핵산증폭검사를 위한 HBV, HCV, HIV-1 체외진단용 의료기기 국가표준품의 장기 안정성

최경영¹ · 윤경원¹ · 차영주² · 민혁기¹ · 김재현¹

대한적십자사 혈액수혈연구원¹, 중앙대학교 의과대학 진단검사의학교실²

Long-Term Stability of HBV, HCV, and HIV-1 National Reference Standards for in vitro Diagnostic Medical Devices Intended to Be Used for the Nucleic Acid Amplification Test

Kyoung Young Choi¹, Kyoung Won Youn¹, Young Joo Cha², Hyuk Ki Min¹, Jaehyun Kim¹

Blood Transfusion Research Institute, Korean Red Cross¹, Wonju, Department of Laboratory Medicine, Chung-Ang University College of Medicine², Seoul, Korea

Background: National reference standards are essential to the quality assessment and regulatory approval of in vitro diagnostic medical devices. However, the long-term stability of national reference standards has not been comprehensively secured. This study was performed to assessment on the long-term stability of the hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) national reference standards intended to be used for the nucleic acid amplification test (NAT).

Methods: The viral loads of the MFDS (Korea Ministry of Food and Drug Safety) working standard and recombinant DNA for HBV, HCV, and HIV-1 were measured before and after storage at -70°C for up to 72 months using Cobas Ampliprep/Cobas Taqman assays (Roche Molecular System, Inc., Branchburg, USA) at defined time points.

Results: The viral loads of national reference standards for in vitro diagnostic medical devices of HBV, HCV, and HIV-1 stored at -70°C for up to 72 months did not differ significantly from the baseline viral load. The changes in viral load of national reference standards of HBV, HCV, and HIV-1 tested after storage at -70°C for up to 72 months ranged from -0.36 to $0.16 \log_{10}$ IU/mL and did not exceed $0.5 \log_{10}$, which is the estimated intra-assay variation of molecular tests.

Conclusion: The HBV, HCV, and HIV-1 national reference standards for in vitro diagnostic medical devices intended to be used for the NAT were relatively stable after long-term storage at -70°C for up to 72 months, regardless of the initial titer. (Korean J Blood Transfus 2018;29:171-181)

Key words: National reference standard, Real-time stability, HBV, HCV, HIV-1

Received on June 25, 2018. Revised on July 11, 2018. Accepted on July 13, 2018

Correspondence to: Jaehyun Kim

Blood Transfusion Research Institute, Korean Red Cross, 50 Hyeoksin-ro, Wonju 26465, Korea

Tel: 82-33-811-0221, Fax: 82-33-811-0240, E-mail: kimjh@redcross.or.kr, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9494-156X>

This research was supported by a grant (18173MFDS323) from Ministry of Food and Drug Safety in 2018.

© 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.
Copyright ©2018 The Korean Society of Blood Transfusion

서론

체외진단의약품 및 체외진단용 의료기기의 성능평가 및 유효성 검증을 위해서는 특성이 잘 규명된 다양한 종류의 물질이 필요하다. 이러한 체외진단의약품 및 체외진단용 의료기기의 성능을 유지·개선하기 위해서는 체계적인 품질관리가 필수적인데 이를 위해 반드시 필요한 것이 표준물질(reference standard material)이다.

세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 체외진단분석기 및 체외진단의약품의 개발, 평가, 표준화와 관리의 중요성을 인식하여 WHO 생물의약품표준화 전문가 회의(WHO Expert Committee on Biological Standardization, WHO ECBS) 등을 구성하여 표준물질에 대한 정책을 결정하고 있으며, WHO 국제표준품(WHO International Standard) 위탁관리 기관인 NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control)나 WHO CCs (WHO Collaborating Centers for Biological Standards and Standardization)를 통해 WHO 국제표준품을 제조·공급하고 있다. 그러나 국제표준품은 각 나라별 유행하는 유전자변이형을 모두 구하기 힘든 경우가 종종 있고, 그 가격이 고가이며 공급량도 제한적이어서 모든 검사실마다 국제표준품을 사용하는데 제한이 있다. 이에 WHO ECBS에서는 각 국에서 사용하는 체외진단의약품 및 체외진단용 의료기기의 평가와 품질관리를 위하여 각 나라별로 자국에서 유행하는 병원체의 특성이 반영된 국가표준품(National Reference Standard)을 제조하여 사용하고 이의 사용을 위한 가이드라인을 제시하도록 권고하고 있다[1]. 우리나라 식품의약품안전처에서도 2004년부터 국가사업의 일환으로 화학의약품, 생물의약품, 생약, 체외진단용 의료기기 표준품 등을 지속적으로 개발하여 보급하고 있다.

