



# 신종 감염병 원인병원체 규명을 위한 PCR 기반 검사법 소개

안유정 , 정채원 , 이지은 , 김은진\*

질병관리청 진단분석국 신종병원체분석과

## 초 록

**목적:** 병원체의 지속적인 유전적 변이는 새로운 병원체로 인한 신종 감염병 발생 가능성을 높이며, 이에 따라 범용적 탐지가 가능한 진단 기술 개발의 필요성이 강조되고 있다. 본 논문에서는 신종 혹은 원인불명 감염병의 원인병원체를 규명하기 위한 pan-polymerase chain reaction (pan-PCR) 검사법과 multiplex PCR 검사법을 소개하고자 한다.

**방법:** 병원체 진단을 위한 pan-PCR 및 multiplex PCR 검사법의 연구·개발 및 실제 적용 사례를 소개하기 위하여 코로나바이러스감염증-19 팬데믹 이후 발간된 공중보건 및 PCR 기반 진단법 관련 최신 국내외 기관 보고서와 학술자료를 중심으로 종합적으로 살펴보았다.

**결과:** 두 기술은 신종 및 원인불명 감염병 사례에 효과적으로 대응할 수 있는 핵심 진단법으로 평가된다. Pan-PCR은 공통 유전자 보존 영역을 활용하여 미지 병원체의 초기 선별에, multiplex PCR은 다양한 병원체를 동시에 분별 및 진단할 수 있는 기술이며, 신종 감염병 원인병원체 규명에 상호보완적으로 활용될 수 있다.

**결론:** Pan-PCR과 multiplex PCR은 미래 감염병 위협에 선제적으로 대응하기 위한 PCR 기반의 핵심 진단 플랫폼이다. 두 기술은 각각 범용성과 특이성 방면의 강점을 살려 병행 활용함으로써, 신종 혹은 원인불명 감염병 진단 역량과 공중보건 감시 체계 강화에 기여할 수 있을 것이다.

**주요 검색어:** 신종 감염병; 병원체; 진단법 구축; PCR

## 서 론

코로나바이러스감염증-19(코로나19) 팬데믹을 계기로 새로운 병원체의 출현을 조기탐지할 수 있는 병원체 감시의 중요성과 유전자 진단 기술 고도화의 필요성이 한층 부각되었다[1,2]. 세계보건기구(World Health Organization, WHO)

와 감염병혁신연합(Coalition for Epidemic Preparedness Innovations) 등 주요 국제 공중보건 기구는 향후 출현 가능한 신종 병원체인 'Pathogen X' 대응 전략의 핵심 요소로 범용적 병원체 진단법의 개발 및 도입을 강조하고 있다[3]. 또한 WHO는 감염병의 팬데믹 잠재성과 치료법 개발 가능성 등을 고려하여 연구개발 우선순위를 설정하고 병원체 목록을 발

Received October 2, 2025 Revised October 23, 2025 Accepted October 24, 2025

\*Corresponding author: 김은진, Tel: +82-43-719-8140, E-mail: ekim@korea.kr

Copyright © Korea Disease Control and Prevention Agency



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits unrestricted distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



**핵심 요약**

① 이전에 알려진 내용은?

기존 병원체 진단은 알려진 병원체에는 높은 정확도를 보였지만, 변이 바이러스나 새로운 병원체 진단에는 한계가 있었다. 특히 공중보건 현장에서는 신속함과 범용성을 갖춘 진단법 개발 필요성이 꾸준히 제기되어 왔다.

② 새로이 알게 된 내용은?

Pan-polymerase chain reaction (pan-PCR) 검사법은 미지의 병원체에 대한 신속한 초기 스크리닝에, multiplex PCR 검사법은 다중 감염에 대한 동시 감염 진단에 특화된 장점을 통해 신종 병원체 진단 최전선에서 필수적인 핵심 진단 플랫폼으로서의 역할을 수행할 수 있다.

③ 시사점은?

향후 검사법 표준화 및 상시 운영 체계 구축을 통해 pan-PCR과 multiplex PCR을 고도화함으로써 공중보건 현장의 진단 역량을 강화한다. 이를 통해 국내 감염병 대응 체계의 안전성과 신뢰성을 높이며, 나아가 신종 감염병에 대한 선제 대응 능력을 크게 향상시킬 수 있을 것이다.

표하였으며, 이들의 출현여부를 탐지하기 위한 감시와 병원체 검사 기술, 백신과 치료제의 선제적 개발 등을 권고하고 있다 [4]. 국내에서도 질병관리청이 신종감염병증후군을 제1급 감염병으로 지정 및 관리하고 있어, 향후 기존 진단 시약으로 검출할 수 없는 새로운 병원체를 대상으로 한 진단법 개발과 검증의 필요성이 더욱 강조되고 있다.

이러한 배경 속에서 다양한 진단 기술 중 신속성과 범용성을 동시에 충족 가능한 방법의 개발이 중요한 과제로 대두되

고 있다. Next-generation sequencing (NGS) 검사법은 병원체의 유전체 정보를 포괄적으로 파악할 수 있어 진단과 연구에 큰 역할을 하지만, 높은 비용과 분석 시간 및 장비 요구도로 인해 현장 진단이나 대규모 검사에는 제한적이다[5]. 반면 polymerase chain reaction (PCR) 기반 검사법(표 1)은 빠른 결과 도출, 높은 민감도와 특이도, 장비 접근성 및 비용 효율성을 갖추고 있어 여전히 임상과 현장에서 핵심적인 진단 도구로 활용되고 있다. 특히 pan-PCR과 multiplex PCR은 각각 범용성과 다중성을 특징으로 하여, 감염병 조기 대응 및 대규모 감시체계 구축에 적합한 기술로 주목받고 있다[6,7].

Pan-PCR은 특정 과(family) 또는 속(genus) 내 보존 서열을 표적으로 하여 여러 아형과 변이, 재조합체뿐 아니라 아직 알려지지 않은 신종 및 변종 병원체까지 탐지할 수 있는 범용성을 지닌다[8]. 이는 아형 변화나 재조합, 변이 등 병원체의 다양성이 크거나 특히 아직 알려지지 않은 신종 및 변종, ‘Pathogen X’와 같은 미지의 병원체를 조기에 발견하는 데 강점이 있으며, 변이나 재조합에 따른 신종 및 변종 감염병의 조기 탐지에 효과적인 진단 도구로 활용될 수 있다. 실제로 신종 감염병인 코로나19로 인한 팬데믹 시 pan-PCR을 이용함으로써 단일 병원체 진단법의 한계를 보완하였고, 이와 더불어 범용 진단기술의 활용성과 필요성이 더욱 중요해졌다.

Multiplex PCR은 여러 특이적 프라이머 세트를 이용하여 다양한 병원체를 동시에 분별 및 진단이 가능한 기술로, 구체적이고 신속한 감별 진단에 효과적이다. 최근에는 단일 병원체에 국한되지 않고 복합 감염 사례가 증가하는 추세이며[9],

**표 1. PCR 기반 검사법 간 특징 비교**

구분	Conventional PCR	Pan-PCR	Multiplex PCR
대상 병원체 범위	단일 병원체 검출	동일 계통 내 다양한 병원체 동시 검출	여러 개별 병원체의 특정 유전자 동시 검출
프라이머 설계 기준	단일 병원체 특이적 프라이머	동일 계통 내 보존된 공통 유전자 영역 프라이머	각 병원체 별 특이적 프라이머
증폭 방식	단일 타겟 증폭	공통 영역 증폭	다중 타겟 증폭
활용 목적	단일 병원체 감염 진단	원인불명 병원체 조기 발견 및 스크리닝	다중 병원체 동시 감염 진단

PCR=polymerase chain reaction.

특히 호흡기 감염병은 병원체 간 상호작용과 빠른 변이 속도로 인해 기존 단일 진단법만으로는 한계가 존재한다. 이러한 상황에서 multiplex PCR은 복합 감염의 동시 진단과 감시 체계 강화에 기여하며, PCR 기반 다중 진단법 가운데 가장 널리 사용되는 플랫폼으로 자리매김하고 있다.

본 논문은 신종 감염병 대응을 위한 분자 진단 플랫폼으로서 pan-PCR과 multiplex PCR 기술의 전략적 가치와 현황을 분석하는 데 중점을 두었다. 이들 기술은 광범위한 병원체에 적용 가능하나, 본 리뷰에서는 변이가 적은 세균 또는 진균보다는 변이가 잦고 신종 출현 가능성이 높은 바이러스 병원체를 중심으로 기술하였다. Multiplex PCR의 적용 사례는 임상적 유용성이 입증된 대표적인 상용 패널을 중심으로 살펴보았다. 결과적으로, 신종 및 변종 병원체 출현과 복합 감염 증가라는 감염병 환경 변화 속에서 이들 PCR 기술은 기존 단일 진단법의 한계를 보완하고 조기 발견과 대응을 가능하게 하는 핵심 플랫폼으로 그 중요성이 커지고 있다. 본 논문은 pan-PCR과 multiplex PCR을 중심으로 국내외 진단 기술 개발 동향을 고찰하고, 각 기술의 역할, 한계, 향후 발전 방향을 제시함으로써 코로나19와 같은 신종 감염병 발생에 대비하여 효과적이고 선제 대응 체계 마련에 기여하고자 한다.

