

**STUDIO PRELIMINARE SULL'IMPORTANZA
DEL METODO D'ESTRAZIONE DEL DNA PER LA TITOLAZIONE
DI PCV2 CON REAL-TIME PCR**

***PRELIMINARY EVALUATION OF IMPORTANCE OF DNA
EXTRACTION METHOD FOR PCV2 QUANTITATIVE
REAL-TIME PCR DATA***

FACCINI S., ROSIGNOLI C., FRANZINIG., NIGRELLI A.D.

***Istituto zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna
Sezione Diagnostica di Mantova***

Parole chiave: Real-Time PCR quantitativa, PCV2, estrazione DNA.

Key words: Quantitative Real-Time PCR, PCV2, DNA extraction.

Riassunto. L'applicazione di metodi di Real-Time PCR quantitativa è divenuta importante sia per lo studio di PCV2 che per la diagnosi di patologie ad esso correlate. L'estrazione di DNA da campioni clinici è sicuramente una fase pre-analitica d'importanza critica. Resa, ripetibilità, purezza, efficacia nella rimozione degli inibitori influiscono infatti sui risultati ottenibili con la Real-Time PCR quantitativa. Scopo del presente lavoro è una preliminare valutazione dell'effetto di sistemi d'estrazione diversi sull'analisi quantitativa di due delle principali tipologie di campioni clinici: sieri e linfonodi. Quest'ultimi in particolare risultano essere i più problematici soprattutto in rapporto alla presenza d'inibitori negli estratti.

Abstract. Quantitative Real-Time PCR has become an important tool for PCV2 research and clinical diagnosis. DNA extraction from clinical samples is unquestionably a very critical pre-analytical step. Yield, repeatability, purity, and removal of PCR inhibitors undoubtedly affect quantitative Real-Time PCR results and performances. This study is a first evaluation of how extraction method influences PCV2 quantification in two of the most important clinical samples: serum and lymph node. The latter results to need particular attention due to frequent presence of PCR inhibitors in DNA extracts.

INTRODUZIONE

Il circovirus suino di tipo 2 (PCV2) appartiene alla famiglia *Circoviridae*. È un virus a DNA, privo di envelope, con genoma circolare a singolo filamento, di piccole dimensioni (1,8 Kb). PCV2 è stato riconosciuto come l'agente eziologico della sindrome multisistemica da deperimento post-svezzamento (PMWS) che causa danni economici significativi alla produzione suina a livello mondiale. L'infezione da PCV2 è stata messa in relazione anche con diverse altre sindromi del suino collettivamente denominate "malattie associate a circovirus suino" (PCVAD). Molti studi basati sulla rilevazione del nucleocapside o del DNA virale hanno dimostrato che la quantità di virus presente nel siero e nei tessuti linfoidi degli animali con sintomi clinici è maggiore rispetto a quella riscontrabile nei soggetti sani o asintomatici,

suggerendo l'esistenza di una correlazione tra carica virale e sviluppo della malattia (Liu et al., 2000; Ladekjær-Mikkelsen et al., 2002; Rovira et al., 2002; Brunborg et al., 2004; Olvera et al., 2004; Chung et al., 2005). L'applicazione di metodi di Real-Time PCR quantitativa è divenuta importante sia per lo studio di PCV2 che per la diagnosi di patologie ad esso correlate. L'estrazione di DNA da campioni clinici è sicuramente una fase pre-analitica d'importanza critica (Niesters 2001; Espy et al., 2006; Gunson et al., 2006). Resa, ripetibilità, purezza, efficacia nella rimozione degli inibitori influiscono infatti sui risultati ottenibili con la Real-Time PCR quantitativa. Scopo del presente lavoro è una preliminare valutazione dell'effetto di sistemi d'estrazione diversi sull'analisi quantitativa di PCV2 in due delle principali tipologie campioni clinici: sieri e linfonodi.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati campioni di linfonodi e sieri precedentemente testati per PCV2 con Real-Time PCR e conservati a -80°C .

