

Estabilidad de curvas de transcritos del virus de la hepatitis C empleadas para cuantificar su ácido ribonucleico

✉ Yenitse Perea¹, Anny Armas¹, Yaimé J González¹, Celia M Laza²

¹Laboratorio de Biología Molecular, Subdirección de Inmunoquímica

²Departamento Central de Matemática y Programación

Centro de Inmunoensayo, CIE

Calle 134 y Ave. 25, AP 6653, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba

E-mail: iqbmolecular4@cie.sld.cu

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud estima que la prevalencia del virus de la hepatitis C (VHC) es del 3%, lo que representa aproximadamente 170 millones de personas infectadas en el mundo. Para la confirmación del diagnóstico del VHC, es importante la detección del ácido ribonucleico (ARN) del virus en el suero o plasma humano, por métodos de amplificación de ácidos nucleicos. La determinación cuantitativa del ARN viral circulante permite predecir la respuesta al tratamiento y monitorear la terapia antiviral. El objetivo de este trabajo fue estudiar la estabilidad de curvas de cuantificación construidas a partir de un transcrito de VHC, como componentes de un ensayo de Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) competitivo utilizado para la cuantificación del ARN del VHC en muestras de suero o plasma humano. Se estudiaron las curvas hasta los 18 meses, y en cada tiempo se cuantificaron contra una curva preparada en el momento, utilizando un estándar de cuantificación interno diluido en un tampón de lisis. A partir de cada punto de la curva se extrajo el ARN y se amplificó mediante RT-PCR competitiva y detección fluorimétrica, con el empleo de sondas específicas para los amplicones del VHC y del estándar de cuantificación interno. Los resultados de este análisis mostraron que en cada punto de la curva, el ARN fue estable en todos los tiempos estudiados. Ello posibilita preparar curvas en el tampón de lisis que contiene el estándar de cuantificación interno, de manera que se puedan usar en ensayos de determinación de la carga viral del VHC.

Palabras clave: ARN, VHC, cuantificación

Biotechnología Aplicada 2009;26:218-221

ABSTRACT

Stability of standard curves of hepatitis C virus transcripts used for viral quantification. The World Health Organization currently estimates the prevalence of hepatitis C virus (HCV) infections to be around 3%, representing approximately 170 million of infected people worldwide. An important step in the confirmatory diagnosis of HCV is the detection of its ribonucleic acid (RNA) in human serum or plasma, using nucleic acid amplification methods. Likewise, the measurement of HCV RNA viral loads by these methodologies is important for monitoring the therapeutic efficacy of antiviral drugs and monitor disease progression in HCV-infected individuals. The aim of this work was to study the stability of external curves built with different concentrations of an HCV transcript, which are used as components of a competitive Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) assay for the quantification of HCV RNA in human serum or plasma samples. The curves were studied for a period of 18 months by quantification at each time point against a fresh external curve, using an internal standard diluted in lysis buffer. RNA was extracted from each point of the curve and amplified by competitive RT-PCR, using a fluorimetric detection scheme based on the use of separate, specific probes for the HCV amplicons or the internal quantification standard. The results obtained in this work demonstrated that the RNA from each point of the quantification curve remained stable for all studied time points, allowing the use of ready-to-use curves, prepared in lysis buffer containing the internal quantification standard, for HCV viral load assays.

Keywords: RNA, HCV, quantification

Introducción

La Organización Mundial de la Salud estima que la prevalencia del virus de la hepatitis C (VHC) es del 3%, lo que representa aproximadamente 170 millones de personas infectadas en el mundo [1, 2]. Esa infección puede manifestarse como una hepatitis aguda, frecuentemente asintomática, que puede llevar a la infección crónica en un 70% de los infectados. Tales pacientes habitualmente son asintomáticos por períodos prolongados. Aproximadamente el 20% de ellos desarrollará una cirrosis hepática a los 20 años de evolución [3]. Los pacientes que han desarrollado cirrosis, además del riesgo de la insuficiencia hepática y la necesidad de trasplante, pueden desarrollar carcinoma hepatocelular. Hoy la infección por el VHC es la principal causa de trasplante hepático y de hepatocarcinoma en el mundo occidental [4, 5], por lo

que constituye una causa significativa de morbilidad y mortalidad hepática.

