

c-DNA of HIV-1 detection on spot of Buffy-Coat of leukocytes (DBCS)

Marco Rossi de Gasperis¹, Maria Daniela Caione¹, Carlo Concato¹, Ersilia Fiscarelli², Nicola Di Pietro³, Vittorio Salotti³, Lorenza Putignani¹, Donato Menichella¹, Francesco Callea²

¹ Dipartimento dei Laboratori- Ospedale Pediatrico Bambino Gesù I.R.C.C.S., Roma, ITALIA;

² GeneDia Lammari (Lucca), ITALIA;

Key words: HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus Type 1), DBS (Dried Blood Spot), DBCS (Dried Buffy Coat Spot)

Ricerca del c-DNA di HIV-1 su spot di Buffy-Coat leucocitario (DBCS)

SUMMARY

Introduction: The elective way for the diagnosis of HIV-1-infection in the window period and in children under the age of 16-18 months is to search virus integrated in leukocytes.

Aim of the study was to assess the sensitivity and specificity of extraction from Buffy-Dried Coat Spot (DBCS) in leukocyte to detect c-DNA with nested-PCR in HIV-1-infected individuals compared to Dried Blood Spot (DBS) both extracted by automated instrument EZ1 (QIAGEN, Hilden, Germany). Both DBCS and both DBS were compared with those tests from whole blood by conventional DNA-extraction

Methods: Five ml of whole blood from 50 HIV-infected individuals were collected. 40 µl of each sample were spotted on "FTA ELUTE Micro Card" (Whatman, Inc., Clifton, NJ), 200 µl were extracted according to the manual procedure (QIAGEN "QIAamp DNA minikit) and the remaining sample was incubated at 37 °C for 120 minutes. Plasma was centrifuged at 1000 rcf/1g for 10 minutes at room temperature. Forty µl of the obtained buffy-coat was spotted. Both DBCS and both DBS were dried at room temperature for 24 hours. Two of 5 punch from each spot were extracted with TISSUE DNA kit (Biorobot EZ1 DSP "Qiagen") and eluted in 50 µl of buffer. The recovery of genomic DNA was measured amplifying the β -globin gene by Real-Time "SybrGreen I". The DNA was amplified for the "pol" gene of HIV-1 by nested PCR and revealed in "SYBR-green I". Eight HIV-antibody-negative samples were used as internal control.

Results: The experimental protocol adopted for the DBCS showed high sensitivity and specificity. The extracted DNA from DBS and DBCS was characterized by excellent quality and without any inhibitory agents. The amount of proviral DNA extracted from DBCS is similar to that obtained by conventional extraction, while the DBS test was significantly less sensitive.

Conclusion: These preliminary data suggest that the amount of c-DNA obtained with DBS technique is often not enough for the diagnosis of HIV-1. Recovery of HIV-1 proviral c-DNA obtained by DBCS assay seems to provide higher sensitivity compared to the DBS-based extraction procedure. Furthermore seems to be equivalent to the whole blood manual extraction yield. Additionally, the SybrGreen I detection system shows a similar sensitivity and specificity compared to the traditional agarose gel detection and appears to be less expensive.

INTRODUZIONE

Il metodo di elezione per diagnosticare l'infezione da HIV-1 nel periodo finestra e nei bambini di età inferiore a 16-18 mesi è la ricerca del virus integrato nei leucociti (c-DNA). Nel 2007 trenta paesi a basso e medio reddito hanno adottato un nuovo metodo per la raccolta del sangue necessario al test diagnostico per l'HIV: il Dried Blood Spot Testing. Il Dried Spot è un interessante e semplice metodo che utilizza una speciale carta da filtro per la campionatura, il trasporto sicuro, la conservazione di campioni biologici e l'esecuzione di test diagnostici in laboratori di riferimento posti in località anche molto distanti dai luoghi di prelevamento.

SCOPO

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare sensibilità e specificità di estrazione da Dried Buffy-Coat Spot (DBCS) leucocitario per la ricerca e la diagnosi in nested-PCR di c-DNA di HIV-1, ed un suo confronto con il Dried Blood Spot (DBS), entrambi estratti per mezzo della strumentazione automatica EZ1 (Biorobot EZ1 DSP, Qiagen). I risultati ottenuti dagli estratti da DBCS e DBS sono confrontati con quelli relativi agli stessi campioni estratti da sangue intero, sui quali è stata eseguita una procedura di estrazione convenzionale.

