헌혈혈액 HCV와 HIV 면역혈청검사에 대한 Grey Zone 적용: 아직도 필요한가?

조연정¹ · 권소영² · 양진혁³ · 김재현³ · 김병호⁴ · 신순덕³

대한적십자사 중앙혈액검사센터¹, 서울남부혈액원², 혈액수혈연구원³, 서울서부혈액원⁴

Application of a Grey Zone for HCV and HIV Immunoassays for Blood Donor Screening: Is It still Necessary?

Youn Jung Cho¹, So-Yong Kwon², Jin Hyuk Yang³, Jaehyun Kim³, Byung Ho Kim⁴, Soondoc Shin³

Central Blood Laboratory Center, Korean Red Cross¹, Seoul Nambu Blood Center, Korean Red Cross², Seoul, Blood Transfusion Research Institute, Korean Red Cross³, Wonju, Seoul Seobu Blood Center, Korean Red Cross⁴, Seoul, Korea

Background: When enzyme immunoassays (EIA) were implemented, considering the limited sensitivity of 1st generation EIAs, the Korean Red Cross (KRC) applied grey zones for detection of weak reactive samples that could lead to false negative results. Despite improved performance of assays, grey zone application is still in practice. We examined whether application of a grey zone to HCV and HIV EIAs is still necessary.

Methods: HCV and HIV EIA results, number of grey zone results, results of further testing done on grey zone samples, and NAT results from 2005 to 2012 were analyzed retrospectively using the Blood Information Management System of the KRC.

Results: Among 18,736,094 cases tested, 4,817 HCV (0.03%) and 5,108 HIV (0.05%) cases repeatedly had grey zone results. Twenty-eight (0.58%) HCV grey zone cases were positive on the recombinant immunoblot assay, but negative on NAT. For HIV, 3 cases were diagnosed as indeterminate by the Korea Centers for Disease Control and Prevention (KCDC). However these cases did not seroconvert after several years and were also negative on NAT.

Conclusion: For HCV, since the grey zone led to detection of true anti-HCV positive cases, not detected by NAT, application of the grey zone should be continued. For HIV, since none of the grey zone cases has been diagnosed as HIV positive by the KCDC, further application of the grey zone is thought not to be necessary. Re-evaluation of the grey zone will save costs for testing, and prevent discard of blood components and loss of donors. (Korean J Blood Transfus 2015;26:204-212)

Key words: Enzyme immunoassay, Grey zone, HCV, HIV

Received on July 20, 2015. Revised on July 29, 2015. Accepted on July 29, 2015

Correspondence to: So-Yong Kwon

Seoul Nambu Blood Center, Korean Red Cross, 48 Gaepo-ro 31 gil, Gangnam-gu, Seoul 06304, Korea

Tel: 82-2-570-0600, Fax: 82-2-571-7479, E-mail: sykwon@redcross.or.kr

© 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 © 2015 The Korean Society of Blood Transfusion

서론

B형간염 바이러스(hepatitis B virus, HBV), C형간염 바이러스(hepatitis C virus, HCV) 및 인간면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)는 주요 수혈전파성감염(transfusion-transmitted infection, TTI)이다. 수혈을 통한 이들 바이러스의 전파를 방지하기 위해서 대한적십자사에서는 헌혈혈액 선별검사로 1987년부터 HIV에 대해서 그리고 1991년부터 HCV에 대해서 효소면역검사법(enzyme immunoassay, EIA)을 사용하여 항체검사를 시행하고 있다. 그러나 당시 1세대 EIA 시약들은 민감도가 낮아서, 위음성(false negative) 결과에 의한 감염 우려가 있었고 이를 방지하기 위해 양성 판정기준(signal to cutoff ratio, S/C ratio)보다 낮은 0.8 이상 1.0 미만의 S/C ratio를 grey zone으로 정하여 관리하여 왔다.

HCV는 EIA grey zone을 선별초회검사에만 적용하고 있으며, 중복(duplicate)으로 시행하는 선별재검사에서 1개 이상의 검체가 양성이면 확인검사인 면역블롯검사(recombinant immunoblot as-

say, RIBA)를 시행하고 있다(Fig. 1). HIV의 경우 선별초회검사 grey zone 결과는 재검사하고, 선별재검사에서 grey zone인 검체에 대해서는 화학발광면역검사법(chemiluminescence immunoassay, CLIA)로 추가검사를 시행하고 있다. 추가검사에서 0.85 이상 1.0 미만으로 정한 grey zone 이상의 결과를 보이는 검체는 보건환경연구원(Health Environment Institute, HEI)으로 확인검사를 의뢰하고 있었다(Fig. 2).