체외진단용 의료기기 표준품은 체외진단용 제품(in vitro diagnostics)의 성능평가 및 품질관리를 위해 사용되는 물질로서, 허가·심사와 관련된 시험, 검정 등에 사용될 수 있도록 식품의약품안전처장이 그 기준을 인정하고 확립한 표준품으로 국가표준품에 해당하는 물질이며, 현재 32개 품목이 표준품으로 확립되어 -70°C 초저온냉동고에 보관하며 체외진단용 제품의 제조·수입업체, 대학 및 연구소 등으로 유상 분양되고 있다[2]. 그러나 표준품 확립 이후의 안정성 검증(post-establishment stability monitoring)과 표준품의 사용기한(shelf life)에 대해서는 현재까지 국내·외에서 명확한 가이드라인이 없다. 또한 세계 각국에서 시행하고 있는 체외진단용 의료기기 표준품의 보관온도와 보존기간의 설정은 과학적인 근거보다는 보편적인 기준에 의해 결정된 것으로 보여지며, WHO 국제표준품의 경우에도 표준품 확립 시 10년 이상 분양할 수 있는 수량을 제조하는 것을 목표로 하나 사용기한이 별도로 설정되어 있지는 않다. 이러한 상황에서 본 연구에서는 현재 우리나라 식품의약품안전처에서 분양중인 체외진단용 의료기기 표준품 중 핵산증폭검사(nucleic acid amplification test, NAT)를 위한 B형간염바이러스(hepatitis B virus, HBV), C형간염바이러스(hepatitis C virus, HCV), 사람면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus-1, HIV-1) 관련 국가표준품을 장기간 보관하면서 특정시점에서의 역가(titer)를 제조·확립 당시의 역가와 비교·평가하는 실시간 안정성(real-time stability) 방법으로 평가하여 국가표준품의 객관적인 품질과 신뢰성을 검증하고 표준품 확립 이후 안정성 검증 방안을 모색하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 체외진단용 의료기기 표준품

국가표준품으로서 2012년 4월에 제조·확립된 B형간염바이러스 유전자-회색패널(IVD-12/019), B형간염바이러스 유전자-재조합 DNA (IVD-12/020), C형간염바이러스 유전자-회색패널(IVD-12/021), C형간염바이러스 유전자-재조합 DNA (IVD-12/022), 사람면역결핍바이러스 유전자-회색패널(IVD-12/007), 사람면역결핍바이러스 유전자-재조합 DNA (IVD-12/008) 체외진단용 의료기기 표준품은 식품의약품안전처에서 분양 받아 사용하였다.

2. 실시간 안정성 평가

표준품에 대한 실시간 안정성 평가는 핵산증폭검사 자동화 장비인 TaqMan system과 Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan HBV Test v2.0, HCV Test, HIV-1 Test v2.0 (Roche Molecular System, Inc., Branchburg, USA) 시약을 사용하여 표준품 제조·확립 이후 12, 15, 24, 36, 48, 60, 72개월이 도래하는 시점에서 각각의 표준품을 3회 반복(triplicate) 검사하고, 3회 반복 검사한 결과의 평균값을 제조·확립 당시의 역가(titer)와 비교하였다.

3. 통계분석

통계학적 분석을 위해서는 SPSS (version 23.0, Armonk, NJ, USA) 소프트웨어를 사용하였으며, 보존기간에 따른 표준품 역가의 변화는 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 통해 분석하였다. 유의수준은 P value가 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

결 과

1. HBV 유전자 표준품의 안정성

B형간염바이러스 유전자-재조합 DNA (IVD-12/020) 및 5개의 패널검체로 구성되어 있는 B형간염바이러스 유전자-회색패널(IVD-12/019)은 표준품 제조·확립 당시의 역가인 $6.05 \log_{10}$ IU/mL (재조합 DNA), $6.55 \log_{10}$ IU/mL (panel 1), $4.85 \log_{10}$ IU/mL (panel 2), $4.23 \log_{10}$ IU/mL (panel 3), $3.61 \log_{10}$ IU/mL (panel 4), $2.94 \log_{10}$ IU/mL (panel 5)에서 이들 표준품을 -70°C 에서 72개월을 보관한 뒤에도 역가가 $7.01 \log_{10}$ IU/mL (재조합 DNA), $6.47 \log_{10}$ IU/mL (panel 1), $4.83 \log_{10}$ IU/mL (panel 2), $4.29 \log_{10}$ IU/mL (panel 3), $3.69 \log_{10}$ IU/mL (panel 4), $2.98 \log_{10}$ IU/mL (panel 5)로 나타나 역가의 변화가 거의 없는 것으로 나타났다(Table 1).

표준품을 -70°C 에 보관하면서 보관기간에 따른 역가 변화를 제조·확립 당시의 역가와 비교하여 그 차이($\log_{10}$ difference)를 분석한 결과 B형간염바이러스 유전자-재조합 DNA (IVD-12/020) 및 B형간염바이러스 유전자-회색패널(IVD-12/019) 제조 후 보관기간이 12개월, 15개월, 24개월, 36개월, 48개월, 60개월 및 72개월이 경과한 시점에서 역가의 변화는 $-0.07 \sim 0.16 \log_{10}$ IU/mL로 모두 $\pm 0.5 \log_{10}$ 이하의 차이를 나타내었다(Fig. 1).

