

## Review Article

## 바이러스 유전자 검사 표준물질의 종류, 제조 및 검증

조은정<sup>1</sup>, 이은진<sup>1</sup>, 차영길<sup>2,3</sup>, 이누리<sup>1</sup>, 홍기호<sup>4</sup>, 허희진<sup>5</sup>, 차영주<sup>6</sup>, 김현수<sup>1</sup><sup>1</sup>한림대학교 의과대학 진단검사의학교실, <sup>2</sup>바이오니아 진단과학시약연구소, <sup>3</sup>강원대학교 약학대학, <sup>4</sup>서울의료원 진단검사의학과, <sup>5</sup>동국대학교 의과대학 진단검사의학교실, <sup>6</sup>중앙대학교 의과대학 진단검사의학교실

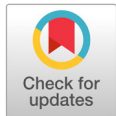
## Types, Production and Validation of Reference Materials for Viral Genetic Testing

Eun-Jung Cho<sup>1</sup>, Eun Jin Lee<sup>1</sup>, Younggil Cha<sup>2,3</sup>, Nuri Lee<sup>1</sup>, Ki Ho Hong<sup>4</sup>, Hee Jin Huh<sup>5</sup>, Young Joo Cha<sup>6</sup>, Hyun Soo Kim<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, Hallym University College of Medicine, Chuncheon, <sup>2</sup>Molecular Diagnostic Division, Bioneer Corp., Seoul, <sup>3</sup>College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon, <sup>4</sup>Department of Laboratory Medicine, Seoul Medical Center, Seoul, <sup>5</sup>Department of Laboratory Medicine, Dongguk University College of Medicine, Goyang, <sup>6</sup>Department of Laboratory Medicine, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

## ABSTRACT

Molecular diagnostic techniques are used for the diagnosis and monitoring of viral infections. The performance of the *in vitro* diagnostic assays is important for an accurate and prompt diagnosis. Positive clinical samples or reference materials (RMs) are essential for the development, validation, and verification of the assays for molecular diagnostics-based virus detection. Since it is difficult to obtain positive clinical samples, the need for RMs with required properties is increasing. In this review, the types, manufacturing methods, and verification of RMs for genetic testing of virus are discussed along with the producers involved in their production, sale, and distribution.

**Keywords:** *In vitro* diagnostic test, Reference material, Viruses



## OPEN ACCESS

pISSN : 2288-0585  
eISSN : 2288-6850

Ann Clin Microbiol 2020 March, 23(2): 57-66  
<https://doi.org/10.5145/ACM.2020.23.2.2>

## Corresponding author

Hyun Soo Kim

E-mail: [hskim0901@empas.com](mailto:hskim0901@empas.com)

Tel: +82-31-8086-2775

Fax: +82-31-8086-2789

Received: November 1, 2019

Revised: December 24, 2019

Accepted: December 24, 2019

© 2020 Korean Society of Clinical Microbiology.



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.

## INTRODUCTION

바이러스 유전자 검사는 바이러스 감염의 진단과 모니터링에 사용되는 검사로, 바이러스 감염의 정확한 진단을 위해서는 진단 제품의 정확도, 정밀도 등의 검사법의 성능이 중요하다. 체외 진단 제품의 성능을 검증하고 평가하기 위해서는 참값이 확인된 바이러스 양성 및 음성 검체가 필요하지만 양성 검체를 구하기 어려우므로 참값이 검증된 표준물질(reference material)에 대한 필요성이 높아지고 있다. 바이러스 양성 표준물질을 생산 및 공급하는 대표적인 국제 기관으로는 NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control; 영국) [1], ATCC (American Type Culture Collection; 미국) [2] 등이 있다. 이들 국제 표준물질은 소량임에도 불구하고 가격이 매우 고가이고, 주문 후 제품을 받기까지 오랜 시간이 소요되며, 제품 수령 후 유효기간이 짧아 안정적인 공급이 어려운 단점이 있다. 국내에서도 질병관리본부와 식품의약품안전처에서 바이러스 표준물질

을 개발하여 보급하고 있으나 아직은 그 종류가 많지 않다. 이 논문에서는 바이러스 유전자 표준물질의 종류, 제조 방법 및 검증방법에 대하여 고찰하고 바이러스 유전자 표준물질의 제조, 판매 및 분양처에 대하여 살펴봄으로써, 바이러스 유전자 표준물질에 대한 기본적인 지식과 국내 연구자들이 체외진단기기 성능평가에 이용할 수 있는 바이러스 표준물질의 정보를 제공하고자 하였다.

