

13 muestras de sangre en papel de filtro positivas al VHC, las cuales se colocaron a 4°C y a temperatura ambiente (hasta 32°C).

Técnicas empleadas

El UMELISA HCV es un ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto que utiliza como fase sólida una placa de Ultramicro ELISA recubierta con péptidos sintéticos del VHC. Se emplea un conjunto anti-IgG Humana/Fosfatasa Alcalina y un sustrato fluorescente. Se emplearon además 3 técnicas de referencia que fueron ORTHO ELISA HCV, UBI HCV EIA y ORTHO (RIBA) para el estudio de la población de pacientes.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se establecieron las condiciones óptimas para la elución de las muestras de sangre colectadas en papel de filtro, que debe realizarse en una hora a temperatura ambiente. El primer paso de incubación de las muestras ya eluidas obtiene la mejor correlación respecto a los resultados de las muestras de suero, si se realiza durante 1 hora, también a temperatura ambiente. En la distribución de frecuencias para la población de donantes se

obtuvo un 1,38% de individuos seropositivos en suero y en sangre colectada en papel de filtro, para el 100% de coincidencia entre ambas formas de colección de la muestra y fueron positivos los 17 pacientes asistentes a consulta de Hepatitis C.

En los análisis de estabilidad de la IgG en el papel de filtro, hemos obtenido un 100% de recuperación de la seropositividad para las muestras almacenadas durante 3 meses a 4°C y este valor se mantiene si se almacenan a temperatura ambiente (hasta 32°C) por un tiempo no superior a los 15 días. Estos resultados demuestran que la utilización de las muestras de sangre en papel de filtro, como forma de colección de muestras, brinda grandes posibilidades de trabajo, debido al elevado nivel de coincidencia de sus resultados respecto a los obtenidos empleando las muestras de suero, además de brindar posibilidades para el almacenamiento.

REFERENCIAS

- ALTER, H. (1990). *Jour. Gastro. and Hept.*, 1: suppl. 78-94
- CHOI, Q. L. et al. (1991). *Brit. Med. Bull.* 46:423-441
- KWO, G. et al (1989). *Science* 244:362-364
- PADRON, G. et al. (1992). *Avan. Mod. Biotechn.* 1:19-25

UMELISA PARA LA CUANTIFICACION DE ANTI-HBsAg

Jannette Trujillo, Leticia Martíez, Rolando Ochoa, Julio Ventura, Irina Valdivia, Marley García, Esther Lazo, Aurora Delahanty.

Centro de Inmunoensayo, Calle 134 y Ave. 25, Apdo Postal 6945, La Habana, Cuba.

INTRODUCCION

La presencia de Anti-HBsAg en suero o plasma humano, indica el restablecimiento de una infección aguda o crónica por el virus de la Hepatitis B y el desarrollo de la inmunidad, así como la seroconversión obtenida después de una inmunización de forma activa.

Para la detección de Anti-HBsAg es conveniente el desarrollo de un método cuantitativo y de determinación que sea capaz de evaluar la respuesta inmunitaria y la duración de la protección inmune (1, 2, 3, 4).

MATERIALES Y METODOS

Con el objetivo de determinar niveles de anti-HBsAg en suero humano, se desarrolló un inmunoensayo enzimático tipo sandwich, utilizando antígeno recombinante para el recubrimiento de la fase sólida y para la conjugación con fosfatasa alcalina. La concentración óptima

de antígeno recombinante utilizado para el recubrimiento fue calculada a partir de la determinación de su meseta, para lo cual se recubre entre 0,1 y 4 µL. La conjugación se llevó a cabo por el método del glutaraldehido en un paso. La sensibilidad y especificidad fueron evaluadas con 700 muestras de donantes de sangre y utilizando un método comercial de referencia (Hepanostika).

RESULTADOS Y DISCUSION

La fijación más eficiente a la fase sólida del antígeno recombinante se logró a una concentración de 0.25 µg/mL. La conjugación con fosfatasa alcalina fue efectiva y mantuvo buena estabilidad.

Fue posible la cuantificación de anti-HBsAg entre 10 y 200 UI/L con una especificidad del 98,9% y una sensibilidad del 100%.

