



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org

19323

14p
+ anexos
20/11/2001

**INFORME DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE EL
ADIESTRAMIENTO EN PRODUCCION DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES.**

Realizado del 4 de Febrero al 4 de Mayo de 1991 en el Centro Oncológico de Medicina Nuclear, Instituto Angel H. Roffo, Av. San Martín 5481, CP 1417, Buenos Aires - Capital Federal, Republica de Argentina.

Profesional Instructor.- Dr. Alberto L. Horenstein,
Dr. Gabriel L. Fiszman.

Proyecto.- Producción Masiva de Anticuerpos Monoclonales
Participante - Eduardo Gonzales Dávalos (Bioquímico-
Farmacéutico)

País.- Bolivia
- Academia Nacional de Ciencias de
Bolivia - Instituto de Investigaciones
Biomédicas, Av. 16 de Julio # 1732,
Casilla 5829, La Paz - Bolivia.

1.	ANTECEDENTES	1
2.	ASPECTOS BASICOS DEL ENTRENAMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	2
3.	ESQUEMA GENERAL DEL TRABAJO REALIZADO	3
4.	CARACTERISTICAS DEL MATERIAL DE TRABAJO	4
4.01.	Lavado del material usado	4
4.02.	Reducciones	4
4.03.	Composicion del medio Opti MEM	4
4.04.	Preparacion del medio Opti MEM	4
5.	DESCONGELAMIENTO DE CELULAS	5
5.01.	Metodología	5
6.	RECUESTO CELULAR	5
6.01.	Metodología	5
7.	CONGELAMIENTO DE CELULAS BACTIA	6
7.01.	Metodología	6
8.	CARACTERIZACION METABOLICA DE LA LINEA BACTIA	7
8.01.	Metodología	7
8.02.	Reproduccion de células Vs. Tiempo	7
8.03.	Consumo de glucosa Vs. Tiempo	8
8.04.	Consumo de glucosa Vs. número de células	8
8.05.	Viabilidad de las células Vs. Tiempo	10
8.06.	Variación del pH Vs. Tiempo	11
8.07.	Actividad del anticuerpo	11
8.08.	Comparación de gráficas	12
8.09.	ELISA anti A - B	13
8.10.	Immuno Diff anti A - B	13
9.	PRODUCCION DE ANTICUERPO	10
9.01.	Metodología empleada	10
10.	PURIFICACION DEL ANTICUERPO (IgG) DEL LIQUIDO ANTITICO	16
10.01.	Precipitacion con sulfato de amonio	17
10.02.	Desalinización en G-25	17
10.03.	Cromatografía de afinidad por proteína A-Sepharosa	17
10.04.	Perfil cromatográfico y observaciones	18
10.05.	Determinación de la actividad aglutinante de los Fracs.	18
10.06.	SDS PAGE	19
10.07.	Conclusiones	19
11.	CLONAJO	20
11.01.	Obtención de Macrófagos	20
11.02.	Obtención de Timocitos y Linfocitos	20
11.03.	Clonado por dilución limitante	21
11.04.	Resultados	22
11.05.	Conclusiones y observaciones	22

12.	INMUNIZACION.....	22
13.	ANTIGENO UTILIZADO	23
14.	PROTOCOLO DE INMUNIZACION IN VIVO.....	23
15.	DETERMINACION DEL ANTICUERPO POR ELISA.....	23
15.01.-	Metodología empleada.....	23
15.02.-	Resultados y conclusiones.....	24
16.	PREPARACION DE CELULAS NSO PARA LA FUSION.....	25
16.01.-	Actividad de la vía endogena.....	25
17.	FUSION.....	25
17.01.-	Metodología por agitación con PEG al 50%	25
17.02.-	Resultados y conclusiones.....	25
18.	CONCLUSION GENERAL DEL TRABAJO REALIZADO.....	26

PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

1. ANTECEDENTES.-

La preparación de hibridomas constituyó un hito en la inmunoquímica. La primera aplicación de esta tecnología fue la producción de anticuerpos monoclonales (AcM) para remplazar en toda clase de inmunoensayos a los anticuerpos policlonales obtenidos por medios convencionales. Es cierto que la preparación de AcM de alta afinidad no deja de ser una tarea laboriosa, pero las posibilidades que ellos ofrecen fueron pronto obvias para todo el mundo. Quizá lo más importante de los AcM fue que nos ayudaron a comprender muchos procesos inmunológicos y que posibilitaron el manipuleo *in vitro* de los anticuerpos.