2. HCV 유전자 표준품의 안정성

C형간염바이러스 유전자-재조합 DNA (IVD-12/022) 및 4개의 패널검체로 구성되어 있는 C형간염바이러스 유전자-회색패널(IVD-12/021)은 표준품 제조·확립 당시의 역가인 $7.44 \log_{10}$ IU/mL (재조합 DNA), $5.23 \log_{10}$ IU/mL (panel 1), $3.34 \log_{10}$ IU/mL (panel 2), $2.80 \log_{10}$ IU/mL (panel 3), $2.20 \log_{10}$ IU/mL (panel 4)에서 이들 표준품을 -70°C

Table 1. Effect of long-term storage at -70°C on the quantitation of HBV DNA, HCV RNA and HIV-1 RNA national reference standard for in vitro diagnostics

National Reference Standard	Mean log ₁₀ viral loads (95% CI) at:								<i>P</i> value
	00 MO	12 MO	15 MO	24 MO	36 MO	48 MO	60 MO	72 MO	
HBV DNA									
Working Standard (IVD-12/019)									
Panel 1	6.55 (6.46 ~ 6.63)	6.50 (6.43 ~ 6.57)	6.51 (6.43 ~ 6.59)	6.47 (6.39 ~ 6.56)	6.56 (6.43 ~ 6.70)	6.51 (6.41 ~ 6.61)	6.47 (6.45 ~ 6.48)	6.47 (6.47 ~ 6.48)	0.88
Panel 2	4.85 (4.74 ~ 4.93)	4.85 (4.71 ~ 4.98)	4.75 (4.68 ~ 4.82)	4.76 (4.70 ~ 4.81)	4.89 (4.79 ~ 5.00)	4.80 (4.73 ~ 4.88)	4.83 (4.77 ~ 4.89)	4.83 (4.79 ~ 4.87)	0.62
Panel 3	4.23 (4.16 ~ 4.29)	4.23 (4.13 ~ 4.32)	4.24 (4.17 ~ 4.30)	4.22 (4.21 ~ 4.23)	4.29 (4.20 ~ 4.37)	4.21 (4.12 ~ 4.30)	4.28 (4.25 ~ 4.31)	4.29 (4.27 ~ 4.31)	0.59
Panel 4	3.61 (3.54 ~ 3.67)	3.61 (3.61 ~ 3.62)	3.64 (3.49 ~ 3.76)	3.64 (3.53 ~ 3.74)	3.61 (3.56 ~ 3.66)	3.53 (3.28 ~ 3.78)	3.68 (3.62 ~ 3.74)	3.69 (3.58 ~ 3.78)	0.48
Panel 5	2.94 (2.79 ~ 3.05)	3.08 (3.05 ~ 3.11)	3.04 (3.01 ~ 3.08)	2.99 (2.94 ~ 3.04)	2.93 (2.85 ~ 3.00)	3.01 (2.94 ~ 3.08)	3.10 (3.06 ~ 3.15)	2.98 (2.91 ~ 3.03)	0.83
HBV Recombinant DNA (IVD-12/020)	6.05 (5.99 ~ 6.09)	5.90 (5.83 ~ 5.97)	5.73 (5.64 ~ 5.82)	5.65 (5.56 ~ 5.75)	5.90 (5.82 ~ 5.99)	7.02 (6.91 ~ 7.13)	6.92 (6.06 ~ 7.41)	7.01 (6.68 ~ 7.20)	0.50
HCV RNA									
Working Standard (IVD-12/021)									
Panel 1	5.23 (5.13 ~ 5.32)	5.33 (5.31 ~ 5.35)	5.28 (5.23 ~ 5.31)	5.13 (5.12 ~ 5.13)	5.31 (5.29 ~ 5.33)	5.22 (5.17 ~ 5.26)	5.21 (5.19 ~ 5.23)	5.13 (5.07 ~ 5.19)	0.42
Panel 2	3.34 (3.26 ~ 3.40)	3.39 (3.36 ~ 3.43)	3.43 (3.37 ~ 3.49)	3.27 (3.26 ~ 3.29)	3.56 (3.53 ~ 3.58)	3.55 (3.53 ~ 3.57)	3.44 (3.43 ~ 3.45)	3.42 (3.41 ~ 3.43)	0.73
Panel 3	2.80 (2.70 ~ 2.88)	2.85 (2.77 ~ 2.93)	2.88 (2.75 ~ 3.01)	2.67 (2.64 ~ 2.71)	2.92 (2.90 ~ 2.93)	3.04 (2.99 ~ 3.09)	2.90 (2.81 ~ 2.99)	2.89 (2.83 ~ 2.95)	0.63
Panel 4	2.20 (2.06 ~ 2.31)	2.39 (2.16 ~ 2.56)	2.31 (2.24 ~ 2.37)	2.01 (1.95 ~ 2.07)	2.41 (2.27 ~ 2.55)	2.49 (2.30 ~ 2.67)	2.30 (2.19 ~ 2.41)	2.34 (2.18 ~ 2.46)	0.66
HCV Recombinant DNA (IVD-12/022)	7.44 (7.21 ~ 7.59)	7.70 (7.65 ~ 7.74)	7.79 (7.73 ~ 7.86)	7.06 (6.93 ~ 7.18)	7.50 (7.46 ~ 7.55)	>8.00 (N/A)	>8.00 (N/A)	>8.00 (N/A)	0.67

