농축기술을 이용한 HCV 저역가 감염혈액의 유전자형 분석

강정원¹ · 강재원¹ · 고대호¹ · 윤미애¹ · 권소영²

대한적십자사 혈액수혈연구원¹, 대한적십자사 혈액관리본부²

Analysis of HCV Genotype with Low Titer of HCV RNA Using the Methods of Concentration

JungWon Kang, M.S.¹, Jae-won Kang, M.S.¹, Dae Ho Ko, M.S.¹, Miae Youn, M.D.¹, So-Yong Kwon, M.D.²

Blood Transfusion Research Institute, Korean Red Cross¹, Wonju; Blood Service Headquarters, Korean Red Cross², Wonju, Korea

Analysis of HCV genotypes can help identify infection routes and the development of treatment methods. However, in some samples with a low titer of HCV RNA, it is difficult to analyze their genotypes. In our previous study about HCV genotyping, we could not identify 12 cases among the 175 HCV NAT reactive samples due to their low titer. In this study, we adopted three different kinds of virus concentration methods to identify the genotypes of the 12 unidentified cases and compared their efficacy. The three virus concentration methods were automatic nucleic acid extraction, polyethyleneimine-magnetic bead-based extraction, and sucrose cushion ultracentrifugation. After virus concentration using every three methods, we analyzed HCV RNA genotypes using the concentrated sample of the best efficacy. Among the 12 cases, six were identified as 1b, four as mixed types, and two were unidentified. Here we could validate that the sample concentration method is useful to identify the HCV genotypes, especially in samples with low HCV RNA titers. Furthermore, considering the convenience, high efficacy, and time-saving, automatic nucleic acid extraction is considered the most useful concentration method for samples with titer lower than 50 IU/mL. (Korean J Blood Transfus 2021;32:43-48)

Key words: HCV genotypes, Concentration efficacy, Automatic nucleic acid extraction device

대한적십자사 혈액관리본부에서는 1991년부터 수혈에 의한 C형 간염바이러스(Hepatitis C virus, HCV)의 감염을 방지하기 위해 HCV 항체검사를 도입하였고, 2005년부터는 핵산증폭검사(Nucleic acid amplification test, NAT)를 실시하고 있다. 도

입 초기에는 혼주(mini-pool) 방법으로 검사를 실시하였으나, 2012년 6월부터 Procleix Ultrio Plus assay/Procleix Tigris System (Grifols, Barcelona, Spain)를 사용하여 개별검체검사를 실시하고 있다. 헌혈자에서 HCV 양성혈액에 대한 역학적 분

Received on November 2, 2020. Revised on March 15, 2021. Accepted on March 17, 2021

Correspondence to: Jae-won Kang, M.S.

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

Tel: 82-33-811-0216, Fax: 82-33-811-0240, E-mail: kangjaewon@redcross.or.kr, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9030-4494>

© 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 ©2021 The Korean Society of Blood Transfusion