El examen que se prefiere para el diagnóstico del VHC es la determinación de anticuerpos anti-hepatitis C, que es altamente sensible. La serología positiva debe confirmarse con un examen adicional, para la detección del ARN viral circulante mediante Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR), que es la técnica más empleada. La determinación cuantitativa del ARN viral circulante (o "carga viral"), mediante RT-PCR permite predecir la respuesta al tratamiento y monitorear la terapia antiviral [6].

Los controles y estándares de ARN sintético o viral son muy sensibles a la degradación por ribonucleasas, por ello al estar contenidos dentro de una solución

1. Soza RA, López-Lastra M. Hepatitis C en Chile: Magnitud del problema. *Rev Méd Chile* 2006;134:777-88.

2. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005;5:558-67.

3. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:35-46.

4. García M, Bárcena R. Hepatocarcinoma y trasplante hepático. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; v. 98 n. 12.

5. Herrero JI, Pardo F, Quiroga J, Rotellar F. Trasplante hepático. *Anales* 2006; Vol. 29, suplemento 2.

estabilizadora (tampón de lisis) se encuentran protegidos de la acción de las ribonucleasas y presentan una mayor estabilidad. Disponer de controles y estándares con una larga estabilidad permite hacer estimaciones correctas de los valores de carga viral del virus de la Hepatitis C por un mayor período.

En el presente trabajo, se estudió la estabilidad de curvas de cuantificación construidas a partir de un transcritos de VHC, como componentes de un ensayo de RT-PCR competitivo utilizado para la cuantificación del ARN del VHC en muestras de suero o plasma humano.

Materiales y métodos

Preparación de las curvas de cuantificación

Los estándares se obtuvieron por transcripción *in vitro* a partir de plásmidos que contenían la secuencia del VHC o del estándar de cuantificación interno. Se diluyeron en una solución estabilizadora (tampón de lisis) [7] hasta el momento de la preparación de las curvas.

La composición del tampón de lisis fue: 0.3 - 0.6 M de tiocianato de amonio; 0.4 - 0.8 M de tiocianato de guanidina; 35 - 40% (v/v) fenol; 5 - 8% (v/v) glycerol; 0.1 - 0.3 M acetato de sodio, pH 4 - 6 y 0.05 - 0.1 mg/mL de ARN heterólogo. Esta solución es igualmente efectiva en todo el rango de concentraciones dadas, y es estable durante dos años cuando se almacena a 4 °C y permanece protegida de la luz. El tampón de lisis permite lisar los viriones en el proceso de aislamiento de los ácidos nucleicos, y constituye un ambiente protector que favorece la estabilización de los ácidos nucleicos contenidos en él.

El estudio de estabilidad se diseñó teniendo en cuenta las diferentes formas de presentación de las curvas, con el objetivo de seleccionar cuál de estas sería más estable, para finalmente escogerla como componente de un ensayo RT-PCR competitivo. Se estudiarían tres tipos de curvas: una curva lista para el uso, una curva que sería reutilizada y una curva preparada en el momento del estudio a partir de un transcritos del VHC con una concentración de 850 000 UI/mL de ARN, que identificamos como curva concentrada. La concentración de los transcritos se obtuvo a partir de un método espectrofotométrico por medición de la densidad óptica a 260 nm.

Las curvas se prepararon partiendo de un transcritos del VHC conservado en tampón de lisis, con una concentración de 1.43×10^{14} UI/mL, y estaban formadas por tres puntos: 2410 UI/mL, 11 300 UI/mL y 66 400 UI/mL, que se analizaron por triplicado en todos los tiempos estudiados.

Teniendo en cuenta los volúmenes requeridos para la curva lista para el uso y la reutilizada, se preparó un único lote de tampón de lisis con transcritos del VHC a diferentes concentraciones: 2410 UI/mL, 11 300 UI/mL y 66 400 UI/mL. También se preparó un único lote de un control de calidad (punto de concentración intermedia con respecto a los puntos de la curva de cuantificación, para saber si la cuantificación se hizo correctamente) para las tres curvas, a partir de un transcritos del VHC a una concentración de 6880 UI/mL. Como competidor, el tampón de lisis para esta preparación contenía un estándar de cuantificación interno, formado por un transcritos en su dilución de competencia.

