

삼일열 말라리아의 진단에서 Circumsporozoite 단백질의 유전형 특이 중합효소연쇄반응-교잡법의 유용성

고려대학교 의과대학 감염내과, 임상병리과*

이찬주 · 박기호 · 박대원 · 이종섭 · 김경오 · 손장욱 · 옹미선* · 임채승* · 박승철 · 김민자

Usefulness of Circumsporozoite Protein Genotype-Specific PCR (Polymerase Chain Reaction)-Hybridization Assay for Diagnosis of Vivax Malaria

Chan Ju Lee, M.D., Ki Ho Park, M.D., Dae Won Park, M.D., Jong Sup Lee, M.D.
Kyoung Oh Kim, M.D., Jang Wook Sohn, M.D., Mi Sun Yong*, Chae Seung Lim, M.D.*
Seung Chul Park, M.D. and Min Ja Kim, M.D.

Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, and
Department of Clinical Pathology*, Korea University Medical Center, Seoul, Korea

Background : Molecular or nucleic acid-based method has been developed for diagnosis as well as epidemiological studies of malaria infection recent years. We developed and evaluated a polymerase chain reaction (PCR)-hybridization assay for its usefulness in diagnosis and genotyping of vivax malaria resurged in South Korea.

Methods : Blood samples were collected from 30 patients diagnosed as vivax malaria and 48 patients with other diseases. The circumsporozoite protein (CSP) gene fragment of *Plasmodium vivax* was amplified by PCR and hybridized with genotype (VK210 or VK247)-specific oligonucleotide probes. The performance of the assay was evaluated and compared with that by a commercially available immunochromatographic test (ICT; AMRAD, Australia).

Results : Twenty-five out of thirty *P. vivax*-positive blood samples were positive for the PCR-hybridization assay.

All products amplified were hybridized only with the VK210-specific probe and showed size polymorphism with approximately 900~ and 865 bp, suggesting of genetic variations of CSP gene. Based on the results of Giemsa-stained blood smear, comparative analysis of test performance demonstrated that sensitivities of the PCR-hybridization assay and ICT were 83.3% and 73.3%, respectively and no false positive results were found. The κ test ratio of two tests yielded results of 0.91 with excellent correlation.

Conclusions : The study suggested that vivax malaria resurged in South Korea has the VK210 genotype of CSP with presence of genetic variants, and that the PCR-hybridization assay is useful for diagnosis as well as genotyping of vivax malaria. (Korean J Infect Dis 33:88~96, 2001)

Key Words : Vivax malaria, Circumsporozoite protein, PCR, Genotyping

서론

말라리아는 인류역사에 있어 매우 오래된 흔한 감염성 질환으로

19세기 이후에는 열대와 아열대 지방에 주로 집중되어 발생하였으나 최근에는 전 세계적으로 증가 추세에 있으며 이미 말라리아가 근절되었던 국가에서 다시 환자가 발생하고 있다^{1,2)}. 우리 나라의 경우도 삼일열 말라리아는 과거에 흔한 풍토병의 하나로서 1960년대 이후 정부와 세계보건기구의 정책에 의해 점차 감소하다가 1970년대 이후로는 완전히 소멸되었으나³⁾, 1993년 7월 경기도 파주에서 토착형

접수: 2001년 1월 12일, 승인: 2001년 2월 16일
교신저자: 김민자. 고려대학교 의과대학 감염내과학교실
Tel: (02)920-5685, Fax: (02)920-5616
E-mail: macropha@chollian.net

말라리아 환자가 1예가 보고되었고⁴⁾, 1994년에는 21예의 삼일열 말라리아가 추가 보고되었으며⁵⁾ 그 후 급격히 증가하여 2000년 5월까지 발생 예는 총 9,800명에 이르고 있다(국립보건원 비공개 자료). 말라리아의 효율적인 진단과 치료는 말라리아가 토착화되어 있는 지역에서 이환율을 감소시키는 중요한 조절 대책 중의 하나이다. 말라리아 진단에서 말초 혈액 도말 슬라이드를 사용하는 검경법은 현재까지 표준방법으로 사용되어지고 있으나, 검사시간이 30분에서 1시간 이상 소요되며, 특히 혈중 원충 농도가 낮은 검체의 경우는 숙련된 검경자를 필요로 한다. 이에 따라 현지에서 손쉽게 수행할 수 있는 말라리아 진단 방법으로 immunocapture assay의 일종인 OptiMAL test (Flow Inc., Portland, USA)⁶⁾, ICT (AMRAD, Australia)⁷⁾, ParaSightTM-F dipstick test (Becton Dickinson, USA)⁸⁾ 등이 개발되어 보급되고 있다. 뿐만 아니라, 최근에 개발되고 있는 *Plasmodium* species의 특이 핵산을 증폭하는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 방법을 비롯한 분자 생물학적 방법들은 말라리아의 원충의 검출뿐만 아니라 치료 약제의 실패나 내성을 예측할 수 있고 또한 역학적 연구에도 유용한 것으로 보고되고 있다⁹⁾.

본 연구에서는 *Plasmodium vivax* species에 특이한 circumsporozoite protein (CSP)의 유전자 부분을 PCR로 증폭하여 혈액내의 *P. vivax*를 검출하고 이어 교잡법(hybridization assay)을 통하여 증폭 산물의 특이성과 CSP의 유전형을 동시에 확인할 수 있는 PCR-hybridization assay를 이용하여 국내에서 재유행하고 있는 삼일열 말라리아의 진단과 역학적 연구에서의 유용성을 조사하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1997년과 1998년에 고려대학교 안암병원에서 혈액 도말 검사에서 확진된 삼일열 말라리아 환자 30명과, 대조군으로 혈액도말 검사에서 말라리아 원충이 음성이면 기타 질환으로 입원한 환자 48명을 포함한 총 78명을 대상으로 하였다. 이들로부터 문진을 통해 여러 인적 사항을 확보하였으며, 2~3 mL의 전혈을 채취하여 검사 전까지 -20℃에서 보관하였다.