RAZIONALE

Uno spot di Micro Card (FTA ELUTE Micro Card, Whatman, Inc., Clifton, NJ) di 11 mm di diametro contiene al massimo 40 µl di sangue intero. La metodica relativa all'estrazione da DBS (Dried Blood Spot) applicata alla strumentazione automatica Biorobot EZ1 consiglia di prelevare da uno spot quattro punches da 3.5 mm di diametro per un totale di 27.22 µl di sangue intero. L'estrazione tradizionale manuale per la ricerca del DNA dell'HIV intergrato (QIAMP DNA Blood) utiliz-

za 200 µl di sangue intero che contengono 4-8 µg di DNA in un eluito di 100 µl di buffer. L'estrazione di tutto uno spot di 40 µl di sangue, avente una concentrazione di DNA di circa 0.8-1.6 µg nello stesso volume finale, porta inevitabilmente ad una riduzione di sensibilità dell'indagine confrontata con un'estrazione manuale tradizionale; se a questo aggiungiamo che la metodica prevede di utilizzare quattro punches da 3.5 mm (0.54-1.1 µg di DNA) o due punches da 5 mm (0.55/1.11 µg di DNA), come nel nostro esperimento, nello stesso volume di eluizione (100 µl) abbiamo per la grande differenza di quantità di DNA, rispetto al campione di 200 µl, una ulteriore importante riduzione di sensibilità. Il virus integrato (cDNA dell'HIV) è presente nei leucociti. Il buffy-coat leucocitario ha un contenuto totale in DNA almeno 10 volte superiore a quello presente nella stessa quantità di sangue intero. Se si "spottano" 40 µl di buffy-coat, pari a 3.46-7.73 µg di DNA, e si prelevano ed estraggono come da metodica quattro punches da 3.5 mm o due punches da 5mm (DBCS), si ottiene una quantità di DNA genomico estratto di 2.40/5.37 µg in un volume di 100 µl di eluato. Se inoltre il DNA estratto dai punches viene eluito in 50 µl di buffer invece di 100 µl, come da estrazione standard, la concentrazione raddoppia ottenendo una concentrazione finale di 4.8-10.74 µg/µl di DNA molto simile a quella ottenuta da 200 µl di sangue intero (Tabella 1)

Tabella. 1. Quantità di DNA (µg) nelle tre differenti modalità di estrazione

Quantità di DNA ottenuto da 200 µl di sangue intero ed eluito in 100 µl	4-8
Quantità di DNA ottenuto da 2 punches da 5 mm di sangue intero (DBS) eluiti in 50 µl	1.1-2.2
Quantità di DNA ottenuto da 2 punches da 5 mm di buffy-coat (DBCS) eluiti in 50 µl	4.8-10.74

Corresponding author: Marco Rossi

Dipartimento dei Laboratori - Ospedale Pediatrico Bambino Gesù I.R.C.C.S., Roma, ITALIA - Piazza S. Onofrio 4
E-mail marcorossid@libero.it

MATERIALI E METODI

Sono stati raccolti in tubi "vacutainer" contenenti K₂EDTA 30 campioni di 5 ml di sangue intero provenienti da pazienti HIV-1 positivi ricoverati presso il reparto malattie infettive dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma e 20 campioni raccolti nella missione "Villaggio della Speranza" "Dodoma, Tanzania. Per ogni campione, 40 µl sono stati spottati su "Micro Card FTA ELUTE" (Whatmann), 200 µl sono stati estratti secondo la procedura manuale (QIAGEN "QIAamp DNA minikit") ed il rimanente è stato incubato a 37°C per 120 minuti. Il plasma separato è stato centrifugato a 1000 rcf per 10 minuti a temperatura ambiente. Il buffy-coat ottenuto è stato "spottato" sulle medesime

