

말라리아 진단시 재조합 Circumsporozoite 단백질의 유용성 평가

이형우^{1,2,*} · 이종수¹ · 이원자¹ · 조신형¹ · 이호자²

¹국립보건원 바이러스질환부 의동물과, ²경희대학교 생물학과

국내에서 유행하는 *Plasmodium vivax*의 유전자를 조작하여 만든 재조합 Circumsporozoite(CS) 단백질(22)을 이용하여 말라리아에 대한 혈청학적 검사의 유용성을 평가하였다. 최초발병일로부터 진단까지 걸린 기간을 기준으로 환자들의 면역반응을 Western blot으로 알아본 결과, 15일이내에 진단받은 환자들은 43.8%(14/32)가 양성반응을 보였고, 16일 이상 경과한 환자들은 94.4%(17/18)가 양성반응을 보여 전체적으로는 62%(31/50)의 양성률을 보였다. Blood stage 항원에 대한 항체를 갖고 있음에도 불구하고 재조합 CS 단백질 항원에 대해 음성인 환자들이 22.6%(7/31)였다. 비유행지 주민(경북 예천군)들은 10.7%(3/28), 유행지 주민(인천시 강화군)들은 27.6%(13/47)의 재조합 CS 단백질에 대한 항체 양성을 보였다. 재조합 CS 단백질 항원의 역학조사시 유용성을 알아보기 위하여 말라리아 유행지인 경기도 파주시 조산리, 마정리, 향양리, 뇌조리 거주 주민 422명의 전혈을 채취하여 혈액도말법과 중합효소연쇄 반응법으로 항원검사를 실시하였으며 blood stage 항원을 이용한 간접면역형광법과 재조합 CS 단백질 항원을 이용한 효소면역측정법으로 말라리아 항체보유 여부를 조사하였다. 혈액도말법에서는 422명 모두 음성이었으나, 중합효소연쇄 반응법에서는 2명(0.47%)이 양성이었다. 간접면역형광법에서는 42명(9.95%), 재조합 CS 단백질 항원을 이용한 효소면역측정법에서는 71명(16.82%)이 양성으로 나타났다. 두 검사에서 모두 항체 양성을 보인 사람은 8명(11.27%)에 불과하였다.

Key words □ antibody, circumsporozoite protein, enzyme-linked immunosorbent assay, indirect immunofluorescent antibody test, *Plasmodium vivax*, polymerase chain reaction

말라리아 원충확인검사에는 의심환자의 혈액을 슬라이드클래스에 박충도말이나 후충도말한 후 건조시켜 Giemsa 염색하여 현미경으로 검사하는 혈액도말법이 일반적으로 사용되고 있다. 혈액도말법 이외에 사용되고 있는 방법으로 DNA probe법(5,18), 중합효소연쇄반응법(Polymerase chain reaction; PCR)(6,8,20,21,29,37) 등이 개발되어 사용되고 있다. 혈청학적 검사에는 간접면역형광법(Indirect immunofluorescent antibody test; IFAT)(9,12,13,14,19,28,30,32)과 효소면역측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)(11,15-17,25,34) 등이 사용되고 있다. IFAT법은 1960년대에 개발 보급되어 사용되고 있는 방법으로 원충에 감염된 적혈구를 항원으로 사용하여 환자나 의증환자에 대한 항체를 측정함으로써 혈액도말법에서 누락되는 환자를 찾는 데 이용되며, 혈청학적 역학조사에 유용한 방법으로 알려졌다. 이 검사법은 국내에서도 1996년부터 저자 등이 도입하여 말라리아 유행지와 비유행지를 판정하거나 의증환자 진단에 보조적 진단법으로 사용하고 있으며(1), 특히 수혈에 의한 말라리아 감염을 역추적하는 방법으로 이용하고 있다(3). 이 방법의 가장 큰 단점은 관찰자의 주관적 판단에 따라 결과가 좌우될 수 있다는 것과 사용되는 시약과 사용한 적혈구 항원, 즉 원충의 blood stage에 발육 단계에 따라서 결과에 영향을 미칠 수 있어, 다른 조사자 간의 데이터의 비교가 어렵

다는 데 있다. 이러한 문제점들을 보완하기 위해서 최근 데이터를 수치화하여 비교할 수 있도록 ELISA법이 연구되어 사용되고 있다. 항원으로는 원충에 감염된 모기로부터 직접 sporozoite를 분리하여 이에 대한 crude extract를 사용하기도 하며(10), 유전자 재조합항원을 박테리아에서 발현시켜 사용하기도 한다(7,27,36, 38). 현재 널리 쓰이고 국내에 도입되어 일부 사용하고 있는 항원은 재조합 CS 단백질과 Merozoite Surface Protein-1 (MSP-1) 등이 있다(2). 국내에서 말라리아 발생전망을 추론한 결과 매년 증가하여 2,002년에는 19,682명이 발생할 것으로 보고된(4) 것과 국내에서 발생하는 말라리아가 긴 잠복기를 걸쳐 발병하는 환자가 70%에 달한다는 특성을 참고로 하면, 매년 진단해야 하는 말라리아 의증환자들도 기하급수적으로 증가할 것으로 판단된다. 그러므로 국내 실정에 맞는 말라리아 혈청학적 검사에 사용될 표준화된 진단항원의 개발 및 보급이 시급하다. 이를 위해서 저자등이 국내에서 발생한 말라리아 환자로부터 *P. vivax*의 유전자를 분리하여 재조합 CS 단백질을 *Escherichia coli*에서 발현시켜 항원성을 확인한 바 있다(22). 본 연구에서는 이 항원을 이용한 말라리아 환자의 진단과 유행지역의 전파정도를 파악하는 데 그 유용성 평가를 하고 활용방안을 모색하였다.

재료 및 방법

유전자 재조합 CS 단백질

저자 등이 *E. coli*에서 발현하여 native조건에서 정제된 재조합

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-380-1509; Fax: 02-380-1560
E-mail: rainlee67@yahoo.co.kr

CS 단백질을 항원으로 사용하였다(22).

