정방향 프라이머(F)	AGATTTGGACCTGCCGAGCG
RP 역방향 프라이머(R)	GAGCGGTGTCTCCACAAGT
RP 형광 프로브(P)	FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGC G CG-BHQ1

F: Forward primer, R: Reverse primer, P: Probe

검사방법의 특이사항으로는 반응액을 만들 때 기계적 섞임(vortex)를 금지한 것(파이펫 사용 권고)과 음성대조군을 가장 먼저 넣고 양성대조군을 마지막에 넣어 물리적인 검사자의 오류를 줄이도록 하였다. 또한 기기 운영에 필요한 모든 과정은 전면사진을 첨부하여 SOP

에 기술하였다.

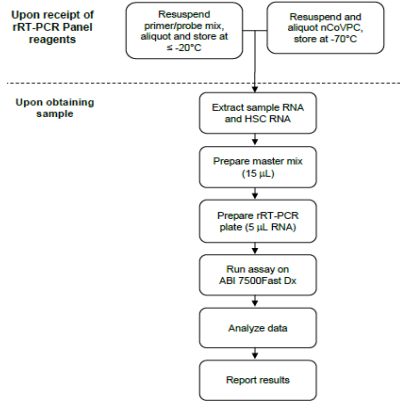


그림 3. 검사표준운영절차

검사결과 판독에서 양성은 Ct값이 40미만으로, 음성은 Ct가 없는 경우로 정의하였다. 또한, 양성대조군과 음성대조군, 검체대조군을 함께 검사하여 검사결과의 신뢰도를 높였다. 양성대조군은 목표 프라이머에 반응하는 RNA 전사체를 사용하였고, 음성대조군은 증류수를, 검체대조군은 핵산 추출물이 검증된 검체를 사용하였다. 검사결과에 대한 판독 및 행동지침은 다음과 같다[표 5]

표 5. 미국의 검사결과 판독 및 행동지침

목표유전자			결과해석	보고	행동지침
N1	N2	RP			
+	+	±	코로나-19 감염	코로나-19 양성	CDC와 의뢰기관에 보고
하나만 양성	±	±	결과 보류	결과 보류	반복검사 후 보고
-	-	+	코로나-19 비감염	코로나-19 음성	의뢰기관에 보고 및 기타 호흡기균 검사
-	-	-	검사 무효	보고 없음	반복검사, 반복검사 후 동일한 결과이면 검체를 다시 채취

4. 일본, 국립전염병센터

도쿄에 위치한 국립전염병센터 바이러스분과에서 확립한 분석법이며, 여타 국가와 다르게 비특이적 증폭을 최소화하기 위해 nested PCR 후 염기서열분석법과 실시간 RT-PCR을 병용하여 진단했다. Nested PCR의 경우, 오픈 리딩 프레임1ab(ORF1ab) 및 표면돌기 단백질(S)을 목표유전자로 사용했고, 실시간 RT-PCR에

서는 핵 단백질(N) 유전자를 사용했다. 각각의 프라이머와 프로브 서열은 [표 6]에 정리하였다.

표 6. 일본 목표 유전자의 프라이머 및 프로브 염기서열

프라이머 및 프로브 이름	염기서열
ORF1a 1 st 정방향 프라이머(F)	TTCGGATGCTCGAACTGCACC
ORF1a 1 st 역방향 프라이머(R)	CTTTACCAGCACGTGCTAGAAGG
ORF1a 2 nd 정방향 프라이머(F)	CTCGAACTGCACCTCATGG
ORF1a 2 nd 역방향 프라이머(R)	CAGAAGTTGTTATCGACATAGC
ORF1a seq정방향 프라이머(F)	ACCTCATGGTCATGTTATGG
ORF1a seq역방향 프라이머(R)	GACATAGCGAGTGATGCC
S 1 st 정방향 프라이머(F)	TTGGCAAATTCAGACTCACTTT
S 1 st 역방향 프라이머(R)	TGTGGTTCATAAAAATTCCTTTGTG
S 2 nd 정방향 프라이머(F)	TCAAGACTCACTTTCTCCAC
S 2 nd 역방향 프라이머(R)	ATTTGAAACAAAGACACCTTCAC
S seq정방향 프라이머(F)	AAGACTCACTTTCTCCACAG
S seq역방향 프라이머(R)	CAAAGACACCTTCACGAGG
N 정방향 프라이머(F)	AAATTTGGGGACCAGGAAC
N 역방향 프라이머(R)	TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC
N 형광 프로브(P)	FAM-ATGTCGCGCATTGGCATGGA-BHQ