HCV는 선별재검사 양성, HIV는 선별재검사 grey zone 이상이면 관련 혈액을 모두 폐기하여 왔으며, 헌혈자는 헌혈유보군(donor deferral registry, DDR)로 등록하고 있으며, 이들 헌혈자는 안전성 검사(re-entry test)에서 음성 결과를 보여야 다시 헌혈할 수 있다.

현재 대한적십자사에서는 우수한 민감도와 특이도를 가진 3세대 EIA 검사시약을 사용하고 있으며, 2005년에는 EIA로 검출할 수 없는 윈도우기(window period)의 HCV와 HIV감염 혈액을 조기에 검출하기 위해 핵산증폭검사(nucleic acid amplification test, NAT)를 도입하였다. 또한 2012

Fig. 1. Blood donor screening algorithm for hepatitis C virus (HCV). Donors with tests results indicated in red are registered in the donor deferral registry (DDR). EIA, enzyme immunoassay; RIBA, recombinant immunoblot assay; S/C, signal to cutoff ratio.

Fig. 2. Blood donor screening algorithm for human immunodeficiency virus (HIV). Donors with tests results indicated in red are registered in the donor deferral registry (DDR). CLIA, chemiluminescence immunoassay; EIA, enzyme immunoassay; HEI, Health Environment Institute; KCDC, Korea Centers for Disease Control and Prevention; S/C, signal to cutoff ratio.

년에는 mini-pool NAT를 개별(individual) NAT로 전환하여 혈액제제로 인한 이데 바이러스의 감염 위험은 그 어느 때보다 낮아졌다. 그럼에도 1세대 EIA검사시약에 적용하던 grey zone을 계속 유지하고 있어 연간 1,200여건(0.05%)의 혈액이 폐기되고 관련 헌혈자들이 DDR로 관리되며 추가 검사를 위한 비용이 발생하고 있다.

본 연구에서는 NAT를 실시하기 시작한 2005년부터 2012년까지 8년 동안의 헌혈자 선별검사 중 HCV와 HIV EIA에 적용하고 있는 grey zone 결과에 대한 확인검사 결과를 추적 조사하여, 현 시점에서 EIA에 대한 grey zone 적용의 유용성을 검토하였다.

대상 및 방법

본 연구는 대한적십자사 혈액관리본부 연구윤리심의위원회의 승인(안전관리팀-732)을 받고 진행하였다.

2005년부터 2012년까지 대한적십자사 헌혈혈액에 대한 HCV와 HIV EIA 검사 결과, grey zone 발생건수, 그에 따른 재검사와 확인검사 및 NAT 결과를 조사하였다. HCV의 경우에는 RIBA 결과를, HIV는 보건환경연구원과 질병관리본부(Korea Centers for Disease Control & Prevention, KCDC)의 확인검사 결과를 조사하였다. 또한 대한적십자사에서 사용한 각 검사방법별 검사시약을 조사하였다.

결 과

1. HCV grey zone 발생 건수와 추가검사 결과

2005년부터 2012년까지 대한적십자사에서 사용한 HCV 검사시약은 Table 1과 같다. 2005년부터 2012년까지 대한적십자사에서 실시한 헌혈혈액에 대한 HCV와 HIV 선별초회검사 18,736,094 건 중 HCV grey zone은 16,215건(0.09%)이었다.

Grey zone을 재검사한 결과, 약 1/3인 4,817건(0.03%)이 한 웰 이상에서 양성 결과를 보여 HCV RIBA를 시행하였는데, 그 결과 양성이 28건(0.58%), 보류(indeterminate)가 407건(8.45%)이었다(Table 2). HCV grey zone 중 RIBA 양성은 모두 HCV NAT 검사 음성이었다.