Il DNA virale è stato estratto dai campioni di siero in doppio e in parallelo con almeno due delle seguenti metodiche. Metodo sera A: 200 μl di siero sono stati processati con Trizol LS[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguendo il protocollo indicato dal produttore per l'estrazione dell'RNA. È noto infatti che, probabilmente a causa del suo genoma a singolo filamento e le sue dimensioni ridotte, il genoma di PCV2 viene facilmente purificato insieme all'RNA. Nel passaggio finale il DNA è stato risospeso in 30 μl di acqua di grado per PCR. Metodo sera B: 200 μl di siero sono stati processati con Nucleospin Blood (Macherey-Nagel GmbH & Co., KG Düren, Germany), seguendo il protocollo indicato dal produttore. L'eluizione è stata ottenuta con 100 μl di acqua di grado per PCR scaldata a 70°C . Metodo sera C: 200 μl di siero sono stati processati con High Pure Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) come raccomandato dal produttore. L'eluizione è stata ottenuta con 50 μl di acqua di grado per PCR. Dai campioni di linfonodi è stato ottenuto un omogenato al 20% in soluzione fisiologica. Il DNA virale è poi stato purificato in doppio e in parallelo secondo almeno due delle seguenti metodiche. Metodo tissues A: 200 μl di omogenato sono stati processati con Trizol LS[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguendo il protocollo indicato dal produttore per l'estrazione dell'RNA. Nel passaggio finale il DNA è stato risospeso in 60 μl di acqua di grado per PCR. Metodo tissues B: 100 μl di omogenato sono stati processati con Nucleospin Tissue (Macherey-Nagel GmbH & Co., KG Düren, Germany), seguendo il protocollo indicato dal produttore per l'estrazione del DNA per tessuti difficili da lisare. L'eluizione è stata ottenuta con 100 μl di acqua di grado per PCR scaldata a 70°C . Metodo tissues C: 100 μl di omogenato sono stati processati secondo un protocollo proprio adattato da Boom et al.(1990). Dopo un'incubazione in buffer di lisi addizionato di Proteinasi K (20mg/ml) per 10 minuti a 70°C , seguita da 1 ora a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 50 μl di sospensione di Silicon dioxide (Sigma). Dopo un'incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente in agitazione, al fine di mantenere in sospensione la polvere, si è proceduto alla serie di lavaggi previsti dal metodo originale. L'eluizione è stata ottenuta con 100 μl di acqua di grado per PCR scaldata a 56°C .

La Real-Time PCR è stata eseguita in accordo con il protocollo precedentemente pubblicato da Olvera (2004). Al fine di valutare l'eventuale presenza d'inibitori è stato introdotto un controllo interno esogeno d'amplificazione (Exogenous internal positive amplification

control - Applied Biosystems). L'analisi è stata effettuata utilizzando lo strumento iCycler iQ BioRad. Al fine della titolazione, il DNA ottenuto da ogni estrazione è stato testato in doppio.

Per la quantificazione è stato utilizzato uno standard plasmidico, preparato dalla ditta MWG, contenente la sequenza sintetica esattamente corrispondente alla ORF2 del GenBank entry AF465211 indicato nella pubblicazione presa a riferimento. E' stata predisposta una curva di titolazione da 10⁷ a 10⁰ copie di plasmide/ μ l e percorrendo a ritroso il processo di purificazione subito dal singolo campione si è risaliti al corrispondente titolo virale per ml di siero o grammo di tessuto.

Al fine di questo studio sono stati presi in considerazione i seguenti parametri: presenza/assenza di segnale di fluorescenza, segnale del controllo interno d'amplificazione, ciclo soglia e conseguente titolo, e coefficiente di variazione del logaritmo del titolo sia per il singolo metodo che tra metodi.