## 방 법

본 논문은 pan-PCR과 multiplex PCR 검사법의 국내외 연구 동향 및 구축 현황을 조사하기 위하여 PCR 기반 진단법 학술 문헌 내에 기술된 pan-PCR 및 multiplex PCR을 이용한 병원체별 검사법 현황을 참고하였다. 또한, 질병관리청, WHO, 미국질병통제예방센터(Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 등 국내외 공중보건 기관에서 발행한 팬데믹 대응 관련 보고서 및 실제 진단 사례를 참고하여 리뷰하였으며 이를 통해 나아가야 할 방향과 전망을 제시하였다.

## 본 론

### 1. Pan-PCR 검사법 소개

#### 1) Pan-PCR 검사법의 기술적 원리 및 한계

Pan-PCR은 동일 계통의 병원체 간 보존된 유전자 서열을 기반으로 진단용 프라이머를 설계하는 기술이다. 먼저 대상 병원체군의 유전체 데이터를 수집하여 다중 서열 정렬을 수행한 뒤, 이 중 높은 보존도를 가지는 유전자 영역을 식별한다. 이후 보존 서열 내에서 특이성과 증폭 효율을 고려한 프라이머 세트를 설계하며, 설계된 프라이머는 변이나 아형 수준의 차이가 존재하는 병원체를 포함한 증폭을 가능하게 한다. Pan-PCR은 원인불명 병원체의 조기 탐지 및 계통 확인에 유용함에도 불구하고, 명확한 병원체 종 규명에는 증폭 산물에 대한 시퀀싱과 같은 후속 분석 과정이 필요하다. 이는 진단에 필요한 총 소요 시간을 증가시키고 NGS 연계 비용을 유발할 수 있어 임상 현장 적용에는 제약 요인이 될 수 있다[10]. 또한 기존 세균성 병원체 진단은 16S ribosomal RNA와 같은 보존 유전자를 표적으로 활용해 광범위한 검출이 가능하나, 바이러스의 경우 유전체 다양성과 빠른 변이 속도, 공통 유전자 부재 등으로 인해 범용 진단이 어렵다는 한계가 존재한다. 이에 따라 pan-PCR은 동일한 병원체 과 중심의 검출 전략으로 개발되었으며, 전 세계 주요 보건 기관들이 이 기술을 감염병 감시와 대응 체계에 적극 도입하고 있다.

#### 2) Pan-PCR 검사법 적용

##### (1) 코로나바이러스

벨기에 루뱅 대학교의 의학연구소에서 연구된 pan-coronavirus PCR 검사법은 RNA-dependant RNA polymerase (RdRp) 유전자 내 고보존 영역을 표적으로 하여 여러 유전적 변이를 포함한 다양한 코로나바이러스 계열을 포괄적으로 탐지할 수 있는 것이 특징이다. 실제로, 본 기술은 사스, 메르스 및 기타 다양한 코로나바이러스에 대해 모두 높은 검출률을 보이며, 병

원체 유전자 변이에 영향이 적은 것으로 보고되었다[11].

(2) 파라믹소비리대, 뉴모비리대

네덜란드 로테르담 의료센터에서 연구된 pan-paramyxoviridae PCR 검사법은 파라믹소비리대(*paramyxoviridae*)와 뉴모비리대(*pneumoviridae*)에 속하는 바이러스의 RdRp 유전자 내 보존 영역을 표적으로 하는 단일 프라이머 세트를 사용하여 동시에 검출할 수 있어 높은 범용성을 가진다. 실제로 해당 기법은 야생 조류 샘플에서도 활용되어 avian metapneumovirus를 포함한 다양한 병원체를 탐지하는 데 성공하였다[12].

(3) 필로비리대

Pan-Filoviridae PCR 검사법은 주로 에볼라바이러스와 마버그바이러스를 포함한 포유류 감염 필로바이러스를 광범위하게 검출할 수 있다. 남아프리카 공화국 국립감염병연구소에서 개발한 SYBR Green 기반 quantitative real-time PCR (qPCR) 방식과 미국 워싱턴 대학교의 의과대학에서 개발된 high-throughput real-time PCR (RT-PCR) 시스템이 각각 적용되어 실시간 감시뿐 아니라 대규모, 저농도 샘플 처리에도 효율적으로 대응할 수 있는 것이 장점으로 평가된다. 실제로 야생 박쥐를 대상으로 한 연구에서 이 검사법은 잠재적 병원체를 조기에 탐지하는 데 활용되었으며, 안정적인 성능을 입

증하였다. 특히, 에볼라 및 마버그와 같은 고위험 바이러스의 지역사회 확산 방지를 위한 선제적 공중보건 대응 수단으로 그 중요성이 부각되고 있다[13,14].

(4) 기타 family, genus

노르웨이 국립보건원에서는 위장관 감염을 통한 유행을 일으키는 노로바이러스(*norovirus*)와 사포바이러스(*sapovirus*)를 포함한 주요 인체 감염 캘리시바이러스를 포괄적으로 탐지할 수 있는 검사법을 개발하였으며 본 연구에서는 해당 방법이 기존의 진단법 대비 신속성과 정확성 면에서 우수함을 보고하였다[15].

독일 베를린 생물안전센터에서는 플라비비리대의 유전정보 중 고도로 보존된 NS5 유전자 영역을 표적으로 하여 황열, 뎅기, 지카 바이러스 등 여러 플라비바이러스 병원체를 포괄적으로 탐지할 수 있으며, 특히 두 가지 바이러스가 동시에 유행하는 지역에서 효과적인 감시 도구로 활용될 수 있는 검사법을 개발하였다(표 2) [11-16].

3) Pan-PCR 기술의 국내외 활용 동향

Pan-PCR은 다양한 바이러스 병원체를 동시에 검출할 수 있는 고도화된 분자진단 기술로 최근 원인불명 감염병의 조기 탐지 및 대응 역량을 강화하기 위한 핵심 전략으로 부각되고

표 2. 병원체 family 별 Pan-PCR 검사법 적용 사례

병원체 family	국가 및 연구 기관	표적 유전자	주요 특징 및 역할	참고문헌
코로나비리대	벨기에 루뱅 대학교	RdRp	여러 유전적 변이를 포함한 다양한 코로나바이러스 계열 포괄 탐지, 유전자 변이에 영향이 적음	[11]
파라믹소비리대 & 뉴모비리대	네덜란드 로테르담 의료센터	RdRp	파라믹소비리대 및 뉴모비리대 동시 검출, 야생 조류 감시 등 높은 범용성	[12]
필로비리대	남아공 국립감염병연구소, 미국 워싱턴 대학교	Nucleoprotein	에볼라 및 마버그 등 고위험 필로바이러스 광범위 검출, 대규모/저농도 샘플 처리 효율적 대응	[13,14]
캘리시비리대	노르웨이 국립보건원	RdRp	노로바이러스, 사포바이러스 등 주요 인체 감염 캘리시바이러스를 포괄 탐지	[15]
플라비비리대	독일 베를린 생물안전센터	Non-structural protein	황열, 뎅기열, 지카 등 여러 플라비바이러스 포괄 탐지, 동시 유행 지역 감시 도구 활용	[16]

PCR=polymerase chain reaction; RdRp=RNA-dependent RNA polymerase.

있다.

질병관리청 또한 ‘Pathogen X’ 대응 전략의 일환으로 국내 유입 가능성이 높은 13개의 바이러스 family를 중심으로 pan-PCR 검사법의 표준화 및 시범 구축을 추진하고 있다. 선정 기준은 해외 주요 공중보건 기관의 주목도, 감염 시 공중보건상 피해가 클 가능성이 높은 호흡기 전파성, 인수공통감염의 위험성, 국내 유입 및 발생 가능성 등 네 가지 항목을 기반으로 하였으며, 이를 통해 국내 감염병 대응 체계의 고도화에 기여할 수 있을 것이다. WHO는 다수의 출혈열 원인불명 병원체를 동시에 검출할 수 있는 pan-Filovirus PCR 검사법을 추진하고 있다. 실험실 기반 감시 체계의 구축뿐만 아니라 의료 인력의 역량 강화, 격리 시설 설치 등 종합적이고 지속 가능한 방역 대응 체계 마련을 위한 지원을 확대하고 있다[17].

