Laboratory Medicine and Quality Assurance

pISSN 2384-2458 • eISSN 2288-7261

Review

https://doi.org/10.15263/jlmqa.2020.42.4.194

Current Status of Proficiency Testing Programs and Development of Reference Materials for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Molecular Diagnostic Tests

Kyu-Hwa Hur*, Kuenyoul Park*, John Jeongseok Yang, Mi-Na Kim, and Heungsup Sung

Department of Laboratory Medicine, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

Corresponding author:
Heungsup Sung
Department of Laboratory Medicine, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, 88 Olympic-ro 43-gil, Songpa-gu, Seoul 05505, Korea
Tel +82-2-3010-4499
Fax +82-2-478-0884
E-mail sung@amc.seoul.kr
*These authors contributed equally to this work.

Received: October 6, 2020
Revised: October 27, 2020
Accepted: October 29, 2020

Laboratory preparedness and rapid expansion of testing capacity are essential for controlling the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak. Such efforts require the prompt implementation of authorized emergency-use test kits and extensive and decentralized screening by qualified clinical laboratories. Until August 2020, 113 clinical laboratories in South Korea were approved to perform molecular tests of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) based on five proficiency testing evaluations conducted by the Korean Association of External Quality Assessment Service. SARS-CoV-2-positive clinical samples or reference materials are key elements for the development, validation, and verification of the SARS-CoV-2 molecular diagnostics. The developed reference materials have a wide range of applications, and they are available as nationwide/international external quality assessment (EQA) materials as well as day-to-day internal quality control materials. This review discusses the current status of the nationwide/international EQAs and development of SARS-CoV-2 reference materials.
(Lab Med Qual Assur 2020;42:194-199)

Key Words COVID-19, SARS-CoV-2, Reference materials, External quality assessment

서론

코로나바이러스감염증-19 (coronavirus disease 2019, COVID-19)는 severe acute respiratory syndrome corona-virus 2 (SARS-CoV-2)에 의한 호흡기증후군으로 신종감염병증후군인 제1급감염병에 해당한다[1]. COVID-19는 2019년 12월 중국 후베이성, 우한시에서 시작되어 2020년 9월 28일 현재 3,270만 명 이상의 확진자와 99만 명 이상의 사망자를 초래하였다[2,3]. 국내에서는 2020년 1월 19일 우한시에서 입국한 사람에서 처음 진단된 이후, 2월 중순부터 시작된 대구•경북 지역의 유행, 5월 클럽 연관 유행, 8월 집회 관련 유행 등을 거치면서 2020년 10월 3일 현재 확진자와 사망자가 각각 24,027명, 420명에 이르고 있다[4]. 아직까지 COVID-19에 특이한 치료제와 백신이 없는 점을 고려할 때 적극적인 의심 환자 및 접촉자 검사, 환자 추적과 분류, 격리와 치료 등이 이 질병에 대처하는 최선의 방책이다.

국내에서는 2020년 2월 4일 PowerChek 2019-nCoV real-time PCR 키트(KogeneBiotech, Seoul, Korea)가 처음으로 긴급사용승인(emergency use authorization, EUA)이 되었으며, 2020년 2월 7일부터 민간의료기관에서 이 키트를 이용하여 SARS-CoV-2 분자진단검사를 실시할 수 있었다[5]. 5회에 걸친 신빙도조사사업을 통해 2020년 10월 3일 현재 총 113개 민간 검사실이 SARS-CoV-2 분자진단검사 실시 허가를 받았다. COVID-19와 같은 신종감염병이 유행하기 시작할 때에는 양성 검체를 구하기 어렵기 때문에 시약 개발, 검사실 내부정도관리, 대한임상검

사정도관리협회의 신빙도조사사업 등에 참값이 검증된 표준물질(reference material)이 필요하다[6]. 바이러스 유전자 표준물질은 성상에 따라 환자 검체, 바이러스 배양액, 핵산 추출액, 합성 유전자, 바이러스 유사 입자, 유전자변형 세포주 등이 있다[6,7]. 이 논문에서는 국내외 SARS-CoV-2 분자진단검사의 신빙도조사사업 실시현황과 사용한 표준물질의 종류, 표준물질의 개발현황에 대해 살펴보고자 하였다.

