determinaciones de anticuerpos contra el HCV. Se debe realizar trimestralmente determinaciones de anticuerpos contra el HCV a todos los hijos de madres con anticuerpos contra el HCV.

En la literatura existen amplias revisiones sobre las propiedades ideales de la leche materna para la lactancia de los recién nacidos (9, 10). Es incuestionable el papel de la lactancia materna en la disminución de la morbi-mortalidad de los infantes debido a la considerable reducción de la frecuencia de enfermedades intestinales y respiratorias (11, 12). También los trastornos de tipo alérgico son significativamente menos frecuentes en los niños amamantados con pecho que en los alimentados con fórmulas, probablemente debido a que estas últimas presentan determinada cantidad de antígenos sin tener los apropiados factores inmunomoduladores presentes de forma natural en la leche humana (13).

La creación de la flora intestinal del niño, durante la primera semana de vida, y la alta cinética de recambio hasta el segundo mes hacen que la leche materna se considere particularmente importante en este período. Además, debe considerarse que el inmaduro sistema inmune del recién nacido (14) desarrolla un violento cambio de la esterilidad de la vida intrauterina al entorno agresivo. La nutrición del infante con leche materna parece ser de ayuda especialmente en este período pues facilita el desarrollo del sistema inmune de manera armónica.

Recientemente se ha estudiado la posibilidad de transmisión del virus C de la hepatitis mediante la lactancia materna sin encontrar RNA del HCV en la leche de madres infectadas con el HCV (8). Los autores del estudio sugieren que no debe interrumpirse la lactancia materna de las madres positivas al virus de la hepatitis C. El consenso general de los especialistas reunidos en este taller es que el consejo médico a una madre infectada por el HCV de lactar o no a su hijo es un problema de riesgo beneficio. Teniendo en cuenta el conocimiento del estado actual sobre la transmisión de la enfermedad no se puede justificar con todo rigor científico una u otra conducta.

Control de foco de la hepatitis producida por el virus C

Los pacientes que resulten positivos en el examen de anticuerpos contra el HCV deben ser remitidos a una consulta especializada para su mejor estudio y seguimiento, siempre con el conocimiento de su médico de atención primaria. Se notificaran como enfermedad de declaración obligatoria todos los casos diagnosticados como hepatitis C aguda. Se sugiere la activación de los grupos de atención a las hepatitis a nivel provincial y la creación de los mismos en las provincias en que no exista, para un mejor cumplimiento del programa de atención a esta enfermedad elaborado por el Ministerio de Salud Pública. Se propone que los responsables del programa de atención deben realizar talleres y otras actividades que apoyen la asistencia integral del problema. Se tuvo presente la necesidad de actualización de los programas docentes en relación con los conocimientos actuales sobre el manejo de la hepatitis virales.

7. Ohto H, Terazawa S, Sasaki N *et al.* Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. N Engl J Med 1994;330:744-750.

8. Polywka S, Feucht H, Zollner B, Laufs R. Hepatitis C virus infection in pregnancy and the risk of mother-to-child transmission. European Journal of clinical microbiology and infectious diseases 1997;16:121-124.

9. Short RV. Brest feeding. Sci Amer 1984;250:23-29.

10. Goldman AS *et al.* Human Milk: Immunologic-nutritional relationship. Annals of the New York Academy of Sciences 1990;236-45.

11. Winberg J *et al.* Does breast milk protect against septicemia in the newborn? Lancet 1971;1:1091-4.

12. Lucas A *et al.* Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. Lancet 1990;336:1519-1523.

13. Hanson LA *et al.* Prospective factors in milk and the development of the immune system. Pediatrics 1985;75:172-6.

14. Bryson YJ *et al.* Deficiency of immune interferon production by leukocytes of normal newborns. Cellular Immunology 1980;55:191-200.

NUEVO PROGRAMA DE CÁLCULO. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE INTERFERONES MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE EFECTO CITOPATOGÉNICO UTILIZANDO EL SISTEMA DE EQUIPOS SUMA

Joel Ferrero Bibilonia,[1] Ladys Duany Zamora,[1] Juan Y Remón Milán,[1] Maribel Vega[1] y Pedro López Saura[2]

[1]*Subdirección de Calidad,* [2]*División de Ensayos Clínicos. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, apartado postal 6162, Ciudad de La Habana, Cuba.*

Introducción

La determinación de la actividad antiviral de interferón (IFN) es una técnica necesaria en los laboratorios que trabajan con estas moléculas para propósitos como el control y desarrollo de procesos de producción, de la calidad de los productos finales, determinación de niveles de IFN endógeno, así como capacidad de producción de estas sustancias en individuos sanos y enfermos, control de tratamientos con IFN, determinación de la presencia de anticuerpos neutralizantes de la actividad antiviral, y otras investigaciones relacionadas con la producción y el mecanismo de acción de los IFN. Todos los problemas anteriormente relacionados requieren un método de determinación confiable, seguro y rápido. Generalmente se utilizan métodos que se basan en la inhibición del efecto citopático (ECP) producida por el IFN en células retadas con algún virus. En nuestro país se usa este sistema (1), tiñendo al final las células con un colorante y leyendo la intensidad de la coloración en el equipo SUMA (Centro de Inmu-

1. Ferrero J, Ochagavia ME, Aguilera A, López-Saura P. Titulación de la actividad antiviral de interferón utilizando el sistema de equipos SUMA. Biotecnología Aplicada 1994;11(1):34-42.

noensayo, La Habana). El procedimiento presentaba aún varias limitaciones como son el que la computadora acoplada al equipo de lectura no es IBM compatible, lo que dificulta la interrelación con el resto de los sistemas de control automático en uso y el programa de calculo de los resultados no contemplaba todos los parámetros exigidos par las regulaciones internacionales.

