

중합효소연쇄반응법에 의한 HIV-2의 신속한 진단

이 두 식, 이 영 재
제주대학교 농과대학 수의학과

Rapid Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus-2(HIV-2) by the Polymerase Chain Reaction(PCR)

D. S. Lee, Y. J. Lee
Department of Veterinary Medicine, Cheju National University

ABSTRACT

HIV-2 proviral sequences present in the PBMCs of the persons in groups A through C were amplified by means of primer pairs representing the LTR (SK89 and SK90, probe SK91) regions of the HIV-2 genome. The appearance of a diagnostic fragment in the autoradiogram indicated the presence of HIV-2 proviral sequences in PBMCs.

HIV-2 sequences were detected in all 5 DNA specimens from seropositive and AIDS-related complex, homosexual men, Group A and in 2 intermediately and 1 weakly of the 4 DNA specimens from seronegative and seropositive homosexual men with lymphadenopathy syndrome, Group B, but in 2 of the 4 DNA specimens from a seronegative and no clinical symptom, homosexual men, Group C.

This method of DNA amplification made it possible to obtain results within 3 days. The method may therefore be used to complement or replace virus isolation as a routine means of determining HIV-2 infection.

서론

HIV-1과 HIV-2는 Retroviridae과, Lenti-virinae아과에 속하는 RNA바이러스로서 역전사효소를 가지고 있다. 이들 바이러스는 감염림파구에 대하여 세포용해효력을 가지고 있으며 서로의 nucleotide sequency간에 약 40~50%정도가 동일한 뉴클레오타이드를 갖고 있다.^{1,2,3}

HIV-1과 HIV-2는 후천성면역결핍증(AIDS : acquired immunodeficiency syndrome)의 병원인자로 인식되고 있다. HIV-1은 세계적으로 만연되어 있으며, HIV-2는 주로 서부아프리카 아메리카 및 유럽에서 보고되고 있다.^{4,5,6,7,8,9}

진단에 HIV-1에 대한 혈청학적시험이 폭 넓게 행하여 지고 있다. 그러나 이들 혈청학적시험의 특이성은 숙주 hapten들에 대한 항체와 연관된 다른 바이러스(HIV-1과 HIV-2, HTLV-I과 HTLV-II)들에 대한 항체간에 서로 교차반응에 의하여 방해된다. 더욱이 급성감염의 경우 항체생성이 늦어지기 때문에 초기 진단이 어렵다.¹⁰ 그래서 차라리 바이러스에 대한 항체를 측정하는 것보다는 직접 바이러스를 측정하는 것이 유리할 때가 많다. 보편적으로 레트로바이러스에 이용되는 방법으로는 바이러스와 감수성이 있는 세포를 같이 배양하거나 바이러스항원을 직접 검출하는 것이다. 정밀한 바이러스와 세포의 혼합세포배양법으로 많은 바이러스를 분리할 수가 있었다. 그러나 이것은 특수한 실험실이 필요하며 비용이 많이 들고 시간이 오래걸리며 무엇보다도 감염성이 있는 많은 바이러스를 취급해야 한다는 어려운점들이 따른다.^{11,12,13,14,15,16,17}

중합효소연쇄반응법(PCR : polymerase chain reaction)으로 HIV-1과 HTLVs를 검출

하는 법이 개발되어 졌다.^{18,19,20,21} 이 법은 민감성이 아주 좋고 빠르게 진단이 가능하고 아주 적은량의 바이러스도 검출할 수 있다는 장점이 밝혀 졌다. 더욱이 증폭시킨 PCR생성물은 비감염성이라 바이러스와 세포 혼합배양시에 일어날 수 있는 위험성이 없다. 그래서 본 연구에서는 HIV-2을 임상적으로 PCR을 이용하여 검출하는 것을 시도했다.

재료 및 방법

ELISA법 : HIV-2 항체는 Enzyme immunoassay kit(Genetic systems, Seattle)를 이용하여 진단하였다.

혈액단핵세포로부터 핵산의 준비 : 회석된 혈액을 Ficoll-Paque(Pharmacia)에 상층하여 단핵세포를 분리하였다. 단핵세포로부터 DNA의 분리는 proteinas K로 소화시킨후 phenol/chloroform으로 추출한후 30ml/l sodium acetate와 ethanol로 침전시켰다. DNA 농도의 측정은 스펙트로메타로에서 260nm로하여 OD를 측정하였다.

Tag-polymerase 반응을 위한 primer와 DNA probe : DNA의 증폭을 위한 primer set는 모두 LTR 9432-9449, 9577-9596쇄에서 그리고 probe는 LTR상의 9524-9561쇄에서 선택하였다. PCR의 DNA증폭을 위한 primer set와 probe는 table 1에 보이는바와 같다.