국내•외 SARS-CoV-2 신빙도조사사업 현황

2020년 2월 대한임상검사정도관리협회는 질병관리청에서 제작한 plasmid DNA를 이용하여 3회에 걸쳐 SARS-CoV-2 분자진단검사 실시 허가를 위한 신빙도조사사업을 실시하였다. 5월과 8월에 추가한 검사 실시 허가용 신빙도조사사업에서는 상품화된 표준물질인 AccuPlex SARS-CoV-2 Reference Material Kit (Seracare, Milford, MA, USA)를 사용하였다. 총 114개 민간 검사실이 실시 허가용 신빙도조사사업에 참여하여 113개(99.1%) 검사실이 검사 실시 허가를 받았다(Table 1).

2020년 3월 말 SARS-CoV-2 분자진단검사를 시행 중인 민간 및 공공 검사기관을 대상으로 실시한 신빙도조사사업에서는 비활성화한 SARS-CoV-2 바이러스 배양액을 음성 환자의 상기도 및 하기도 검체와 혼합하여 제작한 정도관리물질을 사용하였다(Table 2). 하기도 검체는 4개의 양성 검체와 하나의 음성 검체로, 상기도 검체는 4개의 양성 검체와 하나의 human coronavirus OC43 양성 검체로 제작되었다[8]. 총 118개 검사실 중 110개(93.2%) 검사실이 정성평가에서 모든 평가 가능한 항목을 정확하게 보고하였다. 정성평가에서 하나 이상의 “부정확” 결과를 보인 8개 검사실은 모두 하기도 검체에서 “부정확” 결과를 보고하였으며, 모두 Allplex 2019-nCoV Kit (Seegene, Seoul, Korea)를 사용하였다. Cycle threshold 값을 이용한 반정량 평가에서 Allplex 2019-nCoV Kit (Seegene)을 사용한 검사실에서는 4.9% 결과값이 이상값(outlier)이었던데 비해, PowerChek 2019-nCoV Kit (KogeneBiotech)을 사용한 검사실에서는 0.6%만 이상값이었다 (double-sided Grubbs test, $P<0.0001$).

외국의 경우 오스트리아에서 52개 검사실을 대상으로 환자 검체를 희석하여 양성 검체 3개, 음성 검체 1개로 신빙도조사를 실시하였다[9] (Table 2). 총 67개 검사패널에 대한 정성평가 결과 위양성 결과는 없었으며, 40개(59.7%) 검사패널은 모든 검체를 정확하게 정성 보고하였다. 25개(39.3%) 검사패널은 가장 낮은 농도의 양성 검체를 음성으로 보고하였으며, 2개(3.0%) 검사패널

Table 1. Summary of proficiency testing conducted by the Korean Association of External Quality Assessment Service for SARS-CoV-2 real-time polymerase chain reaction

Order	End date	Reference material	No. of samples	No. of participating laboratories	No. of approved laboratories
1	6 Feb 2020	Plasmid DNAs	7	47	46
2	19 Feb 2020	Plasmid DNAs	7	33	33
3	28 Feb 2020	Plasmid DNAs	7	16	16
4	21 May 2020	AccuPlex SARS-CoV-2	5	9	9
5	6 Aug 2020	AccuPlex SARS-CoV-2	5	9	9

The instruments were from the following companies: Plasmid DNAs (Korea Disease Control and Prevention Agency, Cheongju, Korea) and AccuPlex SARS-CoV-2 (eracare, Milford, MA, USA).
Abbreviation: SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

Table 2. Reference materials used for international or nationwide external quality assessments

Scale	Due date of data acquisition	Reference material	No. of samples	No. of participating laboratories	Reference
Nationwide, South Korea	31 March 2020	Cultured virus spiked to clinical specimen	10	118	[8]
Nationwide, Austria	26 May 2020	Clinical specimen	4	52	[9]
International, 36 countries	Not specified (samples received between 6 April and 20 May 2020)	Cultured virus	8	365	[10]

은 가장 낮은 농도와 중간 농도의 양성 검체를 모두 음성으로 보고하였다. 36개국의 365 검사실을 대상으로 한 국제적인 신빙도조사에서는 6개의 핵심 검체와 2개의 교육용 특이도 검체 등 총 8개 검체로 패널을 만들었다[10] (Table 2). 핵심 검체는 비활성화한 바이러스 배양액을 단계 희석하여 만든 5개 양성 검체와 바이러스 운송배지인 1개 음성 검체로 제작되었다. 교육용 특이도 검체는 각각 human coronavirus NL63과 human coronavirus OC43 배양액으로 제작하였다[10]. 총 521개의 데이트 세트 중 핵심 검체에 대해서는 83.1%가 정확하게 보고하였으며, 교육용 특이도 검체를 포함할 경우 81.8%가 정확하게 보고하였다.

