말라리아 헌혈제한지역에 대한 일시적 전혈헌혈 허용에 따른 말라리아 핵산증폭검사 결과 분석

강정원¹ · 이재숙¹ · 고대호¹ · 강재원² · 정유석¹ · 윤미애¹대한적십자사 혈액수혈연구원¹, 대한적십자사 혈장분획센터²

Analysis of Malaria Nucleic Acid Amplification Test Under the Temporary Permission in Malaria Blood Donation Restricted Area

JungWon Kang, M.S.¹, JaeSook Lee, B.S.¹, Dae Ho Ko, M.S.¹, Jae-won Kang, M.S.²,
Yu Soek Jung, M.D.¹, Miae Youn, M.D.¹Korean Redcross Blood Transfusion Research Institute¹, Wonju; Korean Redcross Plasma Fractionation Center², Eumseong, Korea

There were 10 cases of transfusion-transmitted *P. vivax* malaria from 1990 to 2021. The Korean Centers for Disease Control and Prevention (KCDC) designated the areas showing a high frequency of malaria as a malaria-endemic area and has restricted whole blood donation from these areas. While the number of malaria infections has declined in recent years, the blood inventory has declined sharply due to the COVID-19 pandemic. Accordingly, the Ministry of Health and Welfare temporarily approved the donation of whole blood from malaria-endemic areas to secure the supply of blood products. In the present study, an anti-malaria screening and nucleic acid amplification test (NAT) was performed on samples collected from the malaria-endemic areas from May 20 to June 30, 2020. A total of 14,741 samples were collected and tested. NAT was performed for 1096 runs to test all the collected samples. The 117 (0.79%) samples showed initial reactive results due to the contamination of abnormal PCR results. Negative results were obtained for the samples showing initial reactive results using a duplicated re-test. From the NAT tests, no sample showed a true positive result. The results of the malaria antibody screening test were reactive in 10 out of the 14,741 samples. The malaria antibody screening needs to be reviewed through further study because of its insufficient sensitivity and specificity. According to this study, excluding the 10 reactive malaria antibodies, additional blood components could be secured from 14,731 blood donors for a stable blood supply. (Korean J Blood Transfus 2021;32:123-128)

Key words: Transfusion-transmitted malaria, *P. vivax*, Nucleic acid amplification test (NAT)

Received on June 25, 2021. Revised on July 30, 2021. Accepted on August 2, 2021

Correspondence to: JaeSook Lee, B.S.

Korean Redcross Blood Transfusion Research Institute, 50 Hyeoksinsin-ro, Wonju 26465, Korea

Tel: 82-33-811-0216, Fax: 33-811-0240, E-mail: hyaline7@redcross.or.kr, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4250-5018>

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Copyright © 2021 The Korean Society of Blood Transfusion

말라리아는 제 3급 법정감염병으로, 열록날개 모기에 의해 매개되는 열원충(*Plasmodium Species*)에 의해 감염되는 열병이다. 인체 감염되는 원충은 삼일열원충(*Plasmodium vivax*, *P. vivax*), 사일열원충(*P. malariae*), 열대열원충(*P. falciparum*), 난형열원충(*P. ovale*), 원숭이열 원충(*P. knowlesi*) 등이 있으며[1], WHO 추정치에 따르면 해마다 전세계 3.5억~5억명이 감염되어 그 중 약 100만명이 사망하는 것으로 추정된다[2]. 질병관리청 감염병 웹통계[3]에 따르면 국내 말라리아 감염자 발생은 주로 5월에서 10월 사이에 집중되며, 특히 7~8월에 발생빈도가 높다. 국내 수혈에 의한 말라리아 감염은 1997년 3건, 1998년 4건, 2000년 3건으로 총 10건이 보고되었으며, 모두 *P. vivax* 감염에 의한 것이었다[4,5]. 국내 수혈 감염 말라리아 발생 사례에 따라 질병관리청은 말라리아 관련 채혈제한지역을 설정하여 해당지역에서의 전혈 및 혈소판성분헌혈을 제한하고 있다. 말라리아 감염이 확인된 경우 혈액관리법 시행규칙에 의해 채혈금지대상자로 지정하여 말라리아 병력자는 치료종료 후 3년이 경과하지 아니하면 헌혈을 할수 없으며 대한적십자사에서는 병력자를 헌혈유보군으로 등록하여 말라리아 감염자의 헌혈을 방지하고 있다. 또한 대한적십자사에서는 2000년 11월부터 말라리아 위험지역에서 채혈된 성분채혈혈장을 제외한 헌혈혈액을 대상으로 말라리아 항체선별검사를 실시하는 등 말라리아 수혈감염을 예방하기 위한 다양한 노력으로 2001년 이후 수혈매개 말라리아 감염은 발생하지 않았으며, 연간 말라리아 감염자 발생수도 지속적으로 감소하는 추세를 보이고 있다[3]. 국내 말라리아 관련 헌혈제한지역은 매년 질병관리청에서 선정하여 발표하고 있으며 그 기준은 인구 10만명 당 환자발생률이 최근 3년간 평균 10명 이상인 지역으로, 전혈헌혈 및 혈소판성분헌혈이 제한되지만[6], 보건복지부