Se alicuotaron estos tres puntos (2410 UI/mL, 11 300 UI/mL y 66 400 UI/mL) en viales de polipropileno con tapas de rosca (Greiner, Alemania), según correspondió al tipo de curva: para la curva lista para el uso se hicieron alicuotas de 600 μ L; para la curva reutilizada, alicuotas de 1.2 mL; y para la curva concentrada se prepararon alicuotas de 700 μ L de un transcritos del VHC con una concentración de 850 000 UI/mL.

Durante el estudio las curvas se conservaron de 2 a 8 °C.

Diseño del estudio de estabilidad de cada curva

La frecuencia de estudio de la curva lista para el uso (o intacta) fue de 0, 4, 7, 8, 10, 12, 15 y 18 meses; la de la curva después de haber sido empleada una vez (o reutilizada), fue de 0, 4, 6, 7 y 8 meses; la curva preparada a partir de un transcritos del VHC con una concentración de 850 000 UI/mL de ARN (o concentrada), fue de 0, 7 y 12 meses. Esas curvas tienen diferentes frecuencias de estudio debido al interés del fabricante en cuanto a la estabilidad del componente que necesita, a la capacidad de trabajo y al objetivo perseguido con cada una de ellas.

De la curva intacta se tomó una alicuota de cada uno de sus tres puntos y del control de calidad, y se sometieron a una ligera homogenización. Luego se tomaron 500 μ L de cada punto para proceder a su extracción. Con la curva reutilizada se procedió de la siguiente forma: en el tiempo inicial del estudio se extrajeron 600 μ L a todas sus alicuotas de 1200 μ L para llevarlas a la condición de reutilizadas, y el resto del contenido se conservó entre 2 °C y 8 °C en los frascos herméticamente cerrados, los cuales se utilizaron de acuerdo con los tiempos de estudio seleccionados. En cada tiempo de estudio de la curva concentrada, se procedió a hacer diluciones a partir del punto concentrado de 850 000 UI/mL para llegar a las concentraciones deseadas de 2410 UI/mL, 11 300 UI/mL y 66 400 UI/mL.

En cada estudio de estabilidad se preparó una curva control, formada por tres puntos de concentraciones conocidas, construida a partir de un transcritos del VHC en tampón de lisis, con una concentración de 1.43×10^7 UI/mL.

Extracción de ARN

El ARN del VHC se aisló a partir de 500 μ L de cada punto de las curvas de cuantificación y del control de calidad, a los que se añadieron 150 μ L de criosobrenadante humano negativo al VIH, al VHB y al VHC. Para la extracción del ARN se empleó una modificación optimizada del método del fenol-cloroformo de Chomczynski [8]. Para la precipitación del ARN se emplearon 500 μ L de isopropanol (Merck, Alemania). El precipitado se lavó con etanol (Merck, Alemania) al 75%, y posteriormente con acetona (Merck, Alemania). Por último, el ARN se resuspendió en agua libre de ribonucleasas.

Transcripción inversa-amplificación RT-PCR competitiva

Para el ensayo de RT-PCR competitiva se emplearon cebadores de la región 5' no codificante del genoma del virus de la hepatitis C. El estándar de cuantifica-

6. Schutten M, Peters D, Back NKT, Beld M et al. Multicenter Evaluation of the new Abbott realtime assays for quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus RNA. J. Clin Microbiol 2007;45:1712-7.

ción interno contenido en el tampón de lisis se diseñó para que fuera coamplificado con la secuencia del VHC, con una secuencia de 168 pb. La función de compensar la variabilidad entre los tubos durante la extracción del ARN y la amplificación, permitió además detectar posibles sustancias inhibitorias de la amplificación que podían estar en la muestra. El programa para la amplificación fue el siguiente: primeramente un paso a 45 °C durante 30 min, seguido de un paso de desnaturalización a 95 °C durante 3 min, 50 ciclos térmicos (95 °C, 30 s; 67 °C, 30 s; 72 °C, 30 s), y por último, un paso de extensión a 72 °C durante 7 min en un MasterCycler Gradient (Eppendorf).

Detección de los productos amplificados

Los amplicones se desnaturalizaron e hibridaron en placas de poliestireno recubiertas con sondas específicas para los amplicones del VHC y del estándar de cuantificación interno. La detección fluorimétrica fue a través de un lector Plate Reader-521 (Suma, Cuba) conectado a una computadora, para el análisis de los resultados, mediante el programa Strips Reader Software, versión 9, TecnoSuma S.A., Cuba.