Table 1. Continued

National Reference Standard	Mean log ₁₀ viral loads (95% CI) at:								<i>P</i> value
	00 MO	12 MO	15 MO	24 MO	36 MO	48 MO	60 MO	72 MO	
HIV-1 RNA									
Working Standard (IVD-12/007)									
Panel 1	4.32 (4.26 ~ 4.37)	4.19 (4.17 ~ 4.21)	4.25 (4.22 ~ 4.27)	3.76 (3.74 ~ 3.77)	4.22 (4.18 ~ 4.27)	4.23 (4.19 ~ 4.28)	4.22 (4.20 ~ 4.23)	4.16 (4.10 ~ 4.21)	0.74
Panel 2	2.36 (2.22 ~ 2.47)	2.26 (2.22 ~ 2.29)	2.14 (2.08 ~ 2.19)	1.82 (1.72 ~ 1.92)	2.17 (2.02 ~ 2.32)	2.13 (1.90 ~ 2.37)	2.30 (2.16 ~ 2.44)	2.25 (2.19 ~ 2.31)	0.82
Panel 3	2.10 (2.08 ~ 2.12)	1.45 (1.34 ~ 1.57)	1.65 (1.29 ~ 2.00)	1.35 (1.25 ~ 1.46)	1.54 (1.28 ~ 1.80)	1.54 (1.28 ~ 1.79)	1.56 (1.31 ~ 1.81)	1.79 (1.76 ~ 1.82)	0.98
Panel 4	1.45 (1.35 ~ 1.53)	1.33 (1.27 ~ 1.39)	< 1.30 (N/A)	< 1.30 (N/A)	< 1.30 (N/A)	1.46 (1.28-1.64)	< 1.30 (N/A)	< 1.30 (N/A)	0.93
HIV-1 Recombinant DNA (IVD-12/008)	> 7.00 (N/A)	> 7.00 (N/A)	> 7.00 (N/A)	> 7.00 (N/A)	> 7.00 (N/A)	> 7.00 (N/A)	> 7.00 (N/A)	> 7.00 (N/A)	N/A

Abbreviations: MO, month; CI, confidence interval; N/A: not applicable.

에서 72개월을 보관한 뒤에도 역가가 >8.00 log₁₀ IU/mL (재조합 DNA), 5.13 log₁₀ IU/mL (panel 1), 3.42 log₁₀ IU/mL (panel 2), 2.89 log₁₀ IU/mL (panel 3), 2.34 log₁₀ IU/mL (panel 4)로 나타나 역가의 변화가 거의 없는 것으로 나타났다(Table 1).

표준품을 -70°C에 보관하면서 보관기간에 따른 역가 변화를 제조·확립 당시의 역가와 비교하여 그 차이(log₁₀ difference)를 분석한 결과 C형 간염바이러스 유전자-재조합 DNA (IVD-12/022) 및 C형간염바이러스 유전자-회색패널(IVD-12/021) 제조 후 보관기간이 12개월, 15개월, 24개월, 36개월, 48개월, 60개월 및 72개월이 경과한 시점에서 역가의 변화는 -0.09~0.13 log₁₀ IU/mL로 모두 ±0.5 log₁₀ 이하의 차이를 나타내었다(Fig. 1).

3. HIV-1 유전자 표준품의 안정성

사람면역결핍바이러스 유전자-재조합 DNA (IVD-12/008) 및 4개의 패널검체로 구성되어 있는 사람면역결핍바이러스 유전자-회색패널(IVD-12/007)은 표준품 제조·확립 당시의 역가인 >7.0 log₁₀ IU/mL (재조합 DNA), 4.32 log₁₀ IU/mL (panel 1), 2.36 log₁₀ IU/mL (panel 2), 2.10 log₁₀ IU/mL (panel 3), 1.45 log₁₀ IU/mL (panel 4)에서 이들 표준품을 -70°C에서 72개월을 보관한 뒤에도 역가가 >7.00 IU/mL (재조합 DNA), 4.16 log₁₀ IU/mL (panel 1), 2.25 log₁₀ IU/mL (panel 2), 1.79 log₁₀ IU/mL (panel 3), < 1.30 log₁₀ IU/mL (panel 4)로 나타나 역가의 변화가 거의 없는 것으로 나타났다(Table 1).