"Card" in ragione di 40 µl. I DBS e i DBCS (Dried Buffy-Coat Spot) sono rimasti ad asciugare a temperatura ambiente per 24 ore. Due punches da 5 mm prelevati da ogni spot sono stati estratti con il kit DNA TISSUE (Biorobot EZ1 DSP "Qiagen") ed eluiti in 50 µl di buffer. Il "recovery" del DNA genomico è stato misurato amplificando il gene della β-globina in Real-Time "sybr-green I" (Tabella 2). Gli estratti sono stati amplificati per il locus "pol" codificante la proteina integrasi del virus HIV-1 mediante nested-PCR e rilevazione in "Sybr-green I" (Tabella 2). Otto campioni HIV-Ab neg sono stati usati come controllo di specificità del test basato sul gene *pol*. (Tabella 3)

Tabella 2. Sequenze dei primers utilizzati nel corrente studio

Sequenze dei primers (5'-3') per la β-globina	
Beta globina 1 fwd : aca caa ctg tgt tca cta gc	Frammento circa 110 bp
Beta globina 2 rev : caa ctt cat cca cgt tca cc	
Sequenze dei primers (5'-3') per il gene pol codificante l'integrasi dell'HIV-1	
pol fwd EST: agg att cRg gat Yag aag taa aYa tag t	
pol rev EST: tgt cct gtt tct gct ggR ata acY tct gc	Frammento circa 349 bp
pol fwd INT: aat cag aRt tag tca Rtc aaa taa tag a	
pol rev INT: cct tct aaa tgt gta caa tct aRt tgc ca	

Tabella 3. controllo di specificità del test basato sul gene *pol*.

ID n°	Ctβ-globina		Ctβ-globina Estrazione DBS	Ct PCR pol	
	Estrazione Standard	Estrazione DBCS		Estrazione standard	DBCS
1	18.58	18.02	25.22	≥ 50	≥ 50
2	18.62	19.70	28.92	≥ 50	≥ 50
3	16.25	16.54	24.60	≥ 50	≥ 50
4	16.44	17.46	25.24	≥ 50	≥ 50
5	18.08	19.49	25.95	≥ 50	≥ 50
6	20.52	20.72	27.78	≥ 50	≥ 50
7	18.63	21.28	25.80	≥ 50	≥ 50
8	17.12	21.12	24.80	≥ 50	≥ 50

(Ct = numero minimo di cicli in PCR Real-Time per osservare la positività del test)