2. HIV grey zone 발생 건수와 추가검사 결과

2005년부터 2012년까지 대한적십자사에서 사

Table 1. Assays used for hepatitis C virus testing by the Korean Red Cross

Test method	Assays
EIA	2005~2006: LG HCV 3.0 TMB (LG Life Science, Daejeon, Korea) Murex Anti-HCV (Abbott, Dartford, UK) 2007~2012: LG HCV 3.0 TMB (LG Life Science, Daejeon, Korea)
RIBA	2005~2012: LG HCD confirm (LG Life Science, Daejeon, Korea)
NAT	2005~2012. 6: COBAS Ampliscreen HCV 2.0 (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) Procleix HIV-1/HCV assay (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA, USA) After 2012. 6: Procleix Ultrio plus assay (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA, USA)

Abbreviations: EIA, enzyme immunoassay; RIBA, recombinant immunoblot assay; NAT, nucleic acid amplification test.

Table 2. Incidence and resolution of EIA grey zone results for hepatitis C virus

Year	No. of blood units	No. of grey zone units (%)	No. of retest positives (%)	RIBA (%)		
				Negative	Indeterminate	Positive*
2005	2,223,636	2,623 (0.12)	418 (0.02)	404 (96.7)	14 (3.3)	
2006	2,250,592	2,687 (0.12)	427 (0.02)	413 (96.7)	12 (2.8)	2 (0.5)
2007	2,028,684	2,197 (0.11)	393 (0.02)	374 (95.2)	19 (4.8)	
2008	2,265,592	1,196 (0.05)	437 (0.02)	434 (99.3)	3 (0.7)	
2009	2,461,880	1,635 (0.07)	565 (0.02)	538 (95.2)	26 (4.6)	1 (0.2)
2010	2,514,699	1,204 (0.05)	538 (0.02)	478 (88.8)	58 (10.8)	2 (0.4)
2011	2,448,516	2,280 (0.09)	1,027 (0.04)	922 (89.8)	96 (9.3)	9 (0.9)
2012	2,542,495	2,393 (0.09)	1,012 (0.04)	819 (80.9)	179 (17.7)	14 (1.4)
Total	18,736,094	16,215 (0.09)	4,817 (0.03)	4,382 (91.0)	407 (8.45)	28 (0.58)

*All RIBA positive samples were NAT negative.

Abbreviations: EIA, enzyme immunoassay; RIBA, recombinant immunoblot assay.

용한 HIV 검사시약은 Table 3과 같다. 2005년부터 2012년까지 선별초회검사에서 HIV EIA grey zone으로 판정된 9,266건(0.05%) 중 55.1%인 5,108건(0.03%)은 재검사에서 같은 grey zone 결과를 보였다(Table 4). 5,108건 중 CLIA 양성 30건, grey zone은 166건이었다. 이들 196건 중 3건이 보건환경연구원 또는 질병관리본부에서 보류로 판정되었으나 현재까지 양성으로 전환된 사례는 없다. 선별초회검사 HIV grey zone 검체 중 HIV NAT 양성은 없었다.

고 찰

면역혈청검사는 일반적으로 흡광도의 S/C ratio로 양성과 음성을 판정하며, 검사법마다 최적화된 판정기준치를 설정하여야 한다. Feinstein은 임상검사에서 판정기준치에 의한 양·음성의 이분법적 결과보다는 불확실(uncertain), 보류(indeterminate) 또는 미결정(inconclusive)를 포함하는 3단계(three-zone)의 판정을 제안하였다.¹⁾ Clinical and Laboratory Standards Institute 지침에 따르면 진단 검사시약의 판정기준치는 다수의 음성 검체를 사

Table 3. Assays used for human immunodeficiency virus testing by the Korean Red Cross

Test method	Assays
EIA	2005.1~7: Genedia HIV Ag-Ab (Greencross, Yongin, Korea) 2005.8~2008: Genedia HIV Ag-Ab (Greencross, Yongin, Korea) LG Anti-HIV 1/2 Plus ELISA (LG Life Science, Daejeon, Korea) 2009~2012: LG Anti-HIV 1/2 Plus ELISA (LG Life Science, Daejeon, Korea)
NAT	2005~2012. 6: COBAS Ampliscreen HCV 2.0 (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) Procleix HIV-1/HCV assay (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA, USA) After 2012. 6: Procleix Ultrio plus assay (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA, USA)

Abbreviations: EIA, enzyme immunoassay; NAT, nucleic acid amplification test.