석은 국내 HCV 감염환자의 특징을 반영할 수 있을 것으로 생각되고, HCV 감염환자에 대한 치료 및 예방법 개선에 참고가 될 수 있을 것으로 기대된다. 저자들은 이전 연구[1]를 통해 2007년과 2017년에 발생한 HCV NAT 양성 헌혈 혈액에 대해서 HCV RNA 정량 및 유전자형을 분석하였다[1]. 하지만 총 175건의 HCV NAT 양성 헌혈 혈액 중 12건은 유전자형 결과를 도출하지 못했는데, 이는 HCV RNA 역가가 낮기 때문인 것으로 추정한다. 현재 사용되고 있는 HCV RNA 정량검사(Cobas AmpliPrep/Cobas Taqman HCV Quantitative Test, version 2.0, Roche, Basel, Swiss)는 표적 유전자를 9.3 IU/mL까지 검출할 수 있는 민감도가 뛰어난 방법이다. 그러나, 감염초기의 경우 검출되지 않는 아주 낮은 농도의 바이러스가 존재할 수 있으며, 이를 통해 감염이 이루어지는 상황이 발생할 수 있다[2]. 따라서, 이와 같이 바이러스 농도가 저역가를 나타내는 혈액은 향후 수혈 감염 연구에 중요한 재료가 될 수 있어 이에 대한 추가분석이 필요할 것으로 판단되며, 저역가 혈액의 바이러스 검출 민감도를 향상시키기 위해 바이러스 농축기술을 확립할 필요가 있다고 생각하였다. 저역가 바이러스 시료의 농축을 위한 대표적인 방법으로 초원심분리를 이용한 방법과 polyethylene glycol (PEG)을 이용한 방법이 있다[3,4]. 하지만 초원심분리를 이용한 방법은 장시간이 소요되고, PEG 침전법의 경우, 농축 후 잔존하는 PEG에 의해 핵산증폭이 저해될 수 있는 문제점이 있다. PEG보다 더 효율성이 뛰어난 방법으로는 polyethyleneimine (PEI)와 magnetic bead를 결합한 PEI-magnetic bead의 양전하와 바이러스 표면 음전하의 정전기적 상호작용을 이용해서 바이러스를 PEI-magnetic bead에 흡착시켜 농축하는 방법이 있으며[5], 다양한 종류의 바이러스 농축에 대해 그 효율성과 효과가 입증되었다[6-8]. 본

연구에서는 이전 연구[1]에서 HCV 유전자형을 확인하지 못한 12건의 HCV NAT 저역가 검체를 대상으로, 세 가지 방법의 바이러스 농축기술을 적용하여 유전자형을 분석하고, 농축방법들의 효과를 평가하고자 하였다.

첫 번째 농축방법으로, 자동핵산추출장비(Smart LabAssist D14800, TANBead, Taoyuan, Taiwan)와 추출시약(TANBead Nucleic Acid Extraction kit, TANBead, Taoyuan, Taiwan)을 이용해서 핵산을 추출하였다. 두 번째 농축방법으로, PEI-magnetic bead를 이용한 MagExtractor-Viral RNA kit (Toyobo, Osaka, Japan)를 사용하였고, 제조사 설명서에 따라 핵산을 추출하였다[7]. 혈장 300 μ L에 용해흡착액 700 μ L을 첨가하여 교반한 후 PEI-bead 50 μ L를 첨가하였다. 이를 자성 스탠드를 이용하여 침전물을 분리하여 세척 후 최종 용출액은 50 μ L로 하였다. 이때 사용된 용해흡착액, PEI-bead 용액, 자성 스탠드, 세척액 및 용출액은 kit에 포함된 것을 사용하였다. 세 번째 농축방법으로, 초원심분리기(Optima LE-80K, Beckman Coulter, Brea, USA)를 이용해서 핵산을 추출하였다. 10% sucrose solution (ATAGO, Tokyo, Japan) 600 μ L에 3 mL의 혈장을 첨가하여 sucrose cushion을 형성하였고, 이를 100,000 $\times$ g에서 17시간 동안 원심분리하였다. 침전물을 250 μ L TE Buffer (Promega, Wisconsin-Madison, USA)로 부유시키고, TRIzol LS reagent (Thermo, Waltham MA, USA)를 사용하여 Total RNA를 분리하였다. 이러한 세 가지의 핵산추출 및 농축방법을 이용해 얻은 시료를 RealStar HCV RT-PCR Kit 2.0 (Altona diagnostics GmbH, Hamburg, Germany)과 7300 Real-Time PCR Kit 2.0 (Thermo, Waltham MA, USA)를 이용하여 HCV RNA 정량값을 산출하였다. 그 다음으로 유전자형 분석을 위해 HCV RNA 정량값이 가장 높게 나타난 방법의 시료를 이용하여 HCV의 NS5B

영역의 370 bp를 표적으로 한 nested PCR을 실시하였으며, 사용한 primer는 Table 1과 같다[9]. 1차 PCR 반응액은 AmpliTaq Gold 360 Master mix (Applied Biosystems, CA, USA)와 External primer set (Bioneer, Daejeon, Korea)을 사용하여 총 25 μ L에 맞추었고, 핵산증폭은 Veriti 96-well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham

