HCV 핵산증폭검사 양성 헌혈 혈액의 바이러스 유전자 정량 및 유전자형 분석

신선미¹ · 강재원² · 강정원² · 서영익³ · 박정란⁴ · 이대동⁵ · 민혁기⁶ · 김명환³

대한적십자사 중앙혈액검사센터/품질관리팀¹, 대한적십자사 혈액수혈연구원/감염예방연구팀², 대한적십자사 중앙혈액검사센터³, 대한적십자사 대전세종충남혈액원⁴, 대한적십자사 남부혈액검사센터⁵, 대한적십자사 중부혈액검사센터⁶

Analysis of HCV RNA Genotypes and Quantitative Values of Korean HCV NAT Reactive Blood Donors

Sunmi Shin¹, Jae-won Kang², Jungwon Kang², Young Ik Seo³, Jung Ran Park⁴, Dae Dong Lee⁵, Hyukki Min⁶, Myunghan Kim³

Central Blood Laboratory Center, Korean Red Cross/Quality Management Team¹, Seoul, Blood Transfusion Research Institute, Korean Red Cross/TTI Research Team², Wonju, Central Blood Laboratory Center, Korean Red Cross³, Seoul, Daejeon Sejong Chungnam Blood Center, Korean Red Cross⁴, Busan, Nambu Blood Laboratory Center, Korean Red Cross⁵, Jungbu Blood Laboratory Center, Korean Red Cross⁶, Daejeon, Korea

Background: Ever since the Korean Red Cross adopted HCV NAT for blood donor screening in 2005, HCV NAT reactive donors have been identified every year. The identification of the clinical features for these HCV NAT reactive donors may be helpful for the treatment and prevention of HCV infection.

Methods: We analyzed HCV NAT reactive samples to examine the distribution of HCV RNA genotypes and the quantitative values of 128 and 47 HCV NAT reactive samples in 2007 and 2017, respectively.

Results: The dominant genotype of the HCV NAT reactive donors was 1b showing 50.0% (64/128) in 2007 and 44.7% (21/47) in 2017. The genotype 2a was the second most dominant at 40.6% (52/128) in 2007 and 40.4% (19/47) in 2017. The mean titers of HCV RNA were 3.17×10^6 IU/mL in 2007 and 2.61×10^6 IU/mL in 2017. More than 90% of the donors showed a range of more than 1,000 IU/mL for the HCV RNA titer. There was no difference of quantitative values in the different genotypes.

Conclusion: In this study, the distribution of HCV RNA genotypes in Korean blood donors showed a similar pattern compared to that of the general population. There was no correlation between the quantitative values and genotypes in the HCV NAT reactive blood donors, and there was no significant variation in the distribution of HCV RNA genotypes of the HCV NAT reactive donors between 2007 and 2017. Yet it is thought that the characteristics of HCV NAT reactive samples in other years have to be analyzed to achieve more significant results. (Korean J Blood Transfus 2019;30:205-211)

Key words: HCV, Genotype, Quantitative values

Received on September 10, 2019. Revised on October 29, 2019. Accepted on November 15, 2019

Correspondence to: Jae-won Kang

Blood Transfusion Research Institute, Korean Red Cross/TTI Research Team, 50 Hyeoksins-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 ©2019 The Korean Society of Blood Transfusion

서론

C형간염바이러스(hepatitis C virus, HCV)는 만성간염, 간경변증 등의 간질환의 주요원인으로 [1], 우리나라 간경변증 및 간암환자의 약 10~15%가 HCV에 기인하는 것으로 나타나 있다[2]. 과거 HCV 감염은 주로 수혈에 의한 경우가 많았으나, 1991년부터 국내 헌혈 혈액에 대한 HCV 항체검사를 도입하였으며, 2005년부터는 HCV의 핵산 증폭검사(nucleic acid amplification test, NAT)를 실시하고 있어, 수혈에 의한 HCV 감염의 위험은 크게 감소하였다. HCV NAT는 도입 초기에는 Cobas AmpliScreen과 Procleix assay를 이용하여 mini pool의 방법으로 검사를 실시하다가 2012년 2월부터는 Procleix Ultrio Plus assay를 이용하여 개별검체에 대한 검사를 실시하고 있다.