En este trabajo se presentan los resultados de utilizar el fotómetro del sistema SUMA para leer la coloración de los pozuelos secos de las placas de titulación de la actividad antiviral y el cálculo del título de IFN mediante un programa desarrollado en el software EXCEL 5 para Windows, que tiene en cuenta todos los puntos de diluciones de las microplaca. Este programa se aplico al estudio colaborativo para el establecimiento de un patrón internacional de interferón alfa.

Materiales y Métodos

Se utilizaron células HEp-2 (ATCC No. CCL 23) multiplicadas en medio MEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal, 2,2 mg/mL de bicarbonato de sodio y 40 µg/mL de gentamicina, e incubadas a 37 °C y 3 % de CO_2. Las Células se emplearon después de 3 a 10 pases. Como virus productor de ECP se utilizó el Mengo (cepa del Instituto de Biología Molecular, Universidad de Zurich, 1982), multiplicado en fibroblastos de ratón L929.

Se usaron muestras de IFN alfa leucocitario de distintos orígenes: 2 preparaciones de patrones internos (L3 y L4), 2 de patrones internacionales de la OMS (69-19 y Ga23-902-530) y una muestra de un lote de producción de IFN alfa leucocitario.

Para el estudio colaborativo se emplearon 10 muestras denominadas A, B, C, D, E, F, G, H, J y K distribuidas por la National Institute for Biologicals and Control de Gran Bretaña, por encargo de la OMS. Estas muestras se recibieron liofilizadas en ámpulas y fueron reconstituidas con 1 mL de agua de inyección. Posteriormente fueron diluidas según los títulos supuestos que traían asignados.

Se empleó la técnica de titulación establecida en los procedimientos Patrones de Operación para esta actividad. Las placas de titulación, una vez teñidas, fueron leídas secas en el equipo SUMA. El programa de cálculo toma estos resultados y i): calcula el valor promedio de los controles de virus y células de la placa, eliminando un punto que se aleje más de 1,3 desviaciones standard (DS) de la media; ii): normaliza todos los valores de absorbancia de la placa, ajustándolos a 0 (control del virus) y 100 (control de células). Los valores extremos (mayores que 0,99 y menores que 0,01) no serán tenidos en cuenta posteriormente; iii): realiza la transformación Probit de los valores anteriores para lograr la linealidad de los 8 puntos correspondientes a las diluciones de cada muestra; iv): hace el análisis de regresión de los valores anteriores vs. las diluciones para cada muestra; v): elimina los puntos que se alejen de la recta de regresión en más del valor del intervalo de confianza al 75 % de la misma; vi): recalcula la recta de regresión; vii): calcula la dilución que corresponde al valor Probit = 5 (50 % de protección de las células por el IFN); viii): calcula el título como el antilog$_2$ de la dilución anterior, multiplicado por las diluciones previas que haya sufrido la muestra y ix): compara las pendientes de las rectas de regresión entre sí, para el análisis de paralelismo de la relación dosis-respuesta de las muestras.

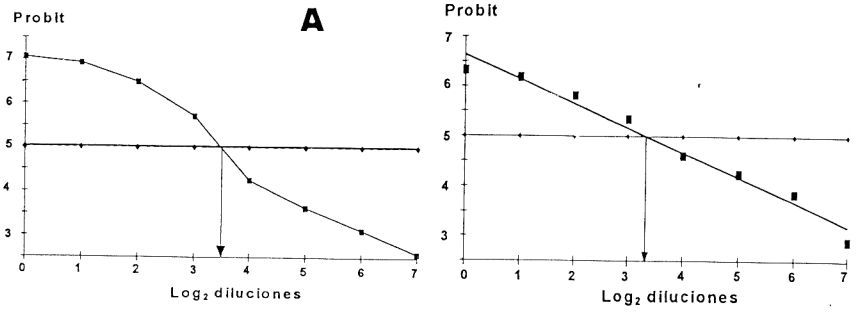

Figura 1. Comparación entre los procedimientos de calculo a partir de las lecturas de absorbancia o de sus transformaciones Probit. Las flechas indican el punto de 50 % de protección y el Log_2 de la dilución correspondiente.