MA, USA)를 이용하여 95 °C에서 5분간 변성시킨 후 95 °C에서 30초, 56 °C에서 30초, 72 °C에서 1분으로 40회 반복 후 72 °C에서 7분간 항온하였다. 2차 PCR 반응액은 external primer set 대신에 internal primer set를 사용한 것 외에는 1차 PCR과 동일하게 진행하였다. 증폭산물의 확인을 위한 전기영동은 Lab Chip GX (Caliper Life Science,

Table 1. Primer set for HCV NS5B nested PCR used in HCV genotype analysis [9]

Target	Primer	Sequence (5'→3')	Location
External	Outer F	TTAACCACATCMRCTCCGTGTG	347~360
	Outer R	GGGACCCCAAGYTTYCTGAG	1465~1485
Internal	Inner F	ACACCCGCTGYTTYGACTC	659~669
	Inner R	GTACCTGGTCATAGCYTCCGTRAA	1015~1040

Table 2. HCV RNA titers (IU/mL) and genotypes of the 12 samples analyzed in this study

Sample No	Without concentration*	With concentration [†]			HCV genotype [‡]
		Automatic extraction	PEI-magnetic bead	Ultracentrifugation	
1	Not detected	3,210	290	50	Not confirmed
2	15.1	4,340 (×287.4)	2,600 (×172.2)	530 (×35.1)	Not confirmed
3	15.3	3,540 (×231.4)	2,290 (×149.7)	60 (×3.9)	1b
4	45.1	10,590 (×234.8)	2,140 (×47.5)	730 (×16.2)	2f/k/m
5	55.7	2,430 (×43.6)	3,350 (×60.1)	3,710 (×66.6)	1b
6	2930.0	4,000 (×1.4)	3,510 (×1.2)	5,090 (×1.7)	1b
7	393.0	2,420 (×6.2)	5,000 (×12.7)	4,780 (×12.2)	1b/h/6/6t/v/u
8	473.0	2,990 (×6.3)	5,000 (×10.6)	3,690 (×7.8)	1b
9	534.0	2,920 (×5.5)	3,440 (×6.4)	470 (×0.9)	2a/c/j/t/u
10	677.0	4,520 (×6.7)	6,850 (×10.1)	2,590 (×3.8)	1/1b
11	849.0	4,170 (×4.9)	6,270 (×7.4)	1,790 (×2.1)	1b
12	1100.0	6,590 (×6.0)	14,090 (×12.8)	8,430 (×7.7)	1b

*Results are from a previous study in 2018 [1] using the Cobas AmpliPrep/Cobas Taqman HCV Quantitative Test, version 2.0 (Roche, Basel, Switzerland). [†]The number in parentheses means a multiple of the quantity without concentration. Automatic extraction was performed using the Smart LabAssist D14800 and TANBead Nucleic Acid Extraction kit (TANBead, Taoyuan, Taiwan). PEI-magnetic bead extraction was done using the MagExtractor-Viral RNA kit (Toyobo, Osaka, Japan). [‡]HCV genotype was analyzed using the sample showing the best efficacy (highest titer, marked in bold) among the three concentration methods.

Abbreviations: PEI, polyethyleneimine.

MA, USA)를 사용하였다. Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 증폭산물을 정제한 후, BigDye Direct Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA)와 Genetic analyzae DX-3500 (Applied Biosystems, CA, USA)를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열 결과를 미국 국립생물공학 정보센터 데이터베이스[10] 중 일치율이 가장 높은 HCV 유전자형을 확인하였다.

