

서아프리카에서 유입된 난형열말라리아 1예

A Case of *Plasmodium ovale* Malaria Imported from West Africa

문세진¹ · 김백남² · 곽은영¹ · 한태희¹

SeJin Moon, M.D.¹, Baek-Nam Kim, M.D.², Eun-Young Kuak, M.T.¹, Tae Hee Han, M.D.¹

인제대학교 의과대학 상계백병원 진단검사의학과¹, 내과²

Departments of Laboratory Medicine¹ and Internal Medicine², Sanggye Paik Hospital, Inje University College of Medicine, Seoul, Korea

In Korea, the majority of imported malaria cases are *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*, but *Plasmodium ovale* cases are rarely reported. We describe an imported case of *P. ovale* that was confirmed by peripheral blood smear and nested PCR targeting the small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene. A 37-yr-old male had visited the Republic of Ghana in tropical West Africa 3 months ago, and suffered from fever and headache since 2 weeks after his return to Korea. The results of rapid malaria test using SD Malaria Antigen/Antibody Kit (Standard Diagnostics, Korea) were negative, but *Plasmodium* species was observed in Wright-Giemsa-stained peripheral blood smear. For the evaluation of possible mixed infection and identification of species, we performed a nested PCR targeting the SSU rRNA gene. *P. ovale* single infection was confirmed by PCR. The sequence analysis of the *P. ovale* SSU rRNA gene showed that our isolate was *P. ovale* classic type. We should confirm *P. ovale* infection for an accurate diagnosis and treatment of imported malaria cases in Korea because the number of travelers to *P. ovale*-endemic regions has recently increased.

Key Words: Malaria, *Plasmodium ovale*

서 론

말라리아는 *Plasmodium species*에 의해 전파되는 원충질환으로, 열대, 아열대 및 일부 온대 지역에서 발생한다. 1979년 세계보건기구는 우리나라에서 말라리아 박멸을 공식적으로 선언하였다. 그러나 1993년 삼일열말라리아가 다시 발생한 이래 삼일열말라리아 감염 사례가 매년 증가하고 있다. 우리나라에서 다른 종의 말라리아는 대부분 해외에서 유입된 것이며, 해외유입 말라리아의 대부분은 열대열 혹은 삼일열말라리아이다[1]. 질병관리본부에 따르면 해외유입 말라리아 환자는 2002년부터 2009년까지 277명으로 보

고되었으며 원충 종류별로는 *P. falciparum* (115명, 41.5%)이 가장 많았고, *P. vivax* (102명, 36.8%), *P. vivax*와 *P. falciparum* 혼합감염 (10명, 3.6%), *P. malariae* (7명, 2.5%), *P. ovale* (3명, 1.1%), 미상 (40명, 14.5%)의 순이었다[2]. 해외유입 난형열말라리아는 우리나라에서 2002년 처음 보고[3]되었으며 국내에서는 발생이 매우 드물다[3]. 이번 증례는 난형열말라리아가 중합효소연쇄반응으로 확진된 두번째 증례로 유전자 염기서열을 분석하여 GenBank에 등록하였기에 이를 보고한다.

증 례

1. 임상 경과 및 검사 결과

37세 남자가 내원 2주 전부터 발생한 열과 두통으로 응급실을 방문하였다. 환자는 3개월 전 서아프리카의 가나지역에 20일간 체류하였으며 당시 mefloquine을 4회 예방적으로 복용하였다. 내원 시 체온은 38.3°C이었으며 신체검진에서 다른 이상은 발견되지 않았다. 전체혈구계산은 백혈구 4,900/μL, 혈색소 12.5 g/dL, 혈소판 57,000/μL이었고, 화학검사(나트륨, 칼륨, 염소, AST, ALT, 총빌리루빈, blood urea nitrogen, 크레아티닌, 총단백, 알부민)는 모두 정상이었다. 말라리아 신속항원검사(SD Malaria Antigen/Antibody Kit, Standard Diagnostics, Inc., Yongin, Korea)는 음성 결과를 보였으

Corresponding author: Tae Hee Han, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Sanggye Paik Hospital, Inje University College of Medicine, 761-1 Sanggye-7 dong, Nowon-gu, Seoul 139-707, Korea

Tel: +82-2-950-1228, Fax: +82-2-950-1274, E-mail: taeheehan@paik.ac.kr

Received: March 19, 2011

Revision received: June 17, 2011

Accepted: June 21, 2011

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

© 2012, 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.