HCV는 염기서열의 변이에 따라 일반적으로 6개의 유전자형으로 구분되며, HCV의 유전자형은 항바이러스 치료의 약제나 치료기간을 결정하는 주요 인자이다[3]. 전세계적으로 유전자형 1형의 빈도가 46%로 가장 빈도가 높고, 3형이 22%, 2형 및 4형이 각각 13%를 차지하는 것으로 나타나 있으며[4], 유전자형 3형은 동남아시아에, 4형은 중동, 이집트, 중앙아프리카, 5형은 남아프리카, 6형은 홍콩, 마카오, 베트남에 주로 분포되어 있는 것으로 나타나 있다[5]. 국내의 경우 1b형과 2a형이 가장 흔하고 기타 1a형, 2b형, 3형, 4형, 6형 등은 1% 미만으로 보고되어 있으며[6], 2005년부터 2009년 동안 HCV NAT 양성으로 나타난 헌혈자에서의 유전자형 분포는 1b형이 47.7%, 2a/2c형 35.5%, 2형 7.6%, 2b형 2.3%, 1a형 1.3%, 1형 0.9%, 2v형 0.5%, 1v형 0.1%로 나타나 있다[7].

본 연구는 2007년도와 2017년도 HCV 양성 헌혈 혈액에 대한 유전자형 검사 및 HCV RNA 정량 검사를 실시하여 국내 HCV NAT 양성 헌혈자

에서의 HCV 임상 자료의 변화를 관찰함으로써 향후 HCV 관련 헌혈 혈액의 안전 대책 강화를 위한 참고 자료로 제시하고자 하며, 더불어 검사 시약 및 장비 등의 임상 평가를 위한 재료로서 희소성의 가치가 있는 귀중한 시료를 장기적으로 보관할 수 있는 체계를 마련하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

HCV NAT 양성 헌혈 혈액 163건(2007년)과 61건(2017년) 중 시료가 확보되어 있는 128건(2007년)과 47건(2017년)을 대상으로 하였다.

2. 방법

1) HCV RNA 유전자형 분석

HCV RNA의 core 단백 유전자와 5'-UTR 영역을 표적으로 Sanger method에 의한 염기서열 분석을 통하여 HCV RNA 유전자형을 분석하였다. MAGNa Pure 96 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)을 이용하여 HCV NAT 양성 혈장으로부터의 핵산을 추출하였으며, 역전사중합효소연쇄반응으로 cDNA를 합성, 증폭 후 ExoSAP-IT Express PCR Reagent (Thermo Scientific, MA, USA)로 증폭산물을 정제하였다. ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA)를 사용하여 염기서열을 분석 후 BLAST 검색을 통하여 유전자형을 결정하였다.

2) HCV RNA 정량검사

Cobas TaqMan (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)을 이용하여 대상 검체에서의 HCV RNA에 대한 정량 검사를 실시하였다. 제조사 COA (Certificate of analysis)에 따른 분석민감도는 98%이며, 검출한계는 10 IU/mL이었다.

3. 통계 검증

통계적인 유의성은 chi-square test를 이용하여 검증하였으며, 유의 수준은 $P < 0.01$ 로 하였다.