F: Forward primer, R: Reverse primer, P: Probe

핵산 추출 및 실시간 RT-PCR 시약 및 기계에 대한 제조사도 권고되었는데, 핵산 추출키트는 QIAGEN사의 QIAamp viral RNA mini kit 제품이며, RT-PCR 법은 수기법으로 Thermo사의 Super Script IV Reverse Transcriptase와 같은 회사의 random 프라이머와 oligodT 프라이머를 권고했다. 1차로 고전적 PCR 후 2차로 nested PCR법은 진행했고, nested PCR 후 전기영동을 통해 목표 크기를 확인하고 잘른 후 핵산을 녹여 염기서열을 확인하였다. RT-PCR 시약은 QIAGEN사의 QuantiTect Probe RT-PCR Kit, 기기는 Roche사의 LightCycler96 system을 사용을 권고했다. 교차오염을 증명하기 위해 양성대조군을 권고했으나, 양성대조군을 명확히 정의하고 지정하지 않았다. 음성대조군은 검체 대신 증류수를 사용하였다.

검사결과 판독은 nested PCR 후 염기서열의 일치도와 RT-PCR의 Ct값인데, Ct값의 경우 2번 반복하여 40보다 작으면 양성으로 보았다. 동일한 방법으로 실험했을 때, 바이러스가 500카피이면 양성대조군의 평균 Ct값은 35이고, 검체는 평균 36.7으로 명시하였다.

5. 독일,샤리테(베를린 대학)

베를린(Berlin) 위치한 샤르테에서 확립한 프로토콜로[15], 2020년 1월 17일 확립 후 공개되었고, 네덜란

드 에라스무스 병원과 런던 공중보건국도 함께 사용하는 방법이다. 목표유전자는 선별용으로 E유전자를 사용하고 확진용으로 RdRp를 사용한다. 각각의 프라이머와 프로브 서열은 [표 7]에 정리하였다. 검사에 쓸 프라이머와 프로브는 2020년 1월 1일에 유전자은행에서 확인한 바이러스 서열을 기준으로 제작되었으며, 검사 전에 인실리코(in-silico) 방법으로 실험 없이 분자모델링을 통한 결과예측으로 375개의 서열을 수집 후 선정하였다.

표 7. 독일 목표 유전자의 프라이머 및 프로브 염기서열

프라이머 및 프로브 이름	염기서열
RdRp 정방향 프라이머(F)	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG
RdRp 역방향 프라이머(R)	CARATGTTAAASACACTATTAGCA TA
RdRp 형광 프로브(P)	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGG AGATGC-BBQ
RdRp 형광 프로브(P)*	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMG GTGATGC-BBQ
E 정방향 프라이머(F)	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGC GT
E 역방향 프라이머(R)	ATATTGCAGCAGTACGCACACA
E 형광 프로브(P)	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGC GCTTCG-BBQ

F: Forward primer, R: Reverse primer, P: Probe, *코로나-19, 사스, 박취-사스를 모두 검출하는 염기서열로 사베코로나바이러스(Sarbecovirus) 아속(subgenus) 를 검출하기 위함

검사방법은 메르스 바이러스 검사법을 일부 변형하여 확립하였고[16], 사스 바이러스 검사법에서 양성대조군 설정을 참조했을 때 민감도가 가장 높았다[17]. 핵산 추출은 Roche사의 MagNA Pure 96 system으로 추출했고 RT-PCR 시약은 Invitrogen사의 Superscript III one step RT-PCR system으로 권고했다. PCR 장비에 대한 권고는 없다. 검사결과 판독에서 양성과 음성에 대한 정의는 없고, 양성대조군과 음성대조군에 대한 권고가 없다.