나 말초혈액 도말검사에서 원충이 50/μL 이하의 밀도로 관찰되었다. 원충에 감염된 적혈구는 정상 적혈구보다 커져 있고 fimbriated margin을 보여 난형열말라리아가 의심되어(Fig. 1) hydroxychloroquine과 primaquine을 복용하였다. 치료 2일 후부터 증상이 호전되었으며 primaquine은 총 2주 복용하였다. 한달 후 혈액검사와 생화학검사는 모두 정상이었으며 말초혈액에서 난형열말라리아의 원충은 관찰되지 않았다.

2. 말라리아 종-특이 nested PCR

Plasmodium 종 및 혼합 감염을 감별하기 위해 small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) 유전자를 겨냥하는 이중중합효소연쇄반응(nested PCR)을 시행하여 *P. ovale*의 단독 감염을 확인할 수 있었다. DNA는 말초혈액에서 boiling법으로 추출하였다. 이중중합효소연쇄반응은 Snounou 등[4]의 논문을 참고하여 시행하였으며, 첫 증폭에 속 특이 시발체 (rPLU5/rPLU6)를 사용하였으며, 두 번째 증폭에서 종 특이 시발체 4가지(*P. falciparum* rFAL1/rFAL3, *P.*

vivax rVIV1/rVIV2, *P. malariae* rMAL1/rMAL2, *P. ovale* rOVA1/rOVA2)를 사용하였다. 증폭은 각각의 시발체 3 μM; dATP, dCTP, dTTP, dGTP 각각 200 μM; Tris-HCl (pH 9.0) 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 40 mM; Taq polymerase (Bioneer, DaeJeon, Korea) 1단 위; DNA 3 μL이 포함된 20 μL reaction mixture로 이루어졌다. 양성 대조로 본 병원에서 말라리아 종이 말초혈액에서 *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*가 확인된 검체를 이용하였고 *P. malariae*는 양성대조 검체를 구하지 못하였다.

첫 번째와 두 번째 중합효소연쇄반응은 모두 같은 증폭 환경에서 이루어졌으며, DNA thermal cycler (iCycler Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에서 30 cycle의 증폭을 시행하였다. 각각의 cycle은 95°C에서 30초간 pre denaturation 후 30번의 증폭 cycle (94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 1분간 primer annealing, 72°C에서 1분간 extension)을 진행하고 5분간 72°C에서 유지하였다. 증폭된 DNA 조각들의 크기는 각각 *Plasmodium*속 1,000 bp, *P. falciparum* 205 bp, *P. vivax* 144 bp, *P. malariae* 120 bp, *P. ovale* 788 bp였다(Fig. 2).

3. 염기서열 분석

첫 번째 중합효소연쇄반응 산물을 rPLU5와 RPLU6를 이용하여 염기서열분석을 시행하였다. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 양방향에서 서열분석을 시행하고 서열분석산물은 ABI 3730 XL autoanalyzer (Applied Biosystems)로 분석하였다. SSU rRNA의