면역이적법 (Western blot)

정제된 제조합 CS 단백질에 대한 항체 존재 여부를 관찰하고자 Tsang 등(1983)의 방법에 따라 면역이적법을 실시하였는데, 우선 SDS-PAGE로 단백질을 전기영동한 후 nitrocellulose membrane(0.2 μ m, Pharmacia Co., Sweden)에 300 mA로 1시간 동안 이적시켰다. 이적이 끝난 nitrocellulose membrane은 적당한 크기로 잘라서 blocking buffer(10 mM phosphate buffered saline, 3% skim milk, pH 7.4)를 첨가하여 12시간동안 4°C에서 blocking시켰다. 이 nitrocellulose membrane을 washing buffer(10 mM PBS, 0.15% Tween 20, pH 7.4)로 10분간, 3회 세척하고 blocking buffer로 희석한[1:100(v/v)] 정상인과 삼일열말라리아에 감염된 환자의 혈청을 각각 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 다시 nitrocellulose membrane을 washing buffer로 10분간, 3회 세척하고 blocking buffer로 희석한 [1:1,000(v/v)] peroxidase conjugated anti-human IgG(Sigma Co., USA)를 첨가하여 다시 3시간 동안 반응시켜 동일한 방법으로 nitrocellulose membrane을 세척하고, 부착된 peroxidase는 침전성 chromogenic substrate인 3-3'-diaminobenzidine(Sigma Co., USA)에 H₂O₂를 첨가하여 발색시키고 증류수로 세척하여 발색을 정지시켰다. 발색 정도를 정상인과 삼일열말라리아 환자의 혈청을 침착한 nitrocellulose membrane을 비교 관찰하였다.

효소면역측정법 (ELISA)

정제된 제조합 CS 단백질을 10 mM PBS(pH 7.4)에 5 μ g/ml의 농도가 되도록 희석한 후, polyvinyl 96 well ELISA plate(Costar Co., USA)에 50 μ l씩 각 well에 첨가하여 25°C에서 12시간 동안 항원을 부착시켰다. 부착이 끝난 plate는 각 well에 150 μ l의 washing buffer(10 mM PBS, 0.15% Tween 20, pH 7.4)를 첨가하여 3회 반복 세척하고, blocking buffer(10 mM PBS, 1% BSA, 100 mM Glycine)를 각 well에 100 μ l씩 첨가하여 1시간 동안 37°C에서 blocking시켰다. 위와 같은 방법으로 세척하고 diluent buffer(0.1% BSA, 0.05% Tween 20, 10 mM PBS)에 적당한 배수로 희석한 정상인과 삼일열말라리아에 감염된 환자들의 혈청을 희석하여 50 μ l씩을 각각 첨가하고 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 위와 동일한 방법으로 세척하고 peroxidase conjugated anti-human IgG(Sigma Co., USA)를 diluent buffer에 1:1,000(v/v)으로 희석하여 각 well에 50 μ l씩 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 위와 동일한 방법으로 세척하고, ABTS peroxidase substrate(2,2'-azino-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate], 0.6 g/l glycine buffer)와 peroxidase solution B(H₂O₂ in 0.02% citric acid buffer, Kirkegaard & Perry Laboratories Co., USA)를 1:1(v/v)로 혼합하여 각 well에 100 μ l씩 첨가한 후, 30분간 반응시키고 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도에서 반응의 강도를 측정하였다.

간접면역형광법 (IFAT)

간접면역형광법에 사용된 항원슬라이드의 제작은 다음과 같이

하였다. 말라리아 원충에 감염된 환자로부터 5 ml의 전혈을 채혈하여 2,000×g에서 5분간 원심분리 후, 혈청을 제거하고 침전된 적혈구의 10배 부피에 해당하는 PBS(pH 7.4)를 첨가하여 재부유시켰다. 이를 다시 2,000×g, 5분간 원심분리하여 적혈구를 세척하였다. 같은 방법으로 2회 더 반복 세척한 후, 침전된 적혈구를 동량의 PBS로 재부유시켜 10-20 μ l를 항원슬라이드의 각 well에 떨어뜨렸다. 상온에서 하룻밤 건조시킨 다음 desiccator에서 3시간 이상 건조 후 비닐봉투에 넣어 밀봉하여 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

각 환자 및 정상인 혈청의 말라리아 항체가 측정을 위해서 냉동보관한 항원슬라이드를 미리 차갑게 준비한 아세톤(-20°C)에 10분간 고정하여 건조시켰다. 이 항원슬라이드에 1:4부터 1:4,096까지 두배수 희석한 혈청을 각 well에 15-20 μ l를 넣고 습윤상자에 넣어 30분간, 37°C에서 배양하였다. 배양이 끝난 항원슬라이드는 PBS에 6분간 담겼다. 증류수로 세척후 건조하여 FITC conjugated anti-human IgG(from goat, Sigma Co., USA)를 PBS에 1:32(v/v)로 희석하여 각 well에 떨어뜨리고 다시 30분간, 37°C에서 배양하였다. 세척과정을 반복한 후 mounting medium (Sigma Co., USA)를 떨어뜨린후 coverslip으로 덮어 형광현미경(×400)에서 관찰하였다. 각 항원슬라이드에는 양성대조군을 함께 반응시켰다.

중합효소연쇄반응법 (PCR)

PCR법으로 검출한 삼일열말라리아 원충 특이 유전자는 merozoite surface protein-1 (MSP-1)이었다. 증폭을 위한 primer는 Premawansa 등(1993)이 사용하였던 *P. vivax* specific primer(MSP-1F, 5'-GGGAATTCTACTACTTGATGGTCCTC-3' & MSP-1R, 5'-GGGAATTCTTGTGACATGTCGTAAGCG-3')였다. 각 혈액으로부터 DNA의 분리는 QIAamp blood Kit(Qiagen Co., Germany)를 사용하여 최종적으로 200 μ l의 DNA를 얻었으며, PCR에 10 μ l씩을 사용하였다. PCR 반응은 Accupower premix-Top(Bioneer Co.)을 구입하여 사용하였으며, 여기에 primer양을 각각 5 pmol씩 첨가하고, 증류수로 최종반응용액의 부피를 20 μ l로 맞추었다. 증폭은 94°C, 30초 -60°C, 1분 -74°C, 1분을 35회 반복하여 수행한 후, 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 PCR산물을 확인하였다.

