

# 기니에서 유입된 사일열말라리아 감염 1예

## A Case of *Plasmodium malariae* Infection Imported from Guinea

강윤정<sup>1</sup> · 심문정<sup>2</sup> · 김정연<sup>3</sup> · 지소영<sup>3</sup> · 이원자<sup>3</sup> · 양진영<sup>4</sup>

Yun-Jung Kang, M.T.<sup>1</sup>, Moon-Jung Shim, Ph.D.<sup>2</sup>, Jung-Yeon Kim, Ph.D.<sup>3</sup>, So-Young Ji<sup>3</sup>, Won-Ja Lee, Ph.D.<sup>3</sup>, Jinyoung Yang, M.D.<sup>4</sup>

단국대학교 보건학과<sup>1</sup>, 안산대학교 임상병리학과<sup>2</sup>, 질병관리본부 국립보건연구원 말라리아 기생충팀<sup>3</sup>, 가톨릭대학교 진단검사의학과<sup>4</sup>

Health Science<sup>1</sup>, Dankook University Graduate School, Cheonan; Department of Clinical Laboratory Science<sup>2</sup>, Ansan University, Ansan;

Department of Malaria and Parasitic Disease<sup>3</sup>, National Institutes of Health, Cheongju; Department of Laboratory Medicine<sup>4</sup>, School of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Recently, the number of Korean travelers and workers to malaria-endemic regions has increased, and the number of patients with imported malaria cases has increased as well. In Korea, most cases of imported malaria infections are caused by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. Only one report of imported *P. malariae* infection has been published thus far. Here, we describe a case of imported *P. malariae* infection that was confirmed by peripheral blood smear and nested PCR targeting the small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene. A 53-yr-old man, who had stayed in the Republic of Guinea in tropical West Africa for about 40 days, experienced fever and headache for 3 days before admission. The results of rapid malaria test using the SD Malaria Antigen/Antibody Kit (Standard Diagnostics, Korea) were negative, but Wright-Giemsa stained peripheral blood smear revealed *Plasmodium*. To identify the *Plasmodium* species and to examine if the patient had a mixed infection, we performed nested PCR targeting the SSU rRNA gene. *P. malariae* single infection was confirmed by nested PCR. Sequence analysis of the SSU rRNA gene of *P. malariae* showed that the isolated *P. malariae* was *P. malariae* type 2. Thus, our findings suggest that when cases of imported malaria infection are suspected, infection with *P. malariae* as well as *P. falciparum* and *P. vivax* should be considered. For the accurate diagnosis and treatment of imported malaria cases, we should confirm infection with *Plasmodium* species by PCR as well as peripheral blood smear and rapid malaria antigen test.

**Key Words:** Malaria, *Plasmodium malariae*, Nested PCR

## 서론

말라리아는 *Plasmodium* 원충이 사람의 혈액으로 들어가 질병을 유발하는 감염병이다. 매년 발생하는 환자 수는 전세계적으로 볼 때, 약 3-5억 명 정도이며 그중 약 200만 명이 사망한다고 한다. 지금까지 사람에게 감염성이 있는 것으로 알려진 종은 열대열원충(*P. falciparum*), 삼일열원충(*P. vivax*), 난형열원충(*P. ovale*), 사

일열원충(*P. malariae*)이다[1, 2]. 최근에는 해외여행의 증가와 해외근로에 따른 해외유입형 말라리아 감염의 가능성이 증가하고 있다. 2002년부터 2010년까지 질병관리본부에 보고된 사일열말라리아 환자는 총 8명이었다[3]. 해외유입형 사일열말라리아는 우리나라에서 2009년 처음 보고[2]되었으며 국내에서는 발생이 매우 드물다. 본 증례는 서아프리카에서 유입된 사일열말라리아로 이중중합효소연쇄반응(nested PCR)으로 확진된 국내 두 번째 증례로 유전자 염기서열을 분석하여 GenBank에 등록되었기에 이를 보고한다.