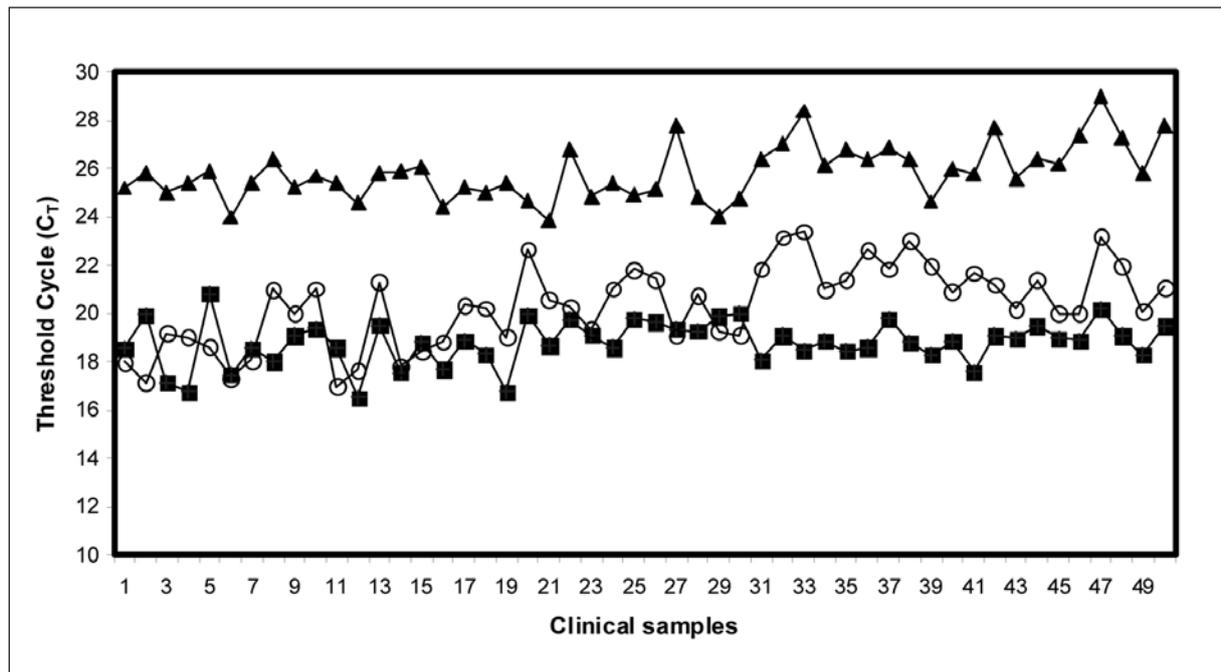


Figura 1. Confronto fra le diverse quantità di β-globina ottenute utilizzando le tre tipologie di estrazione: sangue intero, DBS e DBCS (sono indicate come Ct). ■, β-globin Ct per sangue intero trattato con estrazione manuale (standard); ▲, β-globin Ct per DBS trattato con estrazione automatica; ○, β-globin Ct per DBCS trattato con estrazione automatica.

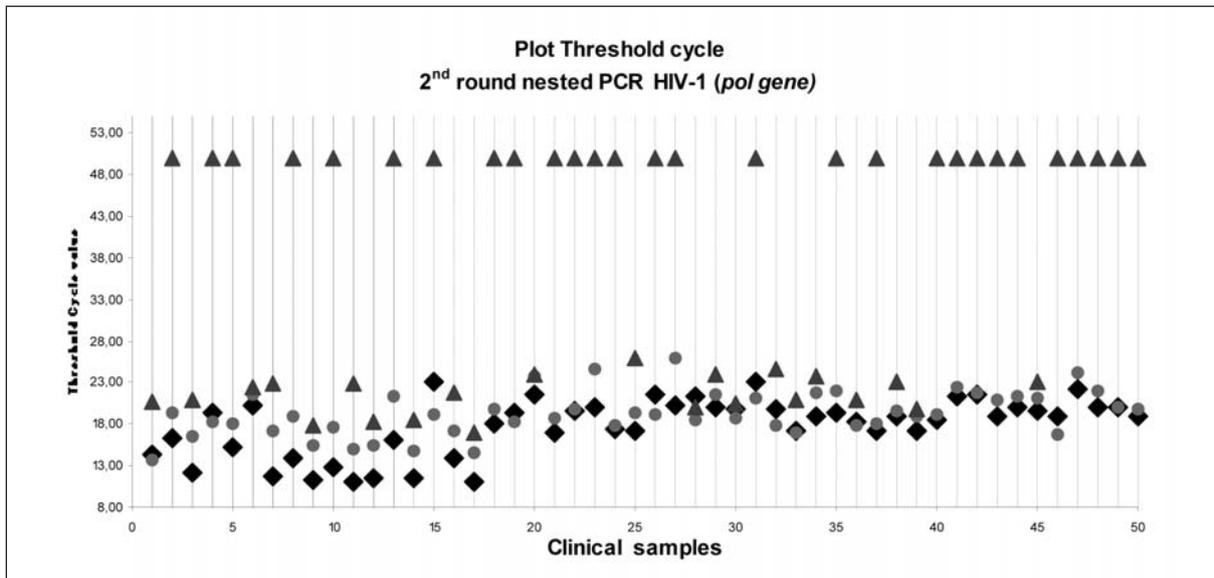


Figura II. Determinazione e confronto di diagnosi HIV-1 mediante gene pol eseguita nelle tre differenti tipologie di estrazione: sangue intero, DBS e DBCS. ◇, pol Ct per sangue intero trattato con estrazione manuale (standard); ▲, pol Ct per DBS trattato con estrazione automatica; ●, pol Ct per DBCS trattato con estrazione automatica.