결 과

1. HCV RNA 유전자형 분포(Table 1)

2007년도에 발생한 HCV NAT 양성 헌혈 혈액 128건과 2017년도에 발생한 HCV NAT 양성 헌혈 혈액 47건 중 각각 64건(50.0%)과 21건(44.7%)에서 HCV RNA 유전자형 1b로 확인되어 가장 많은 분포를 보였으며, 그 다음으로 많은 분포를 보인 것은 2a형으로 2007년도의 경우는 52건(40.6%), 2017년도에는 19건(40.4%)이 확인되었다. 1b형과 2a형을 제외한 유전자형으로 확인된 사례는 2007년도에 1a 1건, 2b 3건, 3a 1건과 2017년도에 2b 1건, 3a 1건이 있었다. 2007년 7건(5.5%)과 2017년 5건(10.6%)의 경우는 유전자형을 확인할 수 없었다. 2007년도와 2017년도의 유전자형 분포는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

Table 1. Distribution of HCV genotype among the HCV NAT positive donors (2007 vs 2017)

HCV genotype	2007	2017
1b	64 (50.0%)	21 (44.7%)
2a	52 (40.6%)	19 (40.4%)
1a	1 (0.8%)	0 (0.0%)
2b	3 (2.3%)	1 (2.1%)
3a	1 (0.8%)	1 (2.1%)
Undetermined	7 (5.5%)	5 (10.6%)
Total	128	47

2. HCV RNA 정량검사 분포

2007년도의 경우 128건의 HCV NAT 양성 혈액의 평균 HCV RNA의 역가는 3.17×10^6 IU/mL (최소 4.51×10^1 IU/mL, 최대 5.01×10^9 IU/mL)로 나타났다. 2017년도의 경우 47건 중 1건은 정량값을 도출하지 못하였고 나머지 46건의 평균 HCV RNA 역가는 2.61×10^6 IU/mL (최소 1.51×10^1 IU/mL, 최대 2.21×10^7 IU/mL)로 나타났다. HCV RNA의 역가 범위별 분포를 살펴본 결과 Fig. 1과 같이 나타났으며, 2007년에는 128건 중 66건(51.6%)이, 2017년에는 46건 중 22건(46.8%)이 $10^6 \sim 10^7$ IU/mL 범위의 HCV RNA 역가를 보였고, 100 IU/mL 미만으로 나타난 경우는 2007년 2건(1.6%)과 2017년 3건(6.4%)이 있었다.

유전자형을 확인할 수 없었던 2007년도의 7건과 2017년도의 5건의 HCV RNA 역가는 Table 2와 같으며, 2017년 1건의 경우 선별검사에서의

Fig. 1. Distribution of HCV RNA titer among the HCV NAT positive donors (2007 vs 2017).

HCV NAT는 양성 결과를 보였으나, 정량값을 도출하지 못한 경우이었다. 정량값을 도출한 혈액 중 100 IU/mL 미만의 HCV RNA 역가를 보인 2007년 2건과 2017년 2건은 모두 유전자형을 확인할 수 없었고, 100~1,000 IU/mL의 역가를 보인 2007년 5건 중 4건, 2017년 1건에서 유전자형을 확인할 수 없었다. 1,000 IU/mL 이상의 역가를 보인 혈액 중 유전자형을 확인할 수 없었던 경우는

Table 2. HCV RNA titers in the donors whose genotypes have not been identified

	Year of donation	HCV RNA titer (IU/mL)
Donor 1	2007	4.51×10^1
Donor 2	2007	5.57×10^1
Donor 3	2007	3.93×10^2
Donor 4	2007	4.73×10^2
Donor 5	2007	5.34×10^2
Donor 6	2007	8.49×10^2
Donor 7	2007	1.10×10^3
Donor 8	2017	ND
Donor 9	2017	1.51×10^1
Donor 10	2017	1.53×10^1
Donor 11	2017	6.77×10^2
Donor 12	2017	2.93×10^3

Abbreviation: ND, not detected in the quantitative assay.

2007년과 2017년에 각각 1건씩 나타났다(HCV RNA 역가는 각각 1.10×10^3 IU/mL, 2.93×10^3 IU/mL).

