Clinical Evaluation of Five Commercial Serological SARS-CoV-2 Immunoassays for COVID-19

Wooyong Shin^{ID}, Hae In Bang^{ID}, Geun Young Yu^{ID}, Mi-Young Kim^{ID}, Eui Young Jang^{ID}, Jung-Ah Kim^{ID}, Jieun Kim^{ID}, Rojin Park^{ID}, Jeong Won Shin^{ID}, and Tae Youn Choi^{ID}

Department of Laboratory Medicine, Soonchunhyang University Seoul Hospital, Seoul, Korea

Corresponding author:

Hae In Bang
Department of Laboratory Medicine,
Soonchunhyang University Seoul
Hospital, 59 Daesagwan-ro, Yongsan-gu,
Seoul 04401, Korea
Tel +82-2-709-9430
E-mail genuine43@schmc.ac.kr

Received: July 23, 2021

Revised: August 27, 2021

Accepted: September 10, 2021

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

Background: Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a serious infectious disease caused by the highly contagious severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). In this study, three types of kits for the lateral flow assay (LFA) and two types of reagents used in the chemiluminescent immunoassay (CLIA) for serological testing of COVID-19 were evaluated and compared to investigate the current status of antibody testing.

Methods: From January 2020 to February 2021, 193 positive and 94 negative samples were tested. For these samples, WonMed COVID-19 immunoglobulin M (IgM)/immunoglobulin G (IgG) (Wonmed, Korea), careUS COVID-19 IgM/IgG (WELLS BIO, Korea), and STANDARD Q COVID-19 IgM/IgG Plus test (SD Biosensors, Korea) kits were used for the LFA, and Anti-SARS-CoV2 Elecsys nucleocapsid (N) and spike (S) (Roche, Switzerland) and ACCESS SARS-CoV-2 IgM and IgG (Beckman Coulter, USA) for the CLIA were compared and evaluated.

Results: All kits and reagents except Elecsys showed variable sensitivities of 46.1%–72.0% for IgM, and 85.0%–88.1% for IgG. Elecsys showed a sensitivity of 86.0% for the N antibody and 85.5% for the S antibody. All reagents showed higher sensitivity in samples 14 days after symptom onset than within 14 days ($P=0.007$). The specificity of LFA and CLIA was 97.9%–100.0%.

Conclusions: Most kits and reagents showed low clinical sensitivity at 7–14 days, that is before the antibody was sufficiently produced. When performing a serological test, IgM and IgG should be checked together to obtain sufficient clinical sensitivity, and the test timing should also be applied carefully.

(Lab Med Qual Assur 2021;43:199-207)

Key Words COVID-19, SARS-COV-2, COVID-19 serological testing, Immunoassay, Antibodies

서론

Coronavirus disease 2019 (COVID-19)는 2019년에 시작하여 전 세계적으로 수천만 명 이상 빠른 전염이 되고 있는 severe

acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)에 의한 심각한 감염병이다. COVID-19는 81%의 환자가 폐렴이 없거나 경증 폐렴의 증상을 보이며, 1%는 발열을 포함한 전형적인 증상이 없는 무증상 환자이기에 지역사회 및 가정 내 2차 감염

이 빠르게 진행되고 있다[1]. 심각한 호흡곤란, 패혈성 쇼크 등의 증상을 보이는 경우는 5% 가량으로 알려져 있으며, 심각한 증상을 보이는 환자의 사망률은 62%에 이르기도 한다[1,2]. 높은 전파력과 사망률 때문에 COVID-19의 빠른 진단이 중요하며, 임상검사에서 바이러스 DNA 검출을 위해 우선되는 방식은 real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)이다[3]. SARS-CoV-2는 positive strand RNA를 가진 코로나바이러스로 5' untranslated region (UTR), replicase complex (*orf1ab*, *RdRp*), *S* gene, *E* gene, *M* gene, *N* gene, 3' UTR 등으로 구성되어 있다[4]. 이 중 국내에서는 *orf1ab*/*RdRp* gene과 *E* gene 또는 여기에 *N* gene을 추가한 RT-PCR이 주로 사용되며, 비인두 도말 검체에 대한 RT-PCR을 단독으로 진단에 사용할 경우 민감도는 73.3%–93.0%, 특이도는 98.8%–100.0%로 알려져 있다[3,5,6].