Table 4. Incidence and resolution of grey zone results in human immunodeficiency virus

Year	No of blood units	No of EIA grey zone units (%)		HEI/KCDC result	
		Initial test	Retest	Indeterminate	Positive
2005	2,223,636	1,005 (0.05)	456 (0.02)	2	0
2006	2,250,592	1,339 (0.06)	732 (0.03)	0	0
2007	2,028,684	1,272 (0.06)	694 (0.03)	1	0
2008	2,265,592	1,003 (0.04)	452 (0.02)	0	0
2009	2,461,880	1,112 (0.05)	641 (0.03)	0	0
2010	2,514,699	1,176 (0.05)	747 (0.03)	0	0
2011	2,448,516	1,523 (0.06)	930 (0.04)	0	0
2012	2,542,495	836 (0.03)	456 (0.02)	0	0
Total	18,736,094	9,266 (0.05)	5,108 (0.03)	3	0

Abbreviations: EIA, enzyme immunoassay; HEI, Health Environment Institute; KCDC, Korea Centers for Disease Control and Prevention.

용한 검사에서 대조용의 공시료(blank) 중 가장 높은 값을 갖는 농도를 기준으로 표준편차를 산정하여 기준치를 설정하거나 또는 약양성 검체를 희석하여 C50 (50 positive/50 negative) 농도로 반복 검사한 측정값을 기준으로 설정하고, grey zone에 해당하는 범위를 포함하여 판정기준치 이상의 결과값을 보이는 검체에 대해서만 양성으로 판정하도록 하고 있다.²⁾

TTI 방지와 헌혈자 관리를 위해 바이러스 검사 시약의 민감도와 특이도가 높아야 하는데, 바이러스 검사의 민감도는 사용하는 항원의 종류와 성상에 좌우된다. 그러나 1990년에 개발된 1세대 HCV 항체 검사시약들의 민감도와 특이도는 다소 떨어졌었다.^{3,4)} 이러한 1세대 시약의 한계를 극복하기 위해 1세대 검사시약에 포함되어 있던 항원단백 c100-3외에 c22-3과 c33c 항원단백을 추가한 2세대 검사시약들이 1992년부터 도입되어 민감도가 개선되었다.^{5,6)} 1996년에는 c100 재조합 단백을 없애고 NS-5 재조합단백을 포함시킨 제3세대 검사시약의 개발로 윈도우기가 더 단축될 수 있었다.⁵⁾ 대한적십자사에서는 1세대 EIA 시약으로 헌혈혈액 선별검사를 시행하면서 혈액의 안전성 강화를 위해 양성기준($S/C \geq 1.0$)에는 해당하지 않으나 근접한 경우($0.8 \leq S/C < 1.0$)를 grey zone으로 정하여 재검하는 기준으로 규정하였다. 1995년 대한적십자사 혈액수혈연구원 사업 및 연구보고서에 따르면, 전국 16개 혈액원의 바이러스 선별검사서에서 HBV의 S/C는 0.5~0.97 이상, HCV는 0.5~0.8 이상, HIV는 0.4~0.5 이상으로 기관별로 grey zone 적용 기준이 달랐다.⁷⁾ 1996년부터는 HBV, HCV 및 HIV 모두 grey zone S/C를 0.8로 동일하게 설정하고 검사단계 중 HBV와 HIV는 선별 초회와 재검사에, HCV는 초회 검사 결과판정에만 적용하고 있다.

외국의 경우, 미국 Blood System Research

Institute에서는 과거에 HIV에 대해서 판정기준치의 90%인 S/C 0.9 이상을 grey zone으로 설정하고 이들 검체에 대해서 확인검사를 시행하였는데, grey zone 결과를 보였던 검체들의 90% 이상이 확인검사서에서 음성결과를 보여 헌혈혈액 선별검사서에서 grey zone을 폐지하였으며 다른 검사항목에 대해서도 grey zone을 적용하지 않고 있다(개인교신). 이외 일본적십자사, 영국국립혈액원 등에서도 헌혈혈액 선별검사에 grey zone을 적용하고 있지 않다(개인교신).