HCV RNA 유전자형별 HCV 역가는 Table 3과 같으며, 1b형과 2a형에서의 HCV RNA 역가의 차이는 뚜렷하게 관찰되지 않았고, 그밖의 유전자형인 1a, 2b, 3a의 경우는 확인 건수가 적어 통계적인 유의성을 관찰할 수가 없었다.

HCV NAT에서는 양성 결과를 보였으나, anti-HCV에서는 음성 결과를 보인 HCV NAT yield 사례 중 2007년도 5건과 2017년 3건에 대한 유전자형과 정량검사를 실시한 결과는 Table 4와 같으

Table 4. HCV genotype and HCV RNA titer of the HCV NAT yield cases (2007 and 2017)

	Year of donation	Genotype	HCV RNA titer (IU/mL)
Case 1	2007	1a	2.95×10^5
Case 2	2007	Not clear	1.10×10^3
Case 3	2007	2a	8.56×10^3
Case 4	2007	2a	1.07×10^3
Case 5	2007	2a	1.52×10^7
Case 6	2017	Not clear	ND
Case 7	2017	Not clear	6.77×10^2
Case 8	2017	Not clear	1.51×10^1

Abbreviation: ND, not detected in the quantitative assay.

Table 3. HCV RNA titers by the HCV RNA genotypes

HCV genotype	Year	Number	Mean	Min	Max
1b	2007	64	8.08×10^7	5.25×10^2	5.01×10^9
	2017	21	2.25×10^6	1.59×10^3	7.71×10^6
2a	2007	52	4.31×10^6	1.07×10^3	1.69×10^7
	2017	19	3.79×10^6	1.22×10^4	2.21×10^7
1a	2007	1	2.95×10^5	2.95×10^5	2.95×10^5
2b	2007	3	3.52×10^6	3.46×10^4	6.04×10^6
	2017	1	6.66×10^5	6.66×10^5	6.66×10^5
3a	2007	1	5.49×10^6	5.49×10^6	5.49×10^6
	2017	1	3.56×10^4	3.56×10^4	3.56×10^4

며, 2017년의 HCV NAT yield 사례의 경우 모두 저역가 양상을 보여, 유전자형을 확인할 수 없었다.

고 찰

HCV 양성 헌혈 혈액에 대한 역학적 특징의 규명은 국내 HCV 감염 환자의 특징을 간접적으로 반영할 수 있을 것으로 보이며, 국내 HCV 감염 환자에 대한 치료 및 예방 방법 개선에 참고가 될 수 있을 것으로 판단되었다. 따라서 10년 전후의 임상 자료의 변화를 관찰함으로써 국내 HCV 감염자에 대한 변화의 추이를 간접적으로 파악하고 이를 통하여 국내에서의 HCV 감염자에 대한 관리 및 치료 방법에 참고가 될 수 있을 것으로 판단하였다. 또한 특이 유전자형을 지닌 감염 혈액과 저역가 감염 혈액의 경우에는 향후 검사 시약의 민감도 및 특이도 평가를 위한 재료로 사용될 수 있을 것으로 보였다. 따라서 국내 HCV NAT 양성 헌혈 혈액에 대한 바이러스 유전자 역가 및 유전자형을 분석함으로써 국내 HCV 감염 혈액의 역학자료 도출과 더불어 향후 임상 평가에 적합한 시료의 확보를 위한 참고 자료를 얻을 수 있을 것으로 판단되었다.

