

# LG Advansure™ Malaria P.f./P.v. real-time QPCR의 말라리아 진단 유용성

## Evaluation of the LG Advansure™ Malaria P.f./P.v. real-time QPCR for the Diagnosis of Malaria

이혜진 · 김하늬 · 유병준 · 김장수 · 김명한 · 임채승 · 이갑노

Hye Jin Lee, Ha Nui Kim, Byong Joon Yoo, Jang Su Kim, Myong Han Kim, Chae Seung Lim, Kap No Lee

고려대학교 의과대학 진단검사의학교실

Department of Laboratory Medicine, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** Malaria is a problematic disease in Korea, and microscopic examination of Giemsa-stained blood smear has been used as the gold standard for its diagnosis. However, this technique is time-consuming and has low sensitivity in samples with low numbers of malarial parasites ( $< 20$  parasites/ $\mu$ L). Here, we evaluated the performance characteristics of the LG Advansure™ Malaria P.f./P.v. real-time QPCR (LG life sciences, Korea).

**Methods:** Blood samples from 173 persons who visited Korea University Ansan Hospital were evaluated. QPCR was performed in 73 malaria patients and 100 healthy subjects by using the LG Advansure Malaria P.f./P.v. real-time QPCR kit, and the results were compared with those of microscopy. The detection limit of this kit was determined by serial dilution of *Plasmodium*-infected blood with normal blood (blood not infected with *Plasmodium*).

**Results:** Among the 73 patients that were microscopically confirmed to have malaria (*Plasmodium vivax* infection,  $N = 70$ , *P. falciparum* infection,  $N = 3$ ), 69 patients were diagnosed with *P. vivax* infection and 3 were diagnosed with *P. falciparum* infection by LG Advansure™ Malaria P.f./P.v. real-time QPCR. Both the tests indicated absence of infection in the 100 healthy subjects. The detection limit of LG Advansure™ Malaria P.f./P.v. real-time QPCR was 0.1 parasite/ $\mu$ L.

**Conclusions:** LG Advansure™ Malaria P.f./P.v. real-time QPCR is a very sensitive and specific technique and can be used as a confirmatory test for malaria.

**Key Words:** Malaria, Real time quantitative PCR, Diagnosis

## 서론

말라리아는 *Plasmodium* 속 원충이 적혈구와 간 세포 내에 기생함으로써 발병하는 급성 열성 감염증이다[1]. 말라리아 감염은

**Corresponding author:** Chae Seung Lim

Department of Laboratory Medicine, Korea University Guro Hospital,

Guro 2-dong, Guro-gu, Seoul 152-703, Korea

Tel: +82-2-2626-1455, Fax: +82-2-2626-1465

E-mail: malarim@korea.ac.kr

Received: October 21, 2010

Revision received: January 31, 2011

Accepted: January 31, 2011

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2011, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

열대와 아열대 지방에서 유행하고 있으며, 전 세계적으로 매년 3.5-5억 명의 환자가 발생하며, 백만 명 정도가 사망하고 있다[2]. 국내에서도 말라리아 확산 방지 및 근절 방안에도 불구하고 비무장 지대 인접 지역과 인천, 강화, 경기북부 지역을 중심으로 삼일열 말라리아(*Plasmodium vivax*)가 유행하고 있다. 뿐만 아니라 아프리카와 동남아시아 등의 말라리아 유행지역으로의 해외여행의 증가로 인하여 열대열원충(*Plasmodium falciparum*)에 의한 감염도 보고되고 있다[3]. 국내의 삼일열 말라리아 토착화와 함께 수입성 말라리아의 증가로 수혈 전파성 감염의 위험도 함께 증가하고 있는데 우리나라에서도 1997년에 수혈로 인한 말라리아 감염 환자의 발생이 보고되었다[4]. 말라리아는 원충의 종류에 따라 치료방법이 달라 조기 진단이 질병의 진행 경과를 단축시킬 수 있기 때문에 빠르고 정확한 진단이 매우 중요하다[5]. 현재까지 말라리아 진단은 김자염색(Giemsa stain)을 통한 박충도말표본과 후충도말표본을 현미경으로 판독하는 것이 표준 검사법으로 되어 있다. 이 방