PCR : PCR에 의한 증폭은 1 μ g의 추출한 DNA, 200 μ M의 dNTP, 0.5 μ M의 primer, 2.5단위의 Tag DAN 중합효소(Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut, UAS), 50mmol KCL, 100mmol/l Tris-Hcl(pH 8.3) 및 2mmol/l MgCl₂을 합하여 100 μ 반응혼합액을 만들어 이용하였다. Primer신장은 30번의

연속적인 사이클에 의해 행하여 졌으며, 각 사이클은 94°C에서 1분간 DNA를 변성하였고, 55°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 1분간 신장하므로 DNA thermal cycler(Perkin Elmer Cetus)에서 시행하였다.

Agarose gel electrophoresis와 Southern-blot hybridization : 4μl의 PCR생성물을 4% agarose gel(100volts 1.5h in TBE buffer; 89mM boric acid, 2mM EDTA, pH 8.3)에서 분리하였다. 여기에 Hae III(Boehringer Mann-heim)으로 소화시킨 plasmid pBR 322의 DNA를 증폭된 절편의 길이를 결정하기 위한 size marker로 전기영동 되어졌다. Southern-blot hybridization를 위하여 4% agarose gel에서 전기영동한 gel를 Zeta blot membrane(Bio-Rad, Richmond, CA, USA)로 트랜스퍼되어 졌다. 이 membrane은 pre-hybridization, hybridization 그리고 세척의 순서로 Maniatis et al(1982)(23-35)의 방법을

따라 행하여 졌다. 즉, Membrane을 세척하기 전에 30pmol oligonucleotide probe(γ -³²P ATP end-labeled polynucleotide kinase: Boehringer Mannheim)로 10시간 hybridization되어졌다. Membran을 세척후 공기로 말린 후 Kodak X-ray film에 노출시켰다.

결 과

동성연애자들을 HIV-2형 항원에 대하여 혈청학적으로 음성 및 양성, 임상증상 등에 따라 세 그룹으로 분류하여 이들의 주위모세혈관혈액으로부터 분리한 단핵세포에서 HIV-2 proviral DNA를 PCR법을 이용하여 검출하였다. Primer쌍으로 HIV-2 genome상의 LTR부위에 위치한 SK89 및 SK90을 이용하였으며 probe로는 SK91를 이용하여 증폭시켰다 (Table 1).

Table 1. Primers and probe for DNA amplification by polymerase chain reaction

Primer pairs and probes designation	Virus	Sequence(5' to 3')	Position*	Region	Size of PCR product
SK89	HIV-2	AGGAGCTGGTGGGGAACG	9432 - 9449	LTR	164bp
SK90		GTGCTGGTGAGAGTCTAGCA	9577 - 9596	LTR	
SK91		TTGAGCCCTGGGAGGTTCTCT CCAGCACTAGCAGGTAG	9524 - 9561	LTR	

* HIV-2 isolate LAV-2_{rod}, GenBank accession no. M15390

주위모세혈관혈액으로부터 분리한 단핵세포에서의 HIV-2형 proviral DNA가 오토레디오 그래프에서 진단 가능한 절편으로 나타났다. 혈청학적 진단법(ELISA)으로 양성이고 AIDS-related complex 증상을 나타내는 동성연애자(Group A)의 주위모세혈관혈액의 단핵세포에서 PCR법에 의하여 모두 강한 양성을 나타냈

다(Fig. 1). 또 혈청학적으로 양성 및 음성이며 lymphadenopathy syndrome 증상을 나타내는 Group B에 속하는 동성연애자들에 대하여서는 두 사람으로부터 중정도의 양성반응을 나타냈고 한 사람으로부터는 약한 양성반응을 나타냈다. 그러나 혈청학적으로 양성인 사람중한 사람에서는 PCR법에 음성을 나타냈다(Fig

2). 혈청학적으로 음성이고 임상증상이 나타나지 않는 Group C 중 두 사람에서도 PCR법에 의하여 약한 양성반응이 나타났고, 다른 두 사람으로부터는 음성으로 나타냈다(Fig 3).

Table 2. Results obtained with the PCR technique by seropositive and seronegative homosexual men and seronegative normalsexual men

Subject	Samples	Clinical status*	Serologic assay**	Primer pair*** (LTR:SK89/90)
Group A	1	ARC	+	+++
	2	ARC	+	+++
	3	ARC	+	+++
	4	ARC	+	+++
	5	ARC	+	+++
Group B	6	LAS	+	-
	7	LAS	+	++
	8	LAS	-	+
	9	LAS	-	++
Group C	10	AS	-	-
	11	AS	-	+
	12	AS	-	+
	13	AS	-	-

* LAS, lymphadenopathy syndrome; ARC, AIDS-related complex; AS, asymptomatic.