Método de cuantificación

Se construyó una curva de calibración externa mediante el método de regresión lineal, formada por el logaritmo común de la carga viral teórica de los puntos de la curva, y el logaritmo común de la relación entre la señal de fluorescencia del VHC y la señal de fluorescencia del estándar de cuantificación interno. Se estimó la carga viral de las muestras desconocidas, interpolando su correspondiente logaritmo común de la relación entre la señal de fluorescencia del VHC y la señal de fluorescencia del estándar de cuantificación interno en la curva de calibración externa.

Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico se empleó el método de correlación lineal entre variables mediante el programa Statistica 6. El coeficiente de correlación se calculó entre los \log_{10} de las concentraciones a tiempo cero contra los \log_{10} de las concentraciones correspondientes a los distintos tiempos estudiados. El coeficiente de correlación mayor o igual que 0,9, indicaba una alta correlación lineal entre las variables.

Resultados y discusión

Estabilidad de la curva intacta

Se estudió la estabilidad de la curva intacta y del control de calidad, y se cuantificaron en los diferentes periodos, con una curva preparada en el momento del ensayo. Se trabajó con los logaritmos de las concentraciones obtenidas a partir de los tres puntos de la curva intacta y para el control de calidad, y se halló la diferencia logarítmica de estos con respecto al tiempo inicial, para entonces corroborar su estabilidad en el tiempo (Tabla 1).

En todos los periodos estudiados, las diferencias logarítmicas de los tres puntos de la curva intacta y del control de calidad estuvieron en ± 0.5 unidades logarítmicas: rangos de variabilidad aceptados en ensayos similares de carga viral y que no se consideran significativos [9, 10].

Tabla 1. Curva intacta y control de calidad cuantificados con la curva preparada al momento

Tiempo (meses)	Intacta CP1 ^a	Intacta CP2 ^a	Intacta CP3 ^a	CC ^b
	$\log_{10} C^c$	$\log_{10} C$	$\log_{10} C$	$\log_{10} C$
0	3.207	3.888	4.726	4.039
4	3.683	4.145	4.556	4.152
7	3.420	4.188	4.708	3.802
8	3.087	3.972	4.781	4.035
10	3.300	4.248	5.040	3.577
12	3.299	3.770	4.362	3.731
15	3.205	4.140	4.455	3.560
18	3.306	4.175	4.697	3.943

^aSon los tres puntos de la curva reutilizada con las siguientes concentraciones: CP1 (2410 UI/mL), CP2 (11 300 UI/mL), CP3 (66 400 UI/mL).

^bControl de calidad del ensayo con la siguiente concentración (6880 UI/mL).
^c $\log_{10} C$: logaritmo común de la concentración promedio de ARN en el VHC.

En el estudio de estabilidad de la curva intacta, los coeficientes de correlación entre los \log_{10} de la concentración a tiempo 0 frente a los \log_{10} de la concentración, correspondientes a los diferentes tiempos analizados, oscilaron entre 0.900 y 0.996, lo que demuestra una alta correlación entre los valores observados.

Estabilidad de la curva reutilizada y concentrada

La estabilidad de la curva reutilizada y su control de calidad y la curva preparada a partir de un punto concentrado y su control de calidad, se estudiaron de la misma forma que para la curva intacta: se cuantificaron en los diferentes periodos, con una curva preparada en el momento del ensayo. Se trabajó con los logaritmos de las concentraciones obtenidas para los tres puntos de las curvas, y sus respectivos controles de calidad. Se halló la diferencia logarítmica de estos con respecto al tiempo inicial, para con ello corroborar su estabilidad en el tiempo (Tablas 2 y 3). Los resultados fueron similares a los de la curva intacta: la diferencia logarítmica de los tres puntos de las curvas y del control de calidad oscilaron en ± 0.5 unidades logarítmicas, rangos de variabilidad aceptados en ensayos similares de carga viral y que no se consideran significativos [9, 10].

En el estudio de estabilidad de la curva reutilizada, los coeficientes de correlación entre los \log_{10} de la concentración a tiempo 0 contra los \log_{10} de la concentración correspondientes a los diferentes tiempos estudiados oscilaron entre 0.976 y 0.999, lo que demuestra una alta correlación entre los valores observados. De igual forma los coeficientes de correlación para la curva concentrada fueron de 0.983 para los tiempos estudiados.

