

ARTICULO ORIGINAL

Evaluación de diferentes péptidos de la región estructural del virus de la hepatitis C

Ivonne Gómez, Milenen Hernández, Carlos Martínez, Marleby García, Antonio Melchor
Centro de Inmunoensayo, Ciudad de La Habana, Cuba

Para el diagnóstico del virus de la hepatitis C, se utilizan ampliamente las pruebas de Elisa por su sensibilidad y especificidad. Gran parte de ellos se basa en el empleo de péptidos sintéticos. Una de las zonas más conservadas y de gran antigenicidad es la región estructural del virus. En este estudio, se sintetizaron siete péptidos de zonas informadas como altamente antigénicas de la región estructural del virus de la hepatitis C. Los péptidos sintetizados representan la región del núcleo del virus. Se realizó la evaluación y comparación de los resultados de los péptidos sintetizados, para lo cual se emplearon muestras positivas (n=72) y negativas (n=42). Con los péptidos más cercanos a la región amino terminal, la reactividad fue alta, pero fue disminuyendo a medida que nos acercábamos a la región carboxilo terminal. Estos resultados coinciden con lo informado por otros autores.

Palabras clave: péptidos sintéticos, HCV core, UMEELISA

Evaluation of different peptides in hepatitis C virus structural region

Elisa tests are widely used for the diagnosis of hepatitis C virus infection because of their sensitivity and specificity. Most of the Elisas are based on the use of synthetic peptides. The structural region of the virus is one of the most preserved regions and it shows high immunogenicity. Seven highly immunogenic peptides from highly immunogenic areas in hepatitis C virus structural region were synthesized. Those peptides represent the structural region of the hepatitis C virus. Results of synthesized peptides were tested and compared. Positive (n=72) and negative (n=42) samples were employed. Reactivity was high in peptides closest to the N-terminus region and it decreased toward the C-terminus region. The results coincide with other authors' results.

Key words: synthetic peptides, HCV core, UMEELISA

El virus de la hepatitis C (HCV) está compuesto por un genoma de ARN de cadena simple con sentido positivo de aproximadamente 9.500 nucleótidos (9,4 kilobases), que codifica para una poliproteína de alrededor de 3.000 aminoácidos, con elevado grado de heterogeneidad genética (1,2). Puede fragmentarse en tres proteínas estructurales (C, E1 y E2/NS1) y seis no estructurales (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a y NS5b) (1).

La proteína estructural del núcleo (C) está altamente conservada y presenta una gran antigenicidad entre los diferentes aislamientos, de ahí la importancia de su incorporación en los

ensayos diagnósticos para la detección de anticuerpos a este virus (3-6). Sin embargo, se ha observado que las zonas cercanas a la región amino terminal son las más antigénicas. A medida que nos alejamos de estas zonas hacia la región carboxilo terminal, la reactividad va disminuyendo (3-6).

En este trabajo se presentan los resultados comparativos de la evaluación de siete péptidos de diferentes regiones del núcleo. Todos los péptidos se sintetizaron de sitios altamente antigénicos.

Materiales y métodos

Síntesis de péptidos

Con el empleo de la predicción de los determinantes antigénicos de las proteínas (7),

Correspondencia:
iqpeptidos@cie.sld.cu

Recibido: 12/04/00; aceptado: 02/02/01

se sintetizaron siete péptidos representativos del virus de la hepatitis C. Los péptidos estaban comprendidos entre los aminoácidos 2-60 para Core1 (31 aminoácidos) y Core2 (20 aminoácidos); entre los aminoácidos 40-90, los péptidos Core3 (26 aminoácidos), Core4 (20 aminoácidos), Core5 (27 aminoácidos) y Core6 (20 aminoácidos), y entre los aminoácidos 100-130, el péptido Core7 (25 aminoácidos). Los péptidos se sintetizaron en fase sólida según el método descrito por Merrifield en 1963, siguiendo la estrategia Boc- en bolsas de polipropileno (*Biotech. Instruments*, USA) (8). Se utilizaron 100 mg de la resina 4-metilbencilhidrilamina (MBHA) (100-200 mesh, 1 mmol/g, Bachem) (9) y el grupo alfa-amino de los aminoácidos protegidos con el grupo Boc- (BACHEM, Suiza). Las reacciones de acoplamiento se realizaron por activación del grupo carboxilo de cada aminoácido con cantidades equivalentes de diisopropilcarbodimida (DIPCDI) 0,2 mol/L en diclorometano (DCM). La eficiencia del acoplamiento de los aminoácidos protegidos se verificó con ayuda del ensayo de ninhidrina. La protección temporal (Boc-) se eliminó con ácido trifluoroacético al 37,5% en DCM (8,9). La desprotección final fue por el método *low-high* con ácido fluorhídrico (HF) puro para análisis (Fluka, Suiza) (8,9). La extracción del péptido se hizo con ácido acético al 30% en agua destilada. El extracto final, diluido en agua, se liofilizó en una liofilizadora Edwards de tecnología inglesa de 9 kg de capacidad en el condensador.