법은 경제적이고 신속하며 비교적 민감하여 원충의 종간의 구별이 가능하다는 장점이 있으나, 결과 해석이 주관적이고 숙련된 기술을 필요로 한다. 특히 혈중 원충 농도가 낮을 경우에는 위음성으로 해석될 가능성이 있고 혼합감염의 경우 정확한 진단이 어려운 단점이 있다[6]. 최근에는 DNA 증폭을 이용한 분자진단법이 말라리아 진단에 유용하게 이용되고 있다. 고식적인 중합효소연쇄반응법과 이중 중합효소연쇄반응법(nested PCR) 등의 여러 가지 중합효소연쇄반응법이 말라리아 진단에 사용되고 있으며, 이 방법은 1 µL당 5개 이하의 원충 감염도 진단할 만큼 민감도가 높고 혼합감염의 감별에도 특이도가 높다고 알려져 있다[7-9]. 그러나 복잡하고 노동집약적이며 검사 소요시간이 길어 임상검사실에서 통상검사로 사용하기에 부적절하며 증폭 후 산물의 오염이 흔하게 발생하여 위양성 결과를 초래할 수 있다[7,10]. 실시간 중합효소연쇄반응은 유전자 증폭 확인이 객관화되고 실시간으로 할 수 있으며 사용법이 간단하고 상대적으로 검사소요 시간이 짧으며 실험실 오염을 줄일 수 있는 정량 검사법이다[8].

본 연구는 삼일열 말라리아와 열대열 말라리아 감염의 진단에 있어 실시간 중합효소연쇄반응 검사법인 LG Advansure™ Malaria P.f./P.v. real-time QPCR (LG 생명과학, 서울, 대한민국)의 유용성을 평가하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

2000년 4월부터 2009년 12월까지 말라리아 감염이 의심되어 고려대학교 안산병원에 내원하여 박충 및 후충 혈액도말표본을 통한 고전적인 검정법으로 원충이 발견되었던 73명의 환자를 대상으로 시행되었다. 대조군으로는 100명의 증상이 없는 건강한 성인을 대상으로 하였다. 환자군의 나이는 24세에서 60세 사이였으며 이들은 내원 당시 발열이 있거나 최근에 발열증상의 병력이 있었다. 환자군과 대조군 모두에게 연구의 목적과 방법을 설명하고 동의를 얻었으며 고려대학교 안산병원 윤리위원회의 심의를 거쳤다 (IRB Number: AS0844-002).

### 2. 방법

#### 1) 검정법

말라리아가 의심되는 환자는 박충도말과 후충도말을 시행하고 Wright Giemsa 염색을 하여 숙련된 판독자가 원충의 종과 농도를 광학현미경으로 판독하였다. 원충의 농도는 1,000 배율에서 백혈구 200개당 나타나는 원충의 수를 계수한 후에 자동 혈구 계산기 (Cell-dyn 4000, Abbott diagnostics, Santa Clara, CA, USA)에서 측정된 백혈구 수로부터  $\mu\text{L}$ 당 원충의 수( $(\text{원충 수}/200 \text{ WBC}) \times \text{WBC}/$

$\mu\text{L}$ )를 간접적으로 계산하였다.