REFERENCIAS

1. AMBROSH, F. et al. (1987). *Postg. Med. J.* 63(2):129-135.
2. AMDRE, F. et al. (1987). *Postg. Med. J.* 63(2):169-178.
3. EDDLESTONN, A. (1990). *Lancet* 335:1142-1144
4. NOMMENSEN, F. et al (1989). *Lancet*: 847-849

MOLECULES MODULATING IMMUNE/INFLAMMATORY RESPONSES, DESIGN AND DEVELOPMENT OF POTENTIAL THERAPEUTICS

Manuel J. Araña¹, Nelson Santiago¹, Glay Chinea¹, Belkis Torres¹, Tirso Pons¹, Maribel Guerra¹, Eduardo López², M. Callejo³, Hilda E. Garay¹, Osvaldo Reyes¹.

¹Pharmaceutical Division, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, P.O. Box 6162. ²Center for Pharmaceutical Chemistry, and ³Finlay Institute, La Habana, Cuba.

INTRODUCTION

The role of different bacteria-derived agents and cytokines on the onset and development of immune and inflammatory responses has been broadly studied. Gram-negative bacteria LPS binding to inflammatory cell membranes is related to the activation of a cytokine cascade constituting a central pathogenic mechanism on sepsis, and also related with activation of HIV replication in monocytes and acute graft-vs-host diseases (1). Therefore the design of anti-LPS molecules as drugs may be useful in the profilaxis and treatment of LPS-mediated diseases. At the same time, based on some natural proteins that function as cytokine antagonists maintaining basic structural features of receptor ligands, some groups have engineered cytokines to obtain both partial agonists or antagonists. Studies based on structure-activity analysis of IL-2/IL-2R interactions, indicating that binding and activation events can be separated or modulated to elicit a subset of IL-2 responses excluding other (2), open the possibility to engineer IL-2 proteins with potential use as immunosupressing drugs (antagonist) or improved immunotherapeutics (partial agonist). We briefly described herein preliminary results in using different approaches to obtain molecules modulating immune/inflammatory responses: (a) LPS neutralizing peptides, considering a charged cluster along the sequence of different LPS binding proteins, (b) IL-2 antagonists and partial agonists, using the phage displaying technology to expose IL-2 and to select desired analogues obtained by random mutagenesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Peptides were synthesised using the tea bag method (3) and purified by RF-HPLC. Peptides were derived from: bovine BPI (KIRGKWAKRNFIK), human LPB (RVQRWKVRKSFFK), rabbit CP18 (RKRLRKFRNK-

IKEKLKKIGQK) and anti-LPS factor from *L. polyphe-mus* (CHYRIKPTFRRLKWKYKGKFWC). A polymyxin B (PMB) LPS-binding peptide(CKKLFKCKTK) and a HPV/E7 peptide (DMVDTGFGAMNFADLQPNK SDVPIDI) were also used. PBMC were cultured in the presence of *P. aeruginosa* LPS 20 ng/mL and equimolar concentrations of the different peptides (1.25 and 100 nM). TNF concentrations of 18-24 h PBMC cultures were determined using L929 target cells as described (4). All DNA manipulations were performed essentially as previously described (5). The biological activity of human IL-2 was tested using the IL-2 dependent murine T lymphocyte cell line CTLL-2 (6).

RESULTS AND DISCUSSION

Peptides corresponding to particular highly positive charge clusters of the sequence of different LPS-binding proteins were all able to inhibit in a dose-depending

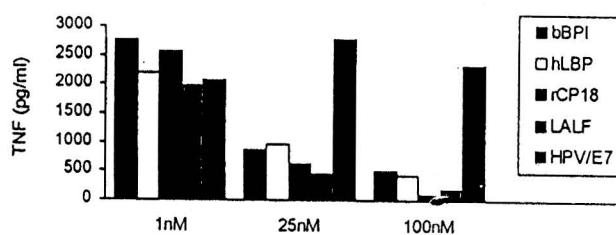


Fig. 1.-Effect of peptides on LPS induction of TNF production in PBMC