혈액도말법

혈액도말법은 전혈 10 μ l씩을 슬라이드글라스상에 떨어뜨려 박층도말하여 공기중에 건조시킨 후, Giemsa 염색하여 광학현미경(×1,000)에서 100 시야를 검경하여 원충을 확인하였다.

결 과

발병기간에 따른 면역반응

발병한 말라리아 환자들이 느낀 최초 발열일과 혈액을 채취한 시점까지, 즉 말라리아로 확진된 기간까지 걸린 시간을 기준으로 96년에 발생한 356명의 환자중에서 냉동보관중인 50명(14%)의 환자를 6개의 그룹으로 분류하여 각 환자들의 혈청과 유전자 재

Table 1. Western blot analysis of the sera of malaria patients according to the days after onset.

Days	No. of tested sera	No of positive	Positive rate (%)
1-5	5	2	40.0
6-10	19	8	42.1
11-15	8	4	50.0
16-20	5	5	100.0
21-30	8	7	87.5
over 31	5	5	100.0
Total	50	31	62.0

조합 CS단백질과의 면역반응을 면역이적법으로 확인하였다. 그 결과 1-5일 사이에 채취한 말라리아 환자의 혈청 5건중 2건만이 양성반응(40.0%)을 나타냈고, 6~10일 사이에 채취한 혈청은 19건중에서 8건이 양성반응(42.1%)을 나타냈으며, 11~15일 사이에 채취한 혈청은 8건중 4건이 양성반응(50.0%)을 보였다. 16~20일 사이에 채취한 혈청은 5건 모두에서 양성반응(100.0%)을 나타냈고, 21~30일사이의 혈청은 8건중 7건이 양성반응(87.5%)을 보였으며, 최초 발병일에서부터 진단까지 걸린 시간이 31일 이상인 말라리아 환자 5명은 모두 양성반응(100.0%)을 나타냈다 (Table 1). 결과적으로 50명의 환자중 31명만이 양성반응(62%)을 보였다

Blood stage 항원과 재조합 CS 단백질 항원에 대한 면역반응 비교

Blood stage의 말라리아 항원에 대한 항체와 sporogony stage의 항원에 대한 항체를 비교하였다. 먼저 현미경상에서 말라리아 원충을 확인하여 말라리아로 확진된 환자의 혈청을 IFAT법으로 IgG에 대한 각각의 항체를 측정하였다. 또한 혈청들을 IFAT 항체에 따라 재조합 CS 단백질에 대한 혈청내의 IgG의 존재 여부를 western blot으로 관찰하였다. IFAT에서 말라리아 환자들의 IgG에 대한 항체는 1:256에서 1:4,096까지의 범위내에 있었다. 1:256의 IFAT IgG 항체를 갖고 있는 4명중 재조합 CS 단백질에 대해서도 반응을 나타낸 사람이 3명(75.0%)이었으며, 1:512의 IFAT IgG 항체를 갖고 있는 2명중 재조합 CS 단백질에 대해서도 반응을 나타낸 사람이 1명(50.0%), 1:1,024의 IFAT

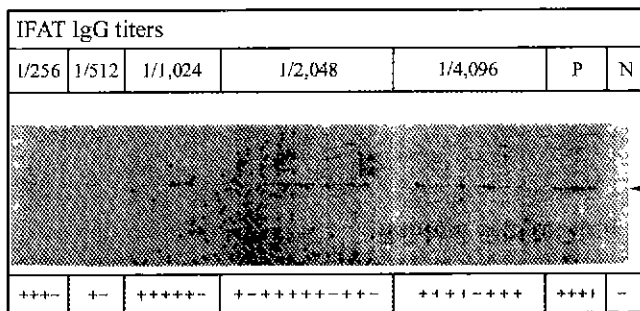


Fig. 1. The comparison of antigenicity between recombinant circumsporozoite protein and blood stage antigen. P; Positive controls, N; Negative control, ◀; recombinant circumsporozoite protein.

IgG 항체를 갖고 있는 6명중 5명(83.3%)이 재조합 CS 단백질에 대해서도 반응을 보였다. 1:2,048의 IFAT IgG 항체를 갖고 있는 11명중 재조합 CS 단백질에 대해서도 반응을 보인 사람이 8명(72.7%)이었으며, 1:4,096의 IFAT IgG 항체를 갖고 있는 8명중 재조합 CS 단백질에 대해서도 반응을 보인 사람은 7명(87.5%)이었다(Fig. 1). 즉, Blood stage의 항원과 sporogony stage 항원에 대한 항체를 동시에 갖지 않는 경우도 있었다

말라리아 유행지와 비유행지 주민들의 재조합 CS 단백질에 대한 면역반응

재조합 CS 단백질을 이용하여 혈청학적 역학조사에 응용하기 위해서 먼저 말라리아 유행지와 비유행지 주민들의 혈청을 수집하여 면역이적법으로 두 지역간의 차이를 비교하였다. 실험에 사용한 비유행지 주민들의 혈청은 1997년 5월초에 경상북도 예천군에 거주하는 주민들로부터 수집한 혈청이며, 유행지 주민들의 혈청은 1997년 11월에 인천시 강화군 거주 주민들로부터 수집한 혈청을 사용하였다. 비유행지 주민들의 혈청을 먼저 간접면역형광법으로 말라리아에 대한 항체검사(IgG)를 실시하였다. 이 방법으로 말라리아 항체를 측정할 결과, 28명 모두 1:32이하의 항체를 보였다. 이들 혈청을 IFAT 항체에 따라 재조합 CS 단백질과 반응시킨 결과, 1:4에서 1:32의 항체를 보인 혈청에서는 모두 음성이었으나(Fig. 2, b, c, d, and e), IFAT에서 반응이 전혀 없었던 8명중에서 3명이 양성반응(10.7%, Fig. 2, a)을 나타냈다.