#### 2) 검출한계 설정

말라리아의 검출 민감도를 결정하기 위해서 열대열 말라리아 양성 검체를 감염되지 않은 혈액으로 10배 희석하여 검사를 실시하였다.  $\mu\text{L}$ 당 10,000개의 원충 농도를 보였던 말라리아 감염 혈액을 정상 혈액으로 희석하여 혈중 원충 농도를  $\mu\text{L}$ 당 10,000개에서 0.001개까지 10배로 배수 희석하였다[2]. 각각의 희석된 검체로부터 DNA를 키트설명서에 따라 분리하고 실시간 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 또한 각각의 희석된 검체에 대하여 박충 및 후충 혈액도말표본을 만들어 현미경으로 양성 여부를 판독하였다. 결과 판독은 현미경 검정법과 중합효소연쇄반응법 모두 한 번씩만 시행하였고 음성결과에 대하여 중합효소연쇄반응 재검은 하지 않았다.

#### 3) 중합효소연쇄반응

EDTA 시험관에 채혈한 뒤  $-80^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하였고, QiAmp DNA mini kit (Quiagen, Chatsworth, CA, USA)를 사용하여 전혈 200  $\mu\text{L}$ 로부터 DNA를 키트 설명서에 따라 분리하였다. 분리된 DNA 5  $\mu\text{L}$ 를 실시간 중합효소연쇄반응에 사용하였다. LG Advansure™ Malaria P.f./P.v. real-time QPCR은 인체의 감염을 일으키는 삼일열 원충과 열대열 원충의 18S rRNA 유전자 영역을 증폭시키도록 고안되었다. 중합효소연쇄반응 검사와 분석은 SLAN 실시간 PCR system (LG 생명과학)을 사용하였다. EDTA 시험관에 채혈하여 추출한 말라리아 DNA, 중합효소연쇄반응 혼합액, 시발체/탐색자 혼합액, 정량표준물질과 양성 대조액, 음성 대조액을 첨가한 후 실시간 중합효소연쇄반응 기기에서 반응을 진행하였고 음성 대조액으로는 salmon sperm DNA, 양성 대조액으로는 P.f./P.v. 양성클론을 사용하였다. 중합효소연쇄반응 조건은 먼저  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 Taq 중합효소(Taq polymerase)를 활성화시킨 후,  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 15초,  $57^{\circ}\text{C}$ 에서 45초,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 20초간 40회 반복했다. 중합효소연쇄반응 결과는 실시간 중합효소연쇄반응 기기에 의해 실시간으로 측정되어 Cycle threshold (Ct) 값으로 나타난다. 각각의 양성 판정 기준 Ct 값은 삼일열원충과 열대열원충 모두 40 이하로 정의하였다.

## 결 과

총 73명의 환자 중 70명이 고전적인 혈액도말 검사상 삼일열 말라리아 감염으로 진단되었고 3명은 열대열 말라리아로 진단되었다. 삼일열 말라리아로 진단받은 70명 중 69명(98.6%)이 LG Advansure™ Malaria P.f./P.v. real-time QPCR 검사에서 양성을 보였고 1명(1.4%)은 음성이었다. 혈액도말검사의 검정법으로 열대열 말라리아로 진단받은 3명의 경우 중합효소연쇄반응검사법에서 100% 양성

**Table 1.** Comparison of the results of real time quantitative PCR and microscopic examination of Giemsa-stained blood film

Microscopy	Advansure Malaria P.f/P.v real time quantitative PCR		
	P. v*	P. f†	Negative
P. v* (N= 70)	69 (98.6%)	0 (0%)	1 (1.4%)
P. f† (N= 3)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)
Negative (N= 100)	0 (0%)	0 (0%)	100 (100%)

\**Plasmodium vivax*; †*Plasmodium falciparum*.

결과이었다. 또한 혈액도말검사의 검경법에서 말라리아가 검출되지 않았던 건강한 성인 100명의 경우 실시간 중합효소연쇄반응검사에서 삼일열 말라리아와 열대열 말라리아 모두 음성 결과를 보였다(Table 1). 본 실시간 중합효소연쇄반응 검사는  $\mu$ L당 0.1개의 원충이 있는 희석검체까지 양성으로 검출할 수 있었다(Table 2).