현재 SARS-CoV-2 분자진단 신빙도조사사업을 시행 중인 국내외 기관은 UK National External Quality Assessment Service, Quality Control for Molecular Diagnostics, College of American Pathologists, Microbix and Oneworld Accuracy, Korean Association of External Quality Assessment Service, 그리고 INSTAND 등에서 시행하며 Table 3에 자세한 사항을 정리하였다.

SARS-CoV-2 표준물질 현황

질병관리청에서 2020년 1월 말 사용한 SARS-CoV-2 real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)과 국내에서 최초로 EUA를 받은 PowerChek 2019-nCoV 키트는 독일의 Corman 그룹 프로토콜을 참고하여 *E* gene과 *RdRp* gene을 검출한다[11]. 따라서 국내에서 최초로 만들어진 플라스미드 DNA 표준물질도 *E* gene과 *RdRp* gene 플라스미드였다. *E* gene PCR 산물(113 bp)과 *RdRp* gene PCR 산물(110 bp)을 pGEM-T Easy Vector System (Promega Corp., Madison, WI, USA)을 사용하여 DH10B cells에 TA cloning하였다. QIAprep Spin Miniprep kit와 Qiagen Plasmid Plus Midi kit (Qiagen, Hilden, Germany)로 플라스미드 DNA를 추출한 후 NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 측정한 DNA 카피 수는 *E* gene은 7.4×10^{11} copies/mL, *RdRp* gene은 8.4×10^{11} copies/mL였다.

European Virus Archive Global (EVAg, Marseille, France)에서는 SARS-CoV Frankfurt 1 바이러스의 전체 RNA와 시험관 내 전사한(*in vitro* transcribed) SARS-CoV-2 *E* gene RNA를 판매하고 있으며, 두 표준물질 모두 SARS-CoV-2 *E* gene 증폭을 위한 대조물질로 사용할 수 있다. SARS-CoV Frankfurt 1 RNA는 10^4 copies/μL 농도로 100 μL 포장되어 있으며, E gene은 10^5 copies/μL 농도로 100 μL 포장되어 있다.

미국 식품의약국(U.S. Food & Drug Administration)에서는

Table 3. Available external quality assessment programs for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 molecular detection

	Program provider					
	UK National External Quality Assessment Service	Quality Control for Molecular Diagnostics	College of American Pathologists	Microbix and Oneworld Accuracy (1WA)	Korean Association of External Quality Assessment Service	INSTAND
Specimen	Freeze-dried	Cultured and/or clinical material	Non-infectious liquid specimens	NA	Cultured virus spiked to clinical specimen	Lyophilized cell culture lysates
No. of challenges	8 (Aug 2020 to Mar 2021)	1/2	2	1/3	2	2
No. of samples per challenge	2	10 (for 1 challenge)/ 5 (for 2 challenges)	3	2	5	5
Website	https://ukneqasmicro.org.uk/	https://www.randox.com/sars-cov-2-eqa-scheme/	https://www.cap.org/laboratory-improvement/proficiency-testing/sars-cov-2-proficiency-testing-programs	https://www.oneworldaccuracy.com/1wa/#/	http://eqas.keqas.org/	https://www.instand-ev.de/en/eqas/eqa-program.html

Abbreviation: NA, not available.

Table 4. Commercial reference materials available for quality control of SARS-CoV-2 testing