## 바이러스 유전자 표준물질의 종류 및 제조방법

### 1. 바이러스 유전자 표준물질의 유전자형 및 유전자 부위

대부분의 바이러스는 혈청형과 유전자형이 다양하므로 바이러스 양성 표준물질을 제조, 판매, 분양하는 경우 바이러스 양성 표준물질에 혈청형 또는 유전자형이 표시되는 것이 바람직하다[3]. 그러나 현재 판매되거나 분양되고 있는 많은 바이러스 표준물질이나 정도관리 물질의 경우 혈청형이나 유전자형 정보 없이 특정 바이러스 양성 정도로만 기재되어 있는 경우가 대부분이다. 바이러스 유전자 표준물질은 표준물질의 성상에 따라 환자 검체, 바이러스 배양액, 핵산 추출액, 합성 유전자, 바이러스 유사 입자, 유전자변형 세포주 등으로 분류할 수 있으며[4], 전체 유전자가 아닌 일부 유전자를 제조할 경우에는 합성할 유전자 부위와 염기서열을 결정해야 한다. 합성할 유전자 부위와 염기서열은 여러 검사법에서 공통적으로 검출되는 유전자 부위를 포함하며, 각 시약의 프라이머가 상보적으로 결합할 수 있는 염기서열이 포함되어야 한다. 바이러스 유전자 검출 시약은 제조사마다 고유의 프라이머 세트들을 사용하게 되는데 표준물질의 유전자 염기서열과 시약에 사용되는 프라이머 염기서열의 일치 여부에 따라 바이러스 양성 표준물질을 측정해도 특정 시약에서 양성으로 나타나지 않을 수 있다. 그러므로 바이러스 유전자 검출 시약의 성능 검증용 또는 정도관리를 바이러스 양성 표준물질을 제작하려는 경우 다양한 혈청형이나 유전자형을 각각 제작하는 것이 가장 이상적이겠으나 다양한 혈청형이나 유전자형을 모두 제작하는 것은 현실적으로 불가능하므로 여러가지 시약에서 검출될 수 있도록 대표적인 혈청형/유전자형을 선택하여 제작하여야 하며, 이 경우 사용목적, 검출되는 유전형, 유전자부위, 검증 내용 등이 바이러스 표준물질 설명서에 기술되는 것이 필요하다.

### 2. 자연 상태에서 유래된 바이러스 유전자 표준물질

#### 1) 환자 검체

바이러스가 높은 역가로 존재하는 환자 검체를 이용하여 표준물질을 제조할 수 있으며, 환자 검체를 정제하여 그대로 냉동하거나 동결건조(lyophilization)하여 표준물질로 사용할 수 있다 [5,6]. 제조 방법은 높은 농도를 가진 바이러스 양성 환자에게 혈액 또는 검체를 기증받아 제조하며, 필요한 경우 음성 환자 검체로 희석하여 대량으로 만든 후 각 용기에 분주하여 냉동(건조)한다. 환자 검체 유래 표준물질은 정성적인 또는 정량적인 목적으로 제조할 수 있는데 정량적 표준물질로 사용할 경우에는 여러 검사실에서 표준물질의 바이러스 농도를 측정하고 검증한 결과가 표준물질 설명서에 기술되어야 한다. 환자 검체 유래 바이러스 유전자 표준물질의 대표적

인 예로 WHO 국제 표준물질을 들 수 있으며, NIBSC [1], Paul-Ehrlich-Institut (PEI) [7]등에서 제조한 A형 간염바이러스(Hepatitis A virus, HAV) RNA (NIBSC 00/562), B형 간염바이러스(Hepatitis B virus, HBV) DNA (NIBSC 10/264, 10/266), C형 간염바이러스(Hepatitis C virus, HCV) RNA (NIBSC 14/150), D형 간염바이러스(Hepatitis D virus, HDV) RNA (PEI 7657/12), E형 간염바이러스(Hepatitis E virus, HEV) RNA (PEI 8758/13, 10/6329), Parvovirus B19 DNA (NIBSC 12/208) 등을 들 수 있다. 정량적 WHO 국제 표준물질의 바이러스 농도는 IU/mL 국제 표준 단위로 표시되어 있다. 국내 식품의약품안전처의 환자 검체 유래 바이러스 유전자 표준물질로는 HBV DNA (IVD-12/019), HCV RNA (IVD-12/021), 인간 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)-1 RNA (IVD-12/007) 등이 있다.