6. 홍콩, 홍콩대학교

홍콩대학교 리카싱 의과대학에서 확립한 프로토콜로, 목표 유전자는 선별용으로 Rrf1b 유전자를, 확진용으로 N 유전자를 사용했다. 각각의 프라이머와 프로브 염기서열은 [표 8]에 정리하였다.

표 8. 홍콩 목표 유전자의 프라이머 및 프로브 염기서열

프라이머 및 프로브 이름	염기서열
ORF1b-nsp14 정방향 프라이머(F)	TGGGGYTTTACRGGTAACCT
ORF1b-nsp14 역방향 프라이머(R)	AACRCGCTTAACAAAGCACTC
ORF1b-nsp14 형광 프로브(P)	FAM-TAGTTGTGATGCWATCA TGACTAG-TAMRA
N 정방향 프라이머(F)	TAATCAGACAAGGAACTGATTA
N 역방향 프라이머(R)	CGAAGGTGTGACTTCCATG
N 형광 프로브(P)	FAM-GCAAATTGTCAATTGTC GG-TAMRA

F: Forward primer, R: Reverse primer, P: Probe

핵산 추출 및 실시간 RT-PCR 시약 및 기계에 대한 제조사도 공개했다. 핵산 추출키트는 QIAGEN사의 QIAamp viral RNA mini kit 제품이며 RT-PCR법은 키 수기법으로 Thermo사의 TaqMan Fast Virus Master mix 제품과 ViiA™ 7 Real-Time PCR를 사용했다.

검사결과 판독에서 양성과 음성에 대한 정의는 없다. 양성대조군에 대한 정의는 세포반수감염용량으로 했고 음성대조군에 대한 권고는 없다. 실시간 RT-PCR 분석과 별개로 일본처럼 nested PCR 후 염기서열분석도 사용가능하지만 주(主) 분석법으로 권고하지 않았다.

7. 태국, 국립보건원

태국 국립보건원 의과학부에서 2020년 1월 23일에 프로토콜을 공개했으며 목표 유전자는 N 유전자를 단독으로 사용했고, 해당 프라이머와 프로브 염기서열은 [표 9]에 정리하였다.

핵산 추출 및 실시간 RT-PCR에 사용할 시약도 권고했는데, 핵산 추출키트는 Macherey Nagel사의 740956 제품이며 RT-PCR키트는 Invitrogen사의 11732-020 제품이다.

검사결과 판독은 음성의 경우 Ct값이 없는 경우이고, 양성인 Ct값이 38이하로 판독한다. 교차오염을 증명하기 위해 양성대조군을 권고했고, 음성대조군은 검체 대신 바이러스 수송배지액을 사용한다.

표 9. 태국 목표 유전자의 프라이머 및 프로브 염기서열

프라이머 및 프로브 이름	염기서열
N 정방향 프라이머(F)	CGTTTGGTGGACCCTCAGAT
N 역방향 프라이머(R)	CCCCACTGCGTTCTCCATT
N 형광 프로브(P)	FAM-CAACTGGCAGTAACCA- BQH1