	Product name					
	SARS-CoV-2 Positive/Negative Run Control (CE-IVD); SARS-CoV-2 Standard (RUO)	Accuplex SARS-CoV-2 Molecular Controls	Accuplex SARS-CoV-2 Reference Material	AcroMetrix COVID-19 RNA Control	NATtrol SARS-Related coronavirus 2 External Run Control	SARS-CoV-2 (COVID-19) Q Controls
Manufacturer	Bio-Rad	Seracare	Seracare	Thermo Fisher	Zeptometrix	Randox Qnostics
Type	Synthetic RNA	Recombinant virus	Recombinant virus	Genomic RNA	Chemically modified, inactivated viral particles	Whole pathogen
Human genomic DNA background	Yes	Human *RNAse P* gene in negative control	Human *RNAse P* gene in negative control	No	A549 cells as negative control	Human cells/nucleic acids in negative control
Test for entire process*	Yes	Yes	Yes	No (not applicable for extraction)	Yes	Yes
Concentration	200,000 copies/mL	5,000 copies/mL	5,000 copies/mL	500 copies/μL (low); 100 copies/μL (ultra-low)	50,000 copies/mL (SARS-CoV-2); 50,000 cells/mL (A549)	NS
Package	5×0.3 mL, positive only	5×1.5 mL (positive vials); 5×1.5 mL (negative vials)	5×1.5 mL (positive vials); 5×1.5 mL (negative vials)	2×20 μL	6×0.5 mL (SARS-CoV-2 or A549 cells)	5×0.5 mL (positive control); 5×0.5 mL (negative control)
Storage	–20°C up to 1 year	2°C–8°C up to 2 years	2°C–8°C up to 2 years	≤–20°C	2°C–8°C	Frozen (single use)
Target genes	*ORF1ab, RdRp, S, E, N*	Full length	*ORF1a, RdRp, E, N*	Full length	Full length	Full length
Value assigned	Internally value assigned by ddPCR	Internally value assigned by TaqMan digital PCR	NS	Internally value assigned by ddPCR	In-house RT-PCR and digital PCR	Digital PCR
Certification and label	CE-IVD or RUO	CE-IVD	RUO	RUO	RUO	CE, RUO

Abbreviations: SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; CE-IVD, Conformité Européenne-*in vitro* diagnostics; COVID-19, coronavirus disease 2019; NS, not specified; ddPCR, Bio-Rad Droplet Digital PCR; PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; RUO, for research use only.
*The entire process comprises extraction, amplification, and detection.

SARS-CoV-2 분자진단검사의 민감도와 특이도를 비교할 목적으로 비활성화된 SARS-CoV-2 배양액과 MERS-CoV 배양액으로 제조한 각각 5개 농도(T1–T5)의 표준물질을 제공한다[12].

SARS-CoV-2 real-time RT-PCR 검사는 제품에 따라 *E* gene, *RdRp* gene 외에도 *N* gene, *ORF1a* gene, *S* gene, *M* gene 등 다양한 표적 유전자를 검출할 수 있다. 따라서 다양한 표적 유전자 부위가 포함된 표준물질이 요구된다. Table 4에 상품화된 SARS-CoV-2 표준물질을 정리하였다. 비활성화한 SARS-CoV-2 바이러스나 재조합 복제불능 포유류 바이러스(replication-deficient mammalian virus) 표준물질은 냉장에서 안정하기 때문에 시험관 내 전사한 RNA나 전체 바이러스 RNA 표준물질보다 보관 및 사용이 용이한 장점이 있다. AcroMetrix COVID-19 RNA Control을 제외한 다른 표준물질들은 검체와 동일하게 핵산 추출과 핵산 증폭과정을 거치게 되어 있기 때문에, SARS-CoV-2 real-time RT-PCR의 전 과정을 점검할 수 있다. 국내에서는 한국표준과학연구원이 렌티바이러스 기반 SARS-CoV-2 표준물질을 제작하고 있다.

위에 소개한 표준물질은 모두 하나의 바이러스주로 만들어져 있기 때문에 real-time RT-PCR 시약의 시발체/프로브 부위의 염기서열 불일치로 인한 일부 유전자 위음성 위험이 있다[13]. Twist Bioscience (San Francisco, CA, USA)에서는 서로 다른 7개 SARS-CoV-2 바이러스주(Australia/VIC01/2020; Wuhan-Hu-1; Japan/Hu_DP_Kng_19-020/2020; USA/TX1/2020; USA/MN2-MDH2/2020; USA/CA9/2020; France/HF2393/2020)로 7개의 개별 표준물질을 제공하고 있다[14]. 단일 가닥 합성 RNA로 약 1×10^{6} copies/μL의 농도로 100 μL씩 포장되어 있다.