Es así, que hace pocos años atrás, el interés comercial de los AcM fue incrementado rápidamente, especialmente en las áreas de diagnóstico, imágenes de tumor, terapia del cancer, etc. Se estimó que en el año 1990 se invirtieron 2.7 billones de dolares; de los cuales la mayor parte fue dirigida hacia la investigación.

Los procedimientos de las técnicas en su gran mayoría se encuentran basadas en las investigaciones realizadas por Georges Köhler y César Milstein (1975), quienes demostraron que la hibridización de linfocitos inmunes de ratón y células de mieloma, daba por resultado la formación de células híbridas las cuales podían secretar inmunoglobulinas homogéneas de especificidad predefinida: los anticuerpos monoclonales.

La Republica de Bolivia a través del proyecto: PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES, otorgado por Naciones Unidas y donde participan varios latinoamericanos, ahora se suma al conocimiento de la tecnología que hará posible que en un plano mediano pueda llegar a producir su AcM.

2. ASPECTOS BASICOS DEL PROGRAMA DE ENTRENAMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

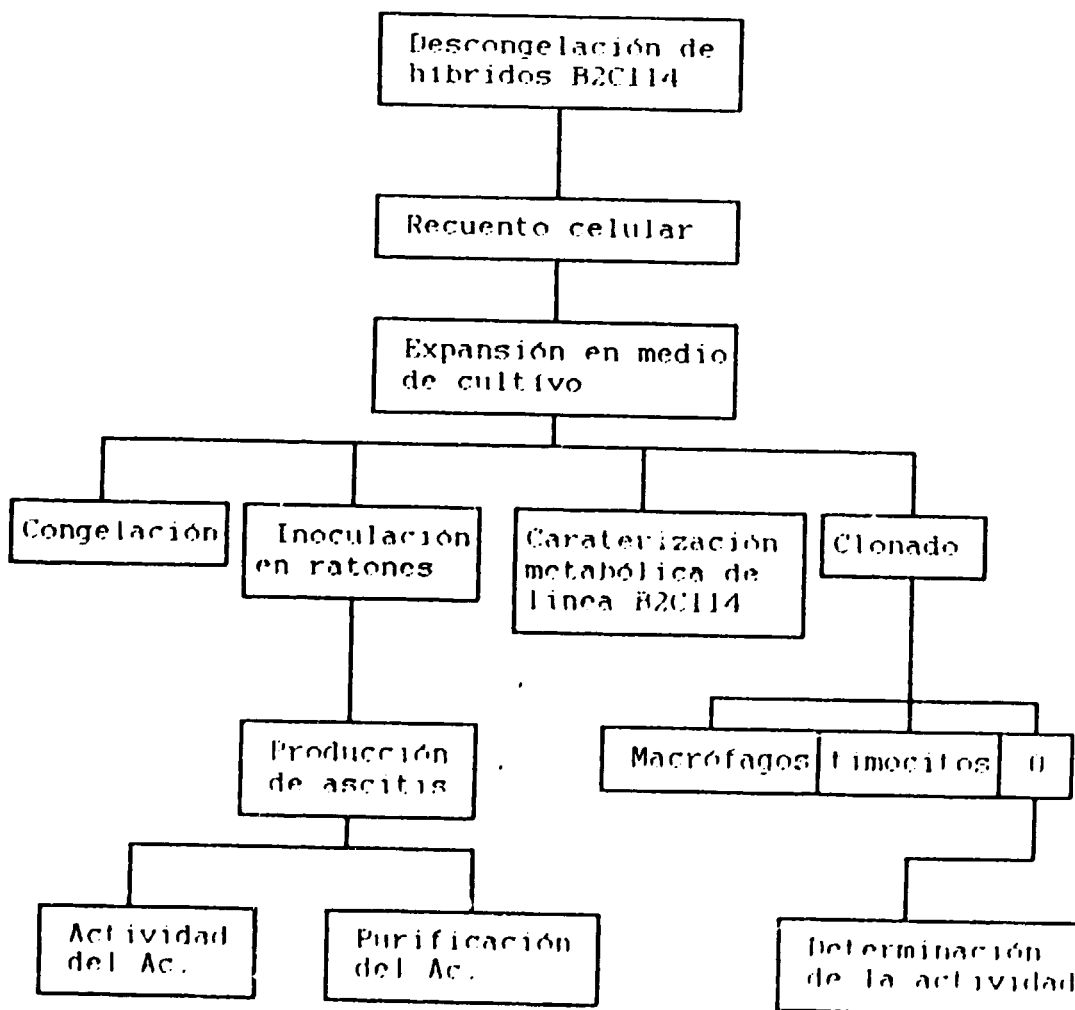
- 1) Preparación de medios y materiales para el cultivo de líneas celulares de mieloma y de hibridomas. Descongelación y congelación de líneas celulares.
- 2) Inoculación de ratones con células de mieloma y con hibridomas para preservar las líneas y para producción de ascitis.
- 3) Detección de micoplasma. Metodología para la descontaminación.
- 4) Estudios metabólicos en cultivo estacionarios para