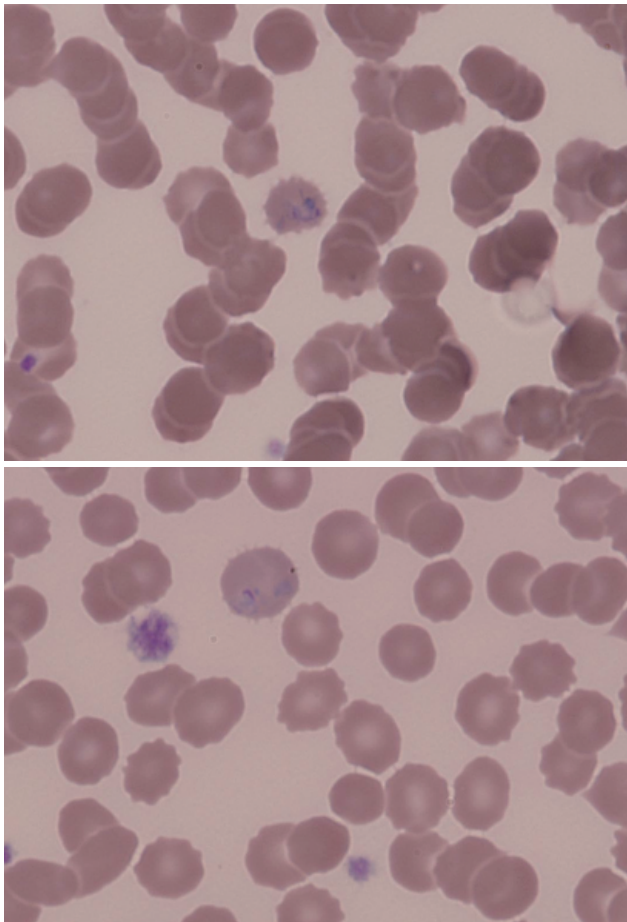


Fig. 1. Wright-Giemsa-stained peripheral blood smear (magnification, ×1,000). A ring form of malaria trophozoite in an enlarged red blood cell with fimbriated margin is observed in each of the two pictures.

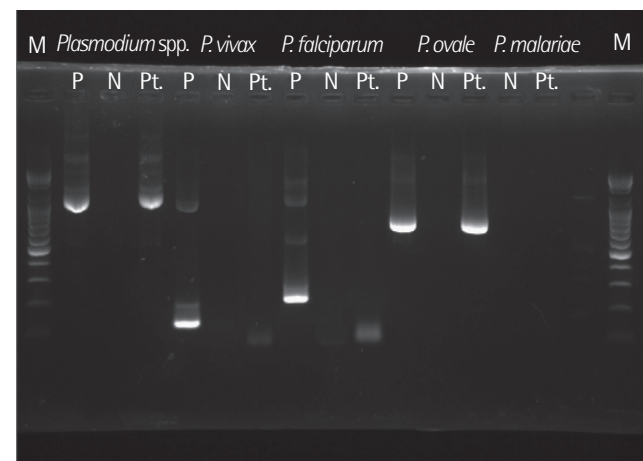


Fig. 2. *Plasmodium* species-specific nested PCR. The *Plasmodium* genus can be identified from the presence of first-round amplification product (1,000 bp). *Plasmodium* species can be identified from the presence of second-round amplification products specific for *P. vivax* (144 bp), *P. falciparum* (205 bp), and *P. ovale* (788 bp) respectively. Only *P. ovale* DNA was detected from the patient's blood. (P, positive control; N, negative control; Pt, Patient's peripheral blood sample; M, DNA ladder marker).

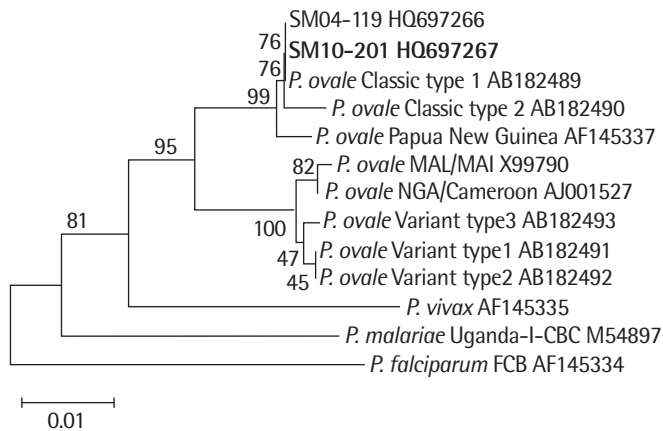


Fig. 3. Phylogenetic tree based on the small subunit ribosomal RNA genes of *Plasmodium* species including eight registered *P. ovale* isolates (Nigerian I/CDC, Papua New Guinea, MAL/MAI, CAG/Cameroon, classic types, and variant types) and *P. ovale* isolate (SM10-201) of this study. SM10-201 is more similar to the isolates of *P. ovale* classic type1 than other isolates.

유전자 서열을 비교하기 위해 *P. ovale* Classic type 1 (AB182489), *P. ovale* Classic type 2 (AB182490), NAG/Cameroon (AJ001527), MAL/MAI (X99790), Papua New Guinea (AF145337), *P. ovale* Variant type 1 (AB182491), *P. ovale* Variant type 2 (AB182492), *P. ovale* Variant type 3 (AB182493)을 사용하였으며, *P. falciparum* (AF145334), *P. vivax* (AF-145335), *P. malariae* (AF145336)를 포함하였다. Phylogenetic tree는 MEGA4를 이용하여 작성하였으며[5], SSU rRNA를 이용하여 *P. ovale*의 부분 서열을 분석한 결과 분리된 *P. ovale* (SM10-201, HQ697267)는 *P. ovale* Classic type이었으며, Classic type 1 (similarity 99%)에 더 가까웠다(Fig. 3).