## 증례

### 1. 임상경과 및 검사 결과

53세 남자 환자가 입원 3일 전부터 발생한 열과 두통을 주소로 본원 응급실을 방문하였다. 환자는 기저질환이 없었고 2013년 5월에서 7월까지 약 40일간 서아프리카 기니(Guinea)에서 체류하였다. 출국 전 말라리아 예방약은 복용하지 않았다. 환자는 혈액검사

**Corresponding author:** Jinyoung Yang

Department of Laboratory Medicine, Yeouido St. Mary's Hospital, 10 63-ro, Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-713, Korea

Tel: +82-2-3779-1320, Fax: +82-2-3779-2285, E-mail: jyjasmine@catholic.ac.kr

Received: November 8, 2013

Revision received: May 28, 2014

Accepted: June 29, 2014

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

© 2015, 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.

에서 백혈구 수 7,020/ $\mu$ L, 혈색소 14.5 g/dL, 혈소판 80,000/ $\mu$ L로 혈소판감소증을 보였다. 혈액생화학검사(총단백, 알부민, 포도당, 총빌리루빈, 아밀라아제, 요소질소, 크레아티닌, 나트륨, 칼륨, 염소)는 모두 정상이었으나, AST 45 IU/L (참고치 7-38 IU/L), ALT 44 IU/L (참고치 4-43 IU/L), 젖산탈수소효소 369 U/L (참고치 106-230 U/L)로 정상 범위보다 약간 증가되어 있었다. 입원 당일 말라리아 신속항원검사(SD Bioline Malaria antigen P.f./Pan rapid kit, Standard Diagnostics Inc., Yongin, Korea)는 음성 결과를 보였으며 말초혈액도말검사에서도 말라리아원충이 발견되지 않았다. 환자는 해열제를 복용하였으나 39°C의 고열을 보이며 호전되지 않았다.

입원 6일 후 다시 말라리아신속항원검사를 하였으나 음성이었으며, 말초혈액도말검사서 정상 크기의 적혈구 내에 밴드형의 말라리아원충이 관찰되었다(Fig. 1). 말라리아원충의 농도는 현미경 1,000 배율에서 백혈구 200개당 원충의 수를 센 후 자동혈구분석기(XE-2100 hematology analyzer, Sysmex, Japan)로 측정한 백혈

구수로  $\mu$ L당 원충의 수를 간접 계산하였고 109/ $\mu$ L로 계산되었다. 환자는 메플로퀸(처음 800 mg 투여 후 400 mg을 6시간 간격으로 4회 투여)을 4일간 투여하였다. 치료 5일째 말초혈액도말 추적검사에서 52/ $\mu$ L 농도의 말라리아원충이 지속적으로 발견되고 다시 열이 발생하여 메플로퀸 1 g을 다시 3일간 투여하였다. 환자는 치료 6일째부터 증상이 호전되었으며 치료 9일째부터 말초혈액도말검사에서 말라리아원충이 발견되지 않았다. 치료 12일째에서도 말초혈액 도말검사서 말라리아원충은 관찰되지 않았으며 혈액검사와 생화학검사도 모두 정상으로 회복되었다.

## 2. 말라리아 종 · 특이 이중 중합효소연쇄반응(Nested PCR)

사일열말라리아감염 및 혼합감염 여부를 확인하기 위하여 Snounou 등[4]이 발표한 18S rRNA 유전자를 이용한 이중중합효소연쇄반응을 일부 변형하여 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 전혈 200  $\mu$ L로부터 QIAamp DNA blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Ger-