## 고 찰

말라리아 감염 후 질병의 경과와 감염된 원충의 종류와 초기 진단 여부에 달려 있어 신속하고 정확한 진단이 중요하다. 특히, 열대열 원충에 감염될 경우 병의 경과가 매우 빠르고 예후가 치명적이므로 민감한 검사법이 더욱 필요하다. 현재까지 말라리아 진단에는 혈액도말표본의 현미경 검사법, 급속 항원 검출법, 그리고 분자진단에서는 전통적 중합효소연쇄반응법, 이 중 중합효소연쇄반응법, 다중 중합효소연쇄반응(multiplex PCR)법 등이 소개되어 있다[11-14]. 그러나 혈액도말표본의 염색을 통한 검경법은 숙련도에 따라 결과의 차이를 보이고 종간의 판별력이 주관적이며 검사결과와 표준화가 이루어지기 어렵다. 또한 판독에 많은 시간이 소모되며 혈중 말라리아 원충의 농도가 낮을 경우에 진단의 예민도가 떨어지는 단점이 있다. Mathieu 등[9]의 보고에 따르면 2002년 영국의 262개의 기관에서 검경법으로 평가했을 때 정확한 말라리아 종의 진단율이 63.7%에서 95%까지 다양했다[9]. 면역크로마토그래피 시약지(immunochromatographic strip)와 단클론항체(monoclonal antibody)를 이용한 신속 항원, 항체 검출법의 경우에 도말검사법과 비교하였을 때 민감도와 특이도가 떨어진다는 보고가 있고[9,12] 현재 감염과 과거 감염을 구분할 수 없어 추적 검사로는 적합하지 않다[15]. 1980년대 후반부터 중합효소연쇄반응과 같은 핵산 증폭 검사법이 말라리아의 진단에 사용되고 있으나 중합효소연쇄반응법의 종류에 따라 민감도와 특이도가 매우 광범위하게 보고되고 있다[16]. 이 중 중합효소연쇄반응법의 경우 혈액도말검사법보다 민감도가 높다고 알려져 있지만 상대적으로 검사 소요시간이 길고 결과의 정량화가 어렵다는 단점이 있다[13]. 혈액도말검사에서 음성이나 임상적으로 말라리아 감염이 의심이 되는 경우, 혼합감염이 의심될 때, 그리고 혈액도말검사의 시행이 불가능

**Table 2.** Detection limit of *Plasmodium falciparum* parasitemia by real time quantitative PCR

	Parasitemia level (parasites/ $\mu$ L)								
	10,000	1,000	100	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
Microscopy	P	P	P	P	P	N	N	N	N
PCR	P	P	P	P	P	P	N	N	N

Abbreviations: P, positive; N, negative.

한 상황에서 신속 진단이 필요한 경우, 이러한 검사법의 단점을 보완한 검사가 요구되고 있다.