F: Forward primer, R: Reverse primer, P: Probe

III. 국가별 검사법 고찰

1. 검사의 특이도 및 민감도, 최소검출한계

진단검사의 신뢰성은 검사의 특이도 및 민감도, 최소한계 등의 항목에 대한 분석적 성능평가를 통해 이뤄진다[17]. 국가별 SARS-CoV-2 검사법에 대한 비교 연구에서 살펴본 결과, 검사의 특이도 및 민감도를 제시한 국가는 프랑스, 미국, 독일이며, 최소검출한계를 설정한 국가는 미국이다. 특이도(specificity)는 생체시료 내 호흡기 질환 관련 바이러스가 검체 내에 공존하더라도 SARS-CoV-2만을 분리하여 정량하는 분석능력으로, 검체 내 호흡기 질환 관련 바이러스에 대한 교차반응도 특이도에 대한 분석적 성능 평가에 포함하였다. 프랑스의 경우 교차반응에 사용한 호흡기 바이러스로 인플루엔자A(H1N1 또는 H3N2), 인플루엔자B(빅토리아, 야마가타), 인플루엔자C, 호흡기 세포융합 바이러스(Respiratory syncytial virus, RSV), 보카바이러스(Bocavirus, BoV), 파라인플루엔자 바이러스(parainfluenza virus, PIV), 아데노바이러스(adenovirus, Ad), 메타뉴모바이러스(metapneumovirus, MPV), 라이노바이러스(rhinovirus, HRV), 여타 코로나 바이러스(HKU1, OC43, 229E, NL63), 메르스 바이러스(MERS-CoV)를 선정하였고, 평가결과 SARS-CoV-2 진단에서 교차반응이 없었다. 미국과 독일은 특이도의 분석적 성능평가 전에 인실리코 기법을 선행하여 목표유전자의 염기서열을 탐색하였고, 프랑스에서 선정한 대부분의 교차반응균으로 동일하게 평가한 결과 SARS-CoV-2 진단에서 호흡기 바이러스에 대한 교차반응은 없었다. 독일은 위양성대조군(false positive control bacteria)으로 선정한 코로나 바이러스(HKU1, OC43, 229E, NL63) 및 MERS-CoV에서 SARS-CoV-2의 교차반응을 검증했을 때, 밀리리터(ml)당 105~1010카피 사이에 교차반응이 없음을 증명하였다.

민감도에 대해서, 프랑스의 경우 IP유전자와 E유전자는 100카피(copies)가 존재할 경우 95% 검출된다고 보고했고, 카피수가 적을수록 검출은 적지만, 3개의 유전자를 한꺼번에 검사(다중검출법)한다면 검체에서 SARS-CoV-2 바이러스가 10카피 이상이면 검출된다

고 보고하였다. 또한 Ct값은 기계에 따라 2 사이클까지 달라질 수 있지만 양성대조군 기준으로 10배수로 희석하여 함께 측정했다면 Ct사이값(ΔCt)이 동일하다는 단서를 달았다.

최소검출한계에 대하여, 미국만이 QIAGEN EZ1으로 검사 시 100.5카피로 설정하였고 같은 회사의 DSP 키트 사용시 100카피로 설정하였다.

2. SARS-CoV-2에 대한 양성대조군 및 음성대조군

양성 및 음성대조군을 설정한 국가는 프랑스, 미국, 일본, 홍콩이다. 프랑스는 양성대조군을 2배수 반복실험하고 음성대조군은 단회 검사하도록 했고, 대조군과 검체를 동시에 검사하여 검사의 정확성을 높였다. 또한 양성대조군은 105, 104, 103 카피를 함께 검사하여 결과판독에서 상대정량이 가능하도록 했다. 미국은 양성 및 음성대조군을 검체 당 단회 검사를 허용하였다. 일본 역시 양성대조군과 음성대조군을 설정했는데, 양성대조군은 목표유전자 서열에 증폭하는 합성RNA를 사용했고, 음성대조군은 증류수를 사용했다. 홍콩은 양성대조군에 세포반수감염용량(tissue culture infective dose 50%, TCID50) 범위를 설정하여 바이러스 역가를 정량할 수 있게 했다.