또한, 인플루엔자 A형 바이러스의 공통 유전자인 matrix gene을 표적으로 하는 범용 RT-PCR 프로토콜을 제공하며, H5, H7 등 고병원성 조류인플루엔자 바이러스를 포함한 인플루엔자 A형의 조기 탐지 및 감시를 지원하고 있다[18]. 이는 인수공통감염병의 잠재적 위험성에 선제적으로 대응하기 위한 필수적인 검사 전략 중 하나이다. CDC 역시 pan-enterovirus, pan-parechovirus PCR 및 시퀀싱 분석을 통한 검출을 수행하여 감염병 대응 역량을 강화하고 있다[19].

## 2. Multiplex PCR 검사법 소개

### 1) Multiplex PCR 기술적 원리 및 한계

최근에는 다중 유전자 진단을 위해 인실리코 분석을 이용한 프라이머 설계 및 dimer (불필요한 프라이머 상호 결합) 평가, 최적화 방법들이 연구되고 있다. 2022년 *Nature Communications* 논문에서 제안된 Simulated Annealing Design using Dimer Likelihood Estimation 방법은 multiplex PCR 프라이머 세트를 설계할 때 프라이머 간의 dimer 형성을 최소화하기 위한 알고리즘적 접근을 중심으로 하여 앰플리콘 증폭의 타깃 효율성과 균등성 또한 최적화한다. 이 방법은 qPCR 패널 설계 및 Sanger sequencing과 연계하는 응용에서도 활용 가능하다고 발표되었다[20]. 그러나 multiplex PCR 검사법은 바이러스의 지속적인 변이로 인해 검사 민감도가 감소할 수 있다는 한계가 있다. 이는 다수의 프라이머 세트 간 상호 결합으로 인한 증폭 효율 영향과 더불어, 프라이머 부위에서 발생하는 단일 염기 변이가 검사법의 민감도를 급격히 저하시킬 수 있기 때문이다[21].

### 2) Multiplex PCR 검사법 적용

Multiplex PCR 기술은 전 세계적으로 감염병 조기진단 및 다중 병원체 동시 검출을 위한 핵심 수단으로 주목받고 있으며, 다양한 국가에서 연구개발 및 상용화가 활발히 이루어지고 있

표 3. 국가별 multiplex PCR 검사법 적용 사례

국가	적용 사례	대상 병원체	특징
독일	FTD Respiratory Pathogens Assay	인플루엔자 A/B, 파라인플루엔자, 아데노바이러스, 코로나바이러스 등 총 16종	다중 튜브 형식으로 16종 호흡기 바이러스 동시 검출
미국	FilmArray Respiratory	총 22종 호흡기 병원체/바이러스 8종, 세균 18종, 항생제 내성 유전자 7종	BioFire Diagnostics사의 FilmArray Respiratory Panel로 대만, 일본 등 세계적으로 사용
중국	다중 RT-PCR+MassARRAY	바이러스 및 세균 포함 총 27종	RT-PCR 후 MassARRAY로 증폭 산물 정량 분석, 복합 감염 진단 가능
한국	PowerChek SARS-CoV-2, Influenza A & B multiplex real-time PCR Kit	SARS-CoV-2 및 인플루엔자 A & B	국제 표준 대비 동등한 성능(>97% 일치율)으로 국내 진단 역량 강화

PCR=polymerase chain reaction; FTD=fast track diagnostics; RT-PCR=real-time PCR; SARS-CoV-2=severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

다. 특히 각국은 공공 감시 체계와 임상 현장에서 이 기술을 적용하여 감염병 대응의 속도와 정확성을 높이고 있다(표 3).

독일에서는 호흡기 감염병 감시에 Fast Track Diagnostics Respiratory Pathogens Assay가 상용화되어 활용되고 있다. 이 검사법은 인플루엔자 A/B, 파라인플루엔자 바이러스, 아데노 바이러스, 코로나바이러스(NL63, OC43 등)를 포함한 총 16종의 호흡기 바이러스를 다중 튜브 형식으로 검출할 수 있도록 설계되었다[22]. 미국 BioFire Diagnostics사에서 개발 및 상용화한 FilmArray Respiratory Panel은 바이러스 및 세균을 포함한 총 22개의 호흡기 병원체 동시 검출이 가능하며, 이는 대만 및 일본의 임상 현장 및 감시 체계에서 활용되고 있다[23]. 대만의 질병통제예방센터에서는 FilmArray Respiratory Panel 기반의 multiplex PCR 검사와 기존에 사용되던 conventional PCR을 동시 수행하여 비교 분석하였다. 결론적으로, multiplex PCR이 기존 검사법보다 훨씬 높은 양성률을 보였으며 다중 병원체 복합 감염 사례를 효과적으로 식별하여 호흡기 병원체의 감시 및 임상 진단에 활용될 수 있음을 입증하였다[24]. 일본에서는 나가사키 대학병원에서 급성 호흡기 감염 환자를 대상으로 FilmArray Respiratory Panel을 이용한 진단검사를 시행하였다. 이를 통해 인플루엔자 바이러스를 포함한 총 17종의 바이러스와 3종의 세균 병원체를 높은 특이도와 민감도로 검출할 수 있음을 확인하였다[25]. 또한, 폐렴 진단에 특화된 FilmArray Pneumonia Panel은 하기도 검체에서 바이러스 8종, 세균 18종, 항생제 내성 유전자 7종을 약 1시간 만에 동시 검출할 수 있다. 특히, 폐렴 원인균 중 임상적으로 중요한 15종의 세균에 대해 정량적 결과를 제공하며, 세균과 바이러스의 복합 감염을 신속하게 진단하고 치료 방향의 핵심적인 근거로 활용되었다[26]. 중국에서는 보다 광범위한 범위의 병원체 동시 검출을 위해 다중 RT-PCR과 질량분석기 기반 기술인 MassARRAY를 결합한 진단법이 개발되었다. 해당 기술은 바이러스와 세균을 포함한 총 27종의 호흡기 병원체를 단일 패널에서 검출할 수 있도록 설계되었으며, 이

방법은 중국 내 지역 보건소 및 병원에서 기존 PCR 기반 진단법 대비 높은 민감도와 특이도로 여러 병원체의 복합적 감염 시에도 다중 감염 진단이 가능하다[27]. 국내에서는 코로나19 팬데믹 이후 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)와 인플루엔자 바이러스 A/B를 동시에 검출하는 multiplex RT-PCR 진단 시약이 성공적으로 개발 및 상용화된 바 있다. 해당 검사법의 성능을 BioFire Respiratory Panel과 비교 평가한 연구 결과, 97% 이상의 높은 일치율을 보이며 동등한 성능을 입증하였다[28].

### 3) Multiplex PCR 기술의 국내외 활용 동향

국내의 원인불명 감염병을 진단하기 위한 multiplex PCR이 감염병 대응 역량을 강화하는 데 활용되고 있다. 특히 WHO, CDC 등은 이러한 기술을 공중보건 감시 및 진단에 적극 도입하고 있다.

질병관리청은 원인불명 감염병에 대한 선제적 실험실 대응 역량 확보를 위해 5개의 증후군(호흡기, 출혈열, 발진, 신경, 설사) 기반 다중검사를 수행하기 위한 패널을 개발 중에 있다. 국내 가금류에서 다빈도로 발생하는 4종(H5N1, H5N6, H5N8, H9N2)의 신속한 선별과 아형 감별을 단일 반응으로 동시에 수행할 수 있도록 기술을 설계하여 국내 감시 및 초기 방역 대응 역량을 강화하고 있다[29]. 또한, 특이적인 프라이머와 프로브를 사용하여 신종 인플루엔자(Influenza A(H1N1)pdm09 virus) 및 계절성 인플루엔자 5종을 단일 반응에서 동시에 검출 가능한 진단법을 개발하였다[30].

이러한 다각적인 진단 기술 개발 및 선제적 확보 노력은 미래 감염병의 잠재적 위험성에 선제적으로 대응하기 위한 핵심적인 전략이다. WHO는 다중 병원체의 동시 검출을 위한 진단법 개발을 적극 권장하며, 특히 호흡기 바이러스의 조기 진단 및 감시를 위해 인플루엔자 바이러스와 SARS-CoV-2를 동시 검출 가능한 multiplex RT-PCR 프로토콜을 제공하고 있다[31]. CDC는 Flu SC2 Multiplex Assay를 개발하여 상기도

및 하기도 검체에서 높은 정확도로 인플루엔자 A/B와 SARS-CoV-2를 동시에 검출할 수 있는 진단법을 제공하고 있다 [32].