### 2) 바이러스 배양액

환자 검체에서 분리된 바이러스를 배양하여 양성 표준물질로 이용할 수 있다. 바이러스 배양액으로 표준물질을 만들 경우에는, 바이러스를 적절한 세포주에 배양하여 모든 세포가 세포병변효과(cytopathic effect)를 보일 때까지 배양과 수확을 반복한다. 모든 세포가 세포 변성을 보이면 저속에서 원심분리하여 상층액을 취한 다음 다시 초고속에서 원심분리한 후 침사를 사용하며, 침사는 원하는 농도를 얻고 기질 효과를 최소화하기 위해 환자 검체 또는 완충액에 희석하여 냉동(건조)한다 [5,6,8]. 바이러스 배양액을 이용하여 바이러스 표준물질을 제조하는 과정에서는 환경에 있던 바이러스의 오염을 방지하고, 원 출처에서 유래한 바이러스 외에는 철저히 무균성을 유지하는 것이 중요하다. 이상의 과정을 거쳐서 만들어진 바이러스 표준물질은 정성적인 또는 정량적인 목적으로 제조될 수 있는데 정량적 목적으로 만들 때에는 개발된 표준물질의 후보를 여러 실험실에서 공동으로 평가하는 과정이 필수적이다 [5,6,9]. 바이러스 배양액 유래 바이러스 유전자 표준물질의 예로 WHO 국제표준물질 중 HIV RNA (NIBSC 16/194), chikungunya virus RNA (PEI 11785/16), Epstein-Barr virus DNA (NIBSC 09/260), human cytomegalovirus DNA (NIBSC 09/162), human herpes virus 6B DNA (NIBSC 15/266), JC polyomavirus DNA (NIBSC 14/114) 등을 들 수 있으며, 배양된 바이러스를 음성 환자 혈장 또는 완충액에 희석하여 제조되었다. ATCC [2]에 가장 많은 종류의 살아있는 바이러스가 보관되어 있으며 분양받아 계대배양이 가능하다. 국내 국가병원체 자원은행(<http://www.nih.go.kr/menu.es?mid=a40403010000>)에도 여러 종류의 바이러스가 보관되어 있고 분양이 가능하다.

### 3) 바이러스 핵산 추출액

바이러스 배양액 또는 환자 검체에서 바이러스 핵산을 추출하여 제조한다. 대표적인 예로 국내 식품의약품안전처 표준물질로 로타바이러스 배양액에서 유전자를 추출하여 제조한 로타바이러스 유전자(RNA)(IVD-12/002)와 미국 ATCC의 다양한 바이러스의 DNA/RNA 등을 들 수 있다.

### 3. 인공적으로 제조된 바이러스 유전자 표준물질

바이러스 유전자 표준물질 중 자연상태로부터 유래되지 않은 표준물질을 Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) MM17-A 가이드라인에서는[4] 증폭산물(amplicons), 체외전사물(*in vitro* transcripts), 합성 올리고뉴클레오티드(synthetic oligonucleotides), 재조합 DNA(recombinant DNA), 플라스미드(plasmids), 핵산함유 파지 및 파지단백질(phage and phage protein packaged nucleic acid), 유전자변형 세포주(genetically modified cell lines) 등으로 세분하여 기술하였으나 실제로는 증폭산물, 체외전사물, 합성 올리고뉴클레오티드, 재조합 DNA, 플라스미드 등으로 정확하게 나누어 구분하기 어렵고 여러 방법이 혼합되어 표준물질이 만들어지고 있다. 여기서는 인공적으로 제조된 바이러스 유전자 표준물질로 많이 사용되고 있는 합성 유전자 및 플라스미드와 바이러스 유사 입자(virus-like particle)를 설명하였다.

#### 1) 합성 유전자 및 플라스미드

합성 올리고뉴클레오티드를 이용하여 바이러스 유전자를 생산하는 기술은 Khorana 등에 의해 개발되었다[10]. 수백 base pair 크기의 여러 조각 올리고뉴클레오티드를 제작하여 적당한 벡터에 재조합시키면 특정한 바이러스 유전자 염기서열을 얻을 수 있다. 이렇게 만들어진 유전자는 DNA 이기 때문에 RNA는 만들어진 DNA를 활용하여 체외전사물로 RNA를 만든다. 증폭산물을 이용하여 합성하는 RNA는 nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) 등을 통해 RNA 바이러스부터 RNA를 합성하며, 이를 표준물질로 활용한다[4,11]. DNA로부터 RNA를 합성하는 경우 T7, SP6 등의 중합효소(polymerase)를 활용하여 RNA를 합성하여 표준물질로 활용한다[12]. 증폭산물이나 체외전사물을 표준물질로 사용할 수 있지만 증폭산물은 PCR 후 연구실의 오염으로 인한 위양성 결과가 나타날 수 있다[13]. 다른 합성 방법인 합성 올리고뉴클레오티드는 phosphoramidites 등의 화학물질을 이용하여 합성하며[14], 재조합 DNA나 플라스미드는 유전자 재조합 기술을 이용하여 서로 다른 유전자를 조합하여 합성하는 것을 의미한다[15].