에서는 동절기 수혈용 혈액의 안정적인 확보를 위해 2019년 제4차 혈액관리위원회(2019. 10. 31.)의 결정에 따라 2019년 11월 1일부터 2020년 3월 31일까지 국내 말라리아 헌혈제한지역에서 일시적 전혈 채혈을 승인하였다. 이후 COVID-19 대응행으로 수혈용 혈액 확보가 계속해서 어려워지자 일시적 채혈을 4월 30일까지 1개월 연장하였고, 2020년 제3차 혈액관리위원회(2020. 5. 18.)에서는 2020년 5월 20일부터 6월 30일까지 말라리아 헌혈제한지역에서의 채혈을 재연장하고, 해당기간 채혈된 혈액에 대해 말라리아 실시간 핵산증폭검사를 실시하기로 결정하였다. 그에 따라 말라리아 헌혈제한지역을 관할하는 대한적십자사 6개 혈액원(강원, 경기, 서울동부, 서울남부, 서울중앙, 인천)에서 채혈된 전혈혈액을 대상으로 말라리아 실시간핵산증폭검사를 실시하였다. 핵산추출은 silicon dioxide가 코팅된 마그네틱 비드가 음전하를 띠는 핵산과 결합하는 원리를 이용했으며, 300 μ L 전혈로부터 TAN Bead Nucleic Acid Extraction Kit (Taiwan Advanced Nanotech, Taoyuan, Taiwan)와 TAN Bead Nucleic Acid Extractor (Taiwan Advanced Nanotech, Taoyuan, Taiwan)를 사용해서 제조사 사용설명서에 따라 추출하였다. 추출한 핵산은 *P. falciparum*과 *P. vivax*를 동시에 검사할 수 있는 Malaria Mutiplex Pan/Pf/Pv detection kit (Micobiomed, Seongnam, Korea)와 Veri-Q316 system (Micobiomed, Seongnam, Korea)를 사용하여 말라리아 열원충 핵산에 대한 실시간 핵산증폭 검사를 실시하였다. 각 검사마다 사용되는 음성 및 양성컨트롤이 있으며, 모든 검체에 internal control을 첨가하여 *P. falciparum*과 *P. vivax* 음성이면서, internal control 이 증폭되지 않으면 해당 검체의 핵산증폭이 유효하지 않은 것으로 판정하였다. 초회 검사에서 말라리아 양성인 경우 2회 재검사를 실시하였으며, 재검 결과 1회 이상 양성인 경우 말라리아

양성인 것으로 판정하였다. 제조사 사용설명서에 제시된 *P. falciparum*의 민감도는 5.89 genomic equivalent/ μ L, *P. vivax*는 3.41 genomic equivalent/ μ L 이었다. 말라리아 항체검사는 제네디아 삼일열 말라리아 항체 엘리자 2.0 (GC MS, Yongin-si, Korea)와 Quadriga BeFree System (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany)를 사용하여 *P. vivax*에 대한 항체를 검사하였다. 본 시약은 유전자 재조합 MSP (merozoite surface protein) 단편항원과 CSP (circumsporozoite protein) 포함 항원을 사용하