말라리아 유행지인 강화군 주민 47명중에서 재조합 CS 단백



Fig. 2. Western blot analysis of the sera of normal people inhabiting in Yechon-gun(Kyongsangbuk-do), in 1997. a: serum does not respond in IFAT, b: serum has an 1:4 IFAT Ab* titer, c: serum has an 1.8 IFAT Ab titer, d: serum has an 1:16 IFAT Ab titer, e: serum has an 1:32 IFAT Ab titer, p: Positive controls representing the IFAT Ab titers. 1:1,024 and 1:2,048. *Ab; Antibody.

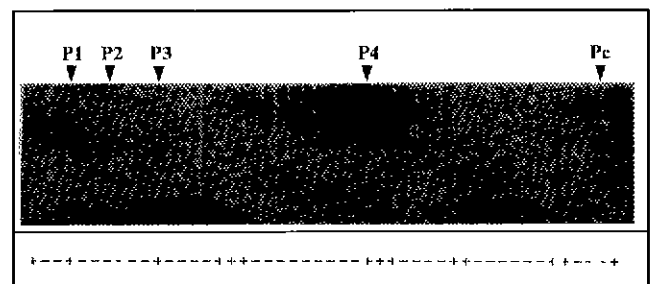


Fig. 3. Western blot analysis of the sera of inhabitants in Kangwha-gun, 1997. P; Positive control, P1-P3; Malaria patients, P4; Malaria patient detected in this study

질 항원과 양성반응을 보인 사람은 13명으로 27.6%의 양성률을 나타내, 비유행지 보다 월등히 높은 양성률을 보였다(Fig. 3).

재조합 CS 단백질의 역학조사에 응용

IFAT법과 재조합 CS 단백질을 항원으로 하는 ELISA법을 비교하여 재조합 CS 단백질의 역학적 응용에 대한 유용성을 평가하고자 하였다. 먼저 IFAT법에 양성기준 설정을 위하여 정상인 86명과 말라리아 환자 58명에 대한 항체가를 측정하였다. 정상인은 1:16의 혈청희석배수까지 항체가를 나타냈으며, 말라리아 환자의 경우는 1:256부터 1:4,096까지의 항체가를 보였다(Fig. 4).

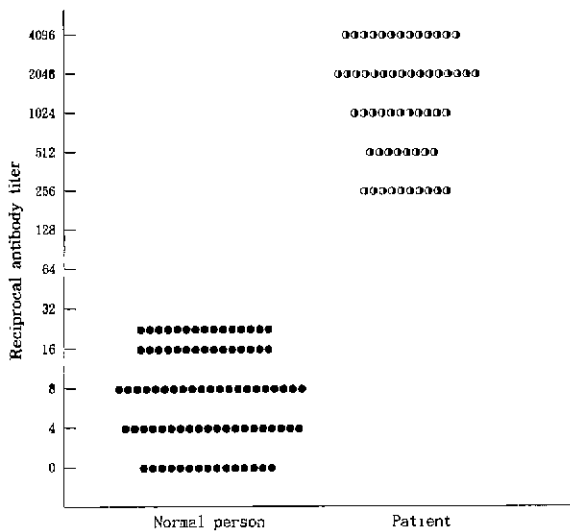


Fig. 4. The IFAT antibody titers of normal persons (●) and malaria patients (○).

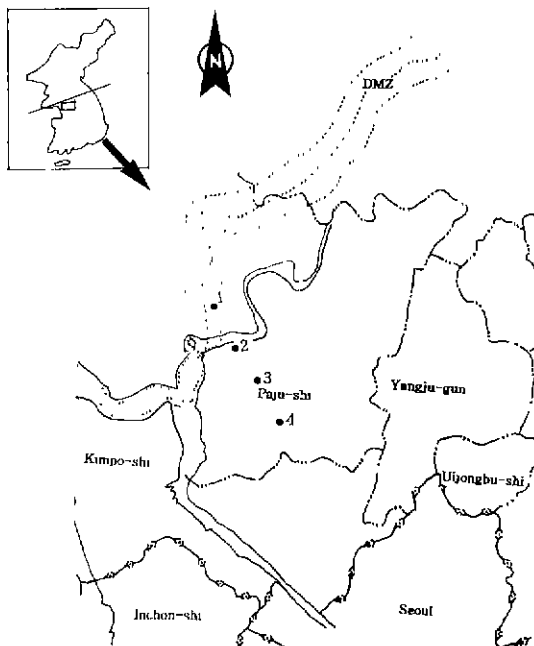


Fig. 5. The areas studied in 1998. 1, Chosan-ri; 2, Majeong-ri; 3, Hyangyang-ri; 4, Noejo-ri.

Table 2. The numbers of malaria patients according to study areas

Year Area	94	95	96	97	98	99	Total
Chosan-ri	0	0	2	4	8	0	14
Majeong-ri	1	0	0	4	10	15	30
Hyangyang-ri	0	0	2	3	5	3	13
Noejo-ri	0	0	0	3	3	0	6
Total	1	0	4	14	26	18	63

이상의 결과로 IFAT법에서는 1:32이상의 혈청희석 배수를 양성 판정 기준으로 결정하였다. ELISA법에서는 음성대조군의 평균값에 3배의 표준편차를 합한 값 이상의 흡광도를 양성으로 판정하였다.