표준품을 -70°C에 보관하면서 보관기간에 따

Fig. 1. Mean difference in the viral load ($\log_{10}$) of HBV DNA, HCV RNA and HIV-1 RNA national reference standard for in vitro diagnostics over 12 to 72 months stored at -70°C . The results obtained by individual panel specimens at different time periods (12, 15, 24, 36 48, 60, and 72 months after storage), and each symbol indicates panels of the national reference standards. (A) Mean difference in the viral load ($\log_{10}$) for HBV DNA working standard and HBV recombinant DNA (HBV rDNA); (B) Mean difference in the viral load ($\log_{10}$) for the HCV RNA working standard and HCV recombinant DNA (HCV rDNA); (C) Mean difference in the viral load ($\log_{10}$) for the HIV-1 RNA working standard and HIV-1 recombinant DNA (HIV-1 rDNA).

른 역가 변화를 제조·확립 당시의 역가와 비교하여 그 차이($\log_{10}$ difference)를 분석한 결과 사람면역결핍바이러스 유전자-재조합 DNA (IVD-12/008) 및 사람면역결핍바이러스 유전자-희석패널 (IVD-12/007) 제조 후 보관기간이 12개월, 15개월, 24개월, 36개월, 48개월, 60개월 및 72개월이 경과

한 시점에서 역가의 변화는 $-0.36 \sim 0.01 \log_{10} \text{ IU/mL}$ 로 모두 $\pm 0.5 \log_{10}$ 이하의 차이를 나타내었다 (Fig. 1).

고 찰

체외진단용 의료기기 표준품은 생물유래의 물질로 제조된 표준품으로 물리화학적 혹은 생물학적 분석이 가능하여야 하며 바이알 사이의 균질성이 보증되고 적절한 안정성을 확보할 수 있어야 한다. 우리나라에서 체외진단용 의료기기 표준품의 제조는 식품의약품안전처의 용역연구사업을 통해 표준품 후보물질이 제조된 이후 다기관 공동품질검증 및 통계분석 후 식품의약품안전처 체외진단 표준품 실무기술위원회의 기술적 검토와 표준품기술위원회의 최종심의를 거쳐 표준품 등록을 확정하고 있다. 그러나 현재까지 우리나라를 비롯한 국외의 규제기관 및 표준품 관리·분양 기관에서는 체외진단용 의료기기 표준품을 포함한 생물학적 표준품의 확립 이후 표준품을 어떤 조건에서 얼마 동안 보존할 수 있는지, 즉 표준품의 사용기한이 얼마인지 또는 안정성 검증은 어떤 방법으로 수행해야 하는지에 대한 질문에 명확한 과학적 검증결과나 가이드라인이 제시되지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 우리나라 식품의약품안전처에서 국가표준품으로 확립하여 관리·분양하고 있는 32개 품목의 체외진단 의료기기 표준품 중 핵산증폭검사를 위한 HBV, HCV, HIV-1 체외진단용 의료기기 국가표준품의 장기안정성을 실시간으로 평가하였다.

일반적으로 생물학적 표준품도 일반의약품의 경우에서처럼 가속열화시험(accelerated degradation test, ADT)과 아레니우스 방정식(Arrhenius equation)을 사용하여 안정성을 예측하고 사용기한을 산정할 수 있다[3,4]. 가속열화시험 결과와 아레니우스 모델에 따른 안정성 유지기간, 즉 사용기한 산출을 위한 표준품 특성값의 허용범위(acceptance criterion)는 규정된 보관온도에서 95% CI (confidence interval)를 적용하고 있다[5]. 그러

나 이러한 통계학적인 방법에 의한 사용기한의 산정은 “통계적 유의성(statistically significant)”이 검정 통계량의 크기, 설정된 귀무가설(null hypothesis) 등으로 오류 가능성을 동반하므로, 반드시 어떤 실험결과의 중요성이나 의사결정의 수단을 의미하지는 않는다. 2005년 José 등[6]의 보고에서도 -70°C 에 보관한 HBV DNA, HCV 및 HIV-1 RNA의 역가와 관련하여 시간과 바이러스의 역가가 선형의 관계를 가진다고 가정하고, -70°C 에 보관한 바이러스의 역가는 시간의 경과에도 변함이 없다는 귀무가설을 기각하여 통계학적으로 유의한 사용기한을 산정하려고 하였으나 실험기간 동안 바이러스의 역가에 실제로 의미 있는 변화를 관찰할 수 없어 사용기한을 산정할 수 없었다. 이에 생물학적 임상검체의 장기 보존에 따른 안정성과 관련하여서는 실제로 통계학적인 수단에 의해 사용기한을 설정하기보다는 장기간 보관하면서 일정간격으로 검사하여 자료를 수집하고 결과를 초기의 역가와 비교하는 방법인 실시간 안정성 평가가 많이 사용되고 있다. 이와 같은 방법으로 2011년 Baleriola 등[7]은 -70°C 에 보관한 HBV, HCV 또는 HIV-1 바이러스가 포함된 임상검체가 9년간 안정하였음을 보고하였다.