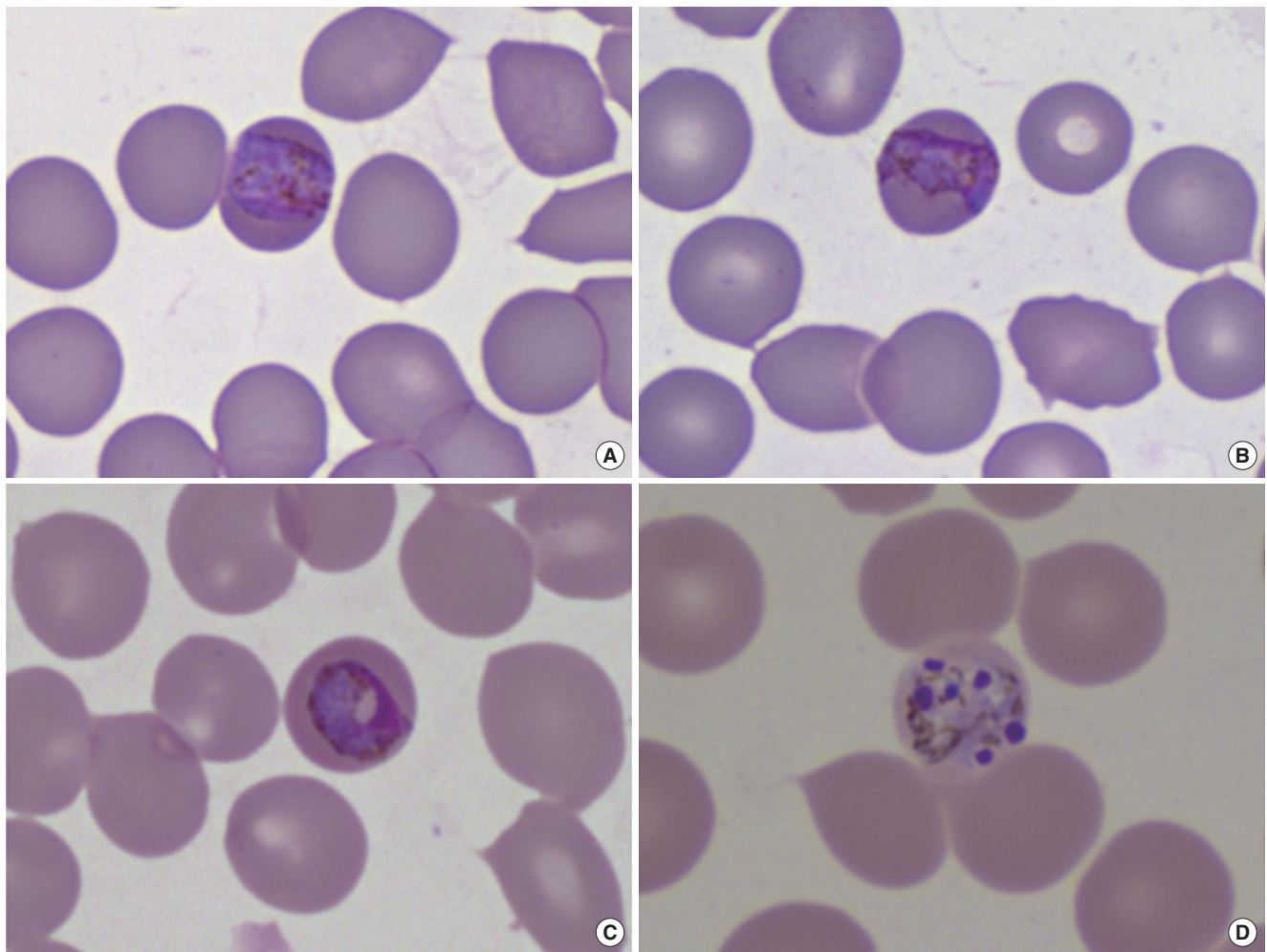


Fig. 1. Wright-Giemsa stained peripheral blood smear ( $\times 1,000$ ). Typical "band" form trophozoites (A, B), "basket" form trophozoites in which the chromatin is located in the center of the vacuole (C), and the schizont form (D) are observed in red blood cells. No red cell enlargement was noted.

many)를 사용하여 DNA를 추출 후, rPLU5/rPLU6 프라이머를 사용하여 1차 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 그 결과 1,100 bp의 중합효소연쇄반응 산물이 확인되어 말라리아원충으로 판독되었으며(Fig. 2), 4종의 말라리아원충을 감별하기 위해 종-특이 프라이머 4종(열대열말라리아, rFAL1/2; 삼일열말라리아, rVIV1/2; 난형열말라리아, rOVA1/2; 사일열말라리아, rMAL1/2)을 사용하여 2차 중합효소연쇄반응을 수행하였다. dATP, dCTP, dTTP, dGTP 각각 200  $\mu$ M, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, KCl 40 mM, Taq polymerase (Bioneer, Daejeon, Korea) 1  $\mu$ L, 각각의 프라이머 1  $\mu$ L, DNA 2  $\mu$ L이 포함된 20  $\mu$ L reaction mixture를 이용하여 2차 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 양성대조군으로 질병관리본부 말라리아 기생충과에서 보유하고 있는 삼일열말라리아, 열대열말라리아, 난형열말라리아가 확인된 검체를 이용하였으나, 사일열말라리아는 양성대조검체를 구하지 못하였다. 열대열말라리아, 삼일열말라리아, 사일열말라리아는 동일한 조건으로 1차 및 2차 중합효소연쇄반응을 시행하였으며 난형열말라리아는 중합효소연쇄반응 조건을 약간 달리하였다. 1차 중합효소연쇄반응 과정은 95°C에서 5분 동안 predenaturation 후 94°C에서 30초 동안 denaturation을 하고, 60°C에서 1분 동안 primer annealing, 72°C에서 1분 동안 extension을 진행하고 5분 동안 72°C에서 유지하며 30 cycle을 시행하였다. 난형열말라리아는 94°C에서 30초 동안 denaturation 후, 45°C에서 30초 동안 primer annealing, 72°C에서 1분 동안 extension 후, 7분 동안 72°C에서 유지하였다.