2. 방 법

1) 혈액 도말 검사

박충 도말과 후충 도말을 만든 뒤 Giemsa 염색을 실시하여 현미경 고배율상(×1,000)에서 100시야 이상을 관찰하여 말라리아 전문가에 의해 삼일열 말라리아를 진단하였으며, 원충 농도(parasitemia)를 기록하였다. 원충 농도는 백혈구 100개당 원충의 수를 센 다음 자동 혈구 분석기에서 측정된 백혈구 수를 이용하여 혈중 말라리아 원충의 농도를 다음과 같은 방법으로 산출하였다.

$$\text{말라리아 원충 농도} = \text{백혈구 } 100\text{개당 원충 수} \times$$

$$\text{백혈구 수} (\mu\text{L}) / 100$$

2) PCR-hybridization assay

(1) 염색체 유전자 추출

InstaGeneTM matrix (BIO-RAD, California, USA)를 이용하여 제조회사의 지시대로 염색체 DNA를 추출하였다. 즉 전혈 6 μL 를 취하여 증류수 1 mL에 가하고 실온에서 30분간 방치한 후 12,000 rpm에서 3분간 원심 분리하였고, 침전물을 약 30 μL 남기고 상청액을 조심스럽게 따라버린다. 남은 침전물에 DNA 추출용액 200 μL 를 가하고 56℃ heat block에 30분간 방치한다. 다음 10초간 강하게 vortex하고 100℃ heat block에 8분간 둔다. 다시 10초간 강하게 vortex한 후 12,000 rpm에 3분간 원심 분리하여 상청액을 회수하고 PCR의 template로 사용하기 전까지 -20℃에 보관하였다.

(2) Primer와 oligonucleotide probe의 제작(Table 1)

Primer는 GenBank에 등록된 *P. vivax* 6주의 CSP 유전자의 염기서열(Thai strain, M34697; CH-3, U08977; CH-4, U08978; CH-5, U08979; PH-46, U08980; PH-79, U08981)을 비교 분석하여 유전자의 중앙부 tandem repeated sequence를

Table 1. Sequences of Primers and Genotype-specific Oligonucleotide Probes Used in this Study

Primer/Probe	Nucleotide sequence (source)
CSP-F	5'-CCA-CGT-GAA-AAT-AAG-CTG-AAA-C-3' (M34697, bases 259~280; U08977, bases 186~207)
CSP-R	5'-GGA-CTA-ACA-ATA-TGA-CTA-GCC-C-3' (M34697, bases 1092~1069; U08977, bases 1119~1098)
VK210-PB	5'-GGA-CAG-CCA-GCA-GG(A/T)-GA-Dig-3' (-G Q P A G-)
VK247-PB	5'-CAA-CCA-GGA-GCA-AAT-GG-Dig-3' (-Q P G A N-)

포함하여 증폭할 수 있도록 forward primer (CSP-F)는 N-terminus conserved sequence로부터, 그리고 reverse primer (CSP-R)는 C-terminus nonrepeat sequence로부터 한쌍의 primer를 각각 디자인하였다. Probe는 PCR 증폭산물의 특이성을 증명하고 검출된 CSP 유전형을 결정하기 위하여 GenBank에 등록된 *P. vivax*의 CSP의 주요 유전형 VK210 (S48804, type 1 repeat polymorphism)과 VK247 (S48805, type 2 repeat polymorphism)에 특이한 tandem repeated sequence를 기초로 하여 2개의 oligonucleotide probe (VK210-PB과 VK247-PB)를 디자인하였고 digoxigenin을 표지 하였다. Tandem repeated sequence의 아미노산서열은 유전형 VK210은 [···GDRA(D)GQPAGDRA(D)GQPAGDRA···], VK247은 [···ANGA(G/D)(N/P)QPGANGA(G/D)(N/P)QPGANGA···]로서 밑줄친 부분은 probe 유래부위이다. Primer와 probe의 제작은 미국 Oligo사로부터 제작을 의뢰하여 구입하였다.

(3) PCR

준비된 PCR template 20 μ L에 1쌍의 primer (20 μ M)을 각각 2 μ L, 2 units의 Taq polymerase (Dynazyme) 1 μ L, 2.5 mM dNTP 4 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L에 16 μ L의 멸균증류수를 넣어, 전체 50 μ L로 만든 후 4분간 94 $^{\circ}$ C에서 denaturation 시키고, 이어서 1분간의 denaturation (94 $^{\circ}$ C), 30초간의 annealing (60 $^{\circ}$ C), 1분간의 extension (72 $^{\circ}$ C) 단계를 thermal cycler (BIO-RAD, USA)에서 40회 반복한 후 72 $^{\circ}$ C에서 7분간의 primer extension 하여 완료하였다. 증폭산물을 최종적으로 얻어진 반응액의 5 μ L를 1.2% agarose gel에 전기영동 하여 ethidium bromide로 염색한 후 증폭된 DNA 절편을 확인하였다.