감염 후 약 1주가 지나면 바이러스에 대한 항체가 검출되기 시작하며, RT-PCR이 음성이면서 감염이 의심되는 증상을 보이는 환자에서 진단에 도움이 될 수 있다[7,8]. 항체검사는 immunoglobulin M (IgM), immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin A (IgA) 혹은 total antibody를 감지하는 검사이다. 이는 분자검사에 보조적으로 사용하거나, 질병에 이환되지 않은 개인에서 이전의 감염 혹은 지역사회 노출을 확인하거나, 환자에서 항체반응을 확인하기 위해 사용될 수 있다[8]. 이들은 PCR 결과가 음전된 이후에도 감염에 대한 면역반응을 관찰할 수 있어 장기적인 관찰에 유용하다. 항체검사를 위한 다양한 키트가 시장에 공개되고 있으며, 민감도 및 특이도에 대한 평가가 이루어지고 있다. 이 중 임상검사실에서 널리 사용할 수 있는 항체검사는 주로 lateral flow assays (LFAs) 키트를 통한 항체 검출이며, 검사가 용이하고 빠르게 결과를 확인할 수 있는 것이 장점이다[9]. LFA 키트가 아닌, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) 및 자동화장비를 사용한 chemiluminescent immunoassays (CLIA) 방식의 검사도 가능하며, 이 중 CLIA 기법이 ELISA 및 LFA보다 더 민감한 것으로 알려져 있다[8]. 전 세계적으로 많은 국가에서 백신 접종이 이루어지고 있어, 백신 접종 후 항체 형성에 사용할 수 있는 혈청학적 검사와 그 유용성도 관심이 높아지고 있다.

본 연구에서는 현장에서 바로 검사할 수 있는 LFA 키트 3종과 Roche, Beckman-Coulter에서 제공하는 CLIA 시약을 평가하여 COVID-19 혈청학적 검사의 현주소와 임상적 유용성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

1. 검체

2020년 1월부터 2021년 2월까지 COVID-19 백신을 접종하지 않은 만 19세 이상의 성인, 비인두 도말 검체를 사용한 SARS-CoV-2 RT-PCR 결과, 양성을 보여 COVID-19 확진된 환자 46명의 검체 199개 및 내원 환자 중 RT-PCR 검사에서 음성이며 임상적 증상이 없는 환자 98명의 혈청 검체 98개를 대상으로 하였다. RT-PCR은 PowerChek 2019-nCoV Real-time PCR kit (Kogenbiotech, Seoul, Korea)을 사용하여 *E* gene 및 *RdRp* gene의 cycle threshold 값이 ≤ 35 인 경우를 SARS-CoV-2 양성, >35 인 경우는 SARS-CoV-2 음성으로 판정하였다. 양성 환자 중 증상 발현 시점으로부터 검사 시점까지의 기간별로 0–7일을 그룹 1, 8–14일을 그룹 2, 15–21일을 그룹 3, 22일 이상을 그룹 4로 나누며, 혈청 검체 채취는 serum separator tube 5 mL 용기를 사용하였다. LFA 검사 및 CLIA 검사를 RT-PCR 양성 검체 및 RT-PCR 음성 검체를 대상으로 검사하였고, 검체량이 부족하거나 5가지 검사 중 하나라도 검사결과의 판독이 불가능한 총 10건은 결과에서 제외하여 최종적으로 양성 검체 193개, 음성 검체 94개에 대한 검사를 완료하였다(Table 1). 음성 검체는 hepatitis B surface antibody, hepatitis C virus antibody (anti-HCV), human immunodeficiency virus (HIV) antigen, HIV antibody, antinuclear antibody (ANA), rheumatoid factor 양성 여부를 확인하여 교차반응이 발생하는지를 확인하였다. 또한 이 연구는 Institutional Review Board of Soonchunhyang University Hospital, Seoul, Korea (IRB file no., SCHUH-2020-11-020)의 승인을 받았다.

Table 1. Number of patients and samples collected in this study

Variable	Positive	Negative
Patients	46	98
Collected samples	199	98
Inadequate samples*	6	4
Group [†]		
Group 1	38	
Group 2	38	
Group 3	25	
Group 4	92	
Total tested samples	193	94

*Samples with insufficient volume or unreadable results. [†]Groups with samples collected for symptom onset from 0 to 7 days (group 1); from 8 to 14 days (group 2); from 15 to 21 days (group 3); 21 days or more (group 4).

2. Lateral flow assay 및 chemiluminescent immunoassays 기법

LFA 키트로 WonMed COVID-19 IgM/IgG (Wonmed, Bucheon, Korea), careUS COVID-19 IgM/IgG (WELLS BIO, Seoul, Korea), STANDARD Q COVID-19 IgM/IgG Plus test (SD Biosensors, Suwon, Korea)를 사용하였고, CLIA method는 Anti-SARS-CoV2 Elecsys nucleocapsid (N) 및 spike (S) (Roche, Basel, Switzerland)를 cobas e 602 module (Roche, Basel, Switzerland)로 검사하였고, ACCESS SARS-CoV-2 IgM, IgG (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) 시약을 UniCel DxI 800 (Beckman Coulter)로 검사하여 비교 및 평가하였다. LFA 키트는 공통적으로 15분 후 결과를 판독하였다. CLIA 시약 중 Anti-SARS-CoV2 Elecsys는 S 항원과 N 항원에 대한 항체를 개별적으로 검출할 수 있다. Anti-SARS-CoV2 Elecsys는 IgG와 IgM을 구분하지 않고 각 시약에 포함되어 있는 재조합 항원 S 또는 N에 대한 항체 전반을 측정한다. Elecsys N은 cutoff index 1.0 미만은 음성, 1.0 이상은 양성으로 판정하였고, Elecsys S는 0.80 U/mL 미만은 음성, 0.80 U/mL 이상을 양성으로 판정하고 250 U/mL까지를 검출범위로 지정하였다. ACCESS SARS-CoV-2 시약 중 IgM은 1.00 signal-to-cutoff ratio (S/CO) 미만은 non-reactive, 1.00 S/CO 이상을 reactive로 정의하였으며, IgG에서는 0.80 S/CO 이하를 non-reactive, 0.80 초과 1.00 S/CO 미만을 equivocal, 그리고 1.00 S/CO 이상을 reactive로 정의하였다. 모든 과정은 제조사에서 제안하는 프로토콜에 따라 경험 있는 병리사가 검사를 수행하였다. 제조사에서 제공한 각 키트 및 시약의