Zhang 등⁸⁾은 1종의 면역혈청검사시약(immunoassay)과 NAT만으로는 HCV RNA 음성, anti-HCV 항체 양성인 검체를 검출하지 못할 수도 있다는 것을 검증하기 위해 10종의 면역혈청검사시약으로 검사한 결과, 47개의 RIBA 양성이나 HCV RNA 음성인 검체에 대한 이들 검사시약의 HCV 항체 검출률이 10.64%에서 43.04%로 다양한 것으로 보고하였다. 또한 검사시약에 따라 S/C ratio가 1.0 미만이었던 경우도 65.96%에서 89.36%까지 다양한 결과를 나타내었다. 2종의 면역혈청검사시약으로 검사할 경우에는 결과가 가장 좋은 조합의 경우 검출률이 55.57%까지 증가하여 Zhang 등⁸⁾은 수혈혈액의 안전성을 위해 HCV NAT 검사와 함께 2종의 anti-HCV 선별검사시약을 사용할 것을 권장하였다. Couroucé 등⁹⁾도 3세대 검사시약들이 감염 초기의 항체를 검출하는 데에 성능의 차이가 있는 것으로 보고하였다. 이와 같이 검사시약에 따라 검사결과가 상이한 것은 각 검사시약을 구성하고 있는 재조합 항원의 구조와 이들 항원들을 제조할 때 사용한 방법에 따라 혈청 내에 존재하는 항체가 다르게 반응할 수 있는 것으로 해석되고 있다.^{10,11)} 따라서 검사시약간 검출 성능의 차이를 보완하기 위해서 Zhang 등⁸⁾이 제안한 것처럼 2종의 검사시약을 사용하는 것이 현실적으로 어려운 경우에는 grey zone 적용과 같이

양성 판정 기준의 범위를 넓히는 것도 대안이 될 수 있을 것이다.

만성 C형간염의 경우에는 HCV RNA 역가가 안정적으로 유지되는 반면, HCV 감염 초기는 HCV RNA 역가의 변동이 특징적이다.¹²⁾ 이러한 HCV RNA의 변동은 C형간염 환자군은 물론이고 치료받지 않은 헌혈자군에서도 확인되었다.¹³⁻¹⁸⁾ 혈액사업에서 이러한 혈액이 중요한 이유는 이들 혈액이 감염성이 있기 때문이다.¹⁹⁾ 2005년부터 2012년 동안의 기간에도 grey zone 적용을 통해서 확인이 가능했던 HCV 항체 양성 28건은 HCV NAT에서는 검출되지 않았다. 이들 28건이 모두 HCV 감염초기에 있는 혈액이라고 단정지을 수는 없고 HCV 감염으로부터 회복된 경우일 수도 있으나 HCV 감염초기 상태를 배제할 수도 없다. 따라서 grey zone 적용으로 이들 혈액을 폐기한 것은 의미가 있다고 하겠다.

HIV의 경우 2005년부터 2012년까지 grey zone 결과로 인해서 질병관리본부의 확진 검사가 의뢰된 혈액 중 2005년에 2건 그리고 2007년에 1건이 보류로 판정되었을 뿐 양성으로 판정되거나 HIV NAT 양성 결과를 보인 사례도 없었다. EIA 검사에서 반복양성 결과를 보이는 경우 많게는 20% 가량이 HIV 항체 확인검사인 웨스턴블롯(Western blot, WB) 검사에서 보류 결과를 나타내는 것으로 보고되고 있다.²⁰⁻²²⁾ WB 상 보류 결과는 항체 생성이 아직 불완전한 HIV 감염의 가능성이 있기 때문에 미국 질병관리본부(Centers for Disease Control)는 6개월 후에 검사를 다시 하고, 6개월 후에도 WB 결과가 보류이거나 음성일 경우에는 HIV 음성으로 판정해야 하는 것으로 권장하였다. EIA 검사 음성인 경우에도 최대 20%에서 WB 보류 결과를 나타낼 수 있는데, HIV 감염을 의심할 수 있는 다른 특이 소견 없이 보류 결과가 지속되는 경우에는 이들 역시 HIV 음성으로 판정하고