3. 국가별 종합효소연쇄반응법(PCR) 증폭수

PCR 증폭수(싸이클, cycle) 수가 1회 증가할 수로 2n 증가하게 되는데[18], 대부분의 국가에서 PCR 증폭수를 40회로 설정한 반면, 독일과 태국은 PCR 증폭수를 45회, 프랑스는 50회로 설정하였다.

4. 검체대조군 설정(핵산 추출 대조군)

미국은 검체에서 RNA 추출률에 대한 대조군을 설정한 유일한 국가이다. 검체대조군은 베타-프로피올락톤(β -propiolactone)을 처리하여 바이러스의 감염력이 없는 사람세포를 사용했으며, 시약업체를 통해 공급받을 수 있도록 했다. 모든 검사실에 동일한 검체대조군을 사용할 수 없을 경우 대체법으로 폐암세포주(A549)나 자궁경부암세포주(Hela) 등의 사용을 허용하였다.

5. 국가별 SARS-CoV-2 검사 표준절차운영에 대한 특이사항

SARS-CoV-2 검출을 위한 실시간 RT-PCR 기반 유전자 증폭검사의 원리는 대부분 거의 동일했지만 국가별 표준절차운영에 대한 특이사항이 정리하면 다음과 같다. 첫째, 비준법 확립 시간을 단축하기 위해 인실리코(in-silico) 방법으로 실험 없이 분자모델링을 통해 결과를 예측하여 프라이머 및 프로브의 염기서열을 분석한 국가는 미국과 독일이다. 둘째, 일본은 염기서열분석을 통한 확진방법도 선정하였는데 가장 정확한 방법이라는 하나 검사비용이 높고 검사시간이 길어 실효성이 적다. 셋째 독일의 경우 독일 박쥐의 대변에서 바이러스 검출검사를 시행하였는데[18][19], 이는 박쥐에 의한 감염을 추적하기 위한 역학조사라기 보다 연구 목적이 크다고 볼 수 있다. 마지막으로, 미국의 SOP가 가장 명확하고 세세했으며, 모든 검사실에서 동일한 방법으로 검사할 수 있는 프로토콜을 확립하려고 노력했다. 또한 시약 및 검체 안전성에 대한 기준점을 마련하였다.

IV. 논의 및 결론

1. 국가마다 다른 목표 유전자 및 검사방법

RNA 바이러스의 특징상 cDNA 형태로 변환될 때 다양한 변종이 발생하게 되고, SARS-CoV-2의 경우 후성유전체도 다양하여 목표 유전자를 전략적으로 제작하지 않으면 위음성(질병이 있음에도 목표유전자 미스매칭으로 검출 불가)이 될 확률이 크다. 그러나 국가별 SARS-CoV-2에 대한 목표 유전자가 상이하며 각국의 검사방침에 따라 목표유전자가 임의 선정되었기 때문에 국가별 검사결과가 다르게 확진될 수 있다. 따라서 코로나-19 감염환자가 입국하는 나라마다 검사결과는 다를 수 있다. 더욱이 국가별 검사방법, 시약사용 기준, 검사결과 판독 기준이 다르기 때문에 동일한 목표 유전자를 증폭한다고 해도 검사 검사결과는 달라질 수 있다. 현재까지 범국가적으로 검사결과를 비교한 연구가 없었고, 바이러스가 단시간에 범유행하면서 국제적 규범 및 표준에 부합하는 국제의로 질관리가 전무하였다.