특성은 Table 2와 같다[10-16].

3. 통계분석

수집한 데이터를 IBM SPSS Statistics ver. 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)로 분석하였다. 각 검사방법 및 그룹별 임상적 민감도의 차이를 확인하기 위해 비교대상의 수에 따라 Kruskal-Wallis 검정 및 Mann-Whitney 검정을 사용하여 비교하였고, 키트 및 시약별 일치도를 확인하기 위해 Cohen's kappa 및 Fleiss' kappa 분석을 사용하여 검사결과를 비교하였다. *P*값이 0.05 이하일 때 분석이 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결과

RT-PCR 결과와 비교하여 전체 검사결과의 민감도, 특이도, 양성 예측률, 음성 예측률을 조사하였다(Table 3). LFA 키트 3종은 IgM에서 46.1%–61.1%의 민감도를 보였고 IgG에서는 87.6%–88.1%의 민감도를 보였다. CLIA 시약 중 ACCESS SARS-CoV-2는 IgM에서 72.0%의 민감도를 보였고 IgG에서는 85.0%의 민감도를 보였다. Elecsys 시약은 N 항체에서 86.0%의 민감도, S 항체에서 85.5%의 민감도를 보였다. LFA 키트의 IgM에 대한 특이도는 97.9%–100.0%였고 IgG에 대한 특이도는 94.7%–97.9%였다. ACCESS 시약은 IgM에서 100.0%의 특이도, IgG에서 98.9%의 특이도를 보였다. Elecsys 시약의 특이도는 N 항체 100.0%, S 항체 100.0%로 나타났다.

WonMed COVID-19 키트 및 careUS COVID-19 키트는 IgG에

Table 2. Manufacturer-provided clinical sensitivity/clinical and analytical specificity

Kit	Antibody	Sample type	Capture antigen	Assay type
WonMed COVID-19 kit [10]	IgM	Serum, plasma	S1 RBD domain	Gold conjugate LFA
	IgG	Serum, plasma	N	Gold conjugate LFA
careUS COVID-19 IgM/IgG kit [11]	IgM	Serum, plasma	N	Gold conjugate LFA
	IgG	Serum, plasma	N	Gold conjugate LFA
STANDARD Q COVID-19 IgM/IgG Plus [12]	IgM	Serum, plasma, whole blood	N, S	Gold conjugate LFA
	IgG	Serum, plasma, whole blood	N, S	Gold conjugate LFA
ACCESS SARS-CoV-2 IgM/IgG [13,14]	IgM	Serum, plasma	S1 RBD domain	CLIA
	IgG	Serum, plasma	S1 RBD domain	CLIA
Anti-SARS-CoV2 Elecsys [15,16]	Total	Serum, plasma	N	ECLIA
	Total	Serum, plasma	S1 RBD domain	ECLIA

The instruments used were from the following companies: Wonmed (Bucheon, Korea); WELLS BIO (Seoul, Korea); SD Biosensors (Suwon, Korea); Beckman Coulter (Brea, CA, USA); and Roche (Basel, Switzerland).

Abbreviations: IgM, immunoglobulin M; S, spike; RBD, receptor binding domain; LFA, lateral flow assay; IgG, immunoglobulin G; N, nucleocapsid; CLIA, chemiluminescent immunoassay; ECLIA, electrochemiluminescence immunoassay.

Table 3. Sensitivity, specificity, PPV, and NPV with RT-PCR technique of three LFA kits and two CLIA reagents