(4) Southern hybridization

PCR 산물을 agarose gel상에서 전기영동을 한 후 gel을 denaturation과 neutralization을 처리한 후 capillary-transfer system을 이용하여 positive charged nylon membrane (Nytran 0,45; Schleicher & Schuell)에 전이시켰다. Nylon membrane을 말린 후 UV cross-link (Spectronics, USA)를 이용하여 DNA를 membrane에 고정시켰다. Nylon membrane을 hybridization glass tube (Robbins Scientific)에 hybridization buffer [5 \times SSC (NaCl, 3 M; Na-citrate, 0.3 M; pH 7.0), 1% blocking reagent, 0.1% N-laurylsarcosine, 0.02% SDS]를 넣고 55 $^{\circ}$ C의 hybridization oven (Hybaid, UK)에서 2시간 동안 pre-hybridization 하였다. Buffer를 버리고 digoxigenin-labelled probe를 넣은 새로운 hybridization buffer로 교환하여 넣은 후 다시 55 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 hybridization 하였다. 반응이

끝난 후 nylon membrane을 꺼내어 2 \times SSC, 0.1% SDS 용액에 담근 뒤 실온에서 5분씩 2회 세척하고, 0.1 \times SSC, 0.1% SDS 용액에 담근 뒤 55 $^{\circ}$ C에서 15분씩 2회 세척하여 공기 중에서 건조시켰다. Digoxigenin-labelled probe와 결합된 DNA를 검출하기 위해 DIG DNA detection kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 제조회사의 지시대로 사용하였다. 즉, buffer 1 (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5)에 nylon membrane을 1분간 세척한 후 buffer 2 (1% blocking reagent in buffer 1)에 30분간 담가두었다가 buffer 1에서 가볍게 세척한 후 antibody-conjugate 용액(8 μ L antibody conjugate in buffer 1)에 30분간 반응시켰다. Buffer 1에서 15분간 2회 세척하여 결합되지 않은 antibody-conjugate를 제거하였고, 다시 buffer 3 (100 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5)에 2분간 담그었다. Color-substrate 용액(45 μ L NBT-solution, 35 μ L X-phosphate solution in buffer 3)에 담그고 암실에 놓아서 color precipitate가 생길 때까지 기다린 뒤 DNA band가 나타나면 buffer 4 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 5분간 담근 후 건조한다.

3) Immunochromatographic test (ICT)

Immunochromatographic test는 *P. vivax* 항원을 검출하기 위한 신속한 시험관용 면역체 진단 검사로 호주의 AMRAD 사 제품을 구입하여 제조회사의 지시대로 사용하였다. 이 검사 Kit는 시험지를 교차하는 두 개의 분리된 선으로서 *P. vivax* 원충의 공통항원 histidine rich protein 2에 대한 단클론 항체가 고정되어있다. 한 방울의 전혈을 콜로이드 모양의 금색 라벨이 붙은 항체들이 묻어 있는 샘플패드에 가하면, 양성 샘플의 경우 말라리아 항원은 패드에 있는 항체에 붙게 되며 형성된 면역 복합체는 고정된 항체에 붙잡힌 시험지를 따라 이동하게 된다. 말라리아 항원이 항체에 붙잡힐 때 검사 표시 창에 분홍색 선이 생기게 되고 음성 샘플을 묻혔을 때는 이 선이 생기지 않게 된다.

4) 통계학적 방법

PCR-hybridization법의 삼일열 말라리아 진단법으로서의 타당성을 검증하기 위해서 혈액도말 검사결과를 기준으로 하여 PCR-hybridization assay, 그리고 ICT 검사 결과의 민감도, 특이도, 위양성율, 위음성율, 양성 예측율, 음성 예측율을 각각 측정하였으며, 두가지 검사의 κ test ratio를 산출하여 일치율을 분석하였다.

결 과

1. 삼일열 말라리아 환자들의 거주지역의 분포

대상환자들 중에서 삼일열 말라리아로 진단된 30명의 거주지는 연천이 15명, 철원 6명, 파주 3명, 문산 2명, 휴전선, 양평, 고양, 그 외의 강원도 지역이 각각 1명이었다. 이들 30명 환자들의 PCR-hybridization assay, ICT, 혈액 도말 검사 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다.

2. PCR-hybridization assay의 결과

대상 환자의 혈액 검체에서 CSP 유전자 절편을 PCR로 증폭하였을 때, 총 78명의 대상 환자 중 말초혈액 도말 검

사에서 삼일열 말라리아로 확진된 30명의 환자 중 25명(83.3%)과 말초혈액 도말 검사에서 *P. vivax* 원충이 관찰되지 않았던 대조군 환자 48명 중 4명(8.3%)에서 양성반응이 관찰되었다. 이어서 CSP 유전자의 VK210과 VK247에 대한 유전형 특이 probe를 각각 사용하여 southern hybridization을 시행하였을 때, 삼일열 말라리아 환자 30명 중 PCR 양성인 25명에서만 특이적인 양성반응을 보였다. 따라서 대조군 환자 4명에서 관찰되었던 PCR 양성반응은 시험과정 중의 오염으로 인한 위양성 반응으로 판정하였으며, 이들 4명의 임상 의무기록을 검토하였을 때 삼일열 말라리아를 의심할만한 소견은 없었다.