2. 각국의 검사법과 우리나라 진단검사 지침 비교

우리나라는 2020년 2월 21일 질병관리본부 감염병 분석센터와 대한진단검사의학회의 신종 코로나바이러스 대책위원회에서 SARS-CoV-2에 대한 검사실 진단 지침을 마련했다[21]. 검사는 선별검사와 확진검사로 나뉘지는데 WHO 지침 중 독일의 검사법과 유사하다. 목표유전자는 선별검사에서는 E유전자, 확진검사에서는 Orf1b유전자의 RdRp를 사용하였다. 우리나라의 경우 국가지침이 있더라도 검사실 자체제작 검사법이나 시약을 사용하는 경우가 있는데, 이 경우에는 급여가 적용되지 않는다(보건복지부 고시 제2020-31호). 여타 국가와 달리 한국은 긴급사용 승인 시약을 제한하였고, 승인된 시약에 대한 정보는 질병관리본부 홈페이지에 공시하였다. 또한, 감염병 예방 및 관리에 관한 법률 18조 4항과 '신종 코로나바이러스 감염증 민간의료기관 유전자 검사 관리' 용역사업에 근거하여 모든 검사 결과와 양성 검체는 질병관리본부 감염병 분석센터로 이송되어 자료 및 검체의 수집과 양성 및 음성 검체의 교차분석을 시행했다.

3. 결론 및 제언

본 종설에서는 2020년 전세계를 강타한 코로나-19의 원인인 SARS-CoV-2의 실시간 RT-PCR에서 목표 유전자 및 검사법, 판독 등을 비교하였다. 본 종설에서 제언할 사항은 아래와 같다.

첫째, 국제규격에 맞는 SARS-CoV-2 목표유전자 설정 및 표준운영절차가 필요하다. 뿐만 아니라 검사결과에 대한 질관리에 대한 기준도 마련되어야 한다. 둘째, 검체 수집부터 시약의 성능시험과 임상적 성능시험, 표준물질 및 검체보관 등에 대한 상세사항도 함께 기준점을 마련하여 관리할 필요가 있다. 셋째, SARS-CoV-2에 대한 인종별 발현차이 연구 등을 통해 코로나-19 대응 경험을 바탕으로 바이러스 정보 공유에 필요한 체계 구축이 필요하다.

참 고 문 헌

- [1] H. Lu, C. W. Stratton, and Y. W. Tang, "Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan China: the mystery and the miracle," *J Med Virol.*, Vol.92, No.4, pp.401-402, 2020.
- [2] D. S. Hui, E. I. Azhar, T. A. Madani, F. Ntoumi, R. Kock, and O. Dar, "The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - the latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China," *Int J Infect Dis.* Vol.91, pp.264-266, 2020.
- [3] A. Gorbalenya, Susan C. Baker, Ralph S. Baric, R. Raoul, C. Drosten, Anastasia A. Gulyaeva, L. Bart, C. Lauber, A. M. Leontovich, W. Benjamin, D. Penzar, S. Perlman, L. M. Leo, D. Samborskiy, A. Igor, I. Sola, and John Ziebuhr, "Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: the species and its viruses - a statement of the Coronavirus Study Group," *BioRxiv*, 937862, 2020.
- [4] J. F. W. Chan, S. Yuan, K. H. Kok, K. K. W. To, H. Chu, J. Yang, F. Xing, J. Liu, C. C. Y. Yip, R. W. S. Poon, H. W. Tsoi, S. K. F. Lo, K. H. Chan, V. K. M. Poon, W. M. Chan, J. D. Ip, J. P. Cai, V. C. C. Cheng, H. Chen, C. K. M. Hui, and K. Y. Yuen, "A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster," *Lancet*, Vol.395, pp.514-523, 2020.
- [5] R. Lu, X. Zhao, J. Li, P. Niu, B. Yang, and H. Wu, "Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding," *Lancet*, Vol.395, pp.565-574, 2020.
- [6] V. D. Menachery, R. L. Graham, and R. S. Baric, "Jumping species-a mechanism for coronavirus persistence and survival," *Curr. Opin. Virol.* Vol.23, pp.1-7, 2017.
- [7] M. A. Tortorici and D. Velesler, "Structural insights into coronavirus entry," *Adv. Virus Res.*, Vol.108, pp.93-116, 2019.
- [8] A. C. Walls, Y. J. Park, M. A. Tortorici, A. Wall, A. T. McGuire, and D. Velesler, "Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein," *Cell*, Vol.181, No.2, pp.281-292, 2020.
- [9] Q. Zeng, M. A. Langereis, A. L. van Vliet, E. G. Huizinga, and R. J. Groot, "Structure of coronavirus hemagglutinin-esterase offers insight into corona and influenza virus evolution," *Proc Natl Acad Sci.*, Vol.5, No.26, pp.9065-9069, 2008.
- [10] D. Kim, J. Y. Lee, J. S. Yang, J. W. Kim, V. N. Kim, and H. Chang, "The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome," *Cell*, Vol.181, No.4, pp.914-921, 2020.
- [11] M. M. Lai and S. A. Stohlman, "Comparative analysis of RNA genomes of mouse hepatitis viruses," *J. Virol.*, Vol.38, pp.661-670, 1981.
- [12] Y. Yogo, N. Hirano, S. Hino, H. Shibuta, and M. Matumoto, "Polyadenylate in the virion RNA of mouse hepatitis virus," *J. Biochem.*, Vol.82, pp.1103-1108, 1977.
- [13] WHO, *Assessment tool for laboratories implementing COVID-19 virus testing: Interim Guidance*, 2020.
- [14] V. M. Corman, O. Landt, M. Kaiser, R. Molenkamp, A. Meijer, D. K. Chu, and T. Bleicker, "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR," *Euro Surveill.* Vol.25, No.3, 2000045, 2020.
- [15] V. M. Corman, I. Eckerle, T. Bleicker, A. Zaki, O. Landt, M. Eschbach-Bludau, S. van Boheemen, R. Gopal, M. Ballhause, T. M. Bestebroer, D. Muth, M. A. Muller, J. F. Drexler, M. Zambon, A. D. Osterhaus, R. M. Fouchier, and C. Drosten, "Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction," *Euro Surveill.*, Vol.17, No.39, 20285, 2012.
- [16] C. Drosten, S. Gunther, W. Preiser, S. van der Werf, H. R. Brodt, and S. Becker, "Identification of a novel coronavirus in