2차 중합효소연쇄반응에서는 1차 중합효소연쇄반응 산물 1  $\mu$ L가 포함된 중합효소연쇄반응 mixture를 92°C에서 20초 동안 denaturation, 58°C에서 20초 동안 primer annealing, 72°C에서 20초 동안 extension하는 조건으로 수행하였다. 난형열말라리아는 94°C에서 30초 동안 denaturation, 45°C에서 30초 동안 primer annealing, 72°C에서 1분 동안 extension을 하는 조건으로 시행하였다. 증폭

된 중합효소연쇄반응 산물의 크기는 각각 열대열말라리아 205 bp, 삼일열말라리아 120 bp, 난형열말라리아 800 bp, 사일열말라리아 144 bp로 확인되었다(Fig. 2).

### 3. 염기서열 분석

중합효소연쇄반응 결과 144 bp의 사일열말라리아 산물이 확인되었으나, 정확한 판정을 위하여 염기서열 분석을 시행하였다. 염기서열을 NCBI BLAST: National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome))에서 검색한 결과, AF488000 사일열말라리아 type 2 small subunit ribosomal RNA 유전자와 99% 일치하여 사일열말라리아에서 유래한 서열임이 확인되었다.

## 고 찰

말라리아는 *Plasmodium* 원충에 의해 전파되는 감염병으로 열대, 아열대 및 일부 온대 지역에서 발생하며 각 종마다 그 분포 지역에 차이를 보인다. 열대열말라리아는 주로 열대지역에서 발생하며, 삼일열말라리아는 열대, 아열대, 온대지역에까지 널리 발생하며, 열대열말라리아와 삼일열말라리아가 전체 발생의 95% 이상을 차지한다. 난형열말라리아는 서아프리카 중부, 중동, 파푸아 뉴기니, 인도네시아 등지에서 주로 발생하나, 베트남, 캄보디아, 미얀마에서도 감염 환자가 보고된 바 있다[5, 6]. 사일열말라리아는 사하라사막 이남, 서남아시아, 서태평양의 섬들에서 주로 발생하는 것으로 알려져 있다[2]. 우리나라에는 삼일열말라리아가 주종을 이루고 있으나, 최근에는 해외여행의 증가와 해외근로에 따른 해외유입형 열대열말라리아가 간혹 보고되고 있다[7]. 질병관리본부에 따르면 해외유입형 말라리아 환자는 2002년부터 2010년