이전 연구[1]에서 측정한 HCV RNA 정량값과 세 가지 방법을 이용해서 농축한 시료에서의 HCV RNA 정량값을 비교한 결과는 Table 2와 같다. Sample No. 1은 이전 연구[1]에서 정량값이 미검출되었으나, 세 가지 농축방법 모두에서 정량값이 확인되었고, 특히 자동핵산추출장비를 이용한 농축에서 정량값이 가장 높게 나타났다. 이전 연구[1]에서 정량값이 확인되지 않은 Sample No. 1을 제외한 검체들의 농축 후 농축배수를 산출한 결과, 농축 전 HCV RNA 역가가 낮을수록 농축배수가 높은 경향을 보였다. HCV RNA 역가가 50 IU/mL 미만인 검체(총 12건 중 3건)에서는 자동핵산추출장비를 사용한 농축법에서의 농축배수가 가장 높게 나타났고, 400 IU/mL 이상인 검체들(총 12건 중 6건)에서는 1건을 제외하고 PEI-magnetic bead를 이용한 농축법에서 농축배수가 가장 높게 나타났다. 초원심분리를 이용한 농축 시 1건의 검체에서는 이전 연구의 정량값보다 더 낮은 역가를 보인 사례도 존재하였다(Sample No. 9). 12건의 저역가 검체에 대한 세 가지 농축 방법 효과에 대한 통계 분석(ANOVA) 결과, 유의미한 차이는 없었으나($P=0.089$), 농축 전 HCV RNA 역가가 50 IU/mL 이하인 검체를 대상으로 세 가지 농축 방법을 통한 농축효과를 통계 분석(ANOVA)한 결과, 자동화추출장비가 다른 두 가지 방법보다 농축효과가 뛰어난 것으로 나타났다($P<0.05$). HCV

유전자형의 분석은 농축 후 HCV RNA 정량값이 최대치를 보인 방법의 핵산을 대상으로 실시하였는데, 자동핵산추출장비 4건(Sample No. 1~4), PEI-magnetic bead 6건(Sample No. 7~12), 그리고 초원심분리기 2건(Sample No. 5, 6)이었다. HCV 유전자형을 분석한 결과, 12건의 검체 중 6건은 1b형, 4건은 mixed type으로 나타났고, 나머지 2건은 유전자형을 확인할 수 없었다. 12건 중 6건(50%)에서 나타난 1b형은 우리나라에서 가장 많이 나타나는 형이다. Mixed type 4건의 경우는 염기서열 분석의 해상도 제한으로 일부 영역에서 명확하게 염기서열을 확인하지 못한 것으로 판단되며, 보다 정확한 분석을 위해서 차세대 염기서열 분석 시스템(next generation sequencing)을 사용한 염기서열 분석을 고려할 필요가 있다. 본 연구에서는 이전 연구[1]와 다른 HCV RNA 표적을 증폭하여 유전자형을 분석하였지만, primer가 인지하는 표적만 바뀌 핵산증폭을 실시하였기 때문에, 증폭 부위 변화가 유전자형 확인을 성공할 수 있었던 요소라기 보다는, 농축에 따른 HCV 핵산의 양 증가가 결정적인 요인이었을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 이전 연구[1]의 HCV NAT 양성 혈액(총 175건; 2007년 128건, 2017년 47건)을 대상으로 실시한 유전자형 검사에서 확인하지 못한 12개 검체를 대상으로 세가지 농축 방법을 이용하여 유전자형을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 적용한 농축 방법은 자동핵산추출장비를 이용한 농축, PEI-magnetic bead를 이용한 농축과 초원심분리기를 이용한 농축이었다. 초원심분리를 이용한 농축방법의 경우 대부분 수기법으로 진행되며, 원심분리시간이 17시간으로 오래 걸리고, 고가의 초원심분리기가 필요하다. PEI-magnetic bead를 이용한 농축은 시간이 상대적으로 짧고, 고가의 장비도 필요하지 않지만, 수작업 과정에서 오류 및 핵산의 손실 가능성을 배제할 수 없고, 검

사자의 숙련도가 필요하다. 반면 silicon dioxide-magnetic particle을 이용한 자동추출장비는 실험과정이 대부분 자동화되어 오류 및 손실가능성이 적다. 저역가 검체에 대한 핵산농축이 필요할 경우 세 가지 방법 모두 효과가 있는 것을 확인하였으며, 특히, 50 IU/mL 이하인 저역가 검체에서는 농축효과, 실험 편의성 및 짧은 소요시간 등을 고려했을 때 자동추출장비가 가장 효용성이 높을 것으로 판단하였다.