Kit	Antibody	Comparator (RT-PCR)		Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
		Positive	Negative				
WonMed COVID-19	IgM+	103	2	53.4% (46.1%–60.5%)	97.9% (91.8%–99.6%)	98.1% (92.6%–99.7%)	50.6% (43.1%–58.0%)
	IgM–	90	92				
	IgG+	169	5	87.6% (61.9%–91.7%)	94.7% (87.5%–98.0%)	97.1% (93.1%–98.9%)	78.8% (69.9%–85.7%)
	IgG–	24	89				
careUS COVID-19 IgM/IgG	IgM+	118	1	61.1% (53.8%–68.0%)	98.9% (93.4%–99.9%)	99.2% (94.7%–100.0%)	55.4% (47.5%–63.0%)
	IgM–	75	93				
	IgG+	169	5	87.6% (81.9%–91.7%)	94.7% (87.5%–98.0%)	97.1% (93.1%–98.9%)	78.8% (69.9%–85.7%)
	IgG–	24	89				
STANDARD Q COVID-19 IgM/IgG Plus	IgM+	89	0	46.1% (39.0%–53.4%)	100.0% (95.1%–100.0%)	100.0% (94.8%–100.0%)	47.5% (40.4%–54.7%)
	IgM–	104	94				
	IgG+	170	2	88.1% (82.5%–92.1%)	97.9% (91.8%–99.6%)	98.8% (95.4%–99.8%)	80.0% (71.3%–86.7%)
	IgG–	23	92				
ACCESS SARS-CoV-2 IgM/IgG	IgM+	139	0	72.0% (65.0%–78.1%)	100.0% (95.1%–100.0%)	100.0% (96.6%–100.0%)	63.5% (55.2%–71.2%)
	IgM–	54	94				
	IgG+	164	1	85.0% (79.0%–89.6%)	98.9% (93.4%–99.9%)	99.4% (96.2%–100.0%)	76.2% (67.5%–83.3%)
	IgG–	29	93				
Anti-SARS-CoV2 Elecsys	N+	166	0	86.0% (80.1%–90.4%)	100.0% (95.1%–100.0%)	100.0% (97.2%–100.0%)	77.7% (69.0%–84.6%)
	N–	27	94				
	S+	165	0	85.5% (79.5%–90.0%)	100.0% (95.1%–100.0%)	100.0% (97.2%–100.0%)	77.0% (68.4%–84.0%)
	S–	28	94				

Values are presented as number, unless otherwise stated. The instruments used were from the following companies: Wondmed (Bucheon, Korea); WELLS BIO (Seoul, Korea); SD Biosensors (Suwon, Korea); Beckman Coulter (Brea, CA, USA); and Roche (Basel, Switzerland).
Abbreviations: PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; LFA, lateral flow assay; CLIA, chemiluminescent immunoassay; CI, confidence interval; IgM, immunoglobulin M; IgG, immunoglobulin G.

Table 4. Results of calculating the clinical sensitivity of four groups divided according to the period from symptom onset to examination

Kit	Antibody	Clinical sensitivity (95% CI)			
		Group 1*	Group 2*	Group 3*	Group 4*
WonMed COVID-19	IgM	39.5% (24.5%–56.5%)	65.8% (48.6%–79.6%)	68.0% (46.4%–84.3%)	50.0% (39.5%–60.5%)
	IgG	55.3% (38.5%–71.0%)	92.2% (77.5%–97.9%)	96.0% (77.7%–99.8%)	96.7% (90.1%–99.2%)
	IgM+IgG [†]	55.3% (38.5%–71.0%)	92.1% (77.5%–97.9%)	96.0% (77.7%–99.8%)	96.7% (90.1%–99.2%)
careUS COVID-19 IgM/IgG	IgM	42.1% (26.7%–59.1%)	76.3% (59.4%–88.0%)	76.0% (54.5%–89.8%)	58.7% (47.9%–68.7%)
	IgG	52.6% (36.0%–68.7%)	89.8% (71.1%–95.1%)	100.0% (83.4%–100.0%)	98.9% (93.2%–99.9%)
	IgM+IgG	55.3% (38.5%–71.0%)	92.1% (77.5%–97.9%)	100.0% (83.4%–100.0%)	98.9% (93.2%–99.9%)
STANDARD Q COVID-19 IgM/IgG Plus	IgM	36.8% (22.3%–54.0%)	52.6% (36.0%–68.7%)	64.0% (42.6%–81.3%)	42.4% (32.3%–53.1%)
	IgG	55.3% (38.5%–71.0%)	86.8% (71.1%–95.1%)	100.0% (83.4%–100.0%)	98.9% (93.2%–99.9%)
	IgM+IgG	60.5% (43.5%–75.5%)	86.8% (71.1%–95.1%)	100.0% (83.4%–100.0%)	98.9% (93.2%–99.9%)
ACCESS SARS-CoV-2 IgM/IgG	IgM	47.4% (31.3%–64.0%)	81.6% (62.1%–91.7%)	92.0% (72.5%–98.6%)	72.8% (62.4%–81.3%)
	IgG	50.0% (33.7%–66.3%)	78.9% (62.2%–89.8%)	100.0% (83.4%–100.0%)	97.9% (91.6%–99.6%)
	IgM+IgG	55.3% (38.5%–71.0%)	86.8% (71.1%–95.1%)	100.0% (83.4%–100.0%)	97.8% (91.6%–99.6%)
Anti-SARS-CoV2 Elecsys	N	52.6% (36.0%–68.7%)	78.9% (62.2%–89.9%)	96.0% (77.7%–99.8%)	100.0% (95.0%–100.0%)
	S	50.0% (33.7%–66.3%)	78.9% (62.2%–89.9%)	96.0% (77.7%–99.8%)	100.0% (95.0%–100.0%)
	N+S [‡]	55.3% (38.5%–71.0%)	84.2% (68.1%–93.4%)	100.0% (83.4%–100.0%)	100.0% (95.0%–100.0%)

The instruments used were from the following companies: Wonmed (Bucheon, Korea); WELLS BIO (Seoul, Korea); SD Biosensors (Suwon, Korea); Beckman Coulter (Brea, CA, USA); and Roche (Basel, Switzerland).