여 국내 토착형 말라리아 삼일열(*P. vivax*)에 대한 항체를 검출하는 원리를 이용했으며, 제조사 사용설명서에 따라 실시하였다. 문헌에 따르면 본 키트의 민감도는 94.0% (282/300), 특이도는 98.4% (717/729)인 것으로 나타났다[7]. 말라리아 실시간 핵산증폭검사 및 항체검사 결과가 모두 음성인 경우에만 혈액을 출고하였다. 2020년 5월 20일부터 6월 30일까지 말라리아 현혈제한지역을 관할하는 대한적십자사 6개 혈액원(강원, 경기, 서울동부, 서울남부, 서울중앙, 인천)의 현혈건수는 총

Table 1. Number of blood donations in the six blood centers managing blood collection, including malaria-endemic areas (2020. 5. 20.~6. 30.)

Blood Center	Number of donations		
	Total	Malaria-endemic areas	Malaria-nonendemic areas
Seoul Jungang	28,821	4,180 (14.50%)	24,641 (85.50%)
Seoul Nambu	23,943	2,009 (8.39%)	21,934 (91.61%)
Seoul Dongbu	29,917	6,180 (20.66%)	23,737 (79.34%)
Gyeonggi	27,754	461 (1.66%)	27,293 (98.34%)
Incheon	19,767	1,225 (6.20%)	18,542 (93.80%)
Gangwon	17,479	686 (3.92%)	16,793 (96.08%)
Total	147,681	14,741 (9.98%)	132,940 (90.02%)

Table 2. Ct value distribution of the initial reactive results of the samples that showed reactive results in the initial test but were nonreactive in the duplicated re-tests

Ct value	Number of samples showing initial reactive results			
	<i>P. falciparum</i> reactive	<i>P. vivax</i> reactive	Both <i>P. falciparum</i> and <i>P. vivax</i> reactive	
			<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>
< 15.0	24	-	6	5
≥ 15.0, < 20.0	13	-	2	2
≥ 20.0, < 25.0	42	-	5	4
≥ 25.0, < 30.0	8	-	3	4
≥ 30.0, < 35.0	3	-	1	1
≥ 35.0	8	2	-	1
Total	98	2	17	

Cut off Ct value for *P. falciparum* and *P. vivax*: <40.

147,681건으로 이중 14,741건(9.98%)은 말라리아 현혈제한지역에서, 132,940건(90.02%)는 현혈제한지역이 아닌 곳에서 채혈된 건수이다(Table 1). 14,741건(9.98%)의 검체에 대해서 대한적십자사 혈액수혈연구원에서 실시간 핵산증폭검사를 실시하였고, 양성 결과는 존재하지 않았다. 검사 1회에 14개 검체를 검사할 수 있으며, 총 1,096회의 검사를 실시하였다. 음성 및 양성컨트롤 부적격으로 18회(1.64%)의 재검을 실시하였으며, 52개(0.35%)의 검체는 internal control 부적격으로 재검을 실시하여, 유효한 결과를 확인했다. 검체 14,741건 중 117건(0.79%)은 초회 양성(*P. falciparum* 양성, 98건; *P. vivax* 양성, 2건; *P. falciparum* 및 *P. vivax* 양성, 17건)이었지만, 재검 결과 모두 음성이었다(Table 2). 초회 검사에서 *P. falciparum* 양성결과를 나타낸 115건의 Ct 값을 분석한 결과, 30건(26.09%)은 15.0 이하, 12건(10.43%)은 30.0 이상이었으며 *P. vivax* 양성결과를 나타낸 2건의 Ct값은 모두 35이상이었다. 14,741건 중 10건(0.07%)은 말라리아 항체검사결과 양성인 것으로 나타났으며, S/CO 값을 분석한 결과, 4건(40.00%)은 3.0 미만, 5건(50.00%)은 9.0 이상이었다(Table 3).