Table 2. Characteristics of 30 Patients with Vivax Malaria and Their Test Results

No.	Sex/Age	Adm. date	Exposure area	Blood smear (parasitemia [*])	ICT	PCR	Product size (bp)
1	M/22	Oct, 98	Yon-ch'on-gun	155 [*]	+	+	865
2	M/23	Aug, 98	"	+ [†]	+	+	900
3	M/24	Sep, 98	"	+	+	+	900
4	M/41	Sep, 98	Paju-shi	6	—	+	900
5	M/22	Sep, 98	Yon-ch'on-gun	6	+	+	900
6	M/49	Oct, 98	"	232	+	+	900
7	M/22	Aug, 98	Ch'olwon-gun	+	—	—	
8	M/28	Aug, 98	Yon-ch'on-gun	4	+	+	900
9	M/42	Jul, 98	"	2	+	+	865
10	M/23	Aug, 98	Paju-shi	39	+	+	900
11	F/21	Jul, 98	Yangp'yong-gun	2	+	+	900
12	F/46	Jul, 98	Yon-ch'on-gun	1	—	+	900
13	M/59	Aug, 98	"	5	+	+	900
14	M/22	Aug, 98	"	28	+	+	865
15	F/48	Oct, 98	Kangwon-do	122	+	+	900
16	M/23	Aug, 97	Ch'olwon-gun	+	+	+	900
17	M/23	Aug, 97	Koyang-shi	+	—	—	
18	M/51	Sep, 97	Munsan-up	62	+	+	900
19	M/24	Jun, 98	Ch'olwon-gun	+	—	+	900
20	M/22	Jun, 98	"	29	+	+	865
21	M/23	Sep, 97	Yon-ch'on-gun	+	+	+	900
22	M/24	Sep, 97	Ch'olwon-gun	+	—	—	
23	F/41	Sep, 97	"	+	—	—	
24	M/28	Oct, 98	Yon-ch'on-gun	12	+	+	900
25	M/37	Oct, 98	Paju-shi	+	+	+	900
26	M/23	Jul, 98	DMZ [‡]	19	—	—	
27	F/3	Jul, 98	Yon-ch'on-gun	111	+	+	900
28	M/24	Jul, 98	Munsan-up	3	+	+	900
29	M/24	Jul, 98	Yon-ch'on-gun	6	+	+	900
30	M/24	Aug, 98	"	9	+	+	865

^{*}Parasitemia : parasite number/100 WBC, [†] + : not counted, [‡]DMZ : demilitarized zone

3. *P. vivax*의 CSP의 유전형 및 다형화 현상

삼일열 말라리아 환자 25명에서 증폭된 CSP 유전자 절편은 southern hybridization에 사용된 VK210 유전형 특이 probe에 모두 반응한 반면에, VK247 유전형 특이 probe에는 전혀 반응하지 않음으로써 모두 VK210 유전형으로 확인되었다(Figure 1). 또한, 이들 25명에서 증폭된 CSP 유전자 절편은 약 900 bp와 865 bp의 크기를 갖는 두 종류로 나타나서 크기의 다형화(size polymorphism)를 보였다. 이는 증폭된 CSP 유전자의 중앙부 tandem repeat sequence에 변이가 있음을 나타내는 것으로 VK210 유전형내에 적어도 2개의 다른 genetic variant가 존재함을 제시하였다. 한편, 증폭된 CSP 유전자 절편의 크기에 따라 지역적 분포를 조사하였을 때, 865 bp 절편을 보인 경우는 25명 중 5명이었고 이들의 거주지는 연천지역 4명, 철원 1명의 분포를 보였다. 900 bp의 절편을 보인 경우는 모두 20명으로 연천 11명, 파주 3명, 철원과 문산이 각각 2명, 양평, 그 외의 강원지역에 각각 1명의 분포를 보였다. 따라서 전체적으로 900 bp의 절편이 우세하게 나타났으나 865 bp 절편과 900 bp 절편에 따른 지역 간의 분포의 차이를 알 수 없었다.

4. PCR-hybridization assay 결과와 혈액내 원충농도와의 관계

30명의 말초 혈액 양성 검체 중 원충 농도(parasitemia)가 측정된 경우는 모두 20명으로 원충 농도는 최저 1/100 WBC에서 최고 232/100 WBC의 범위를 나타내었으며, 19/100 WBC인 1명을 제외한 나머지 19명에서 모두 PCR-hybridization assay에서 양성 반응을 보였다. 원충농도가 10/100 WBC 미만인 경우는 10명이었고, 20~29/100 WBC는 2명, 30~39/100 WBC는 1명, 60~69/100 WBC는 1명, 100 이상/100 WBC는 4명이었다. PCR로 검출된 최소 원충 농도는 1/100 WBC이었다(Table 2).

5. ICT 검사 결과

총 78명의 대상 환자 중 말초혈액 도말 검사에서 삼일열 말라리아로 확진된 30명의 환자 중 22명(73.3%)에서 양성 반응을 보였으며, 대조군 환자 48명 모두에서 음성 반응을 보였다. 위의 PCR-hybridization assay에서 양성 반응을 보인 삼일열 말라리아 환자 25명 중 3명은 ICT에 음성 반응을 보였다.