있다.²³⁾ 또한 WB 보류인 헌혈자의 혈액을 수혈받은 경우 수혈자에게 HIV가 전파되지 않은 것으로 보고되었다.^{24,25)} 2005년에서 2012년까지 조사한 대상들에서도 3건이 질병관리본부에서 보류로 판정을 받았으나 아직까지 이들 헌혈자가 양성으로 전환되지 않았으므로 HIV 음성으로 판정하여야 할 것이다. 따라서 HIV의 경우에는 HIV 검사시약의 HIV 항체를 검출할 수 있는 성능의 개선, HIV NAT 검사의 도입 등을 감안할 때 grey zone 적용이 더 이상 유용하지 않은 것으로 판단된다. HIV EIA에 대한 grey zone 폐지 불필요한 혈액의 폐기를 방지하고, 재검사 및 추가 확인검사에 따른 비용을 절감할 수 있을 것이다. 뿐만 아니라 grey zone 결과로 DDR로 관리되는 헌혈자에게 HIV 감염에 대한 불필요한 걱정을 야기하게 되지 않으며 DDR 등록으로 인한 헌혈자원 감소를 방지할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 HCV와 HIV EIA에 대한 grey zone 적용의 실효성을 재평가하였다. 2012년부터 NAT 검사를 시행한 HBV에 대해서는 보다 많은 자료가 축적된 후 재평가할 예정이다. 본 연구결과를 근거로 HCV EIA에 대해서는 grey zone 적용을 유지하고 HIV EIA에 대해서는 grey zone 적용을 폐지할 것을 제안하였으며, 이 제안이 반영되어 대한적십자사에서는 2015년 5월부터 HIV에 대해서 grey zone 적용을 중단하였다.

요 약

배경: 대한적십자사에서는 C형간염 바이러스(hepatitis C virus, HCV)와 인간면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)에 대한 효소면역검사법(enzyme immunoassay, EIA) 도입 당시 1세대 검사시약의 낮은 민감도를 고려해서 위음성 결과를 방지하고자 grey zone을 적용하였다.

그러나 이후 검사시약의 민감도가 개선되었음에도 불구하고 이에 대한 재평가가 없었기에 본 연구에서는 헌혈혈액에 대한 바이러스 EIA 검사에 있어 grey zone을 계속 적용할 필요가 있는지를 검토하였다.

방법: 대한적십자사의 혈액정보관리시스템을 이용하여 2005년부터 2012년까지 HCV와 HIV EIA 검사 결과, grey zone 발생건수, 그에 따른 재검사와 확인검사 및 NAT 결과를 후향적으로 추적 조사하였다.

결과: 총 18,736,094건에 대해서 검사한 결과 재검사까지 grey zone으로 판정된 경우는 HCV가 4,817건(0.03%) 그리고 HIV가 5,108건(0.05%)이었다. HCV grey zone 검체에 대한 면역블롯검사에서 28건(0.58%)이 양성으로 판정되었으며 이들은 NAT 검사에서 음성이었다. HIV의 경우에는 3건이 질병관리본부에서 보류로 판정되었으나 현재까지 양성으로 전환되지 않았고 NAT 검사결과도 음성이었다.

결론: HCV의 경우에는 NAT 검사로 검출되지 않은 HCV 항체 양성건들이 grey zone 적용으로 확인되었으므로 이를 유지할 필요가 있다. 그러나 HIV의 경우 질병관리본부에서 양성으로 확진된 사례가 없어 grey zone을 더 이상 적용할 필요가 없다고 판단되었다. Grey zone 적용의 재검토를 통해 추가 검사로 인한 비용을 절감하고 불필요한 혈액의 폐기와 헌혈자원의 감소를 방지할 수 있을 것이다.

References

1. Feinstein AR. The inadequacy of binary models for the clinical reality of three-zone diagnostic decisions. *J Clin Epidemiol* 1990;43:109-13
2. NCCLS. User protocol for evaluation of qualitative test performance: approved guideline. 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008
3. McFarlane IG, Smith HM, Johnson PJ, Bray GP, Vergani D, Williams R. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenetic factor or false-positive result? *Lancet* 1990;335:754-7
4. Weiner AJ, Kuo G, Bradley DW, Bonino F, Saracco G, Lee C, et al. Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1990;335:1-3
5. Tobler LH, Busch MP. History of post-transfusion hepatitis. *Clin Chem* 1997;43:1487-93
6. Larsen J, Skaug K, Maeland A. Second-generation anti-HCV tests predict infectivity. *Vox Sang* 1992;63:39-42
7. Korean Red Cross. Annual report of Blood Transfusion Research Institute. Seoul: Korean Red Cross Blood Transfusion Research Institute, 1995
8. Zhang K, Wang L, Sun Y, Zhang R, Lin G, Xie J, et al. Improving the safety of blood transfusion by using a combination of two screening assays for hepatitis C virus. *Transfus Med* 2014;24:297-304
9. Couroucé AM, Barin F, Botté C, Lunel F, Maisonneuve P, Maniez M, et al. A comparative evaluation of the sensitivity of seven anti-hepatitis C virus screening tests. *Vox Sang* 1995;69:213-6
10. Lin S, Arcangel P, Medina-Selby A, Coit D, Ng P, Nguyen S, et al. Design of novel conformational and genotype-specific antigens for improving sensitivity of immunoassays for hepatitis C virus-specific antibodies. *J Clin Microbiol* 2005;43:3917-24
11. Zachary P, Ullmann M, Djeddi S, Meyer N, Wendling MJ, Schvoerer E, et al. Evaluation of three commercially available hepatitis C virus antibody detection assays under the conditions of a clinical virology laboratory. *J Clin Virol*