## 결론

본 논문은 신종 감염병 대응을 위한 분자 진단 플랫폼인 pan-PCR과 multiplex PCR 기술을 중심으로 그 전략적 가치와 현황을 분석하였다. 이들 기술은 변이 및 신종 출현 가능성이 높은 바이러스 병원체를 증점으로 유용성이 입증된 대표적인 상용 패널의 연구·개발 및 실제 적용 사례를 중심으로 리뷰하였다.

Pan-PCR은 유전자 보존 영역을 표적으로 하여 미지 및 신종 병원체에 대한 범용적 탐지 도구로서 역할을 수행하지만, 세부 종 규명을 위해서는 후속 분석이 필수적이라는 한계를 가진다. 또한, multiplex PCR은 인실리코 분석을 통한 최적화 등 기술적 고도화를 통해 다수 병원체의 동시 감별 및 복합 감염 진단에 탁월한 효율을 보이며, 국내에서 SARS-CoV-2 동시 진단 등 임상적 유용성을 성공적으로 입증하였다. 이들 기술은 최종적으로 NGS 기반의 유전체 분석과 연계하여 선별-확인-특성 분석으로 이어지는 효율적인 진단 흐름을 구축할 수 있으며, 이 두 기술은 미래 감염병 위협에 대한 신속성, 범용성, 특이성 요구를 동시에 충족시키기 위한 구체적인 기술적 진화 방향을 제시한다. Pan-PCR은 단순한 양성/음성 검출을 넘어, 증폭 산물을 곧바로 유전체 분석과 연계하는 방향으로 발전해야 한다. 보존 유전자 영역 기반의 증폭 정보를 신속하게 NGS 또는 Sanger sequencing과 연동하여 현장에서 'Pathogen X'의 계통을 빠르게 규명하는 시스템을 구축하는 것이 기술적 목표가 되어야 한다. 다수 병원체 동시 진단에 가장 널리 활용되는 multiplex PCR은 프라이머 디자인의 신뢰성을 높이는 것이 관건이다. 인실리코 최적화 알고리즘을 활용하여 프라이머 간 불필요한 상호 결합을 최소화하고, 높

은 민감도와 특이도를 유지하면서도 진단가능한 병원체 패널을 국내 유행 및 유입 우선순위에 맞춰 확장해야 한다.

이와 같이 WHO, CDC 등 해외 공중 보건 기관에서 Pan-PCR 및 multiplex PCR 검사법을 기반으로 감염병 대응 관련 역량을 강화하는 것은 이들 기술이 미지 병원체의 초기 탐지 및 감염병 감시에 있어 공중보건 전략상 핵심적인 역할을 수행할 것으로 국제사회가 기대하고 있음을 시사한다. 이와 더불어 질병관리청에서도 미래 감염병 위협에 선제적으로 대응하고 국내 감시 역량을 고도화하기 위해 pan-PCR과 multiplex PCR 기술을 핵심적인 진단 수단으로 주목하고 있다. 2023년부터 'Pathogen X' 대응 전략의 일환으로 국내 유입 및 팬데믹 위험도가 높은 13개 바이러스 family를 우선 선정하여 pan-PCR 검사법 구축을 진행하고 있으며, 이와 동시에 multiplex PCR 검사법을 이용한 증상 기반 다중 검사용 패널을 개발하고 있다. Pan-PCR은 신종 또는 미지의 병원체 탐지와 국내 유입 위험군에 대한 1차 선별 상황에서 포괄성과 신속성을 제공하며, multiplex PCR은 다수 병원체의 동시 감별 진단과 복합 감염의 신속한 규명 등 특이성과 효율성이 요구되는 임상 상황에서 사용된다. 궁극적으로 질병관리청은 이



그림 1. 신종 감염병 및 원인불명 병원체 대상 검사 시스템  
PCR=polymerase chain reaction; NGS=next-generation sequencing.

러한 두 기술의 유연한 연계 및 상호보완적 활용을 통해 진단 대응의 효율성을 극대화하고(그림 1), 신속한 환자 관리 및 효과적인 공중보건 대응을 가능하게 하는 진단 체계를 구축하는 것을 목표로 한다. 이러한 pan-PCR과 multiplex PCR 기반을 통한 분자 진단 기술의 고도화는 향후 발생할 수 있는 다음 팬데믹 상황에서 공중보건 진단 대응의 핵심적인 기능을 수행할 것으로 기대된다.

## Declarations

**Ethics Statement:** Not applicable.

**Funding Source:** None.

**Acknowledgments:** None.

**Conflict of Interest:** The authors have no conflicts of interest to declare.

**Author Contributions:** Conceptualization: YJA, CWJ. Data curation: YJA. Formal analysis: YJA. Investigation: YJA, CWJ, JER, EJK. Methodology: YJA. Project administration: JER, EJK. Resources: YJA, CWJ, JER, EJK. Supervision: JER, EJK. Validation: JER, EJK. Visualization: YJA, CWJ. Writing – original draft: YJA, CWJ. Writing – review & editing: JER, EJK.

## References

1. Akande OW, Carter LL, Abubakar A, et al. Strengthening pathogen genomic surveillance for health emergencies: insights from the World Health Organization's regional initiatives. *Front Public Health* 2023;11:1146730.
2. Al-Mandhari A, Barakat A, Abubakar A, Brennan R. Genomic sequencing for epidemic and pandemic preparedness and response: EMRO's vision and strategic interventions. *East Mediterr Health J* 2022;28:851-2.
3. World Health Organization (WHO), Coalition for Epidemic Preparedness Innovations (CEPI). CEPI and WHO urge broader research strategy for countries to prepare for the next pandemic [Internet]. WHO; 2024 [cited 2025 Sep 10]. Available from: <https://www.who.int/news/item/01-08-2024-cepi-and-who-urge-broader-research-strategy-for-countries-to-prepare-for-the-next-pandemic>
4. World Health Organization (WHO). Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts [Internet]. WHO; n.d. [cited 2025 Sep 10]. Available from: <https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts>
5. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 2016;17:333-51.
6. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002;30:1292-305.
7. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:559-70.
8. Millar D, Melki J. Diagnosis of viral families using a nucleic acid simplification technique. In: Sperança MA, editor. *Dengue fever in a one health perspective - latest research and recent advances*. IntechOpen; 2023. p. 111-138.
9. Kim D, Quinn J, Pinsky B, Shah NH, Brown I. Rates of co-infection between SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens. *JAMA* 2020;323:2085-6.
10. Fuchs J, Kleine J, Schemmerer M, et al. varVAMP: degenerate primer design for tiled full genome sequencing and qPCR. *Nat Commun* 2025;16:5067.
11. Vijgen L, Moës E, Keyaerts E, Li S, Van Ranst M. A pan-coronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses. *Methods Mol Biol* 2008;454:3-12.
12. van Boheemen S, Bestebroer TM, Verhagen JH, et al. A family-wide RT-PCR assay for detection of *paramyxoviruses* and application to a large-scale surveillance study. *PLoS One* 2012;7:e34961.
13. Coertse J, Mortlock M, Grobbelaar A, Moolla N, Markotter W, Weyer J. Development of a pan-*Filoviridae* SYBR Green qPCR assay for biosurveillance studies in bats. *Viruses* 2023;15:987.
14. Cui N, Perez YL, Hume AJ, et al. A high-throughput, polymerase-targeted RT-PCR for broad detection of mammalian filoviruses. *Microbiol Spectr* 2024;12:e0101024.
15. Stene-Johansen K, Grinde B. Sensitive detection of human *Caliciviridae* by RT-PCR. *J Med Virol* 1996;50:207-13.
16. Patel P, Landt O, Kaiser M, et al. Development of one-step

- quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of *flaviviruses*. *Virology* 2013;10:58.
17. World Health Organization (WHO). Disease outbreak news: 2014 - Guinea [Internet]. WHO; 2014 [cited 2025 Sep 10]. Available from: [https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2014\\_04\\_05 Ebola-en](https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2014_04_05 Ebola-en)
  18. World Health Organization (WHO). WHO information for molecular diagnosis of influenza virus [Internet]. WHO; 2024 [cited 2025 Sep 10]. Available from: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/molecular-detection-of-influenza-viruses/protocols\\_influenza\\_virus\\_detection\\_2024.pdf?sfvrsn=df7d268a\\_8](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/molecular-detection-of-influenza-viruses/protocols_influenza_virus_detection_2024.pdf?sfvrsn=df7d268a_8)
  19. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Laboratory testing for non-polio enterovirus [Internet]. CDC; 2024 [cited 2025 Sep 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/php/laboratories/index.html>
  20. Xie NG, Wang MX, Song P, et al. Designing highly multiplex PCR primer sets with Simulated Annealing Design using Dimer Likelihood Estimation (SADDLE). *Nat Commun* 2022;13:1881.
  21. Beck AS, Lopareva EN, Hwang H, et al. Evaluation of the sensitivity of a measles diagnostic real-time RT-PCR assay incorporating recently observed priming mismatch variants, 2024. *Euro Surveill* 2024;29:2400410.
  22. Bierbaum S, Forster J, Berner R, et al.; CAPNETZ study group. Detection of respiratory viruses using a multiplex real-time PCR assay in Germany, 2009/10. *Arch Virol* 2014;159:669-76.
  23. Leber AL, Everhart K, Daly JA, et al. Multicenter evaluation of BioFire FilmArray Respiratory Panel 2 for detection of viruses and bacteria in nasopharyngeal swab samples. *J Clin Microbiol* 2018;56:e01945-17.
  24. Chiu SC, Lin YC, Wang HC, et al. Surveillance of upper respiratory infections using a new multiplex PCR assay compared to conventional methods during the influenza season in Taiwan. *Int J Infect Dis* 2017;61:97-102.
  25. Kaku N, Hashiguchi K, Iwanaga Y, et al. Evaluation of FilmArray Respiratory Panel multiplex polymerase chain reaction assay for detection of pathogens in adult outpatients with acute respiratory tract infection. *J Infect Chemother* 2018;24:734-8.
  26. Murphy CN, Fowler R, Balada-Llasat JM, et al. Multi-center evaluation of the BioFire FilmArray Pneumonia/Pneumonia Plus Panel for detection and quantification of agents of lower respiratory tract infection. *J Clin Microbiol* 2020;58:e00128-20.
  27. Zhao H, Yang Y, Lyu J, Ren X, Cheng W. Development and application of a method to detect 27 respiratory pathogens using multiplex RT-PCR combined with MassARRAY technology. *BMC Infect Dis* 2021;21:870.
  28. Kim TY, Kim JY, Shim HJ, et al. Performance evaluation of the PowerChek SARS-CoV-2, influenza A & B multiplex real-time PCR kit in comparison with the BioFire Respiratory Panel. *Ann Lab Med* 2022;42:473-7.
  29. Korea Disease Control and Prevention Agency (KDCA). 2024 KDCA white paper. KDCA; 2025.
  30. Kang C, Lee JY, Choi JH, Kim MS, inventor; Korea Disease Control and Prevention Agency, assignee. The method for detecting pandemic and seasonal influenza virus using multiplex real-time RT-PCR. Korea Patent KR1012239440000. Jan 14, 2013.
  31. World Health Organization. Information for the molecular diagnosis of influenza viruses [Internet]. World Health Organization; 2021 [cited 2025 Sep 10]. Available from: <https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/laboratory-network/quality-assurance/eqa-project/information-for-molecular-diagnosis-of-influenza-virus>
  32. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC's influenza SARS-CoV-2 multiplex assay [Internet]. CDC; 2025 [cited 2025 Sep 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/php/laboratories/influenza-sars-cov-2-multiplex-assay.html>

## Review &amp; Perspective

# Overview of PCR-based Diagnostic Assays for Emerging Infectious Disease Pathogens

Yu Jeong Ahn , Chaewon Jung , Jee Eun Rhee , Eun-Jin Kim\* 

Division of Emerging Infectious Diseases, Department of Laboratory Diagnosis and analysis,  
Korea Disease Control and Prevention Agency, Cheongju, Korea

## ABSTRACT

**Objectives:** Continuous genetic variation in pathogens enhances their infectious potential and promotes the emergence of infectious disease outbreaks, highlighting the need for diagnostic technologies capable of broad-range detection. Herein, we introduce pan-polymerase chain reaction (pan-PCR) and multiplex PCR assays to identify the causative agents of emerging or unknown infectious diseases.

**Methods:** To introduce the research, development, and practical applications of pan-PCR and multiplex PCR assays for pathogen diagnosis, a comprehensive review was conducted. The review focused on recent domestic and international institutional reports and academic literature on public health and PCR-based diagnostic methods. Literature published since the coronavirus disease 2019 pandemic was included.

**Results:** Both technologies have been recognized as core diagnostic approaches to effectively respond to emerging and unknown infectious diseases. Pan-PCR uses conserved gene regions for the initial screening of unknown pathogens, whereas multiplex PCR is used to simultaneously identify specific pathogens, including co-infection cases. These two technologies could be utilized complementarily to identify the causative agents of emerging infectious diseases.

**Conclusions:** Pan-PCR and multiplex PCR show promise as key diagnostic platforms to facilitate proactive responses in the face of infectious disease threats in the future. The simultaneous use of both technologies, capitalizing on their respective strengths in versatility and specificity, is likely to improve diagnostic capabilities for emerging or unknown infectious diseases and strengthen public health surveillance.

**Key words:** Emerging infectious diseases; Pathogens; Diagnostic techniques and procedures; Polymerase chain reaction

\*Corresponding author: Eun-Jin Kim, Tel: +82-43-719-8140, E-mail: ekim@korea.kr

## Introduction

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic has underscored the importance of pathogen surveillance systems that are capable of early detection of emerging infectious

agents and the need to advance genetic diagnostic technologies [1,2]. Major international public health organizations, including the World Health Organization (WHO) and the Coalition for Epidemic Preparedness Innovations, have emphasized the development and implementation of universal diagnostic

**Key messages**

① What is known previously?

Conventional pathogen diagnosis shows a high accuracy for known pathogens; however, it is limited in its ability to diagnose variants or emerging pathogens. There is a growing need to develop diagnostic methods with rapid and broad-range detection capabilities.

② What new information is presented?

Pan-polymerase chain reaction (pan-PCR) specializes in the rapid early screening of unknown pathogens, whereas multiplex PCR enables the simultaneous differential diagnosis of co-infections. Both can serve as essential platforms at the forefront of diagnosing emerging pathogens.

③ What are implications?

The development of pan-PCR and multiplex PCR can be used to strengthen diagnostic capabilities in public health settings, significantly improving their ability to respond proactively to emerging infectious diseases.

methods for pathogens as the key components of strategies to prepare for potential future emerging infectious agents, referred to as “Pathogen X” [3]. The WHO has also established research and development priorities and released a list of pathogens based on factors such as pandemic potential and the

feasibility of developing treatments. The organization recommends surveillance and pathogen testing technologies to detect the emergence of these listed pathogens, as well as the proactive development of vaccines and therapeutics [4]. In the Republic of Korea (ROK), the Korea Disease Control and Prevention Agency (KDCA) has designated and managed novel infectious disease syndromes as Class 1 infectious diseases, further emphasizing the need to develop and validate diagnostic methods for new pathogens that cannot be detected using existing diagnostic reagents.

Against this background, the development of diagnostic methods that can achieve both rapidity and broad applicability has emerged as an important task among various diagnostic technologies. Next-generation sequencing (NGS) enables the comprehensive identification of pathogen genomic information and plays a major role in diagnosis and research; however, its high cost, long analysis time, and equipment requirements limit its use for on-site testing or large-scale screening [5]. In contrast, polymerase chain reaction (PCR)-based assays (Table 1) remain key diagnostic tools in clinical and field settings thanks to their rapid turnaround time, high sensitivity and specificity, accessibility of equipment, and cost-effectiveness. In particular, pan-PCR and multiplex PCR, characterized by their

**Table 1.** Comparative analysis of PCR-based assays

Criterion	Conventional PCR	Pan-PCR	Multiplex PCR
Target pathogen range	Detection of single pathogen	Simultaneous detection of diverse pathogens within the same family	Simultaneous detection of specific genes from multiple individual pathogens
Primer design criterion	Single pathogen-specific primers	Primers targeting conserved common gene regions within the same family	Specific primers for each pathogen
Amplification method	Single target amplification	Common region amplification	Multiple target amplification
Application purpose	Diagnosis of single pathogen infection	Early discovery and screening of unknown pathogens	Simultaneous diagnosis of multiple pathogen infections

PCR=polymerase chain reaction.

universality and multiplexing capability, respectively, have drawn attention as suitable technologies for early infectious disease response and large-scale surveillance systems [6,7].

Pan-PCR targets conserved sequences within a specific family or genus, providing broad applicability that enabled the detection of multiple subtypes, variants, recombinants, and even previously unknown or emerging pathogens [8]. This approach is particularly advantageous for the early identification of novel or variant pathogens, including “Pathogen X,” where high genetic diversity, recombination, or mutation may occur. Therefore, pan-PCR can serve as an effective diagnostic tool for the early detection of new and variant infectious diseases arising from such genetic changes. During the COVID-19 pandemic, the use of pan-PCR helped overcome the limitations of single-pathogen diagnostic methods, further underscoring the importance and utility of universal diagnostic technologies.