Tabla 2. Curva reutilizada cuantificada con la curva preparada al momento

Tiempo (meses)	Reutilizada CP1 ^a	Reutilizada CP2 ^a	Reutilizada CP3 ^a	CC ^b
	$\log_{10} C^c$	$\log_{10} C$	$\log_{10} C$	$\log_{10} C$
0	3.207	3.888	4.726	3.657
4	3.701	4.108	4.668	4.152
6	3.274	4.310	4.942	4.009
7	3.407	3.979	4.686	3.831
8	3.237	4.010	4.577	3.746

^aSon los tres puntos de la curva reutilizada con las siguientes concentraciones: CP1 (2410 UI/mL), CP2 (11 300 UI/mL), CP3 (66 400 UI/mL).

^bControl de calidad del ensayo con la siguiente concentración (6880 UI/mL).
^cLogaritmo común de la concentración promedio de ARN del VHC.

7. González I, García I, Armas A, Perea Y, González YJ *et al.* Scaling up *in vitro* transcription synthesis of RNA standards for competitive quantitative RT-PCR: Looking for bigger yields. *Anal Biochem* 2009;385:179-81.

8. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA, and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 1993;15:532-5.

9. Holodniy M, Rainen L, Herman S. Stability of plasma human immunodeficiency virus load in VACUTAINER PPT plasma preparation tubes during overnight shipment. *J Clin Microbiol* 2000;38:323-6.

10. Schirm J, Van Loon AM, Valentine-Thon E, Klapper PE, Reid J, Cleator GM. External quality assessment program for qualitative and quantitative detection of hepatitis C virus RNA in diagnostic virology. *J Clin Microbiol* 2002;40:2973-80.

Tabla 3. Curva preparada a partir de un punto concentrado (curva concentrada), cuantificada con la curva preparada al momento

Tiempo (meses)	Reutilizada CP1 ^a	Reutilizada CP2 ^a	Reutilizada CP3 ^a	CC ^b
	Log ₁₀ C ^c	Log ₁₀ C	Log ₁₀ C	Log ₁₀ C
0	3.735	4.410	4.950	4.039
7	3.384	3.969	4.626	3.831
12	3.329	3.956	4.831	3.766

^aSon los tres puntos de la curva reutilizada con las siguientes concentraciones CP1 (2410 UI/mL), CP2 (11300 UI/mL), CP3 (66400 UI/mL).

^bControl de calidad del ensayo con la siguiente concentración (6880 UI/mL).

^cLogaritmo común de la concentración promedio de ARN del VHC.

El comportamiento similar de las cuatro curvas a los siete meses de estudio se representan en la figura 1: curva intacta con un coeficiente de determinación ($R^2 = 0.980$) y pendiente ($b = 0.669$), curva reutilizada ($R^2 = 0.966$; $b = 0.699$), concentrada ($R^2 = 0.959$; $b = 0.688$) y curva preparada al momento ($R^2 = 0.959$; $b = 0.688$).

Los resultados permiten que la curva intacta se emplee en diferentes métodos diagnósticos para la cuantificación del virus de la hepatitis C, ya que es estable durante 18 meses, y se puede reutilizar durante 8 meses luego de empleada una vez.

La conservación del ARN en lisados de isotiocianato de guanidina es efectiva a temperaturas de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ [11]. El tiocianato de guanidina es otro agente caotrópico frecuentemente usado para inhibir la acción de las ribonucleasas en los procedimientos de aislamientos de ácidos nucleicos [12]. Usualmente se combina con beta-mercaptoetanol para aislar el ARN proveniente de tejidos ricos en ribonucleasas [13]. Algunos trabajos mencionan el uso del tiocianato de guanidina para la dilución del ARN o para su conservación.

Varios investigadores han referido al isotiocianato de guanidina como un agente estabilizante a temperaturas por debajo de cero. Para este propósito, los agentes caotrópicos se usan a altas molaridades, en el rango de 4 a 6 M, y son los más comúnmente usados en métodos de aislamiento de ácidos nucleicos. Estudios recientes refieren la casi total degradación del ARN, después de las 12 h de almacenamiento a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, en 4 M de tiocianato de guanidina [14].