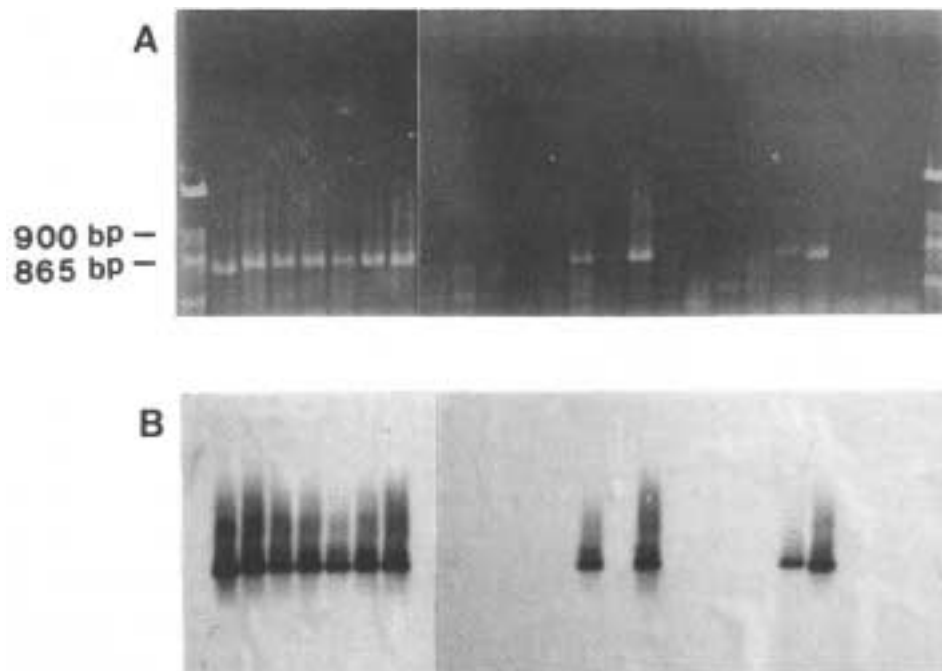


Figure 1. PCR amplification and southern hybridization of CSP gene fragment of *P. vivax* from patients' blood samples. (A) 1.5% agarose gel showing the PCR product, (B) southern blot showing hybridization PCR products with VK210 oligo-probe. Note that PCR products showed size polymorphism ranging from approximately 865- to 900 bp.

Table 3. Evaluation of Test Performance by PCR-hybridization Assay and ICT, Based on the Results by Blood Smear

	PCR-hybridization	ICT
Sensitivity	83.3%	73.3%
Specificity	100.0%	100.0%
False positive rate	0.0%	0.0%
False negative rate	16.7%	26.7%
Positive predictive value	100.0%	100.0%
Negative predictive value	90.6%	85.7%

Table 4. Comparison of Results by the PCR-hybridization Assay and ICT in 78 Blood Samples, and the Kappa Test Ratio

ICT	PCR-hybridization		Total
	Positive	Negative	
Positive	22	0	22
Negative	3	53	56
Total	25	53	78

κ test ratio=0.91 (excellent)

6. PCR-hybridization assay의 진단적 검사로서의 타당성의 검증

전체 78명의 환자를 대상으로 혈액 도말 검사 결과를 기준으로 하여 PCR-hybridization assay와 ICT 결과의 민감도, 특이도, 위양성율, 위음성율을 산출하고 비교함으로써 PCR-hybridization assay의 진단적 검사로서의 타당성을 평가하였다. PCR-hybridization assay와 ICT의 민감도는 각각 83.3%와 73.3%, 특이도는 각각 100%와 100%, 위양성율은 각각 0%와 0%, 위음성율은 각각 16.7%와 26.7%, 양성 예측율은 각각 100%와 100%, 음성 예측율은 각각 90.6%와 85.7%이었다(Table 3). 이와 같은 결과에서 PCR-hybridization assay는 삼일열 말라리아의 진단법으로서 기존의 ICT와 비등하거나 보다 나은 검사방법으로 평가되었다. 전체 78명에서 실시된 PCR-hybridization assay의 결과에 대해 ICT 결과의 일치도를 보기 위하여 kappa test ratio를 구하였다(Table 4). Kappa치는 91%로 두 검사 결과 사이의 일치율이 매우 높게 나타나서 PCR-hybridization assay의 결과가 신뢰성이 있음을 제시하였다.

고찰

본 연구에서는 *P. vivax*의 표면단백 항원의 하나인 CSP

의 유전자를 PCR로 증폭하여 환자 혈액내의 *P. vivax*을 검출하고, 동시에 증폭된 CSP 유전자를 CSP 유전형 특이 probe를 이용한 southern hybridization을 통하여 증폭산물의 특이성뿐만 아니라 CSP의 유전형을 확인할 수 있는 PCR-hybridization assay를 실시하여, 국내에서 재유행하고 있는 삼일열 말라리아 환자의 진단뿐만 아니라 원인 *P. vivax*의 주요 CSP 유전형을 결정할 수 있음을 확인하였다.

말라리아 진단에서 오래 전부터 표준 검사로 사용되어지고 있는 말초혈액의 박충 도말이나 후층 도말법은 모두 광학현미경을 사용하므로 숙련된 검정자를 필요로 한다. 이 진단법은 형태학적으로 종(species)의 구분이 가능하고 혈액 내의 원충의 감염 정도와 여러 가지 단계의 원충도 진단할 수 있는 등의 장점이 있으나, 현미경이 반드시 필요하고 낮은 혈중 원충 농도에서는 진단율이 낮고, 시간이 많이 소요되며 말초 혈액 외에 장기의 모세혈관에 있는 원충의 진단은 불가능하다. 외국에서는 이미 이 제한점들을 보완하는 여러 진단 방법들이 개발되어 사용되고 있는데, 혈액도말 검체의 acridine orange 염색법^{11, 12}과 buffy coat의 형광염색법(quantitative buffy coat technique, QBC)¹³이 있으며, 말라리아 항원 검사인 Immunochromatographic test (ICT)⁷와 ParaSightTM-F dipstick test⁸ 등이 사용되고 있다. 특히 지난 수년 동안 활발히 연구개발 되어온 *Plasmodium* species의 핵산 염기서열에 근거를 두고 있는 PCR 검출법은 말라리아 원충의 CSP^{13, 14}, merozoite surface protein-11⁵, Duffy binding protein¹⁶ 등의 유전자들을 이용하고 있는데 진단 검사로서 뿐만 아니라 약제 내성 유전자의 검출을 통한 약제 내성의 발생이나 빈도 등의 연구와 *Plasmodium* species의 다형성, 재조합율, 감염의 다양성, 유전형의 결정 등을 포함하여 치료 및 백신 개발에 유용한 역학적 정보를 제공할 수 있을 것으로 제시되고 있다¹⁷⁻¹⁹.