Multiplex PCR uses multiple sets of specific primers to simultaneously detect and differentiate various pathogens, making it effective for precise and rapid differential diagnosis. Along with infections caused by a single pathogen, the number of co-infection cases has recently been increasing [9]. Importantly, respiratory infectious diseases present limitations for conventional single-pathogen diagnostic methods because of the interactions among pathogens and their high mutation rates. Under these circumstances, multiplex PCR contributes to the simultaneous diagnosis of co-infections and the strengthening of surveillance systems and has become the most widely used platform among PCR-based multiplex diagnostic methods.

This study focuses on analyzing the strategic value and current status of pan-PCR and multiplex PCR technologies as molecular diagnostic platforms for responding to emerging

infectious diseases. Although these technologies can be applied to a wide range of pathogens, this review primarily discusses viral pathogens that exhibit frequent mutations and a higher likelihood of emerging as new infectious agents rather than bacteria or fungi, which tend to be more genetically stable. The cases of application of multiplex PCR are examined mainly through widely known commercial panels whose clinical utility has been demonstrated. In the changing landscape of infectious diseases characterized by the emergence of new and variant pathogens and an increase in co-infections, these PCR technologies are becoming increasingly important as the key platforms that complement the limitations of single-pathogen diagnostic methods and enable early detection and response. By reviewing the global and domestic trends in the development of diagnostic technologies focused on pan-PCR and multiplex PCR, this study aims to present the roles, limitations, and future directions of these methods, thereby contributing to the establishment of effective and proactive response systems for emerging infectious diseases such as COVID-19.

## Methods

To examine the domestic and international research trends and implementation status of pan-PCR and multiplex PCR assays, this study referred to pathogen-specific diagnostic methods utilizing pan-PCR and multiplex PCR as described in academic literature on PCR-based diagnostics. In addition, pandemic response reports and diagnostic case studies published by national and international public health organizations, including the KDCA, WHO, and United States Centers for Disease Control and Prevention (CDC), were reviewed. Based on these cases, this study presents insights into the future

directions and prospects for the development of these diagnostic technologies.

## Results

### 1. Introduction to the Pan-PCR Assay

#### 1) Technical principles and limitations of the pan-PCR assay

Pan-PCR is a technique that designs diagnostic primers based on the conserved gene sequences shared among pathogens within the same taxonomic lineage. The process begins by collecting genomic data from the target pathogen group and performing multiple sequence alignment to identify the gene regions with a high degree of conservation. Primers are then designed within these conserved regions, considering both specificity and amplification efficiency. The designed primers enable amplification even in pathogens that differ at the variant or subtype level. Although pan-PCR is useful for the early detection and phylogenetic identification of unknown pathogens, further analyses such as sequencing of the amplified products are required for precise species-level identification. This additional step increases the total diagnostic turnaround time and may incur costs associated with NGS linkage, which can be a limiting factor for clinical application [10]. In bacterial diagnostics, conserved genes such as 16S ribosomal RNA have been widely used as targets, allowing broad detection capability. However, in the case of viruses, universal detection is more challenging because of high genomic diversity, rapid mutation rates, and absence of common genes. Therefore, Pan-PCR has been developed as a detection strategy focused on pathogens within the same family, and major public health organizations worldwide are actively incorporating this technology into

infectious disease surveillance and response systems.

#### 2) Application of the pan-PCR assay

##### (1) Coronaviruses

The pan-coronavirus PCR assay developed by the Rega Institute for Medical Research at KU Leuven in Belgium targets a highly conserved region within the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene, enabling the comprehensive detection of various coronavirus lineages, including multiple genetic variants. In fact, this technique has demonstrated high detection rates for viruses of SARS, MERS, and diseases caused by other coronaviruses and has been reported to be minimally affected by genetic variations in the pathogen [11].

##### (2) *Paramyxoviridae* and *pneumoviridae*

The pan-*paramyxoviridae* PCR assay developed at the Erasmus Medical Center in Rotterdam, the Netherlands, uses a single primer set that targets a conserved region within the RdRp gene of viruses belonging to the *paramyxoviridae* and *pneumoviridae* families, allowing simultaneous detection with high universality. This method has also been successfully applied to wild bird samples, enabling the detection of various pathogens, including avian metapneumovirus [12].

##### (3) *Filoviridae*

The pan-*Filoviridae* PCR assay enables the broad detection of mammalian filoviruses, primarily Ebola virus and Marburg virus. SYBR green-based quantitative real-time PCR (qPCR) developed by the National Institute for Communicable Diseases in South Africa and the high-throughput real-time PCR (RT-PCR) system developed by the University of Washington School of Medicine in the United States have both

been applied, offering advantages in real-time surveillance and efficient processing of large-scale or low-concentration samples. In previous studies of wild bats, this assay has been used for the early detection of potential pathogens and has demonstrated reliable performance. Moreover, its value has been emphasized as a proactive public health tool for preventing community transmission of high-risk viruses such as Ebola and Marburg [13,14].

(4) Other families and genera

The Norwegian Institute of Public Health developed a diagnostic assay capable of comprehensively detecting major human-infecting Caliciviruses, including norovirus and sapovirus, which cause outbreaks through gastrointestinal infection. The study reported that the assay demonstrated superior speed and accuracy compared with existing diagnostic techniques [15].

At the Center for Biological Safety in Berlin, Germany, a pan-*Flaviviridae* PCR assay was developed targeting a highly conserved region of the NS5 gene, enabling the broad detection of multiple *Flavivirus* pathogens such as yellow fever virus, Dengue virus, and Zika virus. This assay is effective as a surveillance tool in regions where two or more of these viruses are co-circulating (Table 2) [11-16].

3) Global and domestic trends in the application of pan-PCR technology

Pan-PCR is an advanced molecular diagnostic technology capable of simultaneously detecting a wide range of viral pathogens. It has recently emerged as a key strategy to enhance the early detection and response capacity for infections of unknown origin.

The KDCA is promoting the standardization and pilot implementation of pan-PCR assays focusing on 13 viral families

**Table 2.** Application of pan-PCR assays by pathogen family

Pathogen family	Country or institution	Target gene	Features	Reference
Coronaviridae	University of Leuven, Belgium	RdRp	Broad detection of various coronavirus lineages including genetic variants; less affected by pathogen gene mutations	[11]
<i>Paramyxoviridae</i> & <i>pneumoviridae</i>	Erasmus Medical Center, Netherlands	RdRp	Simultaneous detection of <i>paramyxoviridae</i> and <i>pneumoviridae</i> ; high versatility in wildlife surveillance (e.g., wild birds)	[12]
Filoviridae	NICD, South Africa; University of Washington, USA	Nucleoprotein	Broad detection of high-risk filoviruses (Ebola, Marburg); efficient for large-scale, low-concentration sample processing and real-time surveillance	[13,14]
Caliciviridae	Norwegian Institute of Public Health	RdRp	Comprehensive detection of major human caliciviruses, including norovirus and sapovirus, responsible for outbreaks	[15]
<i>Flaviviridae</i>	Berlin Centre for Biological Safety, Germany	Non-structural protein	Comprehensive detection of multiple <i>flaviviruses</i> (Yellow fever, Dengue, Zika); useful for surveillance in co-circulating regions	[16]

PCR=Polymerase chain reaction; RdRp=RNA-dependent RNA polymerase; NICD=National Institute for Communicable Diseases.

considered highly likely to be introduced into the country as part of its strategic preparedness for “Pathogen X.” The selection criteria were based on four factors: the level of attention from major international public health organizations, potential public health impact due to respiratory transmissibility, zoonotic risk, and the likelihood of domestic introduction and occurrence. Through this initiative, the KDCA aims to contribute to the advancement of the national infectious disease response system. The WHO is also promoting the development of a pan-*Filovirus* PCR assay that can simultaneously detect multiple hemorrhagic fever pathogens of unknown origin. In addition to establishing laboratory-based surveillance systems, the WHO is expanding its support for strengthening the capacity of healthcare personnel, setting up isolation facilities, and developing comprehensive and sustainable epidemic response frameworks [17].

Furthermore, the WHO provides a universal RT-PCR protocol targeting the matrix gene common to influenza A viruses, facilitating the early detection and surveillance of influenza A, including highly pathogenic avian influenza subtypes such as H5 and H7 [18]. This represents one of the essential diagnostic strategies for proactively addressing the potential risks of zoonotic infectious diseases. Similarly, the CDC has enhanced its infectious disease response capabilities through the detection of pathogens using pan-enterovirus and pan-parechovirus PCR assays combined with a sequencing analysis [19].