la caracterización de hibridomas. Incluye: velocidad de crecimiento, consumo de glucosa, pH, y producción de anticuerpos.

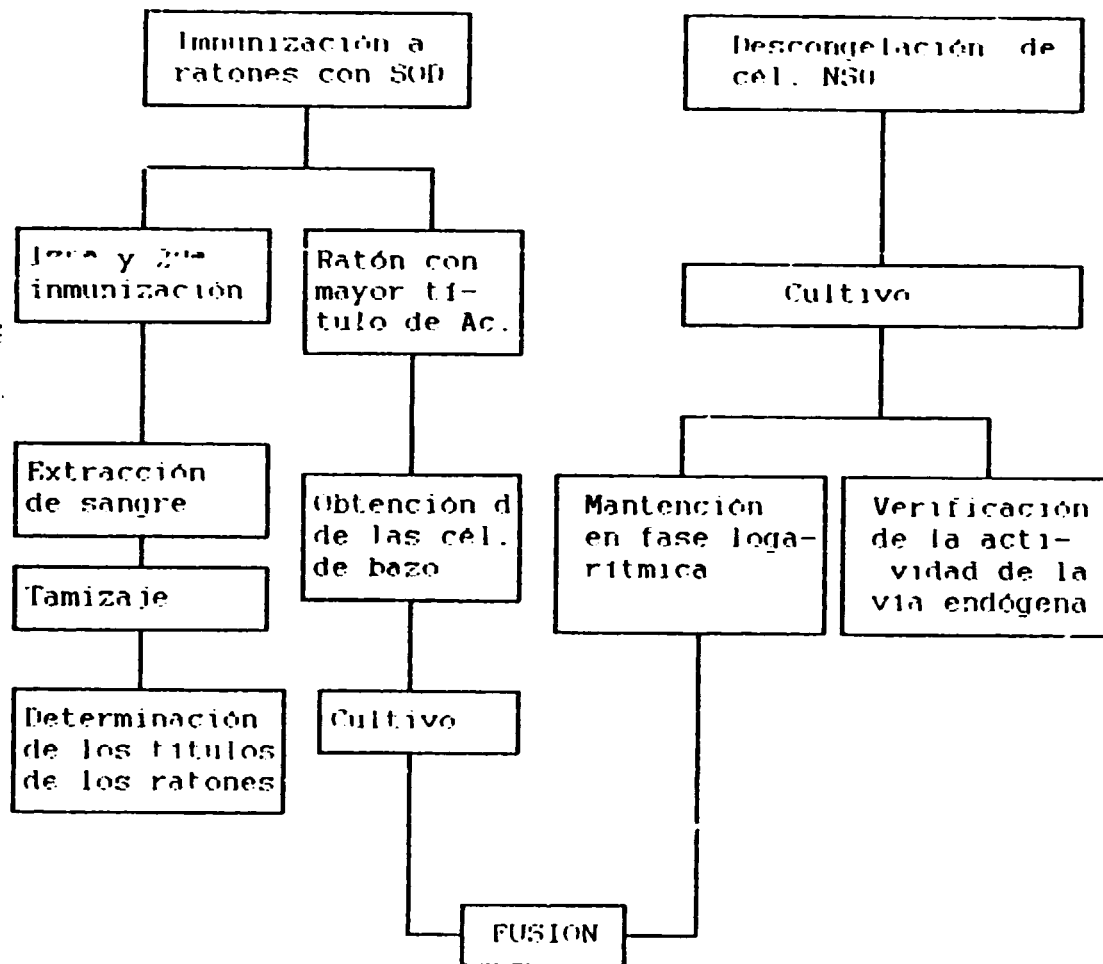
- 5) Métodos de inmunización empleados para la obtención de anticuerpos monoclonales.
- 6) Hibridización celular mediante la fusión con polietilenglicol, mantenimiento de los cultivos: Preparación de PEG, de medios selectivos, procedimiento de fusión, mantenimiento de los cultivos, clonado y preservación de híbridos.
- 7) Metodologías de detección de anticuerpos (Tamizaje): radioinmunoensayo, hemaglutinación, dot blot.
- 8) Purificación de sobrenadante y ascitis por precipitación y cromatografía. Determinación de la pureza.