많이 사용되는 방법의 하나로 길이가 수백 bp 이상이 되는 유전자의 합성은 올리고뉴클레오티드합성과 PCR을 기반으로 하여 제조하는 방법이 주로 이용된다. 이 방법은 합성된 올리고뉴클레오티드를 서로 겹치게(overlapping)한 후 PCR을 진행하여 유전자 합성을 진행한다[16]. 합성된 유전자는 cloning 기술을 이용하여 벡터(vector)에 합성된 유전자가 삽입된 플라스미드를 제조하며, *Escherichia coli* K-12같은 대장균에 삽입하여 대량으로 합성하여 사용한다. RNA의 합성은 SalI 등의 제한효소를 사용하여 플라스미드 DNA를 일렬화 한 후(linearized template), T7, SP6 등 상용화되어있는 중합효소를 사용하여 합성한다. RNA 합성 후에는 DNase I 효소를 사용하여 합성된 플라스미드를 제거하며, DNA 제거 후 상용화되어 있는 정제 시약을 사용하여 정제한다[17]. RNA 합성은 바이러스의 종류에 따라 T7, SP6 중합효소를 사용할 수 있다. RNA 바이러스는 double stranded RNA, (+) stranded RNA, (-) stranded RNA의 각 RNA의 특성에 따라 중합효소를 다르게 사용한다[18].

바이러스 합성 유전자 표준물질의 예로 WHO 국제표준물질 중 recombinant human papillomavirus (HPV) plasmid (NIBSC 06/202, 06/206)가 있으며, 미국 National Institute of Standard and Technology (NIST) [19] 바이러스 유전자 정량 표준물질로 DNA 측정을 위한 Cytomegalovirus (CMV) (SRM 2366, 2366a)와 BK virus DNA quantitative standard (SRM 2365)가 있다. WHO HPV

농도값은 IU/ampoule 로 표시된 반면, NIST의 CMV와 BK virus 유전자 표준물질은 digital PCR 로 농도를 측정하여 농도 값이 copies/ $\mu$ L 단위로 표시되어 있다. 국내 식품의약품안전처 표준물질 중 재조합 플라스미드 방식을 사용한 표준물질로는 Rotavirus Plasmid DNA (IVD-12/001), HIV-1 재조합 DNA (IVD-12/008), HBV 재조합 DNA (IVD-12/020), HCV 재조합 DNA (IVD-12/020) 가 있으며, 합성 DNA의 경우로는 인유두종바이러스(HPV) L1 DNA Human Papilloma Virus L1 DNA (08/023)가 있다. 국가병원체 자원은행의 합성 바이러스 유전자 표준물질로는 덴기열 합성 RNA nucleotide (NCCP 76109), 진드기매개뇌염바이러스(Tick-borne encephalitis virus, TBEV) RNA nucleotide (NCCP 76107) 등이 있다.

## 2) 바이러스 유사 입자(Virus-like particle, VLP)

합성 유전자의 안정성과 추출 과정(extraction procedure)에 대한 대조물질로 사용하기 위해 핵산을 캡슐화(encapsulation)한 VLP를 만들어서 표준물질 또는 정도관리물질로 이용하기도 한다. VLP는 핵산분해효소(nuclease)에 저항성을 가지고 있기 때문에 많은 연구자들이 VLP를 사용하였다 [20,21]. 지난 30년 동안 VLP는 특히 백신 분야에서 널리 알려진 기술로 발전했으며, 발표된 데이터를 분석한 결과 최소 35개과(family) 110개의 VLP가 제조되었다[22]. 일반적으로 말하는 VLP는 바이러스의 유전자가 없는 상태이며, 전염성이 없으나 실제 바이러스와 유사한 형태이기 때문에 백신으로 활용이 많이 된다[23]. 바이러스 표준물질 또는 정도관리물질로 활용되고 있는 VLP는 Lentivirus VLP, MS2-like VLP 등이 있다. Lentivirus VLP는 상용화되어 있는 lentivirus 형질주입(transfection) 벡터를 사용하며(예: pSF-lenti vector), 합성된 유전자를 lentivirus 벡터에 삽입시킨다. 삽입된 lentivirus 벡터를 human embryonic kidney (HEK) 293T세포 등에 형질 주입시켜 VLP를 제조한다[20].

제조된 VLP는 바이러스의 구조 단백질(structural protein)이 유전자에 없기 때문에 스스로 복제가 불가능하여 안정성이 높다[20]. MS2 phage는 pACYC-MS2 벡터, pACYCDuet-1 등을 사용하며, 합성된 유전자를 벡터에 삽입시킨다. 삽입된 MS2 벡터를 *Escherichia coli* strain BL21 (DE3)에 형질 전환(transformation)한 후 VLP를 제조한다 [21,24]. MS2 phage는 *E. coli*에만 감염성이 있기 때문에 인체에 대한 안정성이 높다. 표준물질로 또는 정도관리물질의 목적으로 바이러스 유사 입자들이 제조되어 판매되고 있다.