## 2. Introduction to the Multiplex PCR Assay

### 1) Technical principles and limitations of multiplex PCR

Recently, studies have been conducted on primer design using an *in silico* analysis, evaluation of dimers (undesired

primer–primer binding), and optimization methods for multi-gene diagnostics. A 2022 article in *Nature Communications* introduced the Simulated Annealing Design using Dimer Likelihood Estimation (SADDLE) method—an algorithmic approach for designing multiplex PCR primer sets that minimizes primer dimer formation while optimizing target amplification efficiency and uniformity. This method was also reported to be applicable to qPCR panel design and applications combined with Sanger sequencing [20]. However, the detection sensitivity of multiplex PCR assays may decline because of continuous viral mutations. This reduction is attributed not only to the decreased amplification efficiency caused by interactions among multiple primer sets but also to single-nucleotide variations occurring in primer-binding regions, which can substantially impair assay performance [21].

### 2) Application of the multiplex PCR assay

Multiplex PCR technology has attracted global attention as a key tool for the early diagnosis of infectious diseases and simultaneous detection of multiple pathogens. Research, development, and commercialization efforts are actively underway in several countries. Countries are applying this technology in public surveillance systems and clinical settings to improve the speed and accuracy of infectious disease response (Table 3).

In Germany, the Fast Track Diagnostics Respiratory Pathogens Assay has been commercialized and is being used for respiratory infectious disease surveillance. This assay is designed to detect a total of 16 respiratory viruses, including influenza A and B, parainfluenza virus, adenovirus, and coronavirus (e.g., NL63, OC43), using a multi-tube format [22]. The FilmArray Respiratory Panel, developed and commercialized by BioFire Diagnostics in the United States, enables the

**Table 3.** Global application of multiplex PCR assays

Country	Application	Target pathogens	Features
Germany	FTD Respiratory Pathogens Assay	Total of 16 types including Influenza A/B, parainfluenza, adenovirus, coronavirus (etc.)	Simultaneous detection of 16 respiratory viruses using a multi-tube format
USA	FilmArray Respiratory	Total of 22 respiratory pathogens/ 8 viruses, 18 bacteria, 7 antimicrobial resistance genes	BioFire Diagnostics FilmArray multiplex panel utilized globally (e.g., Taiwan, Japan)
China	Multiplex RT-PCR+MassARRAY	Total of 27 types including viruses and bacteria	Quantitative analysis of amplification products via MassARRAY after RT-PCR; capable of co-infection diagnosis
Republic of Korea	PowerChek SARS-CoV-2, Influenza A & B multiplex real-time PCR Kit	SARS-CoV-2 and Influenza A & B	Strengthens domestic diagnostic capacity with performance comparable to international standards (over 97% agreement)

PCR=polymerase chain reaction; FTD=fast track diagnostics; RT-PCR=real-time PCR; SARS-CoV-2=severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

simultaneous detection of 22 respiratory pathogens, including both viruses and bacteria. This panel is currently used in clinical settings and surveillance systems in Taiwan and Japan [23]. The Taiwan Centers for Disease Control conducted a comparative analysis by simultaneously performing multiplex PCR assays using the FilmArray Respiratory Panel and the conventional PCR assays previously in use. The study concluded that multiplex PCR assays demonstrated a significantly higher positive detection rate than conventional assays and effectively identified cases of multiple co-infections. These results confirmed the utility of multiplex PCR for both respiratory pathogen surveillance and clinical diagnosis [24]. In Japan, Nagasaki University Hospital conducted diagnostic testing using the FilmArray Respiratory Panel in patients with acute respiratory infections. The study confirmed that this method could detect a total of 17 viral and 3 bacterial respiratory pathogens with high specificity and sensitivity [25]. In addition, the FilmArray Pneumonia Panel, a system specialized for pneumonia diagnosis, can simultaneously detect 8 viral species, 18 bacterial

species, and 7 antibiotic resistance genes from lower respiratory tract specimens within approximately 1 hour. Notably, it provides quantitative results for 15 clinically significant bacterial pathogens associated with pneumonia, enabling the rapid diagnosis of bacterial-viral co-infections and serving as a key reference for guiding treatment decisions [26]. In China, a diagnostic method combining multiplex RT-PCR with MassARRAY, a mass spectrometry-based technology, has been developed to enable the simultaneous detection of a broader range of pathogens. This assay is designed to detect a total of 27 respiratory pathogens, including both viruses and bacteria, within a single panel. Compared with conventional PCR-based diagnostic methods, the assay demonstrates higher sensitivity and specificity and allows for the accurate identification of multiple infections, even in cases of complex co-infection, in local health centers and hospitals across China [27]. In the ROK, following the COVID-19 pandemic, multiplex RT-PCR diagnostic reagents capable of simultaneously detecting severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and influenza

A/B viruses have been successfully developed and commercialized. A comparative study evaluating the performance of this assay against the BioFire Respiratory Panel demonstrated a concordance rate exceeding 97%, confirming equivalent diagnostic performance [28].

### 3) Global and domestic trends in the application of multiplex PCR

Multiplex PCR is utilized both domestically and internationally to strengthen infectious disease response capabilities through the diagnosis of infections with unknown etiologies. In particular, the WHO and CDC are actively incorporating this technology into public health surveillance and diagnostic systems.

The KDCA is currently developing panels for syndrome-based multiplex testing across five categories—respiratory, hemorrhagic, exanthematous, neurologic, and diarrheal—to strengthen proactive laboratory response capabilities for infections of unknown origin. To enhance national surveillance and early outbreak response, the agency has designed a system that enables the rapid screening and subtype differentiation of four avian influenza viruses frequently detected in domestic poultry (H5N1, H5N6, H5N8, and H9N2) within a single reaction [29]. In addition, a diagnostic assay has been developed that can simultaneously detect the pandemic influenza A (H1N1) pdm09 virus and five seasonal influenza subtypes within a single reaction using specific primers and probes [30].

Such multidimensional efforts to develop and preemptively secure diagnostic technologies represent a key strategy for proactively addressing the potential risks of future infectious diseases. The WHO strongly encourages the development of diagnostic methods capable of the simultaneous detection of

multiple pathogens and provides a multiplex RT-PCR protocol for the concurrent detection of influenza viruses and SARS-CoV-2, particularly for the early diagnosis and surveillance of respiratory viruses [31]. The CDC has also developed the Flu SC2 Multiplex Assay, which enables the simultaneous detection of influenza A/B and SARS-CoV-2 with high accuracy from both upper and lower respiratory specimens [32].

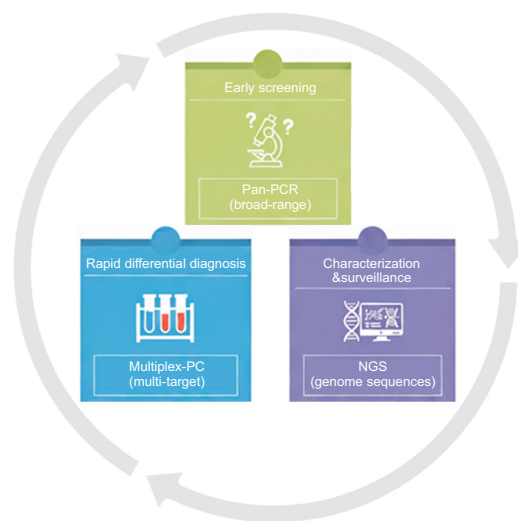
## Conclusion

This study analyzed the strategic value and current status of pan-PCR and multiplex PCR technologies as molecular diagnostic platforms for responding to emerging infectious diseases. Focusing on viral pathogens with high mutation rates and potential for novel emergence, this review examined the research, development, and practical applications of widely known commercial panels whose utility has been demonstrated.

Pan-PCR serves as a universal detection tool targeting conserved genetic regions, thereby enabling the identification of unknown and emerging pathogens; however, it requires additional analyses for precise species-level identification. Meanwhile, multiplex PCR has demonstrated excellent efficiency in the simultaneous differentiation of multiple pathogens and the diagnosis of co-infections through technical advancements such as *in silico* optimization. In the ROK, the clinical utility of multiplex PCR has been successfully validated through applications involving the simultaneous detection of SARS-CoV-2 and other pathogens. These technologies can ultimately be integrated with NGS-based genomic analysis to establish an efficient diagnostic workflow encompassing screening, confirmation, and characterization. Together, pan-PCR

and multiplex PCR represent specific directions for technological advancement aimed at simultaneously meeting the demands for rapidity, universality, and specificity in response to future infectious disease threats. Moving forward, pan-PCR should evolve beyond simple positive/negative detection toward the direct integration of amplified products with genomic analysis. The technological goal should be to establish a system that rapidly determines the phylogeny of “Pathogen X” in the field by quickly linking the amplification data from conserved gene regions to NGS or Sanger sequencing. For multiplex PCR, which remains the most widely used method for the simultaneous detection of multiple pathogens, enhancing the reliability of primer design is critical. By applying *in silico* optimization algorithms to minimize unnecessary primer–primer interactions, diagnostic panels can be expanded according to the priority of domestic prevalence and potential introduction, while maintaining high sensitivity and specificity.