한편, 냉동액(liquid-frozen)에 포함되어 있는 바이러스 핵산의 불활화에는 보관온도 등 보존 조건뿐만 아니라 핵산의 자연적인 가수분해(natural hydrolysis), 핵산가수분해효소의 함량(nuclease content), RNA 또는 DNA가 바이러스 외피단백질(virus coat proteins)로 보호되어 있는지 아니면 그대로 노출되어 있는지 등의 여러 가지 요인이 작용할 수 있다. 따라서 HBV, HCV, HIV-1 체외진단용 NAT 의료기기 국가표준품 등과 같은 생물학적 표준품의 사용기한을 일률적으로 규정하거나 통계학적인 방법을 통해 산정해내는 것은 불가능하다. 미국 FDA (Food and Drug Administration)의

의약품 안정성 평가 가이드라인에서도 실온과 실온 이하에서 보관하는 의약품의 안정성 평가 방법을 달리하도록 제시하고 있으며, 실온 이하에서 보관하는 의약품의 경우 냉장보관, 냉동보관, -20°C 이하에 보관하는 의약품의 평가 방법을 구분하고 있다. 규정된 보관온도가 -20°C 이하인 의약품의 안정성 재평가 기간 또는 사용기한은 장기간의 데이터를 기반으로 의약품의 특성에 따라 품목별로 설정할 것을 권고하고 있다[8]. 또한 최근 De Vore 등[9]은 0°C 이하에 보관하는 생물학적 물질의 안정성 기간 산출에 있어 기존의 아레니우스 모델에 의한 안정성 예측이 부정확하여 실시간 안정성 평가가 가장 정확하고 경제적인 평가 방법임을 보고하였다.

임상검체의 실시간 안정성 평가에서는 특정 보관조건에서 보관 중인 사람의 혈장(human plasma) 또는 기타 용액에 포함되어 있는 바이러스의 역가가 보관 전 역가의 50%가 보존되는 시점, 즉 최초 바이러스 역가의 $0.5 \log_{10}$ 감소되는 시점을 사용기한으로 간주할 수 있다[6]. 분자진단법을 사용한 바이러스 정량검사(quantitative analysis)의 검사내 변이(intra-assay variation)와 검사간 변이(inter-assay variation)가 약 $\pm 0.2 \log_{10}$ 으로 보고되고 있고[10,11], 임상검체의 생물학적 변이(biological variability)는 약 $\pm 0.3 \log_{10}$ 으로 보고되고 있어[12] 바이러스 분자진단에서는 임상검체의 보관 중 $0.5 \log_{10}$ copy/mL 또는 $0.5 \log_{10}$ IU/mL 이하의 변이는 일반적인 범위로 받아들이고 있으며[13-15], $0.5 \log_{10}$ 이상의 역가 변화가 있을 때 유의미한 변화로 간주하고 있다[16].

핵산증폭검사를 위한 HBV, HCV, HIV-1 체외진단용 의료기기 국가표준품은 바이러스 농도를 알고 있는 감염자의 혈청을 일정비율로 희석하여 제조한 희석패널(dilution panel; working standard) 표준품과 검출대상 바이러스 유전자를 유전자 재

조합법으로 제조한 표준품이 있다. 우리나라 국가표준품인 B형간염바이러스 유전자-재조합 DNA (IVD-12/020), C형간염바이러스 유전자-재조합 DNA (IVD-12/022), 사람면역결핍바이러스 유전자-재조합 DNA (IVD-12/008) 체외진단용 의료기기 표준품은 검출대상 바이러스 유전자를 유전자 재조합법으로 제조한 표준품이며, HBV C2/adw형 양성혈장으로 제조하여 5개의 양성 패널검체로 구성된 B형간염바이러스 유전자-희석패널(IVD-12/019), HCV 2a/2c 양성혈장으로 제조하여 4개의 양성 패널검체로 구성된 C형간염바이러스 유전자-희석패널(IVD-12/021) 및 HIV-1 B형 양성혈장으로 제조하여 4개의 양성 패널검체로 구성된 사람면역결핍바이러스 유전자-희석패널(IVD-12/007)은 희석패널 표준품으로 핵산증폭검사의 성능평가 및 품질관리에 활용할 목적으로 개발되었다[17].