위와 같은 기준으로 말라리아 유행지인 파주시에 대한 혈청학적 역학조사를 수행하였다. 조사 지역은 4 지역으로 Fig. 5에 그 위치를 표시하였으며, 이들 지역에서 최근 6년간 환자 발생을 Table 2에 나타냈다. 총 63명의 환자 발생이 있었던 지역이었다. 이 지역에 거주하는 주민들을 대상으로 1998년 11월9일-10일 까지 이틀간 총 422명의 전혈을 수집하였다. 혈액도말법으로 말라리아 원충을 검사한 결과 모두 음성이었다. IFAT법으로 말라리아 항체를 검사한 결과, 양성반응을 보인 사람은 총 42명으로 양성률이 10.0%였다. ELISA법에서 양성반응은 71명이었으며 양성률이 16.8%였다(Table 3). PCR법에서는 2명의 혈액에서 약 500 bp의 PCR산물을 확인할 수 있었으며 양성률이 0.5%였다. IFAT 결과에서 얻은 마을별 양성률과 휴전선에서부터의 거리와 비교한 결과 휴전선에 가까운 지역일수록 마을별 양성률이 높은 양상을 볼 수 있었다(Fig. 6). 또한 ELISA결과를 같

Table 4. The number of positive in ELISA according to IFAT antibody titer

ELISA	IFAT	IFAT antibody titer						Total	
		0	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64		1:128
No. of ELISA positive		28	4	12	19	1	2	5	71

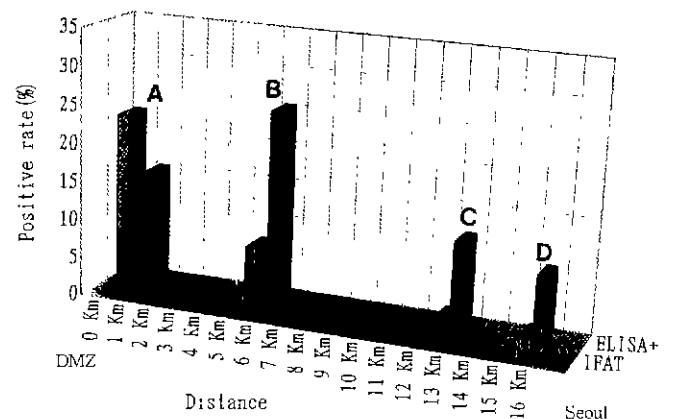


Fig. 6. The comparison of positive rates between IFAT and ELISA according to the distance from the DMZ. A: Chosan-ri, B: Majeong-ri, C: Hyangyang-ri, D: Noejo-ri

Table 3. Positive rate according to several diagnostic methods

Village	No. of exam	Bood smear		PCR		IFAT		ELISA	
		No. of positive	Positive rate (%)	No. of positive	Positive rate (%)	No. of positive	Positive rate (%)	No. of positive	Positive rate (%)
Chosan-ri	87	0	0	1	1.2	21	24.1	13	15.0
Majeong-ri	163	0	0	1	0.6	15	9.2	41	25.2
Hyangyang-ri	79	0	0	0	0	3	3.8	9	11.4
Noejo-ri	93	0	0	0	0	3	3.2	8	8.6
Total	422	0	0	2	0.5	42	10.0	71	16.8

양성률이 ELISA법이 IFAT법보다 대체로 높게 나타났다.

또한 IFAT 양성자와 ELISA 양성자는 일치하지 않았다(Table 4). 두 검사방법에서 모두 양성반응을 보인 경우는 8명으로 11.3%에 불과하였다.

고 찰

말라리아의 혈청학적 검사에 사용할 표준항원을 개발할 목적으로 재조합 CS 단백질질을 *E. coli*에서 발현시켜 정제한 항원(22)의 활용방안과 유용성을 평가하였다. 먼저 말라리아 환자 50명을 대상으로 진단 항원으로서의 가치를 알아보았다. 50명의 환자 혈청들을 최초 발병일에서 채혈일까지, 즉 진단까지 걸린 기간에 따라 6개의 그룹으로 분류하여 western blot를 실시한 결과, 진단 기간까지 걸린 시간이 15일 이내인 환자들은 32명중에서 14명만이 양성을 보여 43.8%의 양성률을 보였다. 16일 이상인 환자들 18명중에서는 17명이 양성을 보여 94.4%의 양성률을 보였다. 대체로 최초 발병일부터 진단까지 걸린 시간이 길수록 재조합 CS 단백질 항원에 대한 항체 양성반응은 강하게 나타나는 것으로 보이며 전체적으로는 62%가 양성을 보였다(Table 1). *P. falciparum*에 감염된 환자에서도 62%만이 CS 단백질에 대한 항체를 갖고 있다는 보고와 일치하였다(35). 또한 말라리아 환자의 혈액을 항원으로 하는 IFAT법으로 결정된 각 환자 혈청의 말라리아 항체와 재조합 CS 단백질 항원에 대한 항체반응을 비교한 결과, 31명중에서 음성인 사람이 7명으로 22.6%를 차지하였다. 즉 sporogony stage와 blood stage의 말라리아원충에 대한 항체가 공존하지 않는 환자가 관찰되었다. 이러한 결과는 재조합 CS 단백질을 이용하여 말라리아 환자를 진단할 경우에는 발병일과 진단까지 걸린 시간을 고려하지 않으면 음성으로 판정되는 위험성이 있는 것으로 사료된다. 즉 말라리아 원충에 감염된 모기에 노출되어 CS 단백질로 외부가 둘러싸인 sporozoite가 인체 내로 유입되어 immunoglobulin이 형성되는 시간과 형성된 immunoglobulin이 사라지는 시간을 고려해야 할 것으로 판단된다. 발병과 CS 단백질에 대한 항체 양성반응과 일치하지 않는 환자들은 CS 단백질에 대한 항체의 반감기가 태국인들은 27일 이내라는 보고(33)를 참고로 할 때, 이들은 긴 잠복기를 걸쳐 발병한 환자로 이미 체내에는 CS 단백질에 대한 항체가 소실된 환자로 사료된다. 하지만 아프리카인들은 이 항체의 지속기간이 수년 계속되는 것이 관찰된 바(15) 있어 한국인에 대한 정확한

항체 지속기간도 연구되어야 할 것이다.