한편, 말라리아 원충은 성숙단계에 따라 여러 가지 표면단백 항원들과 유전자들이 발현되는데 적혈구 전단계의 항원으로는 circumsporozoite protein (CSP)과 sporozoite surface protein 2 (SSP2) 및 liver stage-specific antigen (LSA-1) 등이 있다. 이 중 circumsporozoite protein은 sporozoite가 처음 인체에 침입시 간세포의 수용체와 결합하며, 매우 강한 면역원성을 유도하는 것으로 알려져 있다²⁰. 적혈구 단계에서는 merozoite surface protein-1, merozoite surface protein-2, erythrocyte binding antigen, ring infected erythrocyte surface antigen, apical membrane antigen-1 등이 있으며 이중 merozoite surface protein-1 gene이 말라리아 감염이 된 경우 중요한 면역을 유도하게 된다²¹. 그러므로 말라리아의 유행지

역에 따라 이와 같은 면역항원을 표적으로 하는 진단시약 및 백신 개발에 관한 연구들이 이루어지고 있다. 국내에서 입 등은 PCR을 이용하여 재유행하는 삼일열 말라리아의 merozoite surface protein의 유전자의 다형성과 염기서열의 계통분석을 통하여 국내 말라리아의 역학적 측면을 보고하였으며²²⁾, 최 등은 삼일열 말라리아 원충의 CSP의 genotype을 분석하여 보고한 바 있다²³⁾.

Plasmodium species의 CSP 유전자는 구조적으로 중앙부에 species-specific tandem repeat sequence가 있고, N-terminus와 C-terminus 부위에 conserved sequence를 갖는다. Central repeat region은 immunodominant 항원부위로서 그동안 vaccine 개발의 후보물질로 연구되어 왔으나, 최근 여러 지역으로부터 분리된 strain에 따라 CSP의 다형성이 알려짐에 따라 백신 개발이나 진단 시약 개발에 있어서 이에 대한 주의가 요구되고 있다²³⁻²⁵⁾. *P. vivax*의 경우 CSP는 대표적인 두가지 genotype (VK210과 VK247)이 있음이 알려져 있으며, 이들은 지역적으로 분포의 차이를 보인다²⁵⁾. VK210형과 VK247형의 특징적인 central repeat sequence는 각각 GDRAD/AGQPA와 ANGAGNQPQ의 반복아미노산 구조를 보이지만, 동일한 CSP 유전형내에서도 repeat sequence의 반복되는 수는 분리주 사이에 약간씩 다르며 sequence variation이 존재함이 제시되었고, Qari 등은 Brazil과 Papua New Guinea에서 분리한 39 isolates에서 22개의 CSP의 genetic variant들을 발견하였다²⁶⁾.

본 연구에서 PCR-hybridization assay를 통하여 CSP 유전자가 검출되었던 국내에서 재유행하는 삼일열 말라리아 환자 25명에서 CSP 유전형은 모두 VK210형을 보였으며, 이는 이미 보고된 연구와 상이한 결과를 나타내었다. 즉, 최 등의 연구²³⁾에서는 VK210 유전형과 VK247 유전형에 동시에 양성을 보인 경우가 92.7%로 국내에는 두가지 유전형이 모두 존재하며, 이에 따라 VK210과 VK247 유전형에 모두 효과가 있는 백신의 개발이 필요함을 제시하였다²³⁾. 이와 같이 두 연구에서 유전형의 차이가 있는 이유는 최 등이 사용한 probe는 VK210은 GQPAG, VK247은 ANGAG에 각각 해당하는 염기서열을 사용하였는데, 한국형 말라리아의 CSP 유전자중 반복 아미노산구조에 자주 등장하는 GNGAGGQ-PA에 해당하는 염기서열에 대해 두가지 probe가 모두 교차 반응함으로써 두 유전형이 동시에 존재하는 것으로 판단되었을 가능성이 있으며(personal communication), 본 연구에서는 VK210형의 경우 GQPA, VK247형은 QPGAN에 각각 해당하는 염기서열을 probe로 사용하였는데, 결과는 더 특이적으로 VK210에만 반응한 것으로 판단되어 한국형 말라리아

의 sequence를 고려할 때 본 연구의 결과가 더 정확한 것으로 사료된다.

본 연구에서 PCR-hybridization assay를 이용하여 25명의 환자들에서 증폭된 CSP 유전자 절편의 크기는 약 865 bp와 900 bp로서 2가지로 관찰되었는데, 환자의 거주지역에 따른 다형화의 분포의 차이를 보이지 않았다. 그러나 국내 말라리아 유행이 철책으로부터 10 km내의 범위에 있는 주 유행 지역인 경기도 파주와 연천지역에서부터 시작하여 1997년도에는 철책 20 km 범위 이상인 지역에까지 확산되고 있으므로 향후 환자 및 매개 모기들에서 분리되는 *P. vivax*의 CSP 유전자의 다형화 현상은 유행지역의 확산에 대한 역학적 연구에서 유용한 도구의 하나로 사료된다.

