

Ana Esteban Vazquez^a, Eduardo Malmierca Corral^{b,*}^a Servicio de Reumatología, Hospital Universitario Infanta Sofía, Spain^b Servicio de Medicina Interna/Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Infanta Sofía, Universidad Europea de Madrid, Spain

* Corresponding author.

E-mail address: edumalmi@yahoo.es (E. Malmierca Corral).<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.10.005>

0213-005X/ © 2019 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Estabilidad del ARN viral en muestras clínicas para el diagnóstico viral



Stability of viral RNA in clinical specimens for viral diagnosis

En biología molecular la conservación del material genético de muestras clínicas es clave cuando se realizan experimentos con ARN. Por ello, es importante tomar las máximas precauciones para evitar su degradación, principalmente por las ARNasas que pueden provocar la fragmentación del material genómico. Estas son proteínas robustas con actividad enzimática que participan en procesos fisiológicos diversos y su función principal es hidrolizar y degradar el ARN, además se pueden introducir en los experimentos de forma exógena^{1,2}.

Cuando las muestras clínicas se mantienen en el laboratorio largos períodos de tiempo, el ARN de las mismas es especialmente vulnerable a la degradación^{3,4}, lo que podría influir en el diagnóstico viral al disminuir la sensibilidad de las técnicas de amplificación.

Diversos estudios han demostrado que los inhibidores de ribonucleasas presentan un amplio espectro de actividades inhibitorias contra las ARNasas, protegiendo eficazmente el ARN durante los procedimientos de laboratorio lo que permite una gran flexibilidad en el diseño experimental. Su utilización puede ser una solución para minimizar estos problemas de degradación^{5–7}.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la integridad del ARN viral de muestras clínicas tras su almacenaje a 4°C, después de un periodo de tiempo de trabajo estándar (10 días), que se considera suficiente para realizar todos los procesos rutinarios que implica el diagnóstico viral de una muestra, y analizar la eficacia y el rendimiento de un inhibidor de ARNasas para evitar su degradación.

De las muestras procesadas en la Unidad de Virología del Hospital Central de Asturias durante 2 meses, se estudiaron 67 exudados (42 nasofaríngeos y 25 faríngeos) recogidos en un medio de trans-

porte de virus. Se llevó a cabo una extracción y purificación del material genómico con el Reactivo MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, en el sistema automático MagNA Pure LC 2.0 (Roche Diagnostics, Suiza). Se obtuvieron 100 µl para una posterior amplificación de fragmentos de genoma viral y se aplicaron protocolos de diagnóstico sindrómico del laboratorio. En todos ellos se evaluaba la cantidad y la calidad de la muestra, y con la amplificación del gen de la β-globina humana se informaba la carga viral normalizada (por número de células). Del extracto nucleico total se separaron 2 alícuotas de 10 µl y en una se añadió 1 µl RNase[®] Inhibitor (Applied Biosystems, EE. UU.), ambas se almacenaron a 4°C.

Las 67 muestras incluidas fueron sometidas al proceso diagnóstico habitual en el laboratorio para enterovirus (n: 53), parainfluenzavirus (n: 11) e influenza A (n: 3). A los 10 días, a las 2 alícuotas almacenadas se les volvió a realizar la misma PCR y se compararon los ciclos de amplificación (Ct) con y sin inhibidor. También se dividieron en 3 grupos según su Ct (< 20, 20–25 y 25–35 ciclos) y el tipo de virus.

Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el programa para ordenador, GraphPad InStat v2.04a (GraphPad Software, EE. UU.) según los requerimientos específicos.

En la [tabla 1](#) observamos que en todas las muestras estudiadas se evidencia la presencia de ARN viral, y en ningún grupo se encontraron diferencias estadísticamente significativas a los 10 días independientemente de añadir o no inhibidor. Además, la media de los Ct no varía de manera significativa en ningún virus.

Las muestras repitieron el rango de amplificación en 59 (88,1%) de las ocasiones después de 10 días, y en 58 (86,6%) de los casos, cuando a la muestra extraída se la añadió RNasin[®].