요 약

HCV 유전자형 분석은 감염 경로의 규명과 치료 방법 개발에 도움이 될 수 있다. 그러나 낮은 HCV RNA 역가를 지닌 검체의 경우 유전자형을 분석하기가 어렵다. 실제로 지난 연구에서 175건의 HCV NAT 양성 검체 중 12건에 대하여 낮은 역가로 유전자형을 확인하지 못하였다. 본 연구에서는 낮은 역가를 보인 12개 검체의 유전자형을 확인하기 위하여 자동핵산추출장치, PEI-magnetic bead 추출, 그리고 초원심분리기의 방법을 채택하였다. 그리고 그 세 가지 방법으로 시행한 농축값이 가장 높은 핵산을 이용하여 HCV RNA 유전자형을 분석한 결과, 이전 연구에서 유전자형을 확인하지 못한 12검체 중 10검체에 대해 유전자형을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 저역가 검체에 대한 핵산농축이 필요할 경우 세 가지 방법 모두 효과가 있는 것을 확인하였으며, 특히, 50 IU/mL 이하인 저역가 검체에서는 농축효과, 실험 편의성 및 짧은 소요시간 등을 고려했을 때 자동추출장비가 가장 효용성이 높을 것으로 판단하였다.

References

1. Shin SM, Kang JW, Kang JW, Seo YI, Park JR, Lee DD, et al. Analysis of HCV RNA genotypes and quantitative values of Korean HCV NAT reactive blood donors. Korean J Blood Transfus 2019;30:205-11
2. Kang JW, Shin SM, Seo DH, Kang JW, Ko DH, Song CE, et al. Estimation of the residual risk of transfusion-transmissible infectious agents in Korea. Korean J Blood Transfus 2019;30:156-62
3. Lee SH, Kim SJ. Effective concentration method for applying PCR to detect viruses in water. Korean J Microbiol 1999;35:41-6
4. Sanyal D, Kudesia G, Corbitt G. Comparison of ultracentrifugation and polyethylene glycol precipitation for concentration of hepatitis B virus (HBV) DNA for molecular hybridisation tests and the relationship of HBV-DNA to HBe antigen and anti-HBe status. J Med Microbiol 1991;35:291-3
5. Satoh K, Iwata A, Murata M, Hikata M, Hayakawa T, Yamaguchi T. Virus concentration using polyethyleneimine-conjugated magnetic beads for improving the sensitivity of nucleic acid amplification tests. J Virol Methods 2003;114:11-9
6. Uchida E, Sato K, Iwata A, Ishii-Watabe A, Mizuguchi H, Hikata M, et al. An improved method for detection of replication-competent retrovirus in retrovirus vector products. Biologicals 2004;32:139-46
7. Uchida E, Kogi M, Oshizawa T, Furuta B, Satoh K, Iwata A, et al. Optimization of the virus concentration method using polyethyleneimine-conjugated magnetic beads and its application to the detection of human hepatitis A, B and C viruses. J Virol Methods 2007;143:95-103

8. Uchida E, Yamaguchi T. [Viral safety of biologicals: evaluation of hepatitis C virus (HCV) nucleic acid amplification test (NAT) assay and development of concentration method of HCV for sensitive detection by NAT]. *Yakugaku Zasshi* 2010;130:163-9 Japanese
9. Tong YQ, Liu B, Liu H, Zheng HY, Gu J, Liu H, et al. Accurate genotyping of hepatitis C virus through nucleotide sequencing and identification of new HCV subtypes in China population. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:874.e9-874.e21
10. National Center for Biotechnology Information. Genotyping. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi> [Online] (last visited on 29 April 2020)