Abbreviations: CI, confidence interval; IgM, immunoglobulin M; IgG, immunoglobulin G; N, nucleocapsid; S, spike.

*Groups with samples collected for symptom onset from 0 to 7 days (group 1); 8 to 14 days (group 2); 15 to 21 days (group 3); 21 days or more (group 4). †Determined as positive if either IgM or IgG is positive. ‡Positive if either S or N is positive.

서 각각 5% (5/94), 5% (5/94)의 위양성을 보였고 STANDARD Q CoVID-19 키트는 2% (2/94)의 위양성을 보였다. IgM에서는 WonMed 키트가 2% (2/94), careUS 키트가 1% (1/94), STANDARD Q 키트는 위양성을 보이지 않았다. CLIA 시약 중에서는 ACCESS SARS-CoV-2 시약이 IgG에서 1% (1/94) 위양성을 보였고 Elecsys 시약은 위양성을 보인 검체가 없었다.

양성 환자를 증상 발현 후 검사 일시까지의 기간별로 4개의 그룹으로 나누어 보았을 때(Table 4), 대부분의 키트 및 시약이 항체가 충분히 생성되기 전의 기간인 7-14일 전에서 임상적 민감도가 낮게 나타났다. 그룹 1과 그룹 2 사이에는 임상적 민감도의 차이가 있었고($P=0.008$), 그룹 2와 그룹 3 간에는 차이가 뚜렷하지 않았으며($P=0.292$) 그룹 3과 그룹 4 간에도 차이가 관찰되지 않았다($P=0.317$). 그룹 1에서 2, 그룹 3에서 4의 두 그룹을 비교했을 때는 임상적 민감도에 뚜렷한 차이가 있어($P=0.007$) LFA 및 CLIA 기법 모두 그룹3 이후의 검체에서 민감도가 높게 나타났다.

Elecsys 시약은 그룹 3, 그룹 4의 검체에서 N, S 항체 검사 모두

96.0%, 100%의 민감도를 보여 항원의 종류-N, S 여부에 관계 없이 항체 형성은 2주가 지나면 검출에 충분한 정도로 형성되는 것으로 보인다. Elecsys 검사는 IgM, IgG 를 구분할 수 없기 때문에 항체의 subtype에 따른 차이는 확인할 수 없었다.

ACCESS SARS-CoV-2 에 대한 본 연구의 데이터에서는 전체 검체를 대상으로 했을 때 IgM의 민감도 71.9%, IgG의 민감도 83.9%를 보였으며 역시 그룹 1에서는 각각 47.5%, 47.5%로 낮은 민감도를 보였다. 14일 이후의 검체를 대상으로 했을 때는 IgM 77.5%, IgG 98.3%의 민감도로, IgG가 IgM보다 더 민감하였다. 환자에 따라 IgM의 형성 정도에는 차이가 있었다.

증상 발현 후 2주 이전의 그룹 1과 그룹 2 사이에서 IgM ($P=0.009$)은 먼저 통계적으로 유의한 차이를 보였고, IgG ($P=0.233$)는 통계적으로 유의한 차이가 보이지 않았다. 그룹 2와 그룹 3 간에 IgM은 뚜렷한 증가를 확인할 수 없었으며($P=0.279$), IgG는 그룹 2와 3 사이를 기준으로 항체 검출이 증가했다($P<0.001$).

각 키트 및 시약별 결과의 일치도를 조사한 결과, IgM에서

Table 5. Cohen's kappa (95% confidence interval) concordance between each kit and reagent

	WonMed	careUS	STANDARD Q	ACCESS	Elecsys
IgM					
WonMed	-				
careUS	0.766 (0.691-0.842)	-			
STANDARD Q	0.674 (0.584-0.764)	0.687 (0.602-0.772)	-		
ACCESS	0.621 (0.532-0.709)	0.790 (0.716-0.860)	0.619 (0.534-0.705)	-	
RT-PCR	0.413 (0.331-0.495)	0.500 (0.516-0.584)	0.359 (0.284-0.435)	0.628 (0.545-0.711)	
IgG					
WonMed	-				
careUS	0.898 (0.846-0.950)	-			
STANDARD Q	0.913 (0.864-0.961)	0.942 (0.902-0.982)	-		
ACCESS	0.892 (0.839-0.945)	0.878 (0.821-0.934)	0.892 (0.839-0.945)	-	
RT-PCR	0.782 (0.708-0.856)	0.782 (0.708-0.856)	0.813 (0.744-0.882)	0.780 (0.706-0.853)	
Total*					
WonMed	-				
careUS	0.897 (0.845-0.950)	-			
STANDARD Q	0.927 (0.883-0.971)	0.927 (0.882-0.971)	-		
ACCESS	0.898 (0.847-0.950)	0.883 (0.828-0.939)	0.913 (0.865-0.961)	-	
Elecsys [†]	0.869 (0.821-0.918)	0.898 (0.855-0.941)	0.928 (0.883-0.972)	0.942 (0.903-0.982)	-
RT-PCR	0.782 (0.708-0.856)	0.795 (0.734-0.855)	0.827 (0.771-0.883)	0.814 (0.745-0.883)	0.829 (0.763-0.895)

The instruments used were from the following companies: Wonmed (Bucheon, Korea); WELLS BIO (Seoul, Korea); SD Biosensors (Suwon, Korea); Beckman Coulter (Brea, CA, USA); and Roche (Basel, Switzerland).