** Minus sign denotes a negative ELISA, and plus sign denotes positive results on ELISA.

*** Labels +++, ++, +, and - denote high-level, intermediate-level, low-level, and negative, respectively, for the relative intensities of the diagnostic band observed in the autoradiograms

Group A : Those in group A(n=5) were randomly selected seropositive homosexual and AIDS-related complex men.

Group B : Those in group B(n=4) were randomly selected seronegative homosexual and lymphadenopathy syndrome men.

Group C : Those in group C(n=4) were randomly selected seronegative homosexual and asymptomatic men.

고찰

HIV-2는 RNA virus로서 Retrovirus군에 속한다.¹ 이들의 genome은 더욱이 역전사효소에 의해서 상보DNA로 전사되어 감염세포들, 즉 T 림프구, 대식세포, 마이크로글리아세포들에 삽입되어 프로바이럴 상태로 존재한다. HIV 감염증의 진단법으로 HIV 구조단백질에 대한 항체를 ELISA나 입자응집반응법(PAT)을 이용한 것들이 있다. 그러나 이들 혈청학적

진단법들은 HIV 양성인 환자들을 진단하는데 충분하지 못한 실정이다.²² 이런 혈청학적진단법들의 문제점들을 해소하기 위해 같은 환자의 혈청으로 western blot 및 형광항체법을 통하여 양성 판정을 한번더 증명하여야만 한다. 이들 혈청학적 진단법에 이용하는 항원으로서는 세포배양에서 정제한 HIV, 합성된 HIV 단백질 및 HIV 특이 펩타이드 등이 사용되고 있으나 가끔 이들 항원들에 대하여 잘못된 양성판정이 나타나고 있다. 왜냐하면 HIV

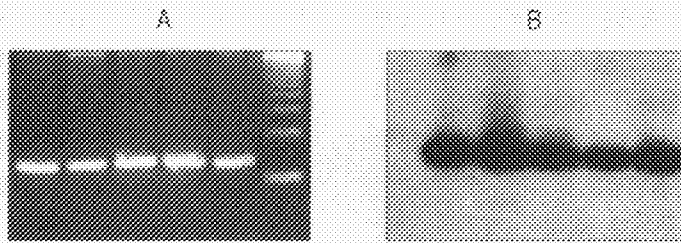


Fig 1. A : Detection of HIV-2 proviral genomes in HIV-2 seropositive and AIDS-related complex homosexual blood donors. From PBMCs from HIV-2 both donors, DNA were extracted, and a total of $1\mu\text{g}$ of the DNAs was amplified in mixed-primer method. The products were electrophoresed on 4% agarose gel.
B : Representative group A samples of HIV-2 DNA amplified with SK89/90 and detected with SK91 probe.

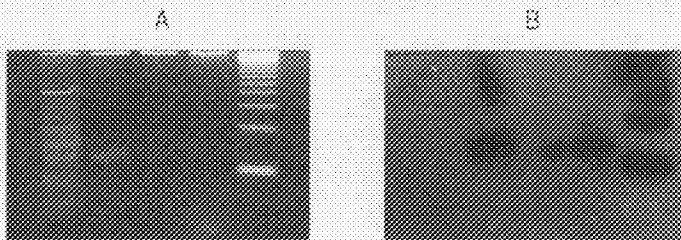


Fig 2. A : Detection of HIV-2 proviral genomes in HIV-2 seronegative and lymphadenopathy homosexual blood donors. From PBMCs from HIV-2 both donors, DNA were extracted and a total of $1\mu\text{g}$ of the DNAs was amplified in mixed-primer method. The products were electrophoresed on 4% agarose gel.
B : Representative group B samples of HIV-2 DNA amplified with SK89/90 and detected with SK91 probe.

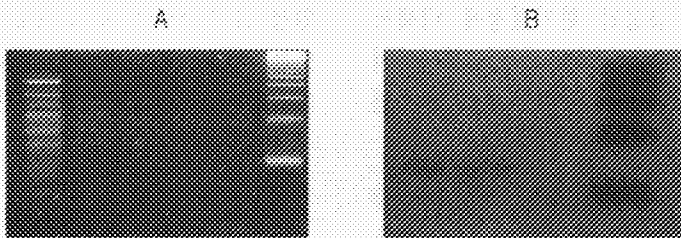


Fig 3. A : Detection of HIV-2 proviral genomes in HIV-2 seronegative and asymptomatic homosexual blood donors. From PBMCs from HIV-2 both donors, DNA were extracted, and a total of $1\mu\text{g}$ of the DNAs was amplified in mixed-primer method. The products were electrophoresed on 4% agarose gel.
B : Representative group C samples of HIV-2 DNA amplified with SK89/90 and detected with SK91 probe.