재조합 CS 단백질을 이용한 western blot의 위양성을 알아보고자 비유행지에 거주하는 주민들과 유행지 지역에 거주하는 주민들을 대상으로 western blot를 실시한 결과 비유행지 지역 거주 주민 28명중 3명이 양성반응을 보여 위양성률이 10.7%로 나타났다(Fig 2). 그러나 위양성반응인지를 판단하기에는 어려움이 있었다. 즉, 양성을 보인 사람들이 말라리아 유행시기(5~10월)에 말라리아 유행지인 경기도와 강원도에 여행하여 말라리아에 노출이 되었는지 아니면 과거 유행시기에 말라리아에 걸린 경험이 있었는지는 알 수 없었기 때문이다. 하지만 CS 단백질에 대한 항체의 특성상 이 양성자들은 유행지에 여행한 경험이 있을 것으로 추정된다. 그러므로 CS 단백질을 항원으로 환자를 진단할 경우에는 유행지역에 여행한 경험이 있는가를 고려해야 할 것으로 사료된다. 좀 더 정확한 연구를 위해서는 비유행지에서 여행 경험이 없는 5세미만의 어린이의 혈청을 얻어 동일한 실험을 반복한다면 이 보다는 더 낮은 위양성률을 확인할 수 있을 것으로 생각된다. 말라리아 유행지인 강화군 주민 47명중에서는 CS 단백질에 대해서 항체 양성을 보인 사람은 13명으로 27.6%의 양성률을 나타냈다(Fig. 3). 이들 중에서 P1, P2, P3는 1997년도에 말라리아에 걸린 경험이 있었던 사람이었으며, P4는 이 연구과정에서 양성반응을 보여 혈액도말법에서 말라리아원충을 확인한 환자였다. 비유행지 주민에게서 나타난 10.7%가 위양성 반응이었다고 하더라도 유행지주민의 재조합 CS 단백질에 대한 항체 양성률이 16.9% 더 높게 나타나 CS 단백질에 대한 주민들의 항체검사로 말라리아의 유행지와 비유행지를 구별할 수 있을 것으로 판단되었다

이상의 실험결과들을 기초로 정제된 재조합 CS 단백질을 실제 역학조사에 응용하여 그 유용성을 평가하여 보았다. 지금까지 사용하고 있는 역학조사 방법인 IFAT법과 정제한 단백질을 이용한 ELISA법으로 동일표본에 대하여 항체검사를 실시하였고, 항원 검사로는 혈액도말법과 PCR법을 수행하였다.

검사한 422명 모두 혈액도말법에서 음성으로 판정되었고, PCR법에서는 2명의 양성자가 발견되어 양성률이 0.5%였다. 이들중 한명은 조산리에서 거주하는 사람으로 IFAT법에서 1:256의 항체가를 나타냈으나 ELISA법에서는 음성이었다 또한 이 사람은 98년도에 발병한 경험이 있는 사람으로 혈액도말법에서 음성, PCR법에서 양성을 보인 것은 병세는 완화되었으나 근치는 않된 경우로 판단된다. 이러한 사람은 계속적으로 유행지에서 감염된

으로 역할을 할 것으로 생각되므로 말라리아의 확산을 방지하기 위해서는 이러한 환자들의 추경검사를 근치될 때까지 지속적으로 해야 할 것으로 사료된다. 또 다른 양성자는 마정리에 거주하는 사람으로 IFAT법에서 1:64로 양성. ELISA법에서도 양성반응을 보였다. 이 사람은 현재까지도 발병하지 않는 것으로 보아 무증상 보충자로 판단되며, 이 경우는 자신은 발병하지 않지만 감염원으로서 역할은 할 것으로 사료된다. IFAT법에서 양성률은 10.0%(42명)이었고, ELISA법에서 양성률은 16.8%(71명)였다 (Table 3). IFAT법 보다 ELISA법이 약 1.7배 높은 양성률을 보였다. 또한 IFAT결과를 마을별 양성률을 기준으로 휴전선에서부터의 거리와 비교한 결과, 휴전선에 가까운 지역일수록 높은 양성률을 나타내었다(Fig. 6). ELISA결과를 같은 방법으로 비교한 결과도 비슷한 양상을 나타냈다. 본 실험에 사용한 IFAT법의 항원이 환자의 혈액내에 존재하는 말라리아 원충의 blood stage의 항원이고, ELISA법에 사용한 항원은 sporogony stage의 표피 단백질인 *E. coli*에서 발현시켜 정제한 항원임을 감안하고, blood stage의 항원에 대한 항체 지속기간이 항말라리아 약제의 투여가 없을 경우 6개월이상 2년까지도 지속되나, sporozoite에 대한 항체의 반감기는 한달인 것을 고려할 때, 어떤 사람이 sporozoite에 대한 항체를 보유하고 있다는 것은 blood stage상의 항원에 대한 항체를 보유하고 있는 사람보다 최근에 sporozoite에 감염된 모기에 노출되었다고 추정할 수 있다. 이러한 관점에서 조산리의 경우는 말라리아의 전파기 과거보다는 줄었고, 마정리, 향양리, 너조리는 과거보다 말라리아 매개모기의 활동이 왕성해져 간다고 볼 수 있다. 실제로 조산리에서는 99년에 환자의 발생이 없었고 마정리는 환자 발생이 98년보다 50%가 증가하였다(Table 2). 이러한 결과에 대한 해석은 앞으로 말라리아 확산을 계속 파악함으로써 보다 정확한 정보를 얻을 수 있겠지만, 이론적으로는 새로운 말라리아 유행이 의심되는 지역을 판정하여 방역대책을 수립하는 데 기초자료로 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

또한 IFAT양성자와 ELISA양성자는 일치하지 않았다. 즉, 두 검사방법에서 모두 양성반응을 보인 경우는 8명으로 11.3%에 불과하였다(Table 4). 이러한 경우는 간세포내에 성공적으로 sporozoite가 침입하여 증식한 후, 혈액내로 아주 최근에 원충이 나와서 blood stage에 대한 특이 항체가 형성된 것으로 여겨진다. 또한 IFAT에서 음성이고 ELISA에서 양성인 63명은 당해연도에 sporozoite에 감염된 경험이 있으나 원충이 혈액으로 전이되지 않은 경우로 사료된다. 즉, 말라리아 원충의 발육단계에 따라 항체의 생성과 소멸이 다양하게 이루어지고 있어, 항원의 종류에 따라 말라리아에 대한 항체양성률이 변할 수 있고, 일치하지 않을 수도 있음을 시사하고 있다. 말라리아 환자의 조기 발견을 위해서 어떠한 경우가 말라리아 환자로 전이할 수 있는가에 대해서는 연구가 진행중이다.