Abbreviations: IgM, immunoglobulin M; IgG, immunoglobulin G; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction.

*Determined as positive if either IgM or IgG was positive. [†]Positive if either spike or nucleocapsid was positive.

0.619–0.790의 일치도를 보였고 대부분 중등도에서 좋은 일치도를 보였고(Table 5), RT-PCR과는 다소 낮은 일치도를 보였고(0.359–0.628). IgG에서는 0.878–0.942의 좋은 일치도를 보였고 RT-PCR과는 0.780–0.813의 일치도였다. IgM 혹은 IgG 둘 중 하나에서만 양성인 경우를 전체 양성으로 판정하였을 때, 역시 0.883–0.927로 좋은 일치도를 보였으며, Elecsys에서 N 혹은 S 항원 양성을 전체 양성으로 판정했을 경우와도 아주 좋은 일치도(0.829–0.942)를 보였다. RT-PCR과 전체 양성 일치도 또한 좋음에서 아주 좋은 일치도(0.782–0.829)를 보였다.

고찰

지금까지 보고된 바에 의하면 IgG는 증상 발현 후 12–15일, IgM은 4–14일, IgA는 4–24일 가량이 검출되기 시작하는 평균 혹은 중앙값이다[17]. 항체가 검출되는 기간에 대해서는 다양한 보고가 있으나 IgM의 경우 정점까지 증가했다가 증상 발현 후 3–5주부터 감소하기 시작하며, IgG의 경우 증상 발현 후 50일 전후로 정점까지 증가한 이후 비교적 평탄하게 감소하며 7개월 이후까지도 검출이 보고되어 있다[18–20].

LFA 키트에 대한 타 연구의 민감도는 52.8%–94.6%로 보고되어 본 연구와 유사했다[7,21,22]. IgM 또는 IgG 둘 중 하나만 양성이어도 양성으로 판정했을 때 증상 발현 후 15일 이후의 결과는 88.0%까지 상승하는 소견을 공통적으로 보였고[23], 타 연구에서도 IgM을 단독으로 보았을 때 민감도가 32.5%–76.1%, IgG를 단독으로 보았을 때 53.7%–85.9%로 보고되어 있어 본 연구의 민감도와 유사했다[21,24]. CLIA 방식의 검사 민감도는 79.9%–94.4%, 그 중에서 Anti-SARS-CoV2 Elecsys의 민감도는 94.95%로 본 연구의 2주 이상 검체를 대상으로 했을 때의 결과와 유사하다[7,21]. 평가한 키트와 시약의 종류에는 다소 차이가 있으나, 전체적인 임상적 유용도는 유사할 것으로 생각된다.

위양성 중 교차반응으로 의심되는 결과가 WonMed kit 및 ACCESS SARS-CoV-2 IgG 시약에서 1건 확인되었다. 해당 환자는 ANA에서 nuclear membranous pattern으로 강양성(>1:5,120)을 보였으며, 추출핵항원(extractable nuclear antigen, ENA)에서 U1-nuclear ribonucleoprotein (nRNP), anti-Ro, anti-double-stranded DNA (dsDNA), anti-centromere protein B에서 양성을 보였다. 그러나 ANA 정량에서 1:2,560 이상의 강양성을 보인 다른 환자 3인에서는 교차반응이 보이지 않았으며, 교차반응이 확인된 검체에서만 양성을 보인 ENA 결과는 U1-nRNP, anti-dsDNA였다. U1-nRNP 항체는 U1 ribonucleoprotein (RNP)에 대한 항체로, 바이러스 또한 RNP로 구성되어 있으므로 이에 대한 높은 항체가 혈청학적 검사에

서 검출된 것으로 생각된다. dsDNA 항체 또한 바이러스 구성 성분인 핵산에 대한 항체로 교차반응을 일으킨 것으로 보인다. 그러나 과거 감염의 가능성 또한 배제할 수 없다. ACCESS SARS-CoV-2 IgG 시약과 Elecsys S 시약 모두 바이러스의 S1 항원 중 receptor binding domain에 대한 항체를 검출하는 시약이므로 교차반응의 차이는 추가적인 확인이 필요하다. 그 외 hepatitis A virus antibody, anti-HCV, HIV antigen, HIV antibody와는 교차반응을 관찰할 수 없었다.