이 연구의 목적은 말라리아 감염 진단을 위한 LG Advansure™ Malaria P.f./P.v. real-time QPCR 제품을 평가하기 위한 것으로 본 연구 결과 분석시간이 신속하고 민감도(98.6%)와 특이도(100%)가 모두 높게 나타났다. 현미경 검경법에서 삼일열 원충 감염을 확인하였으나 중합효소연쇄반응 검사에서 음성이 나온 1 예의 경우, 중합효소연쇄반응검사의 재검을 하지는 않았으나, 그 원인으로 핵산 추출 과정에서 DNA가 변성되었거나 핵산추출이 불완전한 경우, 증폭 저해물질의 존재 또는 중합효소연쇄반응 과정의 오염, 증폭 과정 중에 민감도의 저하 등을 생각해 볼 수 있다. 검출한계는  $\mu$ L당 0.1개의 원충까지 검출할 수 있어서 혈액도말표본의 현미경 검사법보다 10배 예민하여, 현미경 검경법에서 위음성 결과를 보이는 경우라도 중합효소연쇄반응법으로 말라리아 감염을 진단할 수 있다. 이는 실시간 중합효소연쇄반응법을 이용한 말라리아 검출의 기존 보고와 유사한 결과였다[2]. 원충 농도의 정량화는 말라리아 치료 시 약제 내성을 미리 예측할 수 있으므로 말라리아 치료 효과 추적에 매우 중요하다. 이 연구에 사용된 실시간 중합효소연쇄반응 키트는 농도를 알고 있는 정량표준물질을 이용하여 표준곡선을 얻고 이를 바탕으로 원충의 농도를 정량화할 수 있다. 실시간 중합효소연쇄반응의 경우 증폭과정과 증폭산물의 감시가 밀폐된 공간에서 일어나 검체의 불필요한 조작 과정을 줄이며 증폭산물 검출을 위해 필요한 중합효소연쇄반응 후 증폭산물의 조작 과정을 생략할 수 있어 오염을 최소화할 수 있다. 또한 조작과정이 단순하며 중합효소연쇄반응 과정과 DNA 증폭과정을 동시에 감시할 수 있으며 검사 소요시간을 단축시킬 수 있다. 또한 DNA 기반 검사이므로 약물치료로 인하여 말라리아의 형태가 변하거나 현미경으로 관찰했을 때 삼일열 원충이나 열대열 원충의 전형적인 형태를 보이지 않아 말라리아의 종을 판별하기 모호한 경우에도 유용하게 사용될 수 있다. 18S rRNA 유전자가 비말라리아 종의 DNA와 교차반응을 일으킨다는 보고도 있으나 본 연구에서는 교차반응으로 인한 위양성 결과는 관찰되지 않았다[7].

아직까지 말라리아 감염의 진단에 있어 실시간 중합효소연쇄반응법에 대한 평가 연구는 드물다. 실제로 검사결과가 나오기까지 한 시간 이상이 소요되는 경우 응급상황에서 신속검사로 분류되



지는 않는다. 본 검사실에서도 중합효소연쇄반응검사는 말라리아 감염의 초기 진단이 아닌 현미경 검사로는 음성이나 임상증상으로 말라리아가 강력히 의심되는 경우, 또는 현미경 검사상 정확한 중간 판별이 어려운 경우에 이차적으로 사용하고 있다. 이러한 점으로 미루어 볼 때 말라리아 감염의 초기 진단이 아닌 현혈 혈액 중 말라리아 감염 혈액의 선별검사로써 실시간 중합효소연쇄반응 검사의 적용 가능성을 고려해 볼 수 있을 것이다. Hang 등[17]은 현혈 혈액 내에는 원충의 농도가 매우 낮으므로 토착지역에서 혈액 선별검사에 중합효소연쇄반응법이 필요하다고 주장한 바 있다.

결론적으로 LG Advansure™ Malaria P.f./P.v. real-time QPCR은 높은 민감도와 특이도를 보여 말라리아의 정확한 진단과 진단 후 환자의 치료 평가와 추적 관찰에 적합하다. 또한 이 검사법은 방법이 간단하고 소요 시간이 짧아 대규모 검사로도 이점이 있다. 최근 증가하고 있는 여행자 클리닉이나 말라리아 감염의 역학조사와 같이 검체의 수가 많은 경우, 실시간 중합효소연쇄반응 검사가 효율적으로 사용될 수 있다. 뿐만 아니라 높은 민감도를 필요로 하는 현혈 혈액 검사에도 적용할 수 있을 것이다.

## 요 약

**배경:** 말라리아는 국내에서 여전히 유행하고 있는 감염질환이다. 현재까지 말라리아의 진단에는 혈액도말검사의 검경법이 표준방법으로 되어 있으나 혈중 원충 농도가 낮을 경우에 예민도가 떨어지고 판독하기까지 많은 시간이 소요된다. 본 연구자들은 최근 개발된 LG Advansure™ Malaria P.f./P.v. real-time QPCR (LG 생명과학)의 수행능력을 평가하고자 한다.