2020년 COVID-19 대확산으로 전세계적으로 현혈참여가 급감하였고[8], 국내 혈액재고 또한

급격히 감소함에 따라, 수혈용 혈액의 안정적 확보를 위해 해당기간동안 말라리아 현혈제한지역에서 한시적으로 전혈현혈이 허용되었다. 해당기간동안 일상검사로 시행되는 항체선별검사와 함께 실시간핵산증폭검사가 시행되었다. 말라리아 검사법은 신속진단검사법, 혈액도말 후 현미경 관찰법, 말라리아 항체 및 항원검사, 핵산증폭검사 기반 검사법 등이 있다[9]. 혈액사업에서는 비교적 검사 정확도가 뛰어나고, 대량의 검체를 신속하게 검사할 수 있는 장점이 있어 항체검사법이 널리 사용되고 있다[10]. 그러나 항체검사법은 열원충 *P. vivax*에 대한 검사 민감도가 만족스럽지 못하고, 초기 감염에서 항체 미검출 사례, 과거 감염 시 양성결과로 판정되는 등의 단점이 있어 말라리아 항체선별검사 타당성에 대한 검토가 필요하다는 연구보고가 있었으며[11], 따라서 추후 항체선별검사의 유용성에 대한 후속연구가 필요할 것으로 사료된다. WHO에서는 epidemiological research 와 sub-microscopic infection mapping 조사를 위해 핵산증폭검사를 사용할 것을 권고하였으며[12], 본 연구에서는 말라리아 항체선별검사와 더불어 말라리아 실시간 핵산증폭검사를 실시하였다. 핵산증폭검사는 고가의 분석장비가 필요하고 숙련된 검사자와 고가의 검사비용, 항체검사와 비교하여 느린 검사속도 등의 단점이 있지만, 검사민감도가 1~5 parasites/ μ L 로 뛰어나며, 낮은 viremia 상태의 감염자를 비교적 잘 검출할 수 있다는 장점이 있어[13-17] 해당기간동안 일상검사인 항체선별검사와 함께 실시간핵산증폭검사를 추가로 실시하였다. 해당기간은 말라리아 유행율이 높아지기 시작하는 기간으로 혈액관리위원회에서는 말라리아 항체검사와 핵산증폭검사를 같이 실시할 것을 결정하였으며, 이는 일상적인 절차는 아니었다. 말라리아 유증상자는 현혈자 문진을 통해 현혈이 대부분 배제되므로 항

Table 3. S/CO ratio of the anti-malaria reactive results (2020. 5. 20. ~ 6. 30.)

S/CO	Number of anti-malaria reactive
<1.5	2
≥ 1.5 , <3.0	2
≥ 3.0 , <6.0	1
≥ 6.0 , <9.0	0
≥ 9.0 , <12.0	3
≥ 12.0 , <15.0	2
Total	10

체검사결과 양성이 반드시 말라리아 감염을 나타낸다고 할 수 없지만, 수혈용 혈액의 안전성을 위해 핵산증폭검사 및 항체검사결과가 모두 음성인 경우에만 수혈용 혈액을 출고하였다. 따라서 말라리아 항체선별검사 양성인 10건을 제외한 14,731건의 혈액제제를 수혈용으로 추가 공급할 수 있었으며, 이는 해당기간 동안 공급한 총 147,681건 중 9.97%를 차지하여, 혈액수급 안정화에 기여할 수 있었다. 말라리아 헌혈제한지역에서 WHO의 권고에 따라 핵산증폭검사를 도입할 경우 본 연구결과와 함께 말라리아 항체검사의 유용성과 관련된 후속연구 결과를 바탕으로 핵산증폭검사 결과를 중점으론 혈액폐기 기준 변경 검토가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