ESQUEMA GENERAL DEL TRABAJO REALIZADO.

PARTE I



PARTE II



4. CARACTERÍSTICAS DEL MATERIAL DE TRABAJO.

Es necesario recalcar que todo el material de trabajo debe estar correctamente lavado y esterilizado.

4.01.- Lavado del material usado.-

- 1) De ser necesario inmediatamente lavarlo con abundante agua, y/o solamente sumergirlo en un recipiente que contenga lavandina al 10%.
- 2) Cepillar con detergente especial y enjuagar con agua corriente 8 veces.

gota y luego centrifugar a 400xg durante 5 min.
E) Se resuspendió las células en medio Opti-MEN con
10 % de SFB precalentado a 37 °C y dispensar
110.000 células en 100 ul pozo para placa de 96 ;
y 1.100.000 células en 1ml/pozo para placa de 24 .

Estas placas estaban previamente preparadas con
macrófagos.

El Después de 24 hrs. se extrajeron 50 ul por pozo y
se adicionó 50 ul de medio HMT. Repetir este
procedimiento hasta llegar a una concentración del
100 % de HAT.

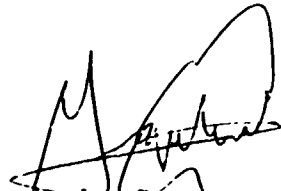
17.02.- Resultados y Conclusiones.-

- El día 6 después de la fusión se pudo observar en
algunos pozos, células que podrían estar iniciando la
formación de clones.

18. CONCLUSION GENERAL DEL TRABAJO REALIZADO

En el trabajo realizado se pudo llegar a obtener un
conocimiento claro de los procedimientos de obtención
de anticuerpos monoclonales. Tanto la parte teórica
como la parte práctica fueron asimiladas bajo expe-
riencias prácticas que fueron seguidas en su totalidad
por profesionales en el tema. La cooperación brindada
por todos los integrantes del Centro Oncológico de
Medicina Nuclear hicieron posible que este trabajo se
realizara sin contratiempos que podrían haber retrasado
este trabajo; para ellos va mi más sincero agradece-
miento.

Igualmente la Republica de Bolivia agradece la coopera-
ción prestada por todos los países y organismos que
participan de este proyecto y que hicieron posible la
realización de este trabajo, mediante el cual mi país
se suma a la búsqueda de su anticuerpo monoclonal.



Eduardo E. González Dávalos
BIOQUIMICO-FARMACEUTICO

COMUNICACIONES BIOLOGICAS

Vol 9 N°1 1990

pp 17-23

A NEW MONOCLONAL ANTI A: EVALUATION AS A BLOOD GROUPING REAGENT

A Almará*, N García Rosasco*, J Valverde*, L Morisoli*,
H Glait°, A Horenstein°

*Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacológicas. UNR. CIUNR. °Centro Oncológico de Medicina Nuclear. CNEA. Instituto de Oncología "Angel H Roffo". Facultad de Medicina. UBA. República Argentina

Key words: A antigen. Blood groups. Blood typing reagents. Monoclonal antibody. Potency.