## 4. 농축 및 동결건조

동결건조 방법은 장시간 보관을 하기 위해 수분을 제거하는 방법으로, 냉동 상태에서 기압을 진공까지 낮춰서, 고체 상태의 수분이 기체로 승화해서 빠져나가게 만든다. 표준물질을 제조하기 위하여 선행 연구들은 다양한 방법을 제시하고 있다. 예를 들어 C. Davis 등에 의한 방법은[25] 동결을  $-40^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 이상, 1차 건조를  $-40^{\circ}\text{C}$ , 300mTorr 진공상태(vacuum)에서 90시간 이상 진행하며, 2차 건조는  $-40^{\circ}\text{C}$ 에서  $20^{\circ}\text{C}$ 까지 온도변화를 주면서 20시간 동안 건조하여 동결건조를 진행한 후, 질소 가스를 채워서 진공 상태를 없앤 후에 밀봉하게 된다. 수많은 연구자에 따라 동결건조 방법이 다양하게 제시되지만, 동결건조에서 온도 및 시간 조건뿐만 아니라 부형제(excipients)에 의해 동결 건조 효율이 결정된다. 부형제는 안정제, 부피감 등을 부여해주는 역할을 하며, 대부분 당류로 구성된다[26]. 이에 따라 표준물질의 동결 건조에 사용되는 부형제는 trehalose, sucrose 등의 이당류가 활용된다.



## 유전자 표준물질의 검증

### 1. 특성값 결정(Assignment of property values)

바이러스 유전자 표준물질의 경우 대부분 국제표준시험법이 확립되어 있지 않은 경우가 많으므로, 표준물질 확립 시 협의에 의해 표준시험법 및 반복회수를 결정하게 된다. 후보 표준물질은 상품화된 분석법이나 검사실 개발 검사법을 통해서 설정값이 주어질 수 있다. WHO와 ISO에서 제공하는 가이드라인에 따르면, 시험 방법 및/또는 검사실 간 합의를 바탕으로 표준 물질의 특성값을 결정하는 방법을 제안하고 있다. 특성값의 설정을 위해 단일기관 혹은 다기관에서의 반복 측정할 것을 권장하고 있다. 특성에 대하여 잘 정립된 측정 방법이 존재한다면 특성화를 위한 실험 그룹의 수를 작게 설정할 수 있으나, ISO에서 제시하는 가이드라인에 따르면, 최소 6-8개 이상의 관련된 실험실 수를 권장하고 있다[27,28]. 특성값 결정에 사용할 수 있는 측정 방법의 수는 매우 제한적인 경우가 많으므로, 가능한 경우 서로 다른 측정법의 결과를 확인하여 각각의 불확도 내에서 일치하는지 확인해야 한다. 잘 확립된 측정 방법이 존재하는 경우, 특성화에 관련된 검사실 수는 2개 또는 3개 정도로 적을 수 있다. 통계적 관리가 적으나, 기술적으로는 유효한 결과로 받아들이기 위해 적절한 경우의 최소 검사실 수는 일반적으로 6개에서 8개까지를 권장하고 있으며, 통계적, 기술적으로 유효하지 않은 결과를 보이는 경우의 최소 검사실 수는 10개 이상, 가급적 15개 이상을 권장하고 있다. 사용 가능한 1차 표준시험법이 없는 경우에는 6개의 역량있는 검사실에서 3개 검사법으로 측정하는 것이 권장되고 있다. 여기서의 검사실은 검사실 내의 다른 부서 또는 그룹이 될 수 있다. 일반적으로 적어도 이틀에 두 개의 포장 단위의 검체를 각각 6번 반복 측정하는 것을 권장하고 있다. 결과의 평균값으로 특성값을 결정할 수 있으며, 대안적으로 균질성 시험의 반복측정 결과값을 특성값으로 이용하는 방법을 고려할 수 있다. 바이러스 유전자 표준물질의 특성값을 표현하기 위한 국제적으로 공인된 SI unit 없으므로 합성 RNA의 물질 내 농도 계산(copies/ $\mu$ L) 또는 cyclus 수(threshold cycle; Ct값)의 평균값을 계산할 수 있다. 특성값, 균질성 및 안정성의 기여도를 조합하여 측정 불확도를 산출하여 최종 특성값을 결정한다.