이상의 결과로 재조합 CS 단백질은 말라리아 원충에 감염된 모기에 노출되었는지를 파악하기 위한 항체검사에 유용할 것으로 판단되며, 환자의 진단시에는 최초발열일과 진단까지 걸린 기간을 고려해야 할 것으로 사료된다. 또한 CS 단백질에 대한 항체가 최초 감염시에만 생성이 되고 재발시에는 boosting되지 않는다는 보고(7)가 있어 이를 이용하면 재발과 최초감염을 구분할

수 있는 항원으로서 유용할 것으로 사료된다. 또한 항체 지속기간이 대체로 길지 않다는 점을 고려하면 이 항원을 이용하여 혈청학적 역학조사를 실시하면 당해년도 말라리아 전파정도를 파악할 수 있는 중요한 자료를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구를 도와주신 인태숙, 김남렬, 박미영선생님과 파주시 보건소장님 그리고 직원 여러분께 감사드립니다.

참고문헌

1. 임채승, 김영기, 이갑노, 이형우, 이원자, 이종수, 조남선, 김대성 1997. 말라리아 호발지역에 세 채혈된 주민과 군현혈자에서 말라리아 검사성적 대한수혈학회지. 8, 291-299.
2. 임채승, 김대성, 김민자, 조성원, 이은일, 송진원, 송기준, 노천섭, 김상훈, 박승철. 1998. 재조합 Circumsporozoite protein 항원을 이용한 Antibody ELISA의 유용성 평가. 대한감염학회 학술대회 초록집. 120.
3. 정인경, 오명돈, 채종일, 이형우, 이원자, 이종수, 서동희, 최강원. 1999. 수혈을 통한 말라리아가 원인었던 불명열 1예. 감염. 31, 41-45
4. 채종일. 1998. 국내 말라리아 유행의 전망과 대책. 대한의학회 98년도 심포지움. 35-43.
5. Barker, R.H Jr 1990. DNA probe diagnosis of parasitic infections. *Exp Parasitol* 70, 491-499
6. Barker, R.H. Jr., T. Banchongaksorn, J.M. Courval, W. Suwonked, K. Rimwungtragoon, and D.F. Wirth 1992. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood samples using the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 416-426.
7. Brown, A.E., H.K. Webster, K. Krinchal, D.M. Gordon, R.A. Wirtz, and B. Permpanich 1991. Characteristics of natural antibody responses to the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 21-27.
8. Brown, A.E., K.C. Kain, J. Pipithkul, and K. Webster. 1992. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections undetected by conventional microscopy. *Trans. R. Soc. Trop. Med.* 86, 609-612.
9. Brown, P., W.E. Collins, D.C. Gajdusek, and L.H. Miller. 1976. An evaluation of malaria fluorescent antibody patterns in several remote island populations of the New Hebrides, Solomons, Western Carolines, and New Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25, 775-783.
10. Brown, A.E., H.K. Webster, K. Pavanand, B. Permpanich, P. Sookto, J. Sattabongkot, and J.B. Gingrich. 1989. Comparison of antibody responses to the circumsporozoite protein repeat region and to intact sporozoites during acute falciparum malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83, 154-157.
11. Burkot, T.R., P.M. Graves, R.A. Wirtz, B. J. Brabin, D. Battistutta, J. A. Cattani, R.M. Mauzels, and M. P. Alpers. 1989. Differential antibody responses to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* circumsporozoite proteins in a human population. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1346-1351.
12. Collins, W.E., M. Warren, J.C. Skinner, and H.J. Fredericks. 1968. Studies on the relationship between fluorescent antibody response and ecology of malaria in Malaysia. *Bull. W. H. O.* 39, 451-463.
13. Collins, W.E. and J.C. Skinner. 1972. The indirect fluorescent anti-