대한적십자사 혈액사업 통계연보에 의하면 헌혈 혈액에서의 HCV NAT 양성 건수는 점차 감소하여 2007년도에는 163건이었으나, 2017년도에는 61건으로 10년 전에 비하여 약 40%로 감소하였다[8]. 헌혈자에서의 HCV NAT 양성자 감소에 따른 HCV NAT 양성 혈액의 특징의 변화를 살펴보고자, 2007년도와 2017년도의 HCV NAT 양성 헌혈 혈액 중 시료가 확보되어 있는 128건(2007년)과 47건(2017년)에 대하여 HCV RNA 정량 및 유전자형 분포를 조사하였다. 연구 결과 2007년도와 2017년도의 HCV NAT 양성 헌혈 혈액에서

의 HCV RNA 유전자형의 분포 및 정량값의 분포에서 유의한 차이는 나타나지 않았지만, anti-HCV에서는 음성 결과를 보이면서 HCV RNA만 양성 결과를 보인 HCV NAT yield 사례의 경우는 2017년도에 발생한 사례의 경우 비교적 낮은 역가를 보여, 대한적십자사에서 헌혈자에 대한 HCV NAT를 처음으로 도입한 2005~2006년도에 발생한 HCV NAT yield 사례들에서 대부분 높은 역가를 보인 것과[9] 다른 양상을 나타냈다.

유전자형이 확인된 HCV NAT 양성 혈액에서의 유전자형 분포는 1b와 2a가 대부분을 차지하였으며, 그 밖에 1a, 2b, 3a도 확인되었으나, 4형 및 6형의 경우는 발견되지 않았다. HCV NAT 양성 헌혈자에 대한 유전자형을 조사한 과거 연구의 경우 당시 사용 시약에서는 2a형과 2c형을 구분하지 못하여 2a/2c형의 형태로 발표하였으나[7,10], 본 연구에 사용된 방법에서는 2a형만을 별도로 도출할 수 있었다. 유전자형별 HCV RNA 역가의 경우에도 뚜렷한 차이를 보이지는 않았으며, 1b형과 2a형을 제외한 기타 유전자형의 경우는 발견된 건수가 적어 유의한 특성의 차이를 확인할 수 없었다. 1b형과 2a형을 제외한 유전자형의 경우 흔하게 발견되지 않기 때문에 향후 임상 연구의 소재로 활용하기 위해 장기 보관할 가치가 있는 것으로 사료되었다.

HCV RNA 정량검사 결과 절반 정도의 검체에서 $10^6 \sim 10^7$ IU/mL의 역가를 지닌 것으로 나타났고, HCV RNA 양성자의 평균역가는 2007년도(3.17×10^6 IU/mL)와 2017년도(2.61×10^6 IU/mL)에서 뚜렷한 차이가 없었다. 1,000 IU/mL 미만의 저역가 양성자의 경우 2007년(5.5%)에 비하여 2017년(8.5%)에는 그 비율이 다소 증가하였다. 헌혈 혈액에 대한 NAT의 필요성이 처음 제기되었을 1990년대 후반에서 2000년대 초반 당시의 국제적인 가이드라인에서는 100 IU/mL 이상의 검출한

제를 지녀야 하며, 혼합 검체(mini pool)를 이용할 경우 개별 검체에서 5,000 IU/mL 이상의 역가를 지닌 HCV 감염 혈액을 검출할 수 있도록 요구하였다[11]. 따라서 본 연구에서는 5,000 IU/mL 미만의 역가를 지닌 HCV NAT 양성 검체를 저역가 검체로 설정하여 저빈도 유전자형의 검체와 더불어 장기 보관하면 좋을 것으로 여겨졌다.

본 연구에서는 10년 전후의 HCV NAT 양성자의 비교를 위하여 2007년도와 2017년도의 HCV NAT 양성 혈액에 대한 분석만 이루어졌지만, 보다 유의한 결과의 도출을 위해 다른 연도에 발생된 양성 혈액에 대한 분석도 필요할 것으로 판단되었다. 본 연구과제 결과 대한적십자사 혈액수혈연구원에서 보관 중인 HCV NAT 양성 혈액 중 장기적으로 보관할 가치가 있는 혈액을 선별할 수 있었으며, 이들의 경우 향후 HCV 관련 임상연구 및 검사 시약, 장비 등의 성능 평가를 위한 유용한 소재가 될 수 있을 것으로 사료되었다.