또한 LFA의 위양성 검체 중 2건은 특이 병력 없는 환자의 검체로 세 종류의 LFA 키트 모두에서 IgM 음성, IgG 양성을 보였고, CLIA 시약을 사용한 검사에서는 모두 음성을 보였다. 다만, ACCESS SARS-CoV-2 IgG에서 0.96, 0.79로 optical density 값이 cutoff 미만이었으나 다른 음성 환자보다 다소 높은 양상을 보였고 Elecsys 시약에서는 S는 두 건 모두 0.4 미만, N은 각각 0.132, 0.080으로 음성을 보였다. 상기한 결과는 과거 COVID-19 감염으로 인해 생성된 항체에 의한 LFA 진양성일 가능성도 있으나, CLIA 법에서는 둘 모두 음성을 보여 가능성은 다소 떨어지며, SARS-CoV-2 외의 코로나 바이러스 감염에서도 IgG ELISA 양성을 보인 보고도 있어 주의가 필요하다[25,26].

WonMed COVID-19 키트의 재검률이 20%로 다른 키트에 비해 높았다. 재검률이 높은 사유 중 하나는 버퍼의 이동거리가 다른 키트에 비해 길어 control line까지 온전히 검체가 도달하기 전에 건조되어 버린다는 점이다. 일부 버퍼가 전혀 이동하지 않는 불량도 수 건 확인되었다. 적정량의 버퍼 사용과 검사자의 숙련도가 검사 성공률을 다소 상승시킬 수 있을 것으로 생각되나, 빠른 건조 문제는 해결하지 못했다. 검체 접종위치와 버퍼 접종위치가 다른 점이 많은 검체를 검사할 때 오염률을 줄이는 것에 도움이 될 것이나, 버퍼의 이동거리를 늘린다는 한계가 있었다. WonMed 키트가 재검률이 높았으나, LFA 키트 전체의 일치도는 IgM의 kappa 계수 0.620 (95% confidence interval [CI], 0.618–0.623; $P<0.001$), IgG의 kappa 계수 0.830 (95% CI, 0.827–0.832; $P<0.001$)로 높은 일치도를 보였으며, 민감도와 특이도 또한 다른 키트와 유사하여 성능적으로 큰 차이는 없을 것이다.

각 키트 및 시약의 일치도는 IgM에서 다소 낮고 IgG에서 좋은 일치도를 보였고 WonMed 키트도 유사한 일치도였다. 그러나 IgM 혹은 IgG 단일로 판정하기보다 IgM+IgG 양성의 kappa 계수가 뚜렷하게 좋은 일치도로 나타나 임상적으로는 IgM+IgG 양성을 참고해야 할 것이다. Elecsys 시약의 경우 비교대상 중 유일하게 IgM, IgG를 구분할 수 없으나 N+S 양성을 비교했을 때 모두 아주 좋은 일치도를 보여 임상적 사용에 유용할 것으로 보인다.

본 연구에서는 LFA 키트 3종과 CLIA 시약 2종을 비교하여 분석한 정보를 제공한다. LFA 키트는 특별한 장비가 없어도 어디서든

사용이 가능하지만, CLIA 시약은 적절한 설비가 필요하다. 혈청학적 유병률, 감염 후 혈청학적 반응 확인 등을 위해 검사방법을 선택할 때 필요한 성능 비교평가의 제시가 본 연구의 목적이다.

모든 키트 및 시약은 증상 발현 후 14일 이후의 검사에서 충분한 민감도를 보이며 특히 7일 전인 그룹 1의 민감도는 55.3%~60.5%에 불과해 해당 시기의 환자에서는 혈청학적 검사 외의 RT-PCR과 같은 검사를 통해 환자의 상태를 확인하는 것이 적절할 것이다. 특이도는 모든 검체에 대해 모든 검사가 높은 특이도를 보였으나, 일부 위양성을 보여 이에 대한 주의가 필요하다. 이와 같이 혈청학적 검사를 할 때 IgM과 IgG를 함께 확인해야 충분한 임상적 민감도를 얻을 수 있을 것이며, 검사 시점 또한 주의하여 적용하여야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 대한임상검사정도관리협회의 2021년 학술연구비 지원

원을 받아 시행한 결과를 바탕으로 작성되었다(과제번호: 2021-005).

ORCID

Wooyong Shin	https://orcid.org/0000-0001-5588-6919
Hae In Bang	https://orcid.org/0000-0001-7854-3011
Geun Young Yu	https://orcid.org/0000-0002-0089-031X
Mi-Young Kim	https://orcid.org/0000-0002-8359-2392
Eui Young Jang	https://orcid.org/0000-0001-5411-6293
Jung-Ah Kim	https://orcid.org/0000-0003-1295-4728
Jieun Kim	https://orcid.org/0000-0002-7794-3475
Rojin Park	https://orcid.org/0000-0003-2866-037X
Jeong Won Shin	https://orcid.org/0000-0001-6913-4793
Tae Youn Choi	https://orcid.org/0000-0002-1950-8010