**방법:** 고려대학교 안산병원에 내원한 173명의 검체를 사용하였다. 고전적인 검경법으로 말라리아로 진단받았던 73명의 환자와 100명의 건강인을 대상으로 하여 LG Advansure™ Malaria P.f./P.v. real-time QPCR를 시행하였고 그 결과를 비교하였다. 또한 말라리아 양성 혈액을 정상 혈액으로 10배로 배수 희석하여 검출 한계를 설정하였다.

**결과:** 총 73명의 환자 중 혈액도말 검사상 70명이 삼일열 말라리아로 진단받았으며 중합효소연쇄반응검사상 69명(98.6%)이 양성률을 보였다. 또한 혈액도말 검사상 열대열 원충이 발견되었던 3명(100%)의 경우 중합효소연쇄반응 검사상 모두 양성 결과였다. 본 중합효소연쇄반응 키트의 경우  $\mu\text{L}$ 당 0.1개의 원충까지 검출할 수 있는 높은 예민도를 보였다.

**결론:** LG Advansure™ Malaria P.f./P.v. real-time QPCR 검사는 민감도와 특이도가 높았으며 원충의 농도가 매우 낮을 경우에도 검출할 수 있어 말라리아 감염의 진단에 유용할 것으로 생각한다.

## 참고문헌

1. Sinden R and Gilles H. The malaria parasites. In: Warrell DA and Gilles HM, eds. Essential malariology. 4th ed. London: Arnold, 2002:8.
2. Gama BE, Silva-Pires Fdo E, Lopes MN, Cardoso MA, Britto C, Torres KL, et al. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Exp Parasitol* 2007;116:427-32.
3. Park J, Shin ES, Woo JH, Kim Y, Bae I, Jang J, et al. Two cases of falciparum malaria with acute respiratory distress syndrome. *Tuberc Respir Dis* 1998;45:888-95.
4. Cho YH, Kwon SY, Seo DH, Kim SI. Transfusion-transmitted malaria in Korea—10 cases during 1997-2001. *Korean J Blood Transfus* 2001;12: 263-70.
5. WHO, ed. Guidelines for the treatment of malaria. 2nd ed. Geneva: WHO, 2010:10-1.
6. Amexo M, Tolhurst R, Barnish G, Bates I. Malaria misdiagnosis: effects on the poor and vulnerable. *Lancet* 2004;364:1896-8.
7. Vo TK, Bigot P, Gazin P, Sinou V, De Pina JJ, Huynh DC, et al. Evaluation of a real-time PCR assay for malaria diagnosis in patients from Vietnam and in returned travellers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101:422-8.
8. Farcas GA, Zhong KJ, Mazzulli T, Kain KC. Evaluation of the RealArt Malaria LC real-time PCR assay for malaria diagnosis. *J Clin Microbiol* 2004;42:636-8.
9. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K. Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol* 2004;42:5636-43.
10. Hanscheid T and Grobusch MP. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *Trends Parasitol* 2002;18:395-8.
11. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:66-78.
12. Lim HS and Kim HS. Evaluation of diagnostic methods of re-emerging malaria in Korean patients. *Yonsei Med J* 2001;42:84-90.
13. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol* 1993;58:283-92.
14. Calderaro A, Piccolo G, Zuelli C, Galati L, Ricci L, Perandin F, et al. Evaluation of a new plate hybridization assay for the laboratory diagnosis of imported malaria in Italy. *New Microbiol* 2004;27:163-71.
15. Mehlotra RK, Lorry K, Kastens W, Miller SM, Alpers MP, Bockarie M, et

- al. Random distribution of mixed species malaria infections in Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62:225-31.
16. Padley DJ, Heath AB, Sutherland C, Chiodini PL, Baylis SA; Collaborative Study Group. Establishment of the 1st World Health Organization International Standard for *Plasmodium falciparum* DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. *Malar J* 2008;7:139.
17. Vu TT, Tran VB, Phan NT, Le TT, Luong VH, O'Brien E, et al. Screening donor blood for malaria by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;89:44-7.