고 찰

말라리아 감염을 일으키는 4가지 종 중에서 삼일열말라리아와 열대열말라리아가 전체 발생의 95% 이상을 차지하는데 삼일열말라리아는 열대, 아열대, 온대지역까지 고루 분포하며, 열대열말라리아는 주로 열대지역에서 분포하고 있다. 사일열말라리아는 산발적으로 분포되어 있으며, 난형열말라리아는 나이지리아나 가나와 같은 서아프리카 중부, 중동, 파푸아 뉴기니, 인도네시아에 분포하지만, 최근에는 미얀마, 캄보디아, 베트남에서도 감염이 보고되고 있다[6-8]. 2004년에 발견된 *P. knowlesi*는 보르네오, 태국, 미얀마, 필리핀 등에서 감염이 보고되었다[9].

우리나라 말라리아는 토착화된 삼일열말라리아가 대부분이기는 하나[1, 10], 해외여행과 해외거주가 늘면서 해외에서 유입된 다른 종의 말라리아 보고사례가 증가하고 있다[2]. 해외유입 말라리아의 대부분은 열대열말라리아였으며 난형열말라리아는 보고된

증례수가 매우 적어 질병관리본부의 보고에 따르면 2002년부터 2008년까지 3건뿐이었다[2].

난형열말라리아의 평균 잠복기는 10-17일이지만 수면소체로 인한 감염으로 수개월 혹은 수년 후에 증상이 나타나기도 한다[9]. Han 등[3]이 국내에서 최초로 보고한 난형열말라리아의 경우도 서아프리카 현지에서 말라리아에 감염된 적 있는 환자가 귀국 8개월 후 증상이 다시 나타나 말초혈액도말검사와 중합효소연쇄반응으로 난형열말라리아가 진단된 사례이었다. 본 증례도 귀국 3개월 후 증상이 발현되어 발생 양상이 이전의 보고와 유사하였다. 난형열말라리아는 이와 같이 증상이 나중에 나타나는 경우가 있으므로 문진시 과거력상 여행력이 간과되어 진단과 치료가 지연될 수 있기 때문에 주의가 필요하다.

말라리아 항원 및 항체 검사키트는 신속하게 말라리아의 감염 여부를 확인할 수 있지만 원충의 밀도가 낮거나 삼일열말라리아 감염이 아닌 경우 위음성을 보일 수 있다[11]. 이 증례에서도 신속 검사 결과는 음성이었지만 말초혈액도말검사에서 말라리아 원충이 관찰되었다. 말초혈액도말검사로 난형열말라리아를 진단할 때는 특징적으로 감염된 적혈구가 커져 있거나 fimbriated margin을 보일 수 있으며, 분열전체 내에서 평균 8개 정도의 분열소체를 보이는 것으로 난형열말라리아의 종감별에 도움을 받을 수 있다[9]. 그러나 국내에서는 난형열말라리아가 보고가 매우 드물어 경험 부족으로 진단이 어려울 수 있으며, 형태학적 관찰만으로는 사일열말라리아와의 감별이 쉽지 않은 경우도 있다. 또한 주요 유행지역에서 단독감염보다 다른 종과의 혼합감염이 흔하므로[8, 12] 난형열말라리아가 의심되는 경우는 말라리아 종을 확진하고 혼합감염 여부도 배제하기 위해 형태학적 관찰 외에 중합효소연쇄반응을 시행하는 것이 필요하다.

난형열말라리아는 열대열말라리아에 비해 경미한 경과를 보이며, 난형열, 삼일열, 사일열말라리아의 임상경과를 비교한 보고에서도[13, 14], 경미한 간기능 검사의 변화를 보이는 외에는 특별한 부작용없이 치료에 잘 반응한다고 하였다. 본 환자도 내원시 경한 빈혈과 혈소판감소증만을 나타냈으며 다른 검사 소견은 정상이었 고 치료 기간 중 검사소견의 이상없이 치료가 완료되어 임상 경과에 대한 이전 보고와 일치된 소견을 보였다.

난형열말라리아의 염기서열 분석은 난형열말라리아의 역학 연구의 기초 자료로 이용되며 염기서열 분석에 기초한 아형에 따른 질병특성 연구의 토대가 된다[15]. 하지만 다른 말라리아에 비교하여 난형열말라리아의 유전자 자료가 매우 부족한 실정이다. 난형열말라리아는 기본형과 변이형으로 나뉘는데, 모두 같은 지역에서 분리되며, 변이형의 경우가 혈중 원충의 밀도가 더 높고 단일 종 감염을 더 많이 일으킨다고 한다[16]. 본 연구에서는 서열 분석을 통해 환자에서 분리된 난형열말라리아가 기본형인 것을 확인하였다.