- body test for malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 21, 690-695.
14. Collins. W.E., J.C. Skinner, and R.E. Coifman. 1967. Fluorescent antibody studies in human malaria. V. Response of sera from Nigerians to five Plasmodium antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 16, 568-571.
 15. Druilhe, P., O. Pradier, J.P. Marc, F. Miltgen, D. Mazier and G. Parent. 1986. Level of antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigens reflect malaria transmission rates and are persistent in the absence of reinfection. *Infect. Immun.* 53, 393-397.
 16. Esposito, F., S. Lombardi, D. Modiano, F. Zavala, J. Reeme, L. Lamizana, M. Coluzzi, and R.S. Nussenzweig. 1988. Prevalence and levels of antibodies to the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in an endemic area and their relationship to resistance against malaria infection. *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 827-832.
 17. Fontes, C.C.J., I. Bathurst, and A.U. Kretzli. 1991. *Plasmodium vivax* sporozoite antibodies in individuals exposed during a single malaria outbreak in a non-endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 28-33.
 18. Holmberg, M., F.C. Shenton, L. Franzen, K. Janneth, R.W. Snow, U. Pettersson, H. Wigzell, and B.M. Greenwood. 1987. Use of a DNA hybridization assay for the detection of *Plasmodium falciparum* in field trials. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 230-234.
 19. Jeffery, G.M., M. Warren, W.E. Collins, and H. Lobel. 1975. Application of the indirect fluorescent antibody method in a study of malaria endemicity in Mato Grosso, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 402-411.
 20. Kain, K.C., A.E. Brown, L. Mirabelli, and H.K. Webster. 1993. Detection of *Plasmodium vivax* by polymerase chain reaction in a field study. *J. Infect. Dis.* 168, 1323-1326.
 21. Laserson, K.F., I. Petralanda, D. M. Hamilin, R. Almera, M. Fuentes, A. Carrasquel, and R.H. Barker Jr. 1994. Use of the polymerase chain reaction to directly detect malaria parasites in blood samples from the Venezuelan Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 169-180.
 22. Lee, H.W., J.S. Lee, W.J. Lee, and H.S. Lee. 1999. DNA sequencing and expression of the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* Korean isolate in *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol.* 37, 234-242.
 23. Lee, J.S., W.G. Kho, H.W. Lee, M. Seo, and W.J. Lee. 1998. Current status of vivax malaria among civilians in Korea. *Kor. J. Parasitol.* 36, 241-248.
 24. McLaughlin, G.L., T.D. Edlund, G.H. Campbell, R.F. Eller, and G.M. Ihler. 1985. Detection of *Plasmodium falciparum* using a synthetic DNA probe. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 837-840.
 25. Mendis, C., G.D. Giudice, A.C.G. Mendis, C. Toungne, A. Pessi, S. Weerasinghe, R. Carter, and K. N. Mendis. 1992. Anti-sporozoite protein antibodies measure age related exposure to malaria in Katragama, Sri Lanka. *Parasit. Immunol.* 14, 75-86.
 26. Premawansa, S., V. A. Snewin, E. Khouri, K.N. Mendis, and P.H. David. 1993. *Plasmodium vivax*: Recombination between potential allelic types of the merozoite surface protein MSP-1 in parasites isolated from patients. *Exp. Parasit.* 76, 192-199.
 27. Sugiyama, T., K. Suzue, M. Okamoto, J. Inselburg, K. Tai, and T. Horii. 1996. Production of recombinant SERA proteins of *Plasmodium falciparum* in *Escherichia coli* by using synthetic genes. *Vaccine.* 14, 1069-1076.
 28. Thomas, V., and A.S. Dissanaik. 1977. Malaria endemicity among Orang Asli (Malasian aborigines) as determined by indirect fluorescent antibody tests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26, 602-606.
 29. Tirasophon, W., P. Rajkulchai, M. Ponglikitmongkol, P. Wilairat, V. Boonsaeng, and S. Panyim. 1994. A highly sensitive, rapid, and simple polymerase chain reaction-based method to detect human malaria (*Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*) in blood samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 308-313.
 30. Tongol-Rivera, P., S. Kano, E. Miguel, P. Tongol, and M. Suzuki. 1993. Application of seroepidemiology in identification of local foci in a malarious community in Palawan, The Philippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 608-612.
 31. Tsang, V.C.W., J.M. Peralta and A.R. Simons. 1983. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Method in Enzymol.* 92, 377-391.
 32. Voller, A., and R.S. Bray. 1962. Fluorescent antibody staining as a measure of malarial antibody. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 110, 907-910.
 33. Webster, H.K., E.F. Boudreau, L.W. Pang, B. Permpanich, P. Sookto, and R.A. Wirtz. 1987. Development of immunity in natural *Plasmodium falciparum* malaria: antibodies to the falciparum sporozoite vaccine 1 antigen (R32tet132). *J. Clin. Microbiol.* 25, 1002-1008.
 34. Webster, H.K., J.B. Gingrich, C. Wongsrichanalai, S. Tulyayon, A. Suvarnamani, P. Sookto, and B. Permpanich. 1992. Circumsporozoite antibody as a serologic marker of *Plasmodium falciparum* transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 489-497.
 35. Wijesundera, M. de S., J.S.M. Peiris, Y.G. Ariyaratne, A.S. Verdini, A. Pessi, and G.D. Giudice. 1990. Antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoites following a malarial outbreak in a non-endemic area of Sri Lanka. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 35-39.
 36. Wirtz, R.A., W.R. Ballou, I. Schneider, L. Chedid, M.J. Gross, J.F. Young, M. Hollingdale, C.L. Diggs, and W.T. Hockmeyer. 1987. *Plasmodium falciparum*: immunogenicity of circumsporozoite protein constructs produced in *Escherichia coli*. *Exp. Parasitol.* 63, 166-172.
 37. Wooden, J., E.E. Gould, A.T. Paull, and C.H. Sibley. 1992. *Plasmodium falciparum*: a simple polymerase chain reaction method for differentiating strains. *Exp. Parasitol.* 75, 207-212.
 38. Young, J.F., W.T. Hockmeyer, M. Gross, W.R. Ballou, R.A. Wirtz, J.H. Troper, R.L. Beaudoin, M.R. Hollingdale, L.H. Müller, C.L. Diggs, and M. Rogenberg. 1985. Expression of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite proteins in *Escherichia coli* for potential use in a human malaria vaccine. *Science* 228, 393-397.

(Received April 12, 2000/Accepted May 15, 2000)

ABSTRACT: The Evaluation of Recombinant Circumsporozoite Protein in Malaria Diagnosis

Hyeong Woo Lee^{1,2*}, Jong Soo Lee,¹ Won Ja Lee,¹ Shin Hyeong Cho¹ and Ho Sa Lee²
(¹Laboratory of Medical Zoology, Department of Viral Disease, National Institute of Health, Seoul, 122-020 and ²Graduate School of Biology, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea)

It had been evaluated the recombinant Circumsporozoite(CS) protein of *Plasmodium vivax* in serologic diagnosis of vivax malaria. Western blot was done to analyse the sera of malaria patients according to the days after onset. The sera which have the terms within 15 days were shown 43.8%(14/32) of positive rates and the sera over the 16 days were shown 94.4%(17/18) of positive rates. So the total positive rate was 62%(31/50). It was 22.6%(7/31) which was shown negative response in Western blot, even though they were shown positive response in Immunofluorescent antibody test(IFAT) using whole blood stage antigens. The positive rate of non-epidemic area(Yechon-gun, Kyongsangbuk-do) was 10.7%(3/28), and epidemic area(Kangwha-gun, Incheon-shi) was 27.6%(13/47) in Western blot analysis using recombinant CS protein. In order to applicate the recombinant CS protein in seroepidemiological survey, blood samples of 422 inhabitants were collected who lived in malaria epidemic areas, Chosan-ri, Majeong-ri, Hyangyang-ri and Noejo-ri in Paju-shi, Kyonggi-do. All of them were negative in microscopic examination and two(0.5%) of them were positive in Polymerase Chain Reaction. 42(10.0%) of them were seropositive in IFAT using whole blood antigens and 71(16.8%) of them were seropositive in Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant CS protein. It was figured out the positive rates were much higher according to the distances of villages which were closed to the demilitarized zone(DMZ) in all kind of diagnostic methods, respectively.