요 약

배경: 대한적십자사에서 2005년 헌혈자 선별검사를 위한 HCV NAT를 도입한 이래, 매년 HCV NAT 양성 혈액이 확인되고 있다. 이들 HCV 양성 혈액에 대한 임상적 특징의 규명은 HCV 감염 예방 및 치료에 도움이 될 것으로 여겨진다.

방법: 2007년과 2017년에 발생된 HCV NAT 양성 혈액 중 시료가 확보된 128건과 47건에 대하여 유전자형 및 정량값의 분포를 분석하였다.

결과: HCV NAT 양성 헌혈자에서 가장 많은 분포를 보인 HCV 유전자형은 1b로 2007년에는 50.0% (64/128), 2017년에는 44.7% (21/47)을 보였다. 두번째로 많은 분포를 보인 유전자형은 2a로 2007년에는 40.6% (52/128), 2017년에는 40.4% (19/47)을 보였다. HCV NAT 양성 헌혈자에서의

평균 HCV RNA 역가는 2007년에는 3.17×10^6 IU/mL, 2017년에는 2.61×10^6 IU/mL로 나타났다. 90% 이상의 헌혈자에서 HCV RNA 역가가 1,000 IU/mL 이상을 보였다. 서로 다른 유전자형에 대한 정량값의 차이는 나타나지 않았다.

결론: 본 연구에서 국내 헌혈자에서의 HCV RNA 유전자형 분포는 일반 국민에서의 분포와 비교하여 비슷한 양상을 보였다. HCV NAT 양성 헌혈자에서의 정량값과 유전자형간의 상관 관계는 나타나지 않았으며, 2007년과 2017년간의 HCV NAT 양성 헌혈자에서의 유전자형의 유의한 차이도 나타나지 않았다. 그러나 보다 유의한 결과를 얻기 위해서는 다른 연도에 발생된 HCV NAT 양성 헌혈자의 특징에 대한 분석도 이루어져야 할 것으로 사료되었다.

References

1. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:553-62
2. Lee SS, Byoun YS, Jeong SH, Kim YM, Gil H, Min BY, et al. Type and cause of liver disease in Korea: single-center experience, 2005-2010. *Clin Mol Hepatol* 2012;18:309-15
3. Jeong SH. Epidemiology of hepatitis C virus infection in Korea. *Korean J Med* 2015;88:630-4
4. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2014;61(1 Suppl):S45-57
5. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2015;61:77-87
6. Seong MH, Kil H, Kim JY, Lee SS, Jang ES, Kim JW, et al. Clinical and epidemiological charac-

- teristics of Korean patients with hepatitis C virus genotype 6. *Clin Mol Hepatol* 2013;19:45-50
7. Oh DJ, Park YM, Seo YI, Lee JS, Lee JY. Prevalence of hepatitis C virus infections and distribution of hepatitis C virus genotypes among Korean blood donors. *Ann Lab Med* 2012;32: 210-5
 8. Korean Red Cross Blood Service Headquarters. Blood service statistic 2018. https://www.bloodinfo.net/promotion_yearstats.do [Online] (last visited on 3 September 2019)
 9. Baclig MO, Chan VF, Ramos JD, Gopez-Cervantes J, Natividad FF. Correlation of the 5'untranslated region (5'UTR) and non-structural 5B (NS5B) nucleotide sequences in hepatitis C virus subtyping. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2010;1:236-44
 10. Kang JW, Lee JS, Seo DH, Huh K, Wee JH, Park Q. Characteristics and follow-up results of the window period blood donors for hepatitis C virus. *Korean J Blood Transfus* 2007;18:15-22
 11. Hennig H, Luhm J, Hartwig D, Klüter H, Kirchner H. A novel RT-PCR for reliable and rapid HCV RNA screening of blood donations. *Transfusion* 2001;41:1100-6