### 2. 균질성 평가(Assessment of homogeneity)

표준물질 제조 과정 중에 표준 물질 간의 균질성을 평가할 것이 권장되고 있다[28]. 균질성은 물질을 용기에 담을 때 채우는 과정이 일정한지와 전체적으로 잘 섞였는지 확인하는 과정으로 병 간 균질성(between-bottle homogeneity)와 병 내 균질성(within-bottle homogeneity)으로 구분된다. 대부분의 표준 물질은 병, 바이알 등의 배치로 제조되며, 표준물질 제조의 마지막 단계는 사용될 병 등을 다시 세분화하여 배치에서 통상 10-30개를 소집단으로 취하 균질성 연구를 수행한다. 균질성 평가를 위해서는 측정의 추세(drift)가 시료 제조의 추세와 분리될 수 있도록 균질성 평가에 사용할 시료를 무작위로 선정하는 것을 권고하고 있으며, 반복할 때에 시료 측정 순서를 역순으로 시행하는 방법을 대안적으로 사용할 수 있다. 냉동되어 있는 검체를 농도별 각각 10 바이알씩 꺼내 해동한 후 바이알마다 3회 반복 측정된 결과값을 일원 배치 분산 분석법(ANOVA)으로 분석한다. 5% 유의 수준에서 분산 분석 결과에서 F비가 F 기각치보다 작거나, P-값이 0.05보다 크면, 95% 신뢰 수준에서 유의성이 없으며, 균질하다고 판단한다. 병간( $M_{among}$ ) 및 병내( $M_{within}$ )의 평균 제곱 값을 구한 뒤, 병간( $S_{bb}$ ) 및 병내 표준편차( $S_{wb}$ )를 다음과 같은 공식 (1)과 (2)에 따라 산출할 수 있다.

$$S_{bb} = \sqrt{S^2_{\alpha}} = \sqrt{\frac{M_{among} - M_{within}}{n_0}} \quad \text{----- (1)}$$

$$S_{wb} = \sqrt{M_{within}} \quad \text{----- (2)}$$

$S_{\alpha}$ : 병간의 분산  
 $M_{among}$ : 병간의 평균제곱  
 $M_{within}$ : 병내의 평균제곱  
 $n_0$ : 각 bottle의 분석결과 수

충분히 반복 가능한 측정 방법으로 균질성 연구를 시행하는 것이 항상 가능한 것은 아니므로 대안적으로 측정 방법의 불충분한 반복성을 고려하여 병 간 표준 불확도( $U_{bb}$ )를 공식 (3)에 따라 산출할 수 있다.

$$U_{bb} = \sqrt{\frac{M_{within}}{n}} \times 4 \sqrt{\frac{2}{VM_{within}}} \quad \text{----- (3)}$$

$M_{among}$ : 병간의 평균제곱  
 $M_{within}$ : 병내의 평균제곱  
 $n$ : 시료의 갯수  
 $VM_{within}$ :  $M_{within}$ 의 자유도 수

### 3. 안정성 평가(Assessment of stability)

이론적으로는 어떤 물질의 주어진 특성에 대하여 유효 기간내에 물질의 특성값에 변화가 없을 때 안정적이라 하며, 실제적으로는 주어진 기간 동안, 특성값의 차이를 실험적으로 구별해 낼 수 없을 때를 안정하다고 한다. 표준물질의 안정성은 1-2개월 사이의 단기 안정성 및 24-36개월 사이의 장기 안정성으로 나눌 수 있으며, 표준물질의 유효기간을 결정하기 위한 보관 기간(shelf-life) 내 안정성 시험, 시약을 사용한 이후부터 표준물질 특성 유지기간을 결정하기 위한 사용 중 (in-use) 안정성 시험, 운송 모의 시험 등으로 종류가 나뉘기도 한다. 안정성 시험은 고전적 디자인 (classic design)에 따라 시험 시작 시점에 보관 조건이 있고, 지정된 시점에 표준물질을 꺼내어 안정성을 확인할 수도 있으며, 등시 디자인(isochronous design)에 따라 다양한 조건에서 다양한 보관 기간 동안 노출된 표준물질을 동일한 방법과 동일한 검사자에 의해 검사할 수도 있다. 가속변질 시험법은 정상적 보관 조건에서 일어나는 것보다 더 빠른 시간 내 변성을 유발할 수 있는 온도, 습도, 압력, 빛 노출 등의 스트레스 환경 조건에서의 영향을 평가한다[28]. 안정성 연구에서 반복 측정 수, 조건 및 연구 기간은 다양한 요인에 따라 달라지게 된다. 측정법의 정밀도, 평가물질의 계획된 유효기간 및 모니터링 빈도, 제안된 보관 조건 하에서의 관찰, 안정성에 영향을 미치는 요인 간의 상호작용 및 추세분석의 검증 등을 고려하여 연구설계를 하는 것이 권장된다. 안정성 평가의 결과분석은 선형 회귀에 대한 분산 분석법을 이용하며, 시간에 따른 다음과 같은 선형 회귀선을 구하여 기울기와 제한치를 이용하여 안정성 평가 먼저 유의성이 있는 추세가 있는지를 확인한다.