1990년 말부터 2021년까지 국내 수혈매개 말라리아 감염사례는 10건으로 *P.vivax*에 의한 감염이었다. 질병관리청에서는 말라리아 발생빈도가 높은 지역을 말라리아 위험지역으로 지정하고 전혈제한조치를 내렸다. 하지만 최근 말라리아 감염자수는 감소하는 추세이고, COVID-19 대유행으로 인해 혈액공급이 급격히 감소함에 따라, 보건복지부에서는 수혈용 혈액제제의 공급확보를 위해 말라리아 위험지역에서의 전혈헌혈을 일시적으로 승인하였다. 그에 따라 2020년 5월 20일부터 6월 30일까지 말라리아 채혈제한지역에서 채혈된 전혈에 대해서 말라리아 항체검사 및 핵산증폭검사를 실시하였다. 총 14,741건의 검체에 대해 1,096회의 검사를 실시하였다. 핵산증폭검사 초회검사에서 양성대조물질 오염 또는 PCR 반응이상에 따른 초회양성은 117건(0.79%)이었고, 2회 재검을 통해 음성결과를 확인하였다. 핵산증폭검사 실제양성은 없었다. 말라리아 항체 검사 결과는 총

14,741건 중 10건이 양성인 것으로 나타났다. 말라리아 항체검사는 민감도와 특이도가 다소 불충분하다는 연구보고가 있어, 추후 연구를 통해 말라리아 항체검사의 효용성에 대한 검토가 필요할 것으로 사료된다. 본 연구를 통해 안정적인 혈액공급을 위해 말라리아 항체 양성인 10건을 제외한 14,731명의 헌혈자로부터 혈액제제를 추가로 확보할 수 있었다.

References

- Centers for Disease Control and Prevention. Malaria. <https://www.cdc.gov/parasites/malaria/index.html> [Online] (last visited on 9 June 2021)
- World Health Organization. Section 1. Global malaria situation in world. Malaria report 2005. Geneva: World Health Organization, 2005:5-17
- Korea Disease Control and Prevention Agency. Infectious disease portal. <http://www.kdca.go.kr/npt/> [Online] (last visited on 9 June 2021)
- 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
- Lee YH, Lee HK, Choi KH, Hah JO, Lim SY. Transfusion-induced malaria in a child after open heart surgery in Korea. J Korean Med Sci 2001;16:789-91
- Korean Redcross Blood Services. Guidebook of blood donation. https://www.bloodinfo.net/donating_promotion_intro.do [Online] (last visited on 24 June 2021)
- Kim J, Jang JW, Kim JY, Oh DJ, Lim CS. Combined use of malaria antigen and antibody enzyme-linked immunosorbent assay for blood screening of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea. Med Princ Pract 2016;25:212-8

8. Mohammadi S, Tabatabaei Yazdi SM, Eshghi P, Norooznezhad AH. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) and decrease in blood donation: experience of Iranian Blood Transfusion Organization (IBTO). *Vox Sang* 2020;115:595-6
9. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 2015
10. Reesink HW. European strategies against the parasite transfusion risk. *Transfus Clin Biol* 2005;12:1-4
11. Kang JW, Youn KW, Huh K, Lim CS, Chun BC, Yeom JS, et al. Consideration of discontinuance of malaria antibody test for blood donor screening. *Korean J Blood Transfus* 2016;27:38-44
12. World Health Organization. Global Malaria Programme. Policy brief on malaria diagnostics in low-transmission settings. Geneva: World Health Organization, 2014
13. Mathison BA, Pritt BS. Update on malaria diagnostics and test utilization. *J Clin Microbiol* 2017;55:2009-17
14. Kasetsirikul S, Buranapong J, Srituravanich W, Kaewthamasorn M, Pimpin A. The development of malaria diagnostic techniques: a review of the approaches with focus on dielectrophoretic and magnetophoretic methods. *Malar J* 2016;15:358
15. Berzosa P, de Lucio A, Romay-Barja M, Herrador Z, González V, García L, et al. Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. *Malar J* 2018;17:333
16. Krampa FD, Aniweh Y, Awandare GA, Kanyong P. Recent progress in the development of diagnostic tests for malaria. *Diagnostics (Basel)* 2017;7:54
17. Mfuh KO, Achonduh-Atijegbe OA, Bekindaka ON, Esemu LF, Mbakop CD, Gandhi K, et al. A comparison of thick-film microscopy, rapid diagnostic test, and polymerase chain reaction for accurate diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J* 2019;18:73