REFERENCES

1. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* 2020;323:1239-42.
2. Weiss P, Murdoch DR. Clinical course and mortality risk of severe COVID-19. *Lancet* 2020;395:1014-5.
3. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. Diagnostic testing for severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2: a narrative review. *Ann Intern Med* 2020;172:726-34.
4. 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.
5. Boger B, Fachi MM, Vilhena RO, Cobre AF, Tonin FS, Pontarolo R. Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19. *Am J Infect Control* 2021;49:21-9.
6. Kandel C, Zheng J, McCreedy J, Serbanescu MA, Racher H, Desaulnier M, et al. Detection of SARS-CoV-2 from saliva as compared to nasopharyngeal swabs in outpatients. *Viruses* 2020;12:1314.
7. Weidner L, Gansdorfer S, Unterweger S, Weseslindtner L, Drexler C, Farcet M, et al. Quantification of SARS-CoV-2 antibodies with eight commercially available immunoassays. *J Clin Virol* 2020;129:104540.
8. Bohn MK, Loh TP, Wang CB, Mueller R, Koch D, Sethi S, et al. IFCC interim guidelines on serological testing of antibodies against SARS-CoV-2. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:2001-8.
9. Premraj A, Aleyas AG, Nautiyal B, Rasool TJ. Nucleic acid and immunological diagnostics for SARS-CoV-2: processes, platforms and pitfalls. *Diagnostics (Basel)* 2020;10:866.
10. Wonmed. WonMed Covid-19 IgG/IgM. http://www.wonmed.com/page/product01_03_02 (Accessed March 19, 2021).
11. WELLS BIO. CareUS COVID-19 IgM/IgG. http://www.wellsbio.net/eng/goods/view.asp?idx=79&category=5&search_type=0&search_word=&page_size=8&page=1 (Accessed March 19, 2021).
12. SD Biosensor. STANDARD Q COVID-19 IgM/IgG Plus test. https://www.sdbiosensor.com/product/product_view?product_no=239 (Accessed March 19, 2021).

13. Beckman Coulter. ACCESS SARS-CoV-2 IgM Antibody Test. <https://www.beckmancoulter.com/products/immunoassay/access-sars-cov-2-igm-antibody-test> (Accessed March 19, 2021).
14. Beckman Coulter. ACCESS SARS-CoV-2 IgG Antibody Test. <https://www.beckmancoulter.com/products/immunoassay/access-sars-cov-2-igg-antibody-test> (Accessed March 19, 2021).
15. Roche Diagnostics. Elecsys Anti-SARS-CoV-2. <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/elecsys-anti-sars-cov-2.html> (Accessed March 19, 2021).
16. Roche Diagnostics. Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S. <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/elecsys-anti-sars-cov-2-s.html> (Accessed March 19, 2021).
17. Post N, Eddy D, Huntley C, van Schalkwyk M, Shrotri M, Leeman D, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: a systematic review. *PLoS One* 2020;15:e0244126.
18. Fung M, Chiu CY, DeVoe C, Doernberg SB, Schwartz BS, Langelier C, et al. Clinical outcomes and serologic response in solid organ transplant recipients with COVID-19: a case series from the United States. *Am J Transplant* 2020;20:3225-33.
19. Lee YL, Liao CH, Liu PY, Cheng CY, Chung MY, Liu CE, et al. Dynamics of anti-SARS-Cov-2 IgM and IgG antibodies among COVID-19 patients. *J Infect* 2020;81:e55-8.
20. Ortega N, Ribes M, Vidal M, Rubio R, Aguilar R, Williams S, et al. Seven-month kinetics of SARS-CoV-2 antibodies and role of pre-existing antibodies to human coronaviruses. *Nat Commun* 2021;12:4740.
21. Kontou PI, Braliou GG, Dimou NL, Nikolopoulos G, Bagos PG. Antibody tests in detecting SARS-CoV-2 infection: a meta-analysis. *Diagnostics (Basel)* 2020;10:319.
22. Trombetta BA, Kandigian SE, Kitchen RR, Grauwet K, Webb PK, Miller GA, et al. Evaluation of serological lateral flow assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus-2. *BMC Infect Dis* 2021;21:580.
23. Perez-Garcia F, Perez-Tanoira R, Romanyk J, Arroyo T, Gomez-Herruz P, Cuadros-Gonzalez J. Alltest rapid lateral flow immunoassays is reliable in diagnosing SARS-CoV-2 infection from 14 days after symptom onset: a prospective single-center study. *J Clin Virol* 2020;129:104473.
24. Serrano MM, Rodriguez DN, Palop NT, Arenas RO, Cordoba MM, Mochon M, et al. Comparison of commercial lateral flow immunoassays and ELISA for SARS-CoV-2 antibody detection. *J Clin Virol* 2020;129:104529.
25. Chaudhury S, Hutter J, Bolton JS, Hakre S, Mose E, Wooten A, et al. Serological profiles of pan-coronavirus-specific responses in COVID-19 patients using a multiplexed electro-chemiluminescence-based testing platform. *PLoS One* 2021;16:e0252628.
26. Ng KW, Faulkner N, Cornish GH, Rosa A, Harvey R, Hussain S, et al. Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *Science* 2020;370:1339-43.