INTRODUCTION

In recent years, a large number of different monoclonal antibodies (MABs) to human red blood cells have been produced in many laboratories. Some of these antibodies have been used in routine blood grouping and others in blood group research.

The blood typing reagents must satisfy the requirements concerning to specificity, stability, potency and availability of unlimited quantities at cost-effective.

A major problem in the preparation of MABs against blood group antigens is the selection of clones which can produce antibodies of sufficiently high avidity and potency comparable to conventional diagnostic reagents, even with the "weak" variants of the antigens (8).

Using spleens from mice immunized with carcinoembryonic antigen (CEA), Horenstein et al. obtained hybridomas that

ACKNOWLEDGEMENTS: The authors thank Mrs Patricia Foresto (Laboratorio de la Dirección de Tránsito, Rosario) for the blood samples, Biotest-Boehringer for supplying commercial reagents and Mrs Mabel Spinetta for help in the revision of the manuscript.

Monoclonal anti-A for ABO grouping

reacted specifically with group A erythrocytes (4,5). An IgG anti-A MAb was secreted into the ascitic fluid of mice inoculated with B₂/C114 clone. The aim of this work was to test whether the production of this anti-A MAb in the ascitic fluid provided a potent reagent for routine blood typing.

MATERIALS AND METHODS

Production of the anti-A MAb (B₂/C114)

The methodology used for fusion of spleen cells obtained from mice immunized with purified CEA, and mouse myeloma X63-Ag8.653, as well as the selection screening and cloning techniques of specific antibody secreting hybridomas have been described previously (3,4). One of the cell lines, named B₂/C114, produced an IgG MAb that reacted specifically against human blood group A antigen. Unlimited quantities of this anti-A MAb were produced into the ascitic fluid of mice injected with B₂/C114 clone.

Erythrocytes

Red blood cells from healthy adults and cord bloods were tested. The differentiation of adult erythrocytes in A₁, A₂, A₁B and A₂B was done with the Dolichos biflorus and Ulex europaeus lectins (2,9).

Agglutination tests

Anti-A titrations. Agglutination tests were performed using 0.1 ml two fold serial dilution of anti-A reagents in isotonic saline containing 2% AB serum and 0.1 ml of 2% three times washed red cell suspensions. Tubes tests were spun immediately at 500 g for 1 min according to the Foods and Drugs Administration (FDA) (1). The highest dilution of a reagent which gave positive (+) degree of reaction was called the titre.

Avidity tests. Avidity tests were done on slides. One drop of undiluted reagent was mixed first with one drop of a 20% A₂B red cell saline suspension (UK techniques) (6); and then with one drop of a 35% A₁, A₂, A₁B and A₂B red cell suspension in group compatible plasma (FDA tests) (1). The seconds that

A Almará et al

passed until the appearance of agglutination was recorded as the avidity time. After 2 and 5 min the degree of agglutination was also recorded.

Inhibition studies

The inhibitory activity of N-acetyl-galactosamine 0.1 M and A or B substances was assessed by agglutination tests. 0.1 ml of appropriately diluted MAb (2 dilutions above the minimum agglutinating concentration) and 0.1 ml of a 2% erythrocyte suspension were added to 0.1 ml of the inhibitor.

Hemolysis tests

Hemolytic activity of the anti-A MAb was tested by adding 0.1 ml of complement (pooled sera of 6 group A₁ donors) and 0.1 ml of a 2% A erythrocyte suspension in veronal buffered saline containing calcium and magnesium ions (7) to 0.1 ml of serially diluted MAb solution. After a 30 min incubation at 37°C, the resulting hemolysis was read macroscopically.

RESULTS

Characteristics of the anti-A MAb (B₂/C114)

The B₂/C114 ascitic fluid is a specific anti-A reagent (5) Evidence for the stability of this monoclonal reagent was shown by no fall in avidity or titre with A₂B red cells after repeated freezing and thawing (four times) or heating at 56°C during 30 min.

The monoclonal B₂/C114 reagent had no hemolytic activity until fresh group A₁ serum, as a source of complement, was added. Under these conditions, the MAb was a potent anti-A hemolysin.