RISULTATI

Sono state eseguite diverse prove di estrazione da campioni di siero utilizzando in parallelo il Kit Roche e Trizol LS[®] ottenendo qualche raro campione inibito con l'uno o con l'altro metodo e risultati comparabili in termini di logaritmo del titolo virale. Di seguito riassumiamo, (Tab.1) a carattere esemplificativo, gli esiti di una prova d'estrazione da 5 pool eseguita in doppio e in parallelo con tutti e tre sistemi d'estrazione prescelti:

Metodo	Titolo medio pool sieri in copie/ml	Positività	Controllo Interno	Titolo medio doppia estrazione singolo metodo	CV% doppia estrazione con singolo metodo
Trizol LS [®]	10 ^{2.42}	+/+	+/+	10 ^{2.9}	11.14%
	10 ^{3.5}	+/+	+/+	10 ^{3.9}	5.6%
	10 ^{5.87}	+/+	+/+	10 ^{5.98}	6.33%
	10 ^{6.82}	+/+	+/+	10 ^{6.91}	0.27%
	10 ^{6.83}	+/+	+/+	10 ^{6.99}	0.29%
Roche	10 ^{2.42}	-/-	+/+		
	10 ^{3.5}	+/-	+/+		
	10 ^{5.87}	+/+	+/+	10 ^{5.68}	3.44%
	10 ^{6.82}	+/+	+/+	10 ^{6.95}	2.76%
	10 ^{6.83}	+/+	+/+	10 ^{6.7}	6.1%
Macherey	10 ^{2.42}	+/+	+/+	10 ^{1.9}	13.46%
	10 ^{3.5}	+/+	+/+	10 ^{3.1}	14.4%
	10 ^{5.87}	+/+	+/+	10 ^{5.95}	11.77%
	10 ^{6.82}	+/+	+/+	10 ^{6.6}	0.64%
	10 ^{6.83}	+/+	+/+	10 ^{6.8}	1.26%

Tab.1 Confronto titolazioni eseguite in doppio e parallelo con tre sistemi d'estrazione.

Per ognuno sei 5 pools di sieri iniziali è stato calcolato il coefficiente di variazione del logaritmo del titolo ottenuto con i diversi metodi (Tab.2).

Titolo medio pool sieri in copie/ml	CV% log titolo ottenuto con i diversi metodi
$10^{2.42}$	25.1%
$10^{3.5}$	16.3%
$10^{5.87}$	6.55%
$10^{6.82}$	2.75%
$10^{6.83}$	3.3%

Tab.2 Coefficiente di variazione del logaritmo del titolo ottenuto in parallelo con i tre sistemi d'estrazione.

Come prevedibile i coefficienti di variazione sia dei logaritmi dei titoli ottenuti a seguito dell'estrazione di uno stesso campione con metodi diversi che da estrazioni di uno stesso campione col medesimo metodo sono più alti per cariche virali più basse, prossime al limite di sensibilità di 103 copie/ml. L'estrazione con il Kit Roche non ha permesso di rilevare la presenza di virus in campioni con titolo virale intorno a 103 copie per ml. Sono state eseguite diverse prove di estrazione da campioni di linfonodi utilizzando in parallelo il metodo Trizol LS® e il metodo proprio adattato da Boom et al.(1990). Al contrario di quanto accade per i sieri, il 70% dei campioni estratti con Trizol LS® è risultato inibito totalmente. Il rimanente 30% ha dato luogo a titoli da 2 a 4 logaritmi inferiori rispetto al medesimo campione testato con il metodo proprio del laboratorio. Riportiamo di seguito, a carattere esemplificativo, una tabella riassuntiva (Tab.3) dei risultati ottenuti da una prova d'estrazione da 5 omogenati di linfonodi eseguita in doppio e in parallelo con tutti e tre sistemi d'estrazione prescelti:

Metodo	Identificativo	Positività	Controllo Interno	Titolo medio doppia estrazione singolo metodo	CV% doppia estrazione con singolo metodo
Trizol LS®	1	-/-	-/-		
	2	+/+	-/-	$10^{4.2}$	12.5%
	3	-/-	-/-		
	4	-/-	-/-		
	5	-/-	-/-		
Boom	1	+/+	+/+	$10^{7.4}$	0.75%
	2	+/+	+/+	$10^{8.7}$	0.71%
	3	+/+	+/+	$10^{4.7}$	8.3%
	4	+/+	+/+	$10^{4.9}$	8.5%
	5	+/+	+/+	$10^{9.2}$	0.67%
Macherey	1	+/+	+/+	$10^{5.16}$	11.5%
	2	+/+	+/+	$10^{7.5}$	0.68%
	3	-/-	+/+		
	4	+/+	+/+	$10^{4.12}$	10.4%
	5	+/+	+/+	$10^{8.7}$	0.76%

Tab.3 Confronto titolazioni eseguite in doppio e parallelo con tre sistemi d'estrazione.