결론적으로 난형열말라리아 위험 지역으로의 해외 여행이나 체류가 최근 증가하고 있으므로 유입된 말라리아는 정확한 진단과 치료를 위해 난형열말라리아가 확진되어야 한다.

요 약

한국에서의 해외 유입 말라리아는 삼일열말라리아와 열대열말라리아가 대부분을 차지하며, 난형열말라리아는 드물게 보고되었다. 저자들은 말초혈액도말검사와 이중중합효소연쇄반응으로 확진된 유입된 난형열말라리아 1예를 보고하는 바이다. 환자는 37세 남자 환자로 3개월 전 가나에서 체류하였으며 귀국 2주 후부터 발열을 보였으며 말라리아 신속항원 검사에서는 음성을 보였으나 말초혈액에서 말라리아 원충이 관찰되었다. 종 확진 및 혼합감염 여부를 확인하기 위해 시행한 말라리아 종 특이 이중중합효소연쇄반응에서 난형열말라리아 단독 감염을 확인하였으며, 시행한 염기서열 분석에서 본원에서 분리된 난형열말라리아는 *P. ovale* classic type으로 확인되었다.

결론적으로 난형열말라리아 위험 지역으로의 해외 여행이나 체류가 최근 증가하고 있으므로 유입된 말라리아는 정확한 진단과 치료를 위해 난형열말라리아가 확진되어야 한다.

참고문헌

1. Park JW. Status of vivax malaria in the Republic of Korea. J Korean Med Assoc 2004;47:521-6.
2. Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2009 Guidelines of malaria. Seoul, Korea: The Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2009:47.
3. Han TH, Kim BN, Seong HK. A case of imported *Plasmodium ovale* malaria. J Korean Med Sci 2006;21:932-5.
4. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 1993; 61:315-20.
5. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief Bioinform 2004;5:150-63.
6. Toma H, Kobayashi J, Vannachone B, Arakawa T, Sato Y, Nambanya S, et al. *Plasmodium ovale* infections detected by PCR assay in Lao PDR. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1999;30:620-2.
7. Win TT, Lin K, Mizuno S, Zhou M, Liu Q, Ferreira MU, et al. Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. Trop Med Int Health 2002; 7:231-9.
8. Kawamoto F, Liu Q, Ferreira MU, Tantular IS. How prevalent are *Plasmodium ovale* and *P. malariae* in East Asia? Parasitol Today 1999;15: 422-6.
9. Garcia LS. Malaria. Clin Lab Med 2010;30:93-129.
10. Park JW, Jun G, Yeom JS. *Plasmodium vivax* malaria: status in the Republic of Korea following reemergence. Korean J Parasitol 2009;47(S): S39-50.
11. Park TS, Kim JH, Kang CI, Lee BH, Jeon BR, Lee SM, et al. Diagnostic usefulness of SD malaria antigen and antibody kits for differential diagnosis of vivax malaria in patients with fever of unknown origin. Korean J Lab Med 2006;26:241-5.
12. May J, Mockenhaupt FP, Ademowo OG, Falusi AG, Olumese PE, Bienzle U, et al. High rate of mixed and subpatent malarial infections in southwest Nigeria. Am J Trop Med Hyg 1999;61:339-43.
13. Tangpukdee N, Thanachartwet V, Krudsood S, Luplertlop N, Pornpin-inworakij K, Chalermrut K, et al. Minor liver profile dysfunctions in *Plasmodium vivax*, *P. malariae* and *P. ovale* patients and normalization after treatment. Korean J Parasitol 2006;44:295-302.
14. Song HS, Kim JM, Na DJ, Kim JY, Kim YJ, Yeom JS, et al. The first case of *plasmodium malariae* infection imported from Nigeria to Korea. Korean J Med 2009;77(S5):S1323-7.
15. Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC. *Plasmodium malariae* and *plasmodium ovale*-the "bashful" malaria parasites. Trends Parasitol 2007; 23:278-83.
16. Win TT, Jalloh A, Tantular IS, Tsuboi T, Ferreira MU, Kimura M, et al. Molecular analysis of *Plasmodium ovale* variants. Emerg Infect Dis 2004;10:1235-40.