Inhibition studies revealed an identical pattern to the 6D4 and 3D3 anti-A MABs (6,12), i.e., the anti-A MAB B₂/C114 was inhibited only by A substance and not by 0.1 M N-acetyl-galactosamine. Neither A nor B substance activity was found in the ascitic fluid.

Monoclonal anti-A for ABO grouping

Study of potency

For anti-A reagent evaluation, A₂B erythrocytes are the critical test cells to demonstrate an inferior anti-A. The use of A₁ and A₂ cells offers little information, as they react strongly even with reagents that fail to detect A₂B red cells.

Table I shows the titres of anti-A monoclonal reagents (B₂/C114 and commercial serum) against A₁, A₂, A₁B, A₂B, 'A₂B' erythrocytes and cord A bloods. The neat ascitic fluid demonstrated a strong reactivity with all samples. The titre anti-A of B₂/C114 MAb exceeded the FDA anti-A standard even with A₂B red cells (1). Of the two A₂B blood samples shown in Table I one of them, 'A₂B', is an example of suppressed A₁B individual that has a far stronger A status than true A₂B blood. This common type must be avoided for assessing anti-A potency especially by avidity tests (12). In fact, both anti-A MAOs gave the same results with 'A₂B' and A₁B erythrocytes.

TABLE I: Saline agglutination titres of the monoclonal anti-A reagents. FDA tests.

2% cells saline	B ₂ /C114	commercial serum	FDA lot 6a*
A ₁	512	128	64
A ₂	512	128	32
A ₁ B	512	64	8
A ₂ B	64	32	4
'A ₂ B'	512	64	
A _{cord}	512	128	

* FDA anti-A standard (12)

A Almará et al

The avidity studies (Table II) showed that the neat B₂/C114 MAb was a potent anti-A reagent. It is important to point out that these values fell within the recommended ones by Voak et al. (12).

TABLE II: Avidity tests of the monoclonal anti-A reagents

UK slide tests with 20% A₂B cells

Anti-A	Avidity (s)	Intensity at 2 min	Intensity at 5 min
B ₂ /C114	17	+	+/**
commercial serum	5	+++	+++/**

FDA slide tests with 35% cells in own plasma

Avidity (s)				
Anti-A	A ₁	A ₂	A ₁ B	A ₂ B
B ₂ /C114	5	12	5	15
commercial serum	2	3	2	4

DISCUSSION

To satisfy the requirements of all users, an anti-A reagent must detect A₁, A₂ and A₁B bloods and have the sufficient potency to give macroscopic reactions with the weaker A₂B and cord A bloods.

The neat anti-A MAb B₂/C114 showed higher titres than the commercial serum with A₁, A₂, A₁B, A₂B and cord A bloods, exceeding the FDA anti-A standard (1). Its avidity was below

Monoclonal anti-A for ABO grouping

than that of the commercial reagent; this can be explained by the IgG or IgM class of each one (7). The avidity was in accordance with Voak et al. (12) but it was lower than that admitted by Rouger et al. (11). This problem could be corrected either modifying the ionic strength or the concentration of the final reagent. However, the MAb B₂/C114 exhibited a superior avidity to the MABs obtained by others workers (10,12)

That the anti-A MAB B₂/C114 is made by one stable line that grows easily ensures a permanent, unlimited supply of a typing reagent of constant properties and high performance. We think that all this and its potency make it a good candidate to replace conventional antisera for ABO grouping.

RESUMEN

Se evaluó un anticuerpo monoclonal anti-A para su uso como reactivo en la tipificación de grupos sanguíneos. El anticuerpo monoclonal, de clase IgG, es secretado en el líquido ascítico de ratones portadores del hibridoma B₂/C114. Este deriva de la fusión entre células de bazo de ratones inmunizados con el antígeno carcinoembrionario y células de mieloma. La producción a bajo costo y las características inmunohematológicas del anticuerpo monoclonal anti-A B₂/C114 propician su utilización como reactivo en la tipificación ABO de rutina.

SUMMARY

A monoclonal anti-A antibody has been evaluated to be used as a routine blood typing reagent. This antibody called B₂/C114 is of IgG nature, it is secreted into the ascitic fluid by a permanent line of cloned cells derived by fusion of anti-carcinoembryonic antigen producing spleen cells and a mouse myeloma cell line. The unexpensive production and the immunohematological characteristics of this antibody make it a reagent suitable for routine ABO grouping.