한편, 본 연구에서 개발된 PCR-hybridization assay가 진단 검사로서의 타당성을 평가하기 위하여 상품화되어 있는 면역진단검사인 ICT를 동일 검체에 대하여 실시하여 결과를 비교하였을 때, PCR-hybridization assay의 민감도와 특이도는 각각 83.3%와 100%로서 ICT의 73.3%와 100%에 비해 민감도가 더 높았으며, 두 검사법 사이의 일치율은 91%로써 높게 나타났다. 국내의 다른 연구에서 조사된 PCR을 이용한 삼일열 말라리아의 검출법의 민감도와 특이도는 각각 82%, 100%로서 본 연구의 결과와 유사하였다²³⁾. 따라서 본 연구에서 개발한 PCR-hybridization assay는 국내 삼일열 말라리아의 진단에 유용한 방법으로 사료된다. 그러나, PCR만을 시행하였을 때, 말초혈액 검사가 *P. vivax* 음성인 기타 열성 질환 환자들에서 PCR 위양성 반응이 관찰되었으므로 반드시 hybridization을 시행하여 PCR 증폭산물의 특이성을 확인하는 것이 중요하다. 또한 증폭산물이 양이 적어 agarose gel상에서 관찰할 수 없는 경우에 hybridization assay를 통하여 민감도를 향상시킬 수 있다. 그 외에도 Singh B는 PCR이 혈액 도말 검사보다는 민감도와 특이도가 높지만 가격 면에서 비싸고 검체 수가 적을 때 혈액 도말 검사보다 빠르지 않은 제한점이 있으므로 말라리아가 만연하는 지역에서 PCR로 혈액 도말 검사를 완전히 대체하기는 힘들다고 주장한 바 있으며⁷⁾, 현장에서 손쉽게 사용할 수 없는 제한점을 가지고 있다.

결론적으로 본 연구에서 개발된 PCR-hybridization assay는 삼일열 말라리아의 진단에 타당한 검사방법으로 사료되며, 동시에 유전형의 결정에 유용하였다. 또한, 조사된 국내 삼일열 말라리아 환자 25명 모두에서 *P. vivax*의 CSP 유전형은 VK210로 확인되었으며, 적어도 2개의 유전적 변이주가 있음을 보였다. 향후 더 많은 검체를 대상으로 CSP 유전자의 genotype을 확인하는 것이 필요하며, 본 연구에서 제

시된 CSP 유전자의 변이는 염기서열 결정을 통하여 명확하게 증명되어야 할 것이다.

요 약

배 경 : 말라리아 진단에 있어서 혈액 도말 검사는 지금까지 가장 표준 검사로 이용되고 있으나, 분자 혹은 핵산구조에 기초를 둔 방법들이 개발되고 있으며, 이 방법들은 말라리아의 진단뿐만 아니라 역학적 연구의 도구로 이용되고 있다. 본 연구에서는 *P. vivax*의 circumsporozoite protein (CSP) 유전형 특이 PCR (polymerase chain reaction)-hybridization assay를 개발하여 국내에서 재유행하는 삼일열 말라리아 환자에 적용함으로써 진단검사로써의 타당성을 평가하고 역학적 연구의 유용성을 조사하였다.

방 법 : 혈액 도말 검사로 확진된 삼일열 말라리아 환자 30명과 대조군으로 혈액도말 검사에서 말라리아 원충이 음성인 기타 질환 환자 48명을 포함한 총 78명을 대상으로 하였다. PCR-hybridization assay는 혈액 검체로부터 CSP 유전자 부분을 PCR로 증폭한 후, CSP의 두가지 유전형 (VK210과 VK247)에 각각 특이적인 oligonucleotide probe를 사용하여 Southern hybridization을 실시하여 증폭된 CSP 유전자의 특이성과 유전형을 결정하였다. PCR-hybridization assay의 진단적 검사로서의 타당성은 상품화되어 있는 말라리아 면역진단키트(Immunochromatographic test, ICT; AMRAD, Australia)의 검사 결과와 비교하여 검증하였다.

결 과 : 총 30명의 삼일열 말라리아 환자 중 25명에서 PCR-hybridization assay는 양성 반응을 보였으며, 25명 모두에서 *P. vivax*의 CSP 유전형은 VK210 검사로 확인되었다. PCR로 증폭된 CSP 유전자 절편은 크기의 다형화(size polymorphism)을 보임으로써 central tandem repeat sequence에 적어도 2개의 genetic variation이 있음을 제시하였으며, 이 다형화 현상은 발생지역에 따라 분포의 차이를 보이지 않았다. 혈액 도말 검사 결과를 표준으로 하여 전체 78명에서 PCR-hybridization assay의 결과를 상품화된 면역 진단키트인 ICT 검사 결과와 비교하였을 때, PCR-hybridization assay와 ICT는 각각 민감도 83.3%와 73.3%, 특이도 100%와 100%이었고 위양성율은 두 경우에서 모두 0%이었고, 위음성율 16.7%와 26.7%를 보였다. PCR-hybridization assay와 ICT의 결과의 일치율 κ 치는 91%로 높았다.

결 론 : 본 연구에서 개발된 PCR-hybridization assay는 삼일열 말라리아의 진단뿐만 아니라 유전형의 결정에 유용하였다. 또한, 국내에서 재유행하는 삼일열 말라리아는 cir-

cumsporozoite protein의 VK210 유전형으로 적어도 2개의 유전적 변이를 보였다.

감사의 글

본 연구의 실험을 도와주신 감염내과 실험실 심희선 연구원에게 특별히 감사 드립니다.