본 연구에서 평가한 핵산증폭검사를 위한 HBV, HCV, HIV-1 체외진단용 의료기기 국가표준품의 경우에도 확립 당시 제시된 표준품의 정량값은 사용한 시약에 따라 차이가 있었는데, 이는 핵산증폭검사의 경우 증폭하는 표적유전자의 부위와 시약마다 검출감도가 다른 것에 기인하는 것으로 판단되었다[17]. 따라서 체외진단용 의료기기 표준품의 안정성에 대한 실험적 검증방법은 현행 보관온도에서(-70°C 이하)에서 보존하면서 정해진 간격으로 검사하여 표준품 제조 시의 역가와 비교하여 보는 후향적 실시간 안정성 평가(retrospective real-time stability monitoring)가 가장 정확한 방법이며, 안정성의 판단 기준은 표준품 제조 당시의 역가와 비교하여 $0.5 \log_{10}$ 이하의 감소를 보일 때 안정한 것으로 판단하는 것이 타당한 것으로 생각된다. 본 연구에서 제조·확립 이후 -70°C 에서 보관하면서 72개월까지 안정성을 평가한 HBV, HCV, HIV-1 체외진단용 의료기기

국가표준품 모두 제조 당시의 역가와 비교하여 $0.5 \log_{10}$ 이하의 감소를 보여 안정한 것으로 판단된다.

표준품은 동결건조품 및 동결품의 형태로 제조되는데, 국제표준품(international standard)의 경우 고역가의 동결건조품으로 제조된다[18]. 이처럼 국제표준품을 고역가의 동결건조품으로 제조하는 것은 일반적으로 낮은 역가의 생물학적 물질이 높은 역가의 생물학적 물질에 비해 상대적으로 역가의 변화가 일어날 가능성이 크고 동결건조품이 동결품 형태보다 역가의 손실이 적기 때문이다. 반면 희석패널 또는 국가표준품의 경우 의료기기의 성능평가 및 품질관리용으로 대량 소모되므로 제조 및 사용에 용이한 동결품으로 제조되고, 사용할 때 희석 오차를 줄이기 위하여 국제표준품에 비해 낮은 역가로 제조되고 있다. 본 연구에서 평가한 핵산증폭검사를 위한 HBV, HCV, HIV-1 체외진단용 의료기기 국가표준품의 경우 사람의 혈장을 원료로 하여 동결품으로 제조되었으며, 높은 역가에서 낮은 역가까지 다양한 농도가 포함되어 있도록 제조된 정성분석(qualitative analysis) 목적의 표준품이다. 따라서 HBV, HCV, HIV-1 체외진단용 의료기기 국가표준품의 고유한 특성값은 물질에 포함되어 있는 바이러스의 절대적인 양이 아닌 양성(reactive) 또는 음성(non-reactive)으로 표현되는 정성적인 척도일 수 밖에 없고, 표준품의 사용 대상이 되는 핵산증폭검사 자체도 정성검사이기 때문에 정량 검사에서처럼 정도관리물질의 측정값이 시간의 흐름에 따라 증가 혹은 감소하는 양상을 직접 확인할 수 없다. 물질에 포함되어 있는 바이러스의 역가는 다만 참고치(reference range)로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

체외분석용 의료기기 표준품의 중장기 안정성 모니터링의 경우, 표준품의 품질 검증과 국가표

준품으로서 사용자(민원인)의 확고한 신뢰를 확보하는 것이 매우 중요하다 할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구의 결과와 외국의 유사 연구 결과를 종합하여보면, 핵산증폭검사를 위한 HBV, HCV, HIV-1 체외진단용 의료기기 국가표준품은 -70°C 에 냉동 보관하였을 경우 최소 10년 이상 안정할 것으로 예상되나 사용기한 또는 품질유지기한을 별도로 정하기는 어렵다. 다만 표준품 보관 중 보관온도의 일탈 등 보관환경의 변화, 표준품 사용자의 환류(feedback)가 있을 경우 관련 전문가들의 검토를 통하여 표준품의 분양 중단을 결정할 수 있을 것이다. 2003년 José 등[19]의 보고에 의하면 핵산증폭검사나 흡광도로 표시되는 검사의 결과를 분석할 때 정량적인 측면을 너무 강조한다면 검사내 변이, 검사간 변이에 의한 결과값의 변동이 분석의 최종목표인 분석결과와 유효성 여부 판단에 걸림돌이 될 수 있음을 보고하였다. 따라서 표준품에 대한 실시간 안정성 평가 결과, 허용범위를 벗어나는 저역가 표준품 패널 검체가 발견될 경우에는 역시 전문가 검토회의 후 해당 패널 검체만 제외한 희석패널 표준품을 분양할 수도 있을 것으로 생각된다.

결론적으로, 본 연구에서 평가한 핵산증폭검사를 위한 HBV, HCV, HIV-1 체외진단용 의료기기 국가표준품은 -70°C 보관조건에서 표준품 제조 후 72개월(6년)이 경과하여도 역가가 $0.5 \log_{10}$ 이하의 감소를 보여 매우 안정한 것으로 나타났으며 실시간 안정성 평가가 표준품의 안정성 모니터링에 유용한 방법임을 확인하였다.

요 약

배경: 체외진단용 의료기기의 성능평가 및 규제기관의 심사·허가를 위해 국가표준품은 필수적인 물질이나 국가표준품의 장기 안정성은 완전

히 확보된 바가 없다. 본 연구에서는 핵산증폭검사를 위한 B형간염바이러스(HBV), C형간염바이러스(HCV), 사람면역결핍바이러스(HIV-1) 국가표준품의 장기안정성을 평가하고자 하였다.