patients with severe acute respiratory syndrome,” N Engl J Med., Vol.348, No.20, pp.1967-1976, 2003.

- [17] S. Broeders, I. Huber, L. Grohmann, G. Berben, I. Taverniers, and M. Mazzara, “Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods,” Trends Food Sci. Technol.. Vol.37, pp.115-126, 2014.
- [18] M. Burns and H. Valdivia, “Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR,” Eur. Food Res. Technol.. Vol.226, pp.1513-1524, 2008.
- [19] J. F. Drexler, F. Gloza-Rausch, J. Glende, V. M. Corman, D. Muth, M. Goettsche, A. Seebens, M. Niedrig, S. Pfefferle, S. Yordanov, L. Zhelyazkov, U. Hermanns, P. Vallo, A. Lukashev, M. A. Muller, H. Deng, G. Herrler, and C. Drosten, “Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences,” J Virol.. Vol.84, No.21, pp.11336-11349, 2010.
- [20] D. Muth, V. M. Corman, H. Roth, T. Binger, R. Dijkman, and L. T. Gottula, “Attenuation of replication by a 29 nucleotide deletion in SARS-coronavirus acquired during the early stages of human-to-human transmission,” Sci Rep.. Vol.8, No.1, 15177, 2018.
- [21] 질병관리본부 감염병분석센터, *코로나바이러스감염증-19 검사실 진단 지침*, 2020.02.21.

저자 소개

김진희(Jin-Hee Kim)

종신회원



- 2010년 8월 : 서울대학교 의과대학(의학석사)
- 2013년 8월 : 서울대학교 의과대학(의학박사)
- 2015년 2월 : 서울대학교 의과대학 선임연구원
- 2015년 3월 ~ 현재 : 청주대학교

보건의료대학 조교수

〈관심분야〉 : 보건의료교육, 동반진단제, 중앙학, 줄기세포, 분자진단