I campioni di linfonodo estratti con kit Nucleospin DNA Tissue Macherey non hanno mai dato luogo a problemi evidenti d'inibizione. Ciononostante la quantità di PCV2 stimata è sempre risultata inferiore a quella dei campioni estratti con il metodo interno e non ha permesso di rilevare uno dei campioni positivi.

DISCUSSIONE

Quelli descritti sono risultati preliminari, derivanti da un'analisi a scopo orientativo, che non si è posta come obiettivo l'individuazione del miglior metodo d'estrazione del DNA per la titolazione di PCV2 con Real-Time PCR, ma di mettere in luce eventuali punti critici. I dati raccolti offrono lo spunto per importanti riflessioni. Emerge innanzitutto che la scelta del sistema d'estrazione si conferma anche per PCV2 un aspetto fondamentale dell'analisi quantitativa con Real-Time PCR. Prima di applicare metodi d'estrazione utilizzati precedentemente per la ricerca PCV2 con PCR tradizionale o dimostrati validi per altri virus è opportuno procedere ad una valutazione. Si evidenzia inoltre che per ogni tipologia di campione occorre individuare un idoneo sistema d'estrazione, prima che per eventuali differenze in termini di efficienza, per le diverse capacità di eliminare la presenza d'inibitori dell'amplificazione. Quest'ultimo emerge sicuramente come fattore critico fondamentale soprattutto per i campioni di linfonodo, suggerendo che l'utilizzo di un controllo interno d'amplificazione è indispensabile per la valutazione dei risultati.

Bibliografia

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. (1990) "Rapid and simple method for purification of nucleic acids". *J. Virol. Meth.* 28(3), 495-503.

Brunborg I.M., Moldal T., Jonassen C.M. (2004) "Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based Real-Time PCR". *J. Virol. Meth.* 122, 171-178.

Chung W., Chan W., Chaung H., Lien Y., Wu C., Huang Y. (2005) Real-time PCR for quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in naturally-infected and challenged pigs *J. Virol. Meth.* 124, 11-19

Espy M.J, Uhl J.R, Sloan L.M., Buckwalter S. P., Jones M. F., Vetter E. A., Yao J. D. C., Wengenack N. L., Rosenblatt J. E., Cockerill III F. R., and Smith T. F., (2006). Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing *Clin. Mic.Rew.* 19(1), 165-256.

Gunson RN, Collins TC, Carman WF. (2006) "Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting". *J Clin Virol.* 35(4),355-67

Ladekjær-Mikkelsen A.S., Nielsen J., Stadejek T., Storgaad T., Krakowka S., Ellis J., McNeilly F., Allan G., Bøtner A. (2002) "Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2)". *Vet. Microbiol.* 89, 97–114.

Liu Q., Wang L., Willson P., Babiuk A., (2000) "Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome". *J. Clin. Microbiol.* 38, 3474–3477.

Niesters H.G.(2001)"Quantitation of viral load using real-time amplification techniques".*Meth.* 25(4),419-29.

Olvera A., Sibila M., Calsamiglia M., Segalés J., Domingo M. (2004). "Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs". *J. Virol. Meth.* 117, 75–80.

Rosell C., Segalés J., Plana-Duran J., Balasch M., Rodriguez-Arriola G.M., Kennedy S., Allan G.M., McNeilly F., Latimer K.S., Domingo M., (1999). "Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs". *J. Comp. Pathol.* 120, 59–78.

Rovira A., Balaschi M., Segalés J., Garc'ia L., Plana-Duran J., Rosell C., Ellerbrok H., Mankertz A., Domingo M. (2002) " Experimental inoculation of convention pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2". *J. Virol* 76, 3232–9.

Segalés J., Rosell C., Domingo M. (2004) "Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease". *Vet.Microbiol.* 98 (2), 137–149.