방법: 식품의약품안전처(MFDS)의 HBV, HCV, HIV-1 희석패널 및 재조합 DNA 표준품을 -70°C에 보관하면서 보관 전 및 특정 보관기간이 경과한 후의 바이러스 역가를 Cobas Ampliprep/Cobas Taqman assays (Roche Molecular System, Inc., Branchburg, USA) 시약을 사용하여 72개월까지 분석하였다.

결과: HBV, HCV, HIV-1 체외진단용 의료기기 국가표준품의 바이러스 역가는 -70°C에서 72개월까지 보관하여도 제조·확립 당시의 바이러스 수치와 큰 변화가 없었다. HBV, HCV, HIV-1 국가표준품을 -70°C에서 72개월까지 보관하는 중 역가의 변화는 $-0.36 \sim 0.16 \log_{10}$ IU/mL로 분자진단의 검사내 변이인 $0.5 \log_{10}$ 범위를 벗어나지 않았다.

결론: 핵산증폭검사를 위한 HBV, HCV, HIV-1 체외진단용 의료기기 국가표준품은 제조 당시의 역가에 관계없이 -70°C에서 72개월까지 장기 보관하여도 비교적 안정하였다.

References

1. World Health Organization. WHO consultation on global measurement standards and their use in the in vitro biological diagnostic field. <http://www.who.int/bloodproducts/publications/en/Minutes-220804.pdf?ua=1> [Online] (last visited on 26 Feb 2018)
2. Ministry of Food and Drug Safety. National reference standards for in vitro diagnostic medical devices. <https://www.mfds.go.kr/index.do?mid=1474&cd=304> [Online] (last visited on 10 Jul 2018)
3. Kirkwood TB. Predicting the stability of biological standards and products. *Biometrics* 1977;33:736-42
4. Kirkwood TB. Design and analysis of accelerated degradation tests for the stability of biological standards III. Principles of design. *J Biol Stand* 1984;12:215-24
5. Tydeman MS, Kirkwood TB. Design and analysis of accelerated degradation tests for the stability of biological standards I. Properties of maximum likelihood estimators. *J Biol Stand* 1984;12:195-206
6. José M, Gajardo R, Jorquera JI. Stability of HCV, HIV-1 and HBV nucleic acids in plasma samples under long-term storage. *Biologicals* 2005;33:9-16
7. Baleriola C, Johal H, Jacka B, Chaverot S, Bowden S, Lacey S, et al. Stability of hepatitis C virus, HIV, and hepatitis B virus nucleic acids in plasma samples after long-term storage at -20°C and -70°C. *J Clin Microbiol* 2011;49:3163-7
8. De Vore KW, Fatahi NM, Sass JE. An extrapolation of a radical equation more accurately predicts shelf life of frozen biological matrices. *Clin Chem* 2016;62:1075-83
9. U.S. Department of Health and Human Services. Guidance for industry: Q1E evaluation of stability data. <https://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-drugs-gen/documents/document/ucm073380.pdf> [Online] (last visited on 30 May 2018)
10. Holodniy M, Mole L, Winters M, Merigan TC. Diurnal and short-term stability of HIV virus load as measured by gene amplification. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994;7:363-8
11. Lin HJ, Myers LE, Yen-Lieberman B, Hollinger FB, Henrard D, Hooper CJ, et al. Multicenter evaluation of quantification methods for plasma

- human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Infect Dis* 1994;170:553-62
12. Winters MA, Tan LB, Katzenstein DA, Merigan TC. Biological variation and quality control of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA quantitation by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2960-6
13. Best SJ, Gust AP, Johnson EI, McGavin CH, Dax EM. Quality of human immunodeficiency virus viral load testing in Australia. *J Clin Microbiol* 2000;38:4015-20
14. Pawlotsky JM. Measuring hepatitis C viremia in clinical samples: can we trust the assays? *Hepatology* 1997;26:1-4
15. Sebire K, McGavin K, Land S, Middleton T, Birch C. Stability of human immunodeficiency virus RNA in blood specimens as measured by a commercial PCR-based assay. *J Clin Microbiol* 1998;36:493-8
16. Saag MS, Holodniy M, Kuritzkes DR, O'Brien WA, Coombs R, Poscher ME, et al. HIV viral load markers in clinical practice. *Nat Med* 1996;2:625-9
17. Kim MH, Cho YJ, Kwon SY, Cho NS. Establishment of plasma working standards for the performance and quality assurance of NAT screening tests for HIV, HCV and HBV. *Korean J Blood Transfus* 2012;23:152-61
18. Sizaret P. The preparation of international reference materials for biological substances. *J Biol Stand* 1988;16:129-37
19. José M, Curtu S, Gajardo R, Jorquera JI. The effect of storage at different temperatures on the stability of hepatitis C virus RNA in plasma samples. *Biologicals* 2003;31:1-8