에 대하여 형성된 항체는 특이적인 HIV 항체 뿐만 아니라 바이러스 성숙동안 형성된 세포 항원에 대하여도 항체가 나타나기 때문이다.¹¹ 바이러스 성숙동안 감염세포에서 형성된 항원은 일반적인 항원정제법으로 바이러스 항원과 분리되지 않기 때문이다. 더욱이 잘못된 양성 결과로 자가면역병, Rheumafactor 양성혈청 및 Epstein-Barr-virus 감염과 연관되어 있을시 나타나기도한다. HIV 구조단백질과 세포단백질들을 규명하기위하여 주로 western-blot법이 이용되고 있다. 여기에서 밴드들이 나타나지 않거나 또는 HIV 단백질들과 일치하지 않는 밴드들이 나타나면 HIV 음성으로 판정된다. 즉 환자의 혈청이 한종류의 막투과단백질 gp41과 반응하거나 또는 core 단백질 p24 및 당단백질 gp120, gp41 등과 그 외에 또 다른 HIV 특이 단백질과 동시에 반응시 양성으로 판정된다. 만일 하나의 core-protein p24와만 반응시는 위양성으로 판정한다. 즉 이때는 seroconversion의 초기를 생각할 수 있다. 이 경우 4~6주후 다시 진단해 볼 수 있다. 비록 HIV에 감염이 되지 않았을 경우도 양성으로 판정된 경우가 있다는 보고도 있다. 즉, 항체들은 여러 종류의 HIV-protein에 대해서 뿐만 아니라 그 외에 바이러스와 다른 기생성 감염증에 대해서도 일어나며 또 Rheu-mafactor와 HLA-antibodies 양성인 환자혈청에 대해서 일어난다. 그래서 wesrtern-blot법은 검사자의 많은 경험이 필요하기 때문에 특별히 전문인이 필요로 한다.²³

B군에서 1명의 혈청학적으로 양성인 사람중 1명은 PCR법으로 음성으로 판정이 나온 것은 3가지 면에서 생각해 볼 수 있다. 첫째, 이들은 provirus의 숫자가 PCR로 증폭하기에 불충분한 것으로 볼 수 있다. 즉, 여기에 사용된 PCR법으로 측정하기에 너무나 적은 량의 감염 임파세포를 갖고 있을지도 모른다. 보통 HIV

에 감염된 사람의 PBMCs에 바이러스 특이 RNA를 간직하고 있는 임파세포의 숫자는 1/1,000보다 적은 것으로 알려져 있다. 이러한 문제는 provirus DNA에 대한 증폭 주기를 여기에서 행한 35cycles 보다 더 많이 행하거나 또는 염색체 DNA 대신에 RNA를 원래의 template로 사용하므로 탐지 민감도를 높일 수 있을 것으로 볼 수 있다.²⁴ 바이러스 RNA는 역전환효소에 의해서 상보적인 DNA로 전환된 후 이 DNA가 증폭되어 진다. 보통 감염 세포에서 바이러스 특이 RNA분자를 탐지하는 민감도는 proviral DNA를 탐지하는 민감도 보다 높다는 결과를 보고하고 있다. 그러나 시초 template로서 RNA의 사용과 이어진 증폭과정은 감염 말초혈액 임파구에서 HIV provirus가 생물학적으로 활성화되어 겨야만 가능하다. 두 번째로 이런 환자들은 유전적으로 변이되어진 HIV에 의해서 감염 되었거나 또는 증폭시 여기에 사용되어진 primer쌍이나 probe에 대한 결합부위가 결핍된 것으로 볼 수 있다. 여기에는 세가지 다른 viral genome인 LTR, gag 및 env 유전자에 위치하는 primer쌍들을 같이 사용하는 것이 좋은 것으로 사료된다. 셋째로 이들은 HIV provirus를 몸에 간직하고 있지 않을지도 모른다. 이들의 PBMCs에서 HIV proviral sequences의 결핍은 아마 비감염성 HIV 항원들에 최초로 노출되어 졌거나 또는 감염후 그들의 PBMCs에서 바이러스가 제거가 일어났는지도 모른다.