참 고 문 헌

- 1) World Health Organization: *World malaria situation in 1993*. *Wkly Epidemiol Rec* 19;71:17-22, 1996
- 2) Barat LM, Zucker JR, Barber AM, Parise ME, Paxton LA, Roberts JM, et al.: *Malaria Surveillance, United States, 1993*. *MMWR* 46(SS-2):27-45, 1997
- 3) Soc CT, Lee KT, Im KI, Min DY, Ahn MH, Kim JJ, et al.: *Current status of malaria in Korea*. *Yonsei Rep Trop Med* 16:11-18, 1985
- 4) 채인호, 임건일, 윤성노, 오원일, 김선주, 채종일: 외국 여행 경력이 없는 남자에서 발병한 삼일열 말라리아 1예. *기생충학잡지* 32:195-200, 1994
- 5) 서재홍, 김신곤, 정희진, 김우주, 김민자, 박승철: 1994년 한국에서 발생한 *Plasmodium vivax*에 의한 Malaria 1예. *감염* 7:83-86, 1995
- 6) Palmer CJ, Lindo JF, Klaskala WI, Quesada JA, Kaminsky R, Baum MK, et al.: *Evaluation of the Opti-MAL Test for Rapid Diagnosis of Plasmodium vivax and plasmodium falciparum Malaria*. *J Clin Microbiol* 36:203-206, 1998
- 7) Singh N, Valecha N, Sharma VP: *Malaria diagnosis by field workers using an immunochromatographic test*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91:396-397, 1997
- 8) Di Perri G, Olliaro P, Nardi S, Allegranzi B, Deganello R, Vento S, et al.: *The ParaSight-F rapid dipstick antigen capture assay for monitoring parasite clearance after drug treatment of Plasmodium falciparum malaria*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91:403-405, 1997
- 9) Singh B: *Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections*. *Internat J Parasitol* 27:1135-1145, 1997
- 10) Kawamoto F: *Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter*. *Lancet* 337:200-202, 1991
- 11) 임채승, 김영기, 이갑노, 김대성, 김순덕, 염용태: Acridine Orange 염색법을 이용한 말라리아의 진단. *감염* 29:119-124, 1997
- 12) Levine RA, Wardlaw SC, Patton CL: *Detection of haematoparasites using quantitative buffy coat analysis*

- tubes. *Parasitology Today* 5:132-133, 1989
- 13) Kain KC, Brown AE, Mirabelli L, Webster HK : *Detection of Plasmodium vivax by polymerase chain reaction in a field trials*. *J Infect Dis* 168:1323-1326, 1993
 - 14) Tahar R, Ringwald P, Basco LK : *Diagnosis of Plasmodium malariae infection by the polymerase chain reaction*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91:410-411, 1997
 - 15) Edoh D, Steiger S, Genton B, Beck HP : *PCR amplification of DNA from malaria parasites on fixed and stained thick and thin blood films*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91:361-363, 1997
 - 16) Fang X, Kaslow DC, Adams JH, Miller LH : *Cloning of the Plasmodium vivax Duffy receptor*. *Mol Biochem Parasitol* 44:125-132, 1991
 - 17) Humar A, Harrington MA, Kain KC : *Evaluation of a non-isotopic polymerase chain reaction-based assay to detect and predict treatment failure of plasmodium vivax malaria in travellers*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91:406-409, 1997
 - 18) Kirchgatter K, del Portillo HA : *Molecular analysis of Plasmodium vivax relapses using the MSP1 molecule as a genetic marker*. *J Infect Dis* 177:511-515, 1998
 - 19) Tahar R, de Pecoulas PE, Mazabrera A, Basco LK : *Plasmodium vivax : Rapid detection by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the key mutation in dehydrofolate reductase-thymidine synthetase gene associated with pyrimethamine resistance*. *Exp Parasitol* 89:343-346, 1998
 - 20) Gordon DM, Cosgriff TM, Schneider I, Wasserman GF, Majarian WR, Hollingdale MR, et al. : *Safety and immunogenicity of a Plasmodium vivax sporozoite vaccine*. *Am J Trop Med Hyg* 42:527-531, 1990
 - 21) Kolakovich KA, Sengoba A, Wojcik K, Tsuboi T, al-Yaman F, Alpers M, et al. : *Plasmodium vivax : favored gene frequencies of the merozoite surface protein-1 and the multiplicity of infection in a malaria endemic region*. *Exp Parasitol* 83:11-19, 1996
 - 22) Lim CS, Kim SH, Kwon SI, Song JW, Song KJ, Lee KN : *Analysis of Plasmodium vivax merozoite surface protein-1 gene sequence from resurgent Korean isolates*. *Am J Trop Med Hyg* 62:261-265, 2000
 - 23) 최중성, 임채승, 이갑노 : *한국의 삼일열 말라리아 서컴스포르조이트 유전자형 분석*. *대한임상병리학회지* 18:671-677, 1998
 - 24) Kain KC, Brown AE, Webster HK, Wirtz RA, Keystone JS, Rodriguez MH, et al. : *Circumsporozoite genotyping of global isolates of Plasmodium vivax from dried blood specimens*. *J Clin Microbiol* 30:1863-1866, 1992
 - 25) Mann VH, Huang T, Cheng Q, Saul A : *Sequence variation in the circumsporozoite protein gene of Plasmodium vivax appears to be regionally biased*. *Mol biochem Parasitol* 68:45-52, 1994
 - 26) Qari SH, Collins WE, Lobel HO, Taylor F, Lal AA : *A study of polymorphism in the circumsporozoite protein of human malaria parasites*. *Am J Trop Med Hyg* 50:45-51, 1994