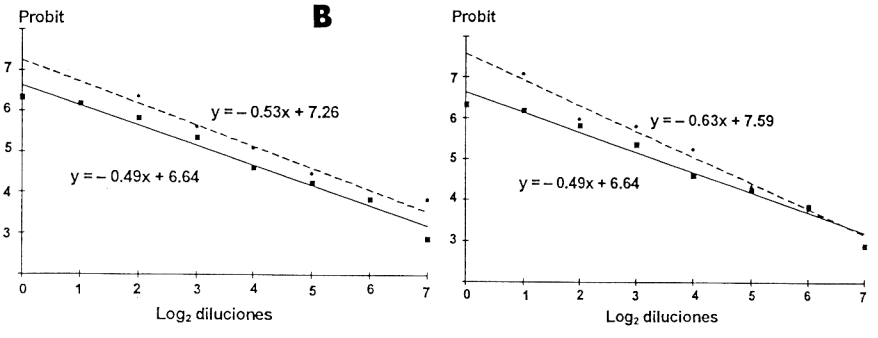

Figura 2. Ejemplos de resultados obtenidos; A: resultados de 2 muestras cuyas pendientes no fueron diferentes estadísticamente; B: 2 muestras con pendientes que fueron diferentes estadísticamente.

Resultados y Discusión

El gráfico de las lecturas de absorbancia en función de la dilución es una curva sigmoidal. Otros grupos en el mundo calculan la dilución que corresponde a 50 % de protección (punto medio entre las lecturas de los controles de virus y células) tomando los puntos de esta curva que permitan trazar una recta y asegurándose que el valor de 50 % esté incluido en ella. Esto implica la selección visual de los puntos que van a ser tomados. La transformación Probit, al linealizar el gráfico, permite utilizar todos los puntos. Solamente se eliminan del calculo aquellos que constituyen valores extremos o que sean errores groseros. Sin embargo, en el programa que se presenta esta selección se realiza automáticamente evitando la decisión subjetiva del operador. Figura 1 y 2.

Se calcularon los títulos de las diferentes muestras mediante el programa desarrollado, no habiendo diferencia con el cálculo a partir de las lecturas directamente. Esto confirma la confiabilidad del procedimiento de cálculo que se presenta, aprovechando la ventaja de que todo el proceso es automático.

El cálculo de las pendientes, que se realiza automáticamente tampoco arrojó diferencias significativas entre las muestras ensayadas por lo que se puede concluir que hubo paralelismo entre las mismas, lo cual era de esperar al tratarse del mismo tipo de interferón.

En cuanto al estudio colaborativo se titularon las muestras en 4 ocasiones, se calcularon los títulos y se hicieron los análisis de paralelismo de las pendientes. Los resultados fueron enviados al NIBSC y formarán parte del análisis conjunto internacional.

El programa de calculo constituye una mejora con relación al existente actualmente en los aspectos como; I): elimina los puntos que constituyen errores groseros con relación a la recta de regresión lo que mejora la precisión del calculo; ii): hace análisis de paralelismo de las muestras de una misma placa mediante la comparación de las pendientes de las rectas de regresión, como establecen las recomendaciones internacionales para el control de las preparaciones de interferón; iii): está desarrollado en EXCEL para Windows, lo que permitirá acoplarlo fácilmente a los nuevos modelos de equipos SUMA y IBM compatibles; iv): permite acumular los valores para análisis históricos y otros cálculos que se desee hacer con ellos; v): puede aplicarse a otros ensayos de actividad que se basen en medición del crecimiento o número de células, EGF e IL-2.

Avances en Biotecnología Moderna Volumen 4

Es una publicación seriada irregular que recoge en artículos cortos 689 trabajos presentados por especialistas de más de 30 países en el Congreso de Biotecnología Habana'97, celebrado del 1 al 6 de diciembre de 1997. Su contenido está dividido en secciones temáticas: *Vacunas, Diagnóstico, Nuevas estrategias terapéuticas, Anticuerpos terapéuticos y recombinantes, Estudios preclínicos y clínicos, Estructura y función de biomoléculas, Producción de biomoléculas terapéuticas, Aseguramiento de la calidad, control analítico y gestión ambiental en la biotecnología y Biotecnología y desarrollo social.*

En años anteriores se han publicado tres volúmenes: el volumen 1 (ISBN 959-235-001-9), correspondiente al evento de 1992, contiene 526 artículos que cubren todos los campos de la biotecnología moderna; el volumen 2 (ISBN 959-235-002-7), de 1994, recoge 450 trabajos relacionados con la biotecnología médica, mientras que el volumen 3 (ISBN 959-235-003-5), de 1995, con 380 artículos, está dedicado a un amplio espectro de temas biotecnológicos vinculados a sus aplicaciones en la agricultura y la producción y salud animal.

ISSN 1027-2860
ISBN 959-235-011-6
376 páginas, papel bond, 20 x 27 cm, cubierta de cartulina cromada
Precio del ejemplar: $15.00 USD

Elfos Scientiae
Apdo. 6072, Habana 6, Cuba
Teléfonos (53-7) 20-8164 / 21-8466
Fax: (53-7) 21-8070 / 33-6008
E-mail: elfos@cigb.edu.cu