결론

임상 검사실에서 SARS-CoV-2와 같은 신종감염병의 분자진단검사를 처음 실시하기 위해서는 EUA가 된 시약과 양성 및 음성 검체가 포함된 신빙도조사사업 참여가 필수적이다. 그러나 신종감염병의 초기 유행 시 양성 검체를 구하기는 어려우므로 참값이 검증된 표준물질이 반드시 필요하다. SARS-CoV-2 양성 표준물질은 시약 제조회사에서는 분자진단검사를 개발하고 검증(validation)할 때, 임상검사실에서는 EUA가 된 분자진단검사 시약을 검정(verification) 및 시연(demonstration)할 때와 내부정도관리 시에 꼭 필요하다. 또한 국가 단위 또는 국제적인 신빙도조사사업을 위해서 SARS-CoV-2 표준물질이 요구된다. 국내에서는 초기 COVID-19 환자의 검체를 이용하여 SARS-CoV-2 유전자의 플라스미드 DNA를 제작하거나 세포배양한 SARS-CoV-2를 비활성한 후 임상 검체에 혼합하여 신빙도조사 패널을 성공적으로 제조하였다. 최근에는 다양한 상품화된 SARS-CoV-2 표준물질이 소개되어 임상검사실에서 내부정도관리용으로 사용할 수 있다. 지금까지 상품화된 SARS-CoV-2 표준물질은 소량임에도 불구하고 고가이며, 주문 후 제품을 받기까지 오랜 시간이 걸리고, 전 세계적인 요구량이 많을 때 구입이 어려운 단점이 있다. 따라서 SARS-CoV-2의 다양한 유전형이 포함되어 있으면서 참값이 확인된 저렴한 국산 표준물질이 요구된다.

이 논문에서는 2020년 10월 3일 현재까지 국가 단위 또는 전세계적으로 시행된 SARS-CoV-2 신빙도조사사업 현황과 SARS-CoV-2 분자진단검사에 사용할 수 있는 표준물질에 대하여 알아보았다. SARS-CoV-2 분자진단검사를 실시하는 임상검사실에서 새로운 진단시약의 평가 또는 내부정도관리 시 표준물질을 선택하는데 도움이 될 것이다.

감사의 글

이 연구는 대한임상검사정도관리협회의 2016년 학술연구비 지원으로 수행되었다(과제번호: 2016-28).

REFERENCES

1. Kim HS, Hong KH, Sung H, Lee H, Kim JS. Laboratory tests for diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). J Health Tech Assess 2020;8:14-9.
2. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. N Engl J Med 2020;382:727-33.
3. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) Weekly Epidemiological Update and Weekly Operation Update: 28 September 2020. https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/ (Assessed October 3, 2020).
4. Korea Disease Control and Prevention Agency. Coronavirus disease-19, Republic of Korea. http://ncov.mohw.go.kr/ (Assessed October 3, 2020).

5. Sung H, Yoo CK, Han MG, Lee SW, Lee H, Chun S, et al. Preparedness and rapid implementation of external quality assessment helped quickly increase COVID-19 testing capacity in the Republic of Korea. Clin Chem 2020;66:979-81.
6. Cho EJ, Lee EJ, Cha Y, Lee N, Hong KH, Huh HJ, et al. Types, production and validation of reference materials for viral genetic testing. Ann Clin Microbiol 2020;23:57-66.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Validation and verification of qualitative multiplex nucleic acid assays; approved guideline: CLSI document MM17-A. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
8. Sung H, Han MG, Yoo CK, Lee SW, Chung YS, Park JS, et al. Nationwide external quality assessment of SARS-CoV-2 molecular testing, South Korea. Emerg Infect Dis 2020;26:2353-60.
9. Gorzer I, Buchta C, Chiba P, Benka B, Camp JV, Holzmann H, et al. First results of a national external quality assessment scheme for the detection of SARS-CoV-2 genome sequences. J Clin Virol 2020;129:104537.
10. Matheeussen V, Corman VM, Donoso Mantke O, McCulloch E, Lammens C, Goossens H, et al. International external quality assessment for SARS-CoV-2 molecular detection and survey on clinical laboratory preparedness during the COVID-19 pandemic, April/May 2020. Euro Surveill 2020;25:2001223.
11. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill 2020;25:2000045.
12. U.S. Food and Drug Administration. SARS-CoV-2 reference panel comparative data. https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-reference-panel-comparative-data#development (Assessed October 3, 2020).
13. Artesi M, Bontems S, Göbbels P, Franckh M, Maes P, Boreux R, et al. A recurrent mutation at position 26340 of SARS-CoV-2 is associated with failure of the E gene quantitative reverse transcription-PCR utilized in a commercial dual-target diagnostic assay. J Clin Microbiol 2020;58:e01598-20.
14. Twist Bioscience. Synthetic viral controls. https://www.twistbioscience.com/products/ngs/synthetic-viral-controls?tab=sars-cov-2-controls (Assessed October 3, 2020).