REFERENCES

1. American Association of Blood Banks (1969), in Considerations in the selection of reagents. Washington, appendix 1, pp 15.
2. Bird GWG (1952). *Nature*, 170: 674.

A Almará et al

3. Horenstein AL, HM Glait, A Koss, AJ Olivari (1985). 28° Winter Meeting of Sociedad Argentina de Inmunología (Rosario) pp 9.
4. Horenstein AL, HM Glait, A Koss, E Capalbo, E D'Orío, AJ Olivari (1986). *Medicina*, 46: 423-428.
5. Horenstein AL, A Koss, HM Glait (1987). *Acta Bioq Clin Latinoamericana*, XXI: 223-227.
6. Lowe AD, E Lennox, D Voak (1984). *Vox Sang*, 46: 29-35.
7. Margni RA (1989), in *Inmunología e Inmunología Química*. Ed Médica Panamericana, Bs As, pp 172, 192-212.
8. Messeter L, T Bročín, M Chester, B Löw, A Lundblad (1984). *Vox Sang*, 46: 185-194.
9. Moore BPL (1980), in *Techniques sérologiques et immunologiques*. Red Cross of Canada (Eds), Toronto, pp 175-176.
10. Némec M, D Dvimalova, T Hořejši, J Vaňák, J Bártek, V Viklický (1987). *Vox Sang*, 52: 125-128.
11. Rouger P, D Anstee (1988). *Vox Sang*, 55: 57-61.
12. Voak D, S Sacks, T Alderson, F Takei, E Lennox, J Jarvis, C Milstein, J Darnborough (1980). *Vox Sang*, 39: 134-140.

RECEIVED: 22/8/90

Correspondence to:

Adriana Almará
Cochabamba 61
(2000) Rosario
ARGENTINA

que parte de ellos representen adreceptores β -presinápticos de la neurona simpática postganglionar.

- 83. Complejos inmunes conteniendo hexón en pacientes con infección respiratoria aguda baja por adenovirus.**- Alicia S. Mischonko, H. Lenzi, Flavia M. Thompson, S. Vidaurreta, C. Navari, S. Grinstein, R. A. Diaz.

Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez; Instituto Osvaldo Cruz, Río de Janeiro; Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

Para determinar la participación de complejos inmunes en la infección respiratoria aguda baja por adenovirus se evaluaron, retrospectivamente, los sueros (n = 28) y especímenes de necropsia (n = 7) de pacientes con diagnóstico virológico confirmado y controles normales (n = 8) o con infecciones no causadas por adenovirus (n = 19). Se buscaron complejos inmunes en suero que contuvieran hexón (el mayor antígeno de la cápsida viral) por enzimo-inmunoensayo, con antisuero policlonal contra hexón para la captura y policlonal contra Ig humanas para el revelado, conjugado con fosfatasa. En tejidos se empleó inmunofluorescencia indirecta. La mitad de los pacientes que sobrevivieron a la infección tenían complejos en suero, sea con IgG, con IgM, o con ambas, así como 3 de los pacientes fallecidos por adenovirus. Los controles fueron negativos para la detección de complejos con hexón, pese a tener anticuerpos antiadenovirus. En pulmón y riñón de las 7 autopsias se encontró hexón, inmunoglobulinas y complemento. La historia clínica de los 7 mostró disfunción renal pese a que la alteración histológica no era severa. Esta es la primera demostración de que durante la infección respiratoria aguda baja por adenovirus pueden aparecer complejos inmunes conteniendo antígenos de adenovirus, contribuyendo probablemente al cuadro clínico de estos pacientes.

- 84. Anticuerpos monoclonales y complemento. Su utilidad en la diferenciación de subgrupos del sistema ABO.**- Adriana Amará, Mariana García Rosasco, Juana Valverde, Lida Morisoli, Analía Koss, H. Glait, A. Horenstein.

Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario; Instituto de Oncología Angel Roffo, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Previamente demostramos que midiendo el tiempo hemolítico 50% (II_{50}) de sueros A_1 frente a mezclas hemolíticas compuestas por glóbulos rojos (GR) A y el anticuerpo monoclonal anti- A_1 B₁/C114, es posible distinguir GR A_1 (II_{50} = 213 \pm 42 seg) del resto de los fenotipos de A (II_{50} > 600 seg). El propósito de este estudio fue diferenciar entre los subgrupos débiles de A. Para ello se modificó la técnica de II_{50} utilizando Gr A tratados con pronasa. Estos adquieren características similares a los de pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna aumentando su sensibilidad al complemento. Luego del tratamiento enzimático, todas las muestras (clasificadas en A_1 y no A_1 con lectina de Dolichos biflorus y Ulex europeus) presentaron un test de Ham Dacie y sacrososamente positivos.

Los valores del II_{50} expresados en segundos fueron: Gr A_1 (adulto) = 66 \pm 15; Gr A_2 (adulto) = 181 \pm 36; cordones A = 171 \pm 20. El aumento de II_{50} para adultos A_2 y cordones A fue significativo (p < 0.005). Por el contrario estas muestras no se diferenciaron entre sí. Considerando la gran variación existente en el número de sitios antigénicos por célula: Gr A_1 (adulto) = 910-1170 \times 10³, Gr A_2 (cordón) = 250-370 \times 10³, Gr A_2 (adulto) = 240-290 \times 10³, los resultados sugieren una relación inversa entre dicho número y el II_{50} .

- 85. Ensayo de un componente protéico de Brucella abortus en el diagnóstico de la brucelosis humana.**- F. A. Goldbaum, J. Wallach, C. P. Rubbi, Laura Morelli, C. A. Fossati.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humera (IDEHU), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Hospital Muñiz, Buenos Aires.

En trabajos anteriores demostramos la presencia, en el extracto citoplasmático de Brucella, de antígenos que permiten detectar pacientes brucelosos con alta sensibilidad y resultan útiles para distinguirlos de los individuos serológicamente positivos (SP+) sin evidencias de enfermedad al momento del examen. Uno de esos antígenos, de 45 kDa (CT₄₅) y pI 4.4 (determinado por IEF), de gran abundancia relativa, fue elegido para su estudio. El mismo fue parcialmente purificado mediante SDS PAGE preparativo y cromatografía de afinidad con IgG de conejo hiperinmune. CT₄₅ fue probado en blotting con suero de 13 humanos brucelosos agudos y crónicos, 26 SP+ y 9 controles sanos, mostrando alta sensibilidad para brucelosos (12/13 = 92%) y baja reactividad para SP+ (7/26 = 26%); los controles sanos fueron siempre negativos. Se obtuvieron además varios anticuerpos monoclonales con el fin de caracterizar el antígeno, uno de los cuales, el IC₄₅, detecta al antígeno por blotting y ELISA por competición con un pool de suero de humanos brucelosos, mientras que un pool de suero de humanos normales no produce inhibición. Los resultados hasta ahora obtenidos indican que el antígeno CT₄₅ podría ser útil para su aplicación al diagnóstico de la brucelosis humana.

- 86. Caracterización de antígenos de Toxoplasma gondii reconocidos por el anticuerpo monoclonal TgP8. Su utilidad en el diagnóstico en la toxoplasmosis.**- Viviana Pzenny, S. Angel, J. Blanco, L. Alvarez, L. Romano, J. C. Garberi, Ana Pastini.

CIMAE, Buenos Aires.

Utilizando el anticuerpo monoclonal TgP8 contra Toxoplasma gondii, producido en nuestro laboratorio, se procedió a la caracterización de los antígenos reconocidos por el mismo. Se estudió su potencialidad diagnóstica. Western blots de extractos totales del parásito revelados con TgP8 reconocieron varias bandas polipeptídicas con los siguientes pesos moleculares: 43, 53, 66 y 72 kD. Técnicas inmunocitoquímicas, western blots y ELISA de fracciones subcelulares sugieren que TgP8 reconoce una familia de proteínas de excreción que se ubican en la parte anterior del parásito. Los primeros ensayos de reconocimiento del mol biológico de estos antígenos mostraron un interesante efecto. Al infectar cultivos celulares de un mieloma murino (Balb/c