La conservación del ARN en el tampón de lisis es muy ventajosa, porque se prepara fácilmente y no afecta su composición, lo que permite su utilización en la mayoría de las aplicaciones de la biología molecular como RT-PCR, hibridaciones, secuenciamiento y otras reacciones enzimáticas, que requieren un alto nivel de conservación del ARN. El método es versátil y compatible con la mayoría de los protocolos de

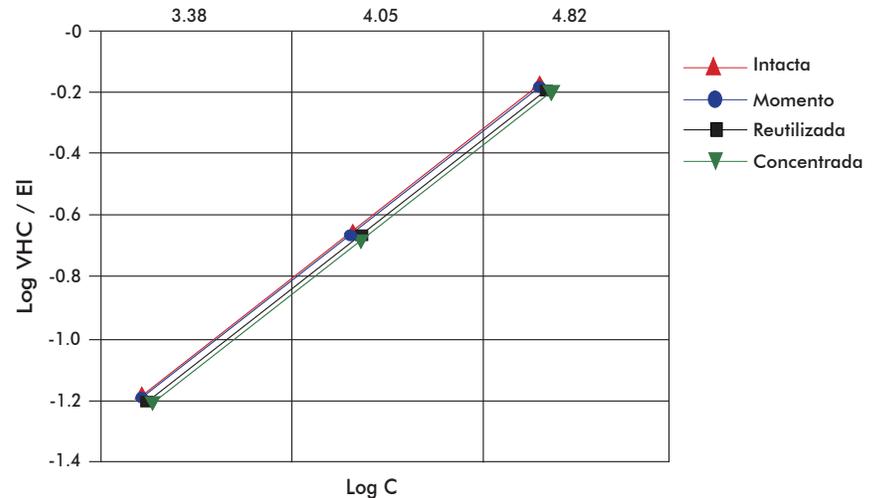


Figura 1. Representación de las curvas de cuantificación, con un comportamiento similar a los siete meses del estudio. Log VHC/EI: logaritmo común de la relación entre las señales de fluorescencia correspondientes al ácido nucleico del virus de la hepatitis C y la del estándar de cuantificación interno (EI). Log C: logaritmo común de la concentración del ARN en el VHC.

aislamiento de ARN (extracción fenólica [12], aislamiento con sílica [15, 16] y aislamiento en un paso ARN/ADN [8]).

El ARN es muy sensible a la degradación por ribonucleasas. Se han propuesto alternativas para mejorar la estabilidad del ARN en un medio rico en ribonucleasas por un largo período a temperaturas por encima de cero, pero ninguna ha sido fructífera. En este trabajo se demuestra que el ARN en el tampón de lisis es estable a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 meses.

Kessler y cols. [17] concluyeron que el ARN del VHC permanece estable en NATs (tubos que contenían un líquido estabilizador de ácidos nucleicos) temperatura ambiente de al menos 96 horas.

Nuestros resultados difieren de los expuestos antes pues las curvas de transcritos de ARN son estables durante 18 meses. Ello se debe a que estas curvas de transcritos del VHC se conservaron en un tampón de lisis que funcionó como una solución estabilizadora de ácidos nucleicos [7], lo cual evitó la pérdida significativa de los niveles de ARN en esa solución, y aumentó la flexibilidad en su transporte y colección.

Uylen [18] alcanzó resultados similares a los nuestros, pues el ARN se sometió a un proceso de congelación y secado, lo que le confirió estabilidad en al menos un año, de $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los resultados en este trabajo posibilitan emplear curvas listas para el uso, preparadas en el tampón de lisis que contiene el estándar de cuantificación interno, en ensayos de determinación de la carga viral del VHC.

11. Gilleland RC, Hockett RD. Stability of RNA molecules stored in GITC. *Biotechniques* 1998;25:944-8.

12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 1989;7:16-7.52.

13. Chirgwin JJ, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979;18:5294-9.

14. Lader ES. *Methods and reagents for preserving RNA in cell and tissue samples*. US Patent 6,204,375; 2001.

15. Boom R, Sol CJ, Salimans MM. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;28:495-503.

16. González-Pérez I, Armas A, García I, González YJ. Homemade RNA isolation protocol using silica columns. Comparison vs. silica based commercial kit and single-step isolation. *Anal Biochem* 2007;360:148-50.

17. Kessler HH, Stelzl E, Raggan RB, et al. Effects of storage and type of blood collection tubes on Hepatitis C virus level in whole blood samples. *J Clin Microbiol* 2001;39:1788-90.

18. Uylen. Freeze-dried compositions comprising RNA. European Patent 027721. 1995 Oct 19.

Recibido en junio de 2009. Aprobado en diciembre de 2009.