- 2005;34:207-10
12. Hajarizadeh B, Grebely J, Applegate T, Matthews GV, Amin J, Petoumenos K, et al; ATACH study group. Dynamics of HCV RNA levels during acute hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2014;86:1722-9
13. Cox AL, Netski DM, Mosbrugger T, Sherman SG, Strathdee S, Ompad D, et al. Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2005;40:951-8
14. McGovern BH, Birch CE, Bowen MJ, Reyor LL, Nagami EH, Chung RT, et al. Improving the diagnosis of acute hepatitis C virus infection with expanded viral load criteria. *Clin Infect Dis* 2009;49:1051-60
15. Loomba R, Rivera MM, McBurney R, Park Y, Haynes-Williams V, Rehmann B, et al. The natural history of acute hepatitis C: clinical presentation, laboratory findings and treatment outcomes. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33: 559-65
16. Hyland C, Seed CR, Kiely P, Parker S, Cowley N, Bolton W. Follow-up of six blood donors highlights the complementary role and limitations of hepatitis C virus antibody and nucleic acid amplification tests. *Vox Sang* 2003;85:1-8
17. Fang CT, Tobler LH, Haesche C, Busch MP, Phelps B, Lepar G. Fluctuation of HCV viral load before seroconversion in a healthy volunteer blood donor. *Transfusion* 2003;43:541-4
18. Kretzschmar E, Chudy M, Nübling CM, Ross RS, Kruse F, Trobisch H. First case of hepatitis C virus transmission by a red blood cell concentrate after introduction of nucleic acid amplification technique screening in Germany: a comparative study with various assays. *Vox Sang* 2007;92:297-301
19. Busch MP, Tobler LH, Gerlich WH, Schaefer S, Giachetti C, Smith R. Very low level viremia in HCV infectious unit missed by NAT. *Transfusion* 2003;43:1173-4
20. Celum CL, Coombs RW, Lafferty W, Inui TS, Louie PH, Gates CA, et al. Indeterminate human immunodeficiency virus type 1 western blots: seroconversion risk, specificity of supplemental tests, and an algorithm for evaluation. *J Infect Dis* 1991;164:656-64
21. Dock NL, Kleinman SH, Rayfield MA, Schable CA, Williams AE, Dodd RY. Human immunodeficiency virus infection and indeterminate western blot patterns. Prospective studies in a low prevalence population. *Arch Intern Med* 1991;151:525-30
22. Busch MP, Kleinman SH, Williams AE, Smith JW, Ownby HE, Laycock ME, et al. Frequency of human immunodeficiency virus (HIV) infection among contemporary anti-HIV-1 and anti-HIV-1/2 supplemental test-indeterminate blood donors. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *Transfusion* 1996;36:37-44
23. Ramirez E, Uribe P, Escanilla D, Sanchez G, Espejo RT. Reactivity patterns and infection status of serum samples with indeterminate Western immunoblot tests for antibody to human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 1992;30:801-5
24. van der Poel CL, Lelie PN, Reesink HW, van Exel-Oehlers PJ, Tersmette M, van den Akker R, et al. Blood donors with indeterminate anti-p24gag reactivity in HIV-1 western blot: absence of infectivity to transfused patients and in virus culture. *Vox Sang* 1989;56:162-7
25. Genesca J, Shih JW, Jett BW, Hewlett IK, Epstein JS, Alter HJ. What do western blot indeterminate patterns for human immunodeficiency virus mean in EIA-negative blood donors? *Lancet* 1989;2:1023-5