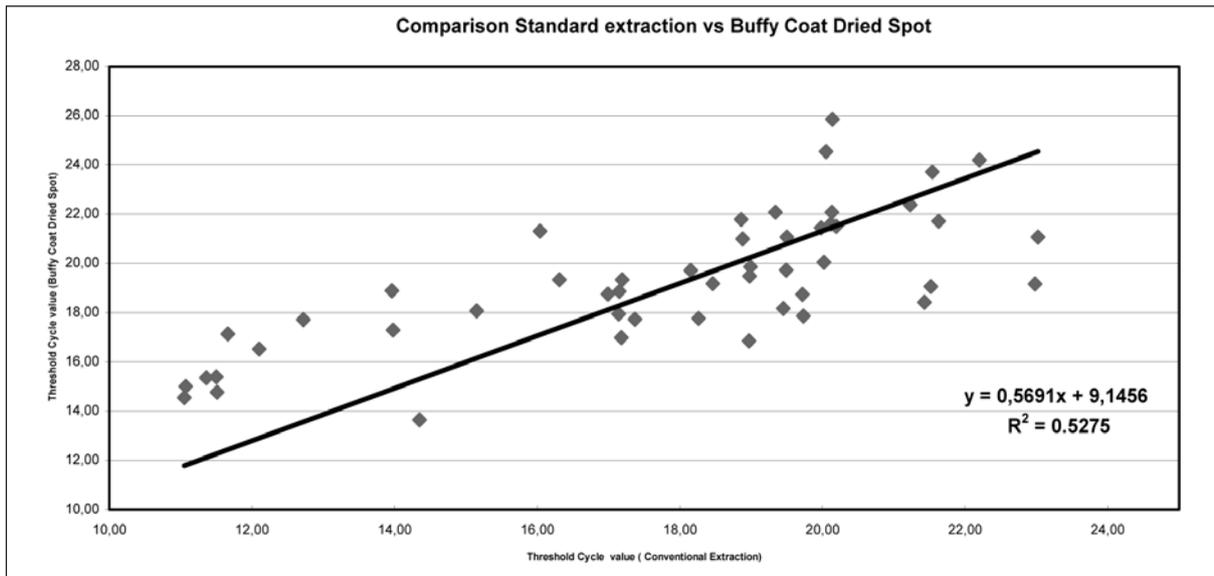


Figura III. Regressione lineare relativa ai Ct ottenuti al 2nd round della Nested-PCR, del gene pol del HIV-1: comparazione tra metodo standard (asse delle X) e DBCS (asse Y).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il protocollo sperimentale adottato per la rilevazione del c-DNA di HIV-1 a partire da spot di buffy-coat leucocitario è risultato un sistema dotato di un'elevata sensibilità. I risultati sperimentali confermano le considerazioni teoriche sull'efficienza di estrazione relative al "recovery" del gene della β-globina; la quantità di DNA estratto dai DBCS è infatti molto simile a quanto è possibile ottenere a seguito di un'estrazione manuale. La quantità di DNA provirale integrato ricavato mediante rivelazione in Real-Time PCR ed espresso in cicli soglia (Ct), risulta sovrapponibile, sia che vengano estratti a partire da DBCS che in maniera convenzionale; mentre il test eseguito su DBS risulta essere significativamente meno sensibile. Le evidenze sperimentali dimostrano che la quantità di c-DNA recuperabile da DBS spesso non è sufficiente per la ricerca del c-DNA dell'HIV-1, nonostante l'utilizzo di tecniche d'amplificazione Nested-PCR. Il

sistema di rivelazione in "Sybr Green I" è altrettanto specifico di quello tradizionale basato su gel di agarosio in quanto consente la verifica della corretta amplificazione del bersaglio mediante curva di dissociazione assicurando di fatto praticità, rapidità, e sensibilità del saggio.

BIBLIOGRAFIA

1. Alvarez-Munoz *et al.* 2005 High correlation of human immunodeficiency virus type-1 viral load measured in dried-blood spot samples and in plasma under different storage conditions. *Arch. Med. Res.*36:382-386
2. Barbi *et al.* 2006. Diagnosis of congenital CMV infection via dried blood spots. *Rev. Med. Virol.* 16:385-392
3. Children and AIDS. Third Stocktaking Report.2008 Unicef publication
4. De Cock *et al.* 2000 Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource poor countries: translating research into policy and practice. *JAMA* 283:1175-1182
5. Dunn *et al.*1995 The sensitivity of HIV-1 DNA polymerase chain reaction in the neonatal period and the relative contributions of intra-uterine and intra-partum transmission. *AIDS*9:F7-F11
6. EZ1 DNA Handbook, Qiagen, III edition 2009.