As such, the efforts by international public health organizations such as the WHO and CDC to strengthen infectious disease response capabilities based on pan-PCR and multiplex PCR assays indicate the global recognition of these technologies as key public health tools for the early detection and surveillance of unknown pathogens. In addition, the KDCA is focusing on pan-PCR and multiplex PCR as key diagnostic tools to proactively respond to future infectious disease threats and enhance domestic surveillance capacity. Since 2023, as part of the Pathogen X response strategy, the agency has been developing pan-PCR assays for 13 viral families prioritized based on their high risk of domestic introduction and pandemic potential, while simultaneously developing syndrome-based multiplex test panels utilizing multiplex PCR technology. Pan-PCR provides breadth and rapidity for the detection of novel or



**Figure 1.** Diagnostic system for emerging and unknown pathogens

PCR=polymerase chain reaction; NGS=next-generation sequencing.

unknown pathogens and for the primary screening of high-risk groups with potential for domestic introduction. In contrast, multiplex PCR is used in clinical settings that require specificity and efficiency, such as the simultaneous differential diagnosis of multiple pathogens and the rapid identification of coinfections. Ultimately, the KDCA aims to maximize diagnostic efficiency through the flexible integration and complementary use of these two technologies (Figure 1), thereby establishing a diagnostic system that enables rapid patient management and effective public health response. The advancement of molecular diagnostic technologies based on pan-PCR and multiplex PCR is expected to play a pivotal role in public health diagnostics in case of future pandemics.

## Declarations

**Ethics Statement:** Not applicable.

**Funding Source:** None.

**Acknowledgments:** None.

**Conflict of Interest:** The authors have no conflicts of interest to declare.

**Author Contributions:** Conceptualization: YJA, CWJ. Data curation: YJA. Formal analysis: YJA. Investigation: YJA, CWJ, JER, EJK. Methodology: YJA. Project administration: JER, EJK. Resources: YJA, CWJ, JER, EJK. Supervision: JER, EJK. Validation: JER, EJK. Visualization: YJA, CWJ. Writing – original draft: YJA, CWJ. Writing – review & editing: JER, EJK.

## References

- Akande OW, Carter LL, Abubakar A, et al. Strengthening pathogen genomic surveillance for health emergencies: insights from the World Health Organization's regional initiatives. *Front Public Health* 2023;11:1146730.
- Al-Mandhari A, Barakat A, Abubakar A, Brennan R. Genomic sequencing for epidemic and pandemic preparedness and response: EMRO's vision and strategic interventions. *East Mediterr Health J* 2022;28:851-2.
- World Health Organization (WHO), Coalition for Epidemic Preparedness Innovations (CEPI). CEPI and WHO urge broader research strategy for countries to prepare for the next pandemic [Internet]. WHO; 2024 [cited 2025 Sep 10]. Available from: <https://www.who.int/news/item/01-08-2024-cepi-and-who-urge-broader-research-strategy-for-countries-to-prepare-for-the-next-pandemic>
- World Health Organization (WHO). Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts [Internet]. WHO; n.d. [cited 2025 Sep 10]. Available from: <https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts>
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 2016;17:333-51.
- Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002;30:1292-305.
- Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:559-70.
- Millar D, Melki J. Diagnosis of viral families using a nucleic acid simplification technique. In: Sperança MA, editor. *Dengue fever in a one health perspective - latest research and recent advances*. IntechOpen; 2023. p. 111-138.
- Kim D, Quinn J, Pinsky B, Shah NH, Brown I. Rates of co-infection between SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens. *JAMA* 2020;323:2085-6.
- Fuchs J, Kleine J, Schemmerer M, et al. varVAMP: degenerate primer design for tiled full genome sequencing and qPCR. *Nat Commun* 2025;16:5067.
- Vijgen L, Moës E, Keyaerts E, Li S, Van Ranst M. A pan-coronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses. *Methods Mol Biol* 2008;454:3-12.
- van Boheemen S, Bestebroer TM, Verhagen JH, et al. A family-wide RT-PCR assay for detection of *paramyxoviruses* and application to a large-scale surveillance study. *PLoS One* 2012;7:e34961.
- Coertse J, Mortlock M, Grobbelaar A, Moolla N, Markotter W, Weyer J. Development of a pan-*Filoviridae* SYBR Green qPCR assay for biosurveillance studies in bats. *Viruses* 2023;15:987.
- Cui N, Perez YL, Hume AJ, et al. A high-throughput, polymerase-targeted RT-PCR for broad detection of mammalian filoviruses. *Microbiol Spectr* 2024;12:e0101024.
- Stene-Johansen K, Grinde B. Sensitive detection of human *Caliciviridae* by RT-PCR. *J Med Virol* 1996;50:207-13.
- Patel P, Landt O, Kaiser M, et al. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of *flaviviruses*. *Virol J* 2013;10:58.
- World Health Organization (WHO). Disease outbreak news: 2014 - Guinea [Internet]. WHO; 2014 [cited 2025 Sep 10]. Available from: [https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2014\\_04\\_05\\_ebola-en](https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2014_04_05_ebola-en)
- World Health Organization (WHO). WHO information for molecular diagnosis of influenza virus [Internet]. WHO; 2024 [cited 2025 Sep 10]. Available from: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/molecular-detection-of-influenza-viruses/protocols\\_influenza\\_virus\\_detection\\_2024.pdf?sfvrsn=df7d268a\\_8](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/molecular-detection-of-influenza-viruses/protocols_influenza_virus_detection_2024.pdf?sfvrsn=df7d268a_8)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Laboratory testing for non-polio enterovirus [Internet]. CDC; 2024 [cited 2025 Sep 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/php/laboratories/index.html>
- Xie NG, Wang MX, Song P, et al. Designing highly multiplex PCR primer sets with Simulated Annealing Design

- using Dimer Likelihood Estimation (SADDLE). *Nat Commun* 2022;13:1881.
21. Beck AS, Lopareva EN, Hwang H, et al. Evaluation of the sensitivity of a measles diagnostic real-time RT-PCR assay incorporating recently observed priming mismatch variants, 2024. *Euro Surveill* 2024;29:2400410.
  22. Bierbaum S, Forster J, Berner R, et al.: CAPNETZ study group. Detection of respiratory viruses using a multiplex real-time PCR assay in Germany, 2009/10. *Arch Virol* 2014;159:669-76.
  23. Leber AL, Everhart K, Daly JA, et al. Multicenter evaluation of BioFire FilmArray Respiratory Panel 2 for detection of viruses and bacteria in nasopharyngeal swab samples. *J Clin Microbiol* 2018;56:e01945-17.
  24. Chiu SC, Lin YC, Wang HC, et al. Surveillance of upper respiratory infections using a new multiplex PCR assay compared to conventional methods during the influenza season in Taiwan. *Int J Infect Dis* 2017;61:97-102.
  25. Kaku N, Hashiguchi K, Iwanaga Y, et al. Evaluation of FilmArray Respiratory Panel multiplex polymerase chain reaction assay for detection of pathogens in adult outpatients with acute respiratory tract infection. *J Infect Chemother* 2018;24:734-8.
  26. Murphy CN, Fowler R, Balada-Llasat JM, et al. Multi-center evaluation of the BioFire FilmArray Pneumonia/Pneumonia Plus Panel for detection and quantification of agents of lower respiratory tract infection. *J Clin Microbiol* 2020;58:e00128-20.
  27. Zhao H, Yang Y, Lyu J, Ren X, Cheng W. Development and application of a method to detect 27 respiratory pathogens using multiplex RT-PCR combined with MassARRAY technology. *BMC Infect Dis* 2021;21:870.
  28. Kim TY, Kim JY, Shim HJ, et al. Performance evaluation of the PowerChek SARS-CoV-2, influenza A & B multiplex real-time PCR kit in comparison with the BioFire Respiratory Panel. *Ann Lab Med* 2022;42:473-7.
  29. Korea Disease Control and Prevention Agency (KDCA). 2024 KDCA white paper. KDCA; 2025.
  30. Kang C, Lee JY, Choi JH, Kim MS, inventor: Korea Disease Control and Prevention Agency, assignee. The method for detecting pandemic and seasonal influenza virus using multiplex real-time RT-PCR. Korea Patent KR1012239440000. Jan 14, 2013.
  31. World Health Organization. Information for the molecular diagnosis of influenza viruses [Internet]. World Health Organization; 2021 [cited 2025 Sep 10]. Available from: <https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/laboratory-network/quality-assurance/eqa-project/information-for-molecular-diagnosis-of-influenza-virus>
  32. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC's influenza SARS-CoV-2 multiplex assay [Internet]. CDC; 2025 [cited 2025 Sep 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/php/laboratories/influenza-sars-cov-2-multiplex-assay.html>