## 바이러스 유전자 표준물질의 제조, 판매, 분양처

현재 국내외 여러 기관에서 바이러스 유전자 표준물질 또는 양성 정도 관리물질을 판매 분양하고 있다. 바이러스 유전자 표준물질 중 국제 표준물질로 인정을 받을 수 있는 최상위 개념의 1차 표준물질(primary reference materials)로는 미국 NIST의 standard reference material과 WHO의 국제참고표준물질(international reference material)을 들 수 있다. 미국 NIST[19]에서는 바이러스 유전자 정량 표준물질로 2019년 8월 현재 CMV와 BK virus 두 종류의 바이러스 유전자 표준물질이 제조 및 분양되고 있다. CMV for DNA measurements (SRM 2366)는 2011년에 만들어져서 분양되다가 2015년에 SRM 2366a로 대체되었으며, BK virus DNA quantitative standard (SRM 2365)는 합성 BK virus genome (NCBI accession No. JQ713822.1)을 합성하여 대장균에 삽입시켜 배양하고 형질 전환된 대장균으로부터 DNA를 추출해 제한효소로 처리하여 정제한 것으로 2017년에 제조되었다. 이 NIST의 바이러스 유전자 표준물질은 digital PCR로 농도를 측정하여 농도 값이 copies/ $\mu$ L 단위로 표시되었다. WHO의 바이러스 유전자 표준물질로는 HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA, HBV DNA, HAV RNA, HPV type 16 DNA, HPV type 18 DNA, BK polyomavirus DNA, chikungunya virus RNA 등이 있으며, 사람 혈청 또는 혈장으로 제조된 물질이거나 합성 및 재조합 유전자 물질로 유전자 농도 값이 국제적으로 합의된 단위인 IU/mL로 부여되어 있다. 이 WHO 바이러스 유전자 표준물질들은 품목별로 NIBSC [1] 및 PEI [7] 등의 기관에서 제조, 분양되고 있으며 매년 품목을 늘려 나가고 있다. 또한 각 국가 및 지역 단위 비영리기관에서 판매, 분양하는 바이러스 유전자 표준물질들도 있다. ATCC [2]에서는 가장 많은 종류의 바이러스 양성 물질을 구할 수 있으며 배양액, 유전자 추출액, 합성/재조합 유전자 형태로 판매되고 있으며, 그 외에 Zeptomatrix, Microbiologics, Vircell microbiologists, SeraCare 등의 업체에서 바이러스 유전자 양성 물질을 제조, 판매하고 있다.

국내에서는 식품의약품 안전평가원에서 체외진단용 의료기기 표준물질을 제작 분양하고 있으며 [29] 현재 바이러스 유전자 표준물질로는 로타바이러스, HIV-1, HBV, HCV, HPV 유전자 표준물질을 보유하고 분양하고 있다. 국가병원체 자원은행에서 인플루엔자바이러스, 지카바이러스, 노로바이러스, 로타바이러스, 아데노바이러스, 사포바이러스, 뎅기바이러스, 중증열성혈소판감소증후군바이러스 등의 바이러스 유전자 양성 물질을 보유하고 있다.

## CONCLUSION

바이러스 유전자 검사의 표준물질은 자연 상태에서 유래되었거나 인공적으로 제조된 물질로 구분되며 각각의 제조방법에 따라 종류가 다양하고, 이를 국내외 여러 기관에서 분양받거나 직접 제조 및 검증과정을 거쳐서 이용할 수 있다. 본 논문이 국내에서 다양한 표준물질을 제조하고 검증하며, 정확한 바이러스 유전자 제품의 성능을 검증하는데 유용한 기본 자료로 활용되어 향후에는 합성 유전자와 바이러스 유사 입자를 변형하여 더 많은 종류의 바이러스 유전자 표준물질이 활발하게 제조될 것으로 기대한다.



## 요약

바이러스 검사를 위한 분자 진단 기법이 바이러스 감염의 진단 및 모니터링에 사용되는 검사로 바이러스 감염의 정확하고 신속한 진단에 바이러스 체외 진단 제품의 성능이 중요하다. 바이러스 양성 임상검체 또는 표준물질은 분자 진단 기반의 바이러스 검출 검사법의 개발 및 검증에 필수적으로 요구된다. 바이러스 양성인 임상 검체를 구하기가 어려우므로 참값이 검증된 표준물질에 대한 필요성이 높아지고 있다. 본 논문에서는 바이러스 유전자 검사의 표준물질의 종류, 제조 및 검증방법과 표준물질의 제조, 판매 및 분양처에 대하여 고찰하였다.

## CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

## FUNDING

본 연구는 2019년도 식품의약품안전처의 연구개발비(19173MFDS334)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). NIBSC web site on biological reference materials. <https://www.nibsc.org/products.aspx/> [Online] (last visited on 30 November 2019).
2. ATCC. ATCC web site on biological reference materials. <https://www.atcc.org/> [Online] (last visited on 30 October 2019).
3. NCBI. NCBI web site on Virus. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/> [Online] (last visited on 3 November 2019).
4. Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI). Validation and verification of qualitative multiplex nucleic acid assays, approved guideline. CLSI document MM17. Wayne, PA: 2008.
5. Fryer JF, Heath AB, Minor PD. A collaborative study to establish the 1st WHO international standard for human cytomegalovirus for nucleic acid amplification technology. *Biologicals* 2016;44:242-51.
6. Fryer JF, Heath AB, Wilkinson DE, Minor PD. A collaborative study to establish the 1st WHO international standard for Epstein-Barr virus for nucleic acid amplification techniques. *Biologicals* 2016;44:423-33.
7. Paul-Ehrlich-Institut. Paul-Ehrlich-Institut web site on medicinal products. <https://www.pei.de/EN/home/home-node.html/> [Online] (last visited on 20 May 2020).
8. Thompson M, Bonavia A, Ehrhardt R. Virus cryopreservation protocol. *Protoc Exch* 2012. doi:10.1038/protex.2012.004.
9. Baylis SA, Blumel J, Mizusawa S, Matsubayashi K, Sakata H, Okada Y, et al. World health organization international standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA. *Emerg Infect Dis* 2013;19:729-35.
10. Khorana HG. Total synthesis of a gene. *Science* 1979;203:614-25.

11. Lanciotti RS and Kerst AJ. Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *J Clin Microbiol* 2001;39:4506-13.
12. Cazenave C and Uhlenbeck OC. RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:6972-6.
13. Kox LF, Rhienthong D, Miranda AM, Udomsantisuk N, Ellis K, van Leeuwen J, et al. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1994;32:672-8.
14. Roy S and Caruthers M. Synthesis of DNA/RNA and their analogs via phosphoramidite and H-phosphonate chemistries. *Molecules* 2013;18:14268-84.
15. Botstein D, Falco SC, Stewart SE, Brennan M, Scherer S, Stinchcomb DT, et al. Sterile host yeasts (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* 1979;8:17-24.
16. Prodromou C and Pearl LH. Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein Eng* 1992;5:827-9.
17. Van Heuverswyn F, Karczmarczyk M, Schimmel H, Trapmann S, Emons H. Influence of primer & probe chemistry and amplification target on reverse transcription digital PCR quantification of viral RNA. *Biomol Detect Quantif* 2016;9:20-8.
18. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Section 6.3, Viruses: Structure, Function, and Uses. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21523/> [Online] (last visited on 15 Oct 2019).
19. National Institute of Standard and Technology (NIST). NIST web site on Standard Reference Materials. <https://www.nist.gov/> [Online] (last visited on 3 November 2019).
20. Mattiuzzo G, Ashall J, Doris KS, MacLellan-Gibson K, Nicolson C, Wilkinson DE, et al. Development of lentivirus-based reference materials for ebola virus nucleic acid amplification technology-based assays. *PLoS One* 2015;10:e0142751.
21. Zhang L, Sun Y, Chang L, Jia T, Wang G, Zhang R, et al. A novel method to produce armored double-stranded DNA by encapsulation of MS2 viral capsids. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99:7047-57.
22. Zeltins A. Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Mol Biotechnol* 2013;53:92-107.
23. Mohsen MO, Gomes AC, Vogel M, Bachmann MF. Interaction of viral capsid-derived virus-like particles (VLPs) with the innate immune system. *Vaccines* 2018;6:37.
24. Sun Y, Jia T, Sun Y, Han Y, Wang L, Zhang R, et al. External quality assessment for avian influenza A (H7N9) virus detection using armored RNA. *J Clin Microbiol* 2013;51:4055-9.
25. Davis C, Berry N, Heath A, Holmes H. An international collaborative study to establish a replacement World Health Organization international standard for human immunodeficiency virus 1 RNA nucleic acid assays. *Vox Sang* 2008;95:218-25.
26. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:1688-713.
27. WHO. WHO web site on WHO expert committee on biological standardization (ECBS). [http://www.who.int/biologicals/WHO\\_ECBS/en/](http://www.who.int/biologicals/WHO_ECBS/en/) [Online] (last visited on 3 November 2019).
28. International Organisation for Standardization. ISO Guide 35. Reference materials - guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability. 2017.
29. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). MFDS web site on national institute of food and drug safety evaluation. [http://www.nifds.go.kr/brd/m\\_96/list.do/](http://www.nifds.go.kr/brd/m_96/list.do/) [Online] (last visited on 30 November 2019).