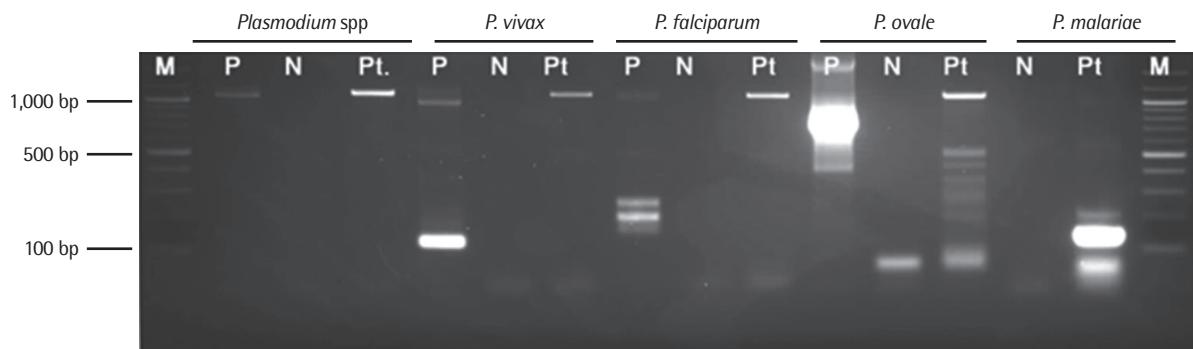


Fig. 2. *Plasmodium* species-specific nested PCR. In the first PCR, 1,100 bp of the *Plasmodium* gene was identified. *Plasmodium malariae* product (144 bp) was detected in the second species-specific PCR. Three other products, *P. vivax* (120 bp), *P. falciparum* (205 bp), and *P. ovale* (800 bp), were also successfully detected as positive controls.

Abbreviations: P, positive control; N, negative control; Pt, Patient sample; M, DNA ladder marker.



까지 353명으로 보고되었으며, 원충 종류별로는 열대열말라리아 (145명, 41.1%), 삼일열말라리아(128명, 36.3%), 삼일열말라리아와 열대열말라리아 혼합감염(10명, 2.8%), 사일열말라리아(8명, 2.3%), 난형열말라리아(5명, 1.4%), 미상(57명, 16.1%)이 발생하였다[3]. 사일열말라리아는 모기 체내에서 다른 종의 말라리아보다 성장 속도가 느려[8] 그 발생 빈도가 높지 않다[2, 9]. 토착형으로 국내에서 발생한 사일열말라리아에 대한 보고는 Hiraba 등(1930)이 충남 서산에서 처음 14예 보고 이래 1961년 보사부(현 보건복지부) 말라리아팀에서 마약중독환자로부터 1예 검출까지 약 43예를 들 수 있다[2, 10]. 해외유입형 사일열말라리아 감염은 2011년 질병관리본부의 통계에서 8명이 집계되었으며(2002-2010년까지 보고된 통계임)[3], 증례로 보고된 것은 현재까지 한 증례[2]가 유일하다. 사일열말라리아는 다른 종에 비해 원충의 농도가 낮아 진단이 늦어질 수 있으며, 다른 종과의 혼합감염이 빈번히 일어난다. 또한 만성 신증후군을 유발하여 사망률을 높이는 경우도 있으므로 정확한 진단이 요구된다[2, 11]. 본 증례의 환자도 처음 내원 당시 현미경 검경에서 말라리아 원충이 관찰되지 않았으며, 말라리아 신속항원검사에서도 음성을 나타내어 치료시기를 놓칠 위험이 있었다. 말라리아 신속항원검사 키트는 말라리아의 감염 여부를 간편하고 신속하게 확인할 수 있으나, 원충의 농도가 낮거나 삼일열말라리아 감염이 아닌 경우 위음성을 보일 수 있다[6, 12]. Moon 등[6]의 해외에서 유입된 난형열말라리아 보고에서 난형열말라리아의 원충의 농도가 50/μL 이하일 때, 신속항원검사서 음성을 보였으나, 본 증례에서 원충의 농도는 109/μL로 저농도 말라리아 혈증이 아니었다. 또한 Kang 등[13]의 서아프리카에서 유입된 난형열말라리아 원충의 농도는 처음 내원 시와 두번째 내원 시 각각 583/μL, 2,478/μL로 계산되어 저농도 말라리아 혈증이 아니었으나 신속항원검사서 위음성 소견을 보였다. 삼일열말라리아에 대한 신속항원검사키트의 민감도와 특이도에 관한 연구는 있으나[14] 아직 삼일열말라리아 이외의 다른 종에 대한 민감도와 특이도 연구는 미흡한 실정이다. 이번 증례의 사일열말라리아와 Kang 등[13]의 증례 난형열말라리아에서 신속항원검사 위음성 소견으로 보아 삼일열말라리아 감염이 아닌 경우에 신속항원검사서 위음성 가능성을 염두에 두어야 한다[12]. 신속항원검사 위음성의 다른 원인으로 검사 표적이 되는 효소를 분비하는 유전자에 변이가 있을 가능성을 생각해 볼 수 있다.