참고문헌

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F et al. Isolation of a T-lymphotrophic retrovirus from a patient a risk of acquired imm-

- une deficiency syndrome(AIDS).
Sien-ce 1983; 220:868~70.
2. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses(HTLV-II) from patients with AIDS and Pre-AIDS. Science 1984; 224: 497~500.
 3. Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M, Montagnier L, Alizon M. Molecular cloning and polymorphism of the human immunodeficiency virus type 2. Nature 1986; 324:691~5.
 4. Alizon M, Wain-Hobson S, Montagnier L, Sonigio P. Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide-sequence analysis of two isolates from African patients. Cell 1986; 46:63~74
 5. Centers for Disease Control. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-worldwide. MMWR 1988; 37:286~95.
 6. Clavel F, Mansinho K, Chamaret S, Guetard D, Favier V, Nina J, Santos-Ferreira MO, Champalimaud JL, Montagnier L. Human Immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. N Engl J Med 1987; 316:1180~5.
 7. Clavel F, Mansinho K, Chamaret S, Guetard D, Favier V, Nina J, Santos-Ferreira MO, Champalimaud JL, Montagnier L. Human Immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. N Engl J Med 1987; 316:1180~5.
 8. Fultz PN, Switzer WM, Schable CA, Derosiers RC, Silva DP, McCormick JB. Seroprevalence of HIV-1 and HIV-2 in Guinea Bissau in 1980. AIDS 1988; 2: 129~32.
 9. Barin F, Denis F, Allan JS, M'Boup S, Kanki P, Lee TH, Essex M. Serologic evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of West Africa. Lancet 1985; 2:1387~9.
 10. Marlink RG, Allan JS, McLane MF, Essex M, Anderson KC, Groopman JE. Low sensitivity of ELISA testing in early HIV infection. N Engl J Med 1987; 315:1549.
 11. Wittek AE, Phelan MA, Well MA et al. Detection of human immunodeficiency virus core protein in plasma by enzyme immunoassay. Ann Intern Med 1987; 107:286~92.
 12. Brun-Vezinet F, Katlama C, Ceunink D, Andrade D, Dario D, Rey MA. LAV-2 seroepidemiological study in the Cape Verde

- Islands. In : Abstracts of the Third International Conference on AIDS. Washington, DC, US Department of Health and Human Services, 1987.
13. Butto S, Verani P, Titti F, Rezza G, Senicola L, Rossi GB. Simultaneous seropositivity to HIV-1 and HIV-2 in Italian drug abusers. *AIDS* 1988; 2: 139~40.
 14. Rey MA, Girard PM, Harzic M, Madjar JJ, Brun-Vezinet F, Saimot AG. HIV-1 and HIV-2 double infection in French homosexual male with AIDS related complex. *Lancet* 1987; 1:388~9.
 15. Rey F, Salaun D, Lesbordes L, Gadelle S, Olliver-Henry F, Barre'-Sinoussi F, Chermann JC, Georges AJ. HIV-1 and HIV-2 double infection in Central African Republic. *Lancet* 1986; 2:1391~2.
 16. Weiss RA, Clapham PR, Weber JN, Whitby D, Tedder RS, O'Connor T, Chamaret S, Montagnier L. HIV-2 antisera cross-neutralize HIV-1. *AIDS* 1988; 2:95~100.
 17. Foucault C, Lopez O, Jourdan G, Fournel JJ, Perret P, Gluckman JC. Double HIV-1 and HIV-2 seropositivity among blood donors. *Lancet* 1987; 1: 165~6.
 18. Kwok S, Mack DH, Mullis KB et al. Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *J Virol* 1987; 61:1690~4.
 19. Kwok S, Ehrlich G, Poiesz B, Kalish R, Sninsky JJ. Enzymatic amplification of HTLV-1 viral sequences from peripheral blood mononuclear cells and infected tissues. *Blood* 1988; 72:1117~23.
 20. Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, et al. DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 1988; 239:295~297.
 21. Wolinsky S, Rinaldo C, Farzadegan H, et al. Polymerase chain reaction(PCR) detection of HIV seroconversion. Presented at the Fourth International Conference on AIDS, Stockholm, June 12~16, 1988.
 22. Marlink RG, Allan JS, McLane MF, Essex M, Anderson KC, Groopman JE. Low sensitivity of ELISA testing in early HIV infection. *N Engl J Med* 1987; 315:1549.
 23. Marquart KH, Muller P, Brede

- HD. HIV-2 in West Germany. AIDS 1988; 2:141~2.
24. Harper ME, Marselle LM, Gallo RC, Wong-Staal F. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymphnodes and peripheral blood from infection individuals by in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:772~776.