El presente estudio demuestra que, aunque el uso de RNasin[®] suele estar recomendado en los protocolos de manejo de virus ARN, no parece imprescindible, al menos en los virus estudiados. En algún caso disminuyó ligeramente el rendimiento en las muestras con y sin inhibidor, y es importante señalar que ninguna muestra resultó indetectable después de 10 días.

Así pues, mantenemos que para estudios virales que se realicen en un periodo de 10 días conservados a 4°C no disminuye la capacidad diagnóstica y no sería necesario añadir reactivos preservantes lo que disminuiría la manipulación de las muestras y además no supondría un aumento en el coste de las pruebas diagnósticas. Sería útil realizar estudios en periodos de tiempo más largos para establecer a partir de qué tiempo la posible degradación del ARN podría ser minimizada al utilizar un inhibidor enzimático.

Financiación

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este trabajo.

Bibliografía

- Green MR, Sambrook J. How to Win the Battle with RNase. *Cold Spring Harb Protoc.* 2019;2019, <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.top101857>.
- Hook B, Hendricksen A, Schagat T. RNase Inhibition: A Head-to-Head Comparison of Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor to RNaseOUT[™]

Tabla 1
Resultados de los Ct en cada uno de los protocolos y media de ellos según el tipo de virus

Ct	Con (sin) inhibidor	Con (sin) inhibidor			Valor de p
		<20	20–25	25–35	
Ct					
<20 n = 18		16 (16)	2 (2)	0 (0)	Ns
20–25 n = 31		4 (1)	20 (24)	7 (6)	Ns
25–35 n = 18		0 (0)	3 (3)	15 (15)	Ns
		Estándar	Con inhibidor	Sin inhibidor	
		24,78 ± 3,44 (21–28)	25,07 ± 2,37 (22–27)	25,28 ± 2,44 (22–27)	
Virus					
IA n = 3		28,67 ± 4,16 (24–32)	28,34 ± 3,78 (24–31)	28,67 ± 5,13 (23–33)	Ns
PIV n = 11		23,54 ± 5,80 (15–30)	24,09 ± 5,75 (17–31)	24,18 ± 5,87 (17–32)	Ns
ETV n = 53		22,13 ± 4,12 (12–29)	22,79 ± 5,53 (11–36)	23,00 ± 5,25 (12–34)	Ns

Ct: ciclos de amplificación; ETV: enterovirus; IA: Influenza A virus; Ns: no significativo; PIV: Parainfluenza virus.

- Recombinant Ribonuclease Inhibitor [consultado 24 Jul 2019] Disponible en: <http://www.promega.es/resources/pubhub/head-to-head-comparison-of-recombinant-rnasin-inhibitor-to-rnaseout-rnase-inhibitor>.
3. Matos RG, Casinhas J, Bárria C, dos Santos RF, Silva IJ, Arraiano CM. The Role of Ribonucleases and sRNAs in the Virulence of Foodborne Pathogens. *Front Microbiol.* 2017;8:910.
 4. Arraiano CM, Andrade JM, Domingues S, Guinote IB, Malecki M, Matos RG. The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiol Rev.* 2010;34:883–923, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00242.x>.
 5. Hendricksen A, Hook B, Schagat T. RNase contamination happens recombinant RNasin inhibitor can safeguard your samples [consultado 24 Jul 2019] Disponible en: <https://www.promega.com/resources/pubhub/rnase-contamination-happens-recombinant-rnasin-inhibitor-can-safeguard-your-samples/>.
 6. Bratz M, Hook B, Schagat T. Recombinant RNasin ribonuclease inhibitor protects RNA without affecting analyses [consultado 24 Jul 2019] Disponible en: <https://www.promega.com/resources/pubhub/recombinant-rnasin-ribonuclease-inhibitor-protects-rna-without-affecting-analyses/>.
 7. Gibson KE, Schwab KJ, Spencer SK, Borchardt MA. Measuring and mitigating inhibition during quantitative real time PCR analysis of viral nucleic acid extracts from large-volume environmental water samples. *Water Res.* 2012;46:4281–91.

Xana García Fernández*, Marta E. Álvarez-Argüelles,
Susana Rojo y María de-Oña

*Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias,
Oviedo, Asturias, España*

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: xanagarcia2009@hotmail.com

(X. García Fernández).

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.09.010>

0213-005X/ © 2019 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.