최근에는 해외여행이나 해외근로로 장기 체류하는 인구가 점점 늘고 있어 해외유입 말라리아가 더 증가할 것으로 생각된다. 해외유입 말라리아로 의심 시 삼일열말라리아와 열대열말라리아뿐만 아니라 흔하지 않은 사일열말라리아나 난원형말라리아도 염두에 두고 진단을 하여야 하며, 정확한 진단과 치료를 위해 말초혈액도말검사 및 신속항원검사 외에 중합효소연쇄반응검사로 말라리아

의 정확한 종을 동정하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

최근 말라리아 풍토병 지역으로 한국인 여행자나 해외 근무자의 수가 증가하였고 그에 따라 해외유입형 말라리아 감염자의 수도 증가하고 있다. 국내에서 해외유입형 말라리아는 열대열말라리아와 삼일열말라리아에 의해 대부분 발생하고 있으며 지금까지 사일열말라리아 감염에 대한 보고는 한 증례가 유일하다. 저자들은 말초혈액 도말검사와 small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) 유전자를 표적으로 하는 이중중합효소연쇄반응을 이용하여 확진된 유입형 사일열말라리아 1예를 보고하는 바이다. 환자는 53세 남자 환자로 서아프리카 기니에서 약 40일간 체류하였고, 입원 3일 전부터 발열과 두통을 호소하였다. SD Malaria Antigen/Antibody Kit (Standard Diagnostics, Korea)를 이용한 말라리아 신속항원검사서 음성의 결과가 나왔으나 Wright-Giemsa로 염색한 말초혈액 도말검사서 말라리아원충이 관찰되었다. 종 확진 및 혼합감염 여부를 확인하기 위해 SSU rRNA 유전자를 표적으로 한 이중중합효소연쇄반응을 시행하여 사일열말라리아 단독 감염을 확인하였다. 사일열말라리아의 SSU rRNA 유전자를 염기서열 분석한 결과, 분리된 사일열말라리아는 사일열말라리아 type 2로 확인되었다. 그러므로 해외유입형 말라리아로 의심 시 열대열말라리아나 삼일열말라리아뿐만 아니라 사일열말라리아도 염두에 두고 진단을 하여야 하며, 정확한 진단과 치료를 위해 말초혈액도말검사 및 신속항원검사 외에 중합효소연쇄반응검사로 말라리아의 종을 확진하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 질병관리본부의 기술적 협조를 받아 진행되었습니다.

## REFERENCES

1. Krotoski WA, Garnham PC, Bray RS, Krotoski DM, Killick-Kendrick R, Draper CC, et al. Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. I. Discovery of a new latent form of *Plasmodium cynomolgi* (the hypnozoite), and failure to detect hepatic forms within the first 24 hours after infection. *Am J Trop Med Hyg* 1982;31:24-35.
2. Song HS, Kim JY, Na DG, 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:S1323-7.
3. Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2011 Guidelines of

- Malaria. Seoul, Korea: The Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2011:51.
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. 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.
6. Moon SJ, Kim BN, Kuak EY, Han TH. A case of *Plasmodium ovale* malaria imported from West Africa. *Lab Med Online* 2012;2:51-4.
7. Kang MS, Choi JW, Nahm CH, Pai SH. A case of cerebral malaria associated with renal failure due to *Plasmodium falciparum*. *Korean J Clin Pathol* 2000;20:459-62.
8. Molineaux L. The epidemiology of human malaria as an explanation of its distribution, including some implications for control. In: Wernsdorfer WH and McGregor LA, eds. *Malaria: principles and practices of malariology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988:913-98.
9. Collins WE and Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:579-92.
10. Im KI, ed. *Human parasitology*. 1st ed. Seoul: Uihakmunhwasa, 1992: 90-1.
11. Eiam-Ong S. Malarial nephropathy. *Semin Nephrol* 2003;23:21-33.
12. 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.
13. Kang YJ and Yang JY. A case of *Plasmodium ovale* malaria imported from West Africa. *Korean J Parasitol* 2013;51:213-8.
14. Cho D, Lim CS, Kim DL, Ryang DW. Diagnosis and treatment monitoring of *Plasmodium vivax* malaria using the OptiMAL test in South Korean soldiers. *Korean J Clin Pathol* 2001;21:235-9.