Caracterización de los péptidos sintéticos

La determinación de la pureza de los péptidos sintéticos se realizó por el sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) mediante cromatografía de fase reversa (RP-HPLC) (10), en la que se aplicaron 0,2 mg de péptido (gradiente: 0–60 % B (33'); velocidad de flujo: 0,5 mL/min; velocidad del papel: 2 mm/min; sensibilidad: 0,1 AUFS y temperatura: 22 °C). En los cromatogramas se observó una señal principal que se correspondía con la máxima actividad de los péptidos en el UMELISA. La caracterización del péptido de mejores resultados se realizó mediante la espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption of Ions Time-*

of Flight) (11) y el peso molecular coincidió con el peso teórico.

Recubrimiento de la fase sólida

Con cada uno de los péptidos por separado, se preparó una disolución a 2 mg/ml en carbonato-bicarbonato, 0,05 mol/l, pH 9,6. Como fase sólida se emplearon placas de poliestireno irradiado (12) con capacidad para 30 ml (placas UMELISA, *Greiner labortechnik*, Alemania), las que se recubrieron a 15 ml/pocillo y se incubaron 4 horas a 37 °C. Las placas se lavaron con una disolución amortiguadora de PBS-T (8 g de NaCl; 1,215 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de KH_2PO_4 ; 0,2 g de NaN_3 ; 0,5 mL de Tween-20, para un volumen de 1.000 mL de agua destilada y pH de 7,3-7,5) y, posteriormente, se bloquearon con una disolución de preservo (sacarosa al 5% y BSA al 1% en PBS-Tween), durante toda la noche a temperatura ambiente (20-25 °C). Se aspiró la disolución de preservo y la fase sólida se dejó secar a 37 °C durante 2 horas. Las placas recubiertas se conservaron a 4 °C, en una cubierta protectora, hasta el momento de su uso (1).

Ensayo UMELISA

Las muestras por evaluar se diluyeron 1:20 en suero de carnero al 5% en una disolución amortiguadora Tris-HCl (15 mmol/l de Tris; pH 7,8 y 0,05% Tween-20) y se incubaron 30 min a 37 °C en las placas de reacción. Se lavó tres veces con la disolución amortiguadora Tris-HCl para eliminar los componentes no fijados y se adicionó un conjugado anti-IgG humana en carnero, marcada con fosfatasa alcalina (*Böehringer Mannheim GmbH*, Alemania), que se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Se realizó un nuevo lavado en las mismas condiciones y se añadió, entonces, el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferilfosfato (*Koch Light Ltd. Haverhill, Suffolk, England*), el cual se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente (13). La fluorescencia emitida se midió en un fluorímetro de la serie SUMA® (PR-521, Centro de Inmunoensayo) (excitación a 365 nm y emisión a 450 nm). En todos los experimentos, se incluyeron controles positivos y negativos, los ensayos se realizaron por cuadruplicado y las muestras se analizaron por duplicado.

Muestras

Se analizaron muestras positivas de diferente procedencia (n=72) confirmadas por el ensayo confirmatorio Deciscan HCV, y muestras negativas (n=42).

Parámetros de evaluación clínica

Según estudios previos, se determinó como nivel de corte 0,3. Se consideran positivas todas las muestras en las cuales (13):

$$\frac{R}{Nc} > 1$$

donde: Nc: nivel de corte
R: relación de corte

$$R = \frac{(Fm - Xb)}{(Fmenor - Xb)} \times 0,3$$

Fm: fluorescencia de la muestra
Xb: media del blanco
Fmenor: fluorescencia menor del positivo.

Entre los parámetros de evaluación clínica, se seleccionaron la sensibilidad y la especificidad, así (13):

$$S = \frac{VP}{VP + FN} \times 100\%$$

donde: VP: verdaderos positivos
FN: falsos negativos

$$E = \frac{VN}{VN + FP} \times 100\%$$

donde: VN: verdaderos negativos
FP: falsos positivos

Resultados y discusión

Se realizó la predicción de secuencias antigénicas de la región del núcleo del HCV, empleando las escalas de propensión para sitios antigénicos (7) y el programa Microsoft Excel versión 7.0. Con base en esos resultados, se sintetizaron siete péptidos representativos de esta región, Core1, Core2, Core3, Core4, Core5, Core6 y Core7, de pesos moleculares teóricos de 3.479,47 kDa, 2.345,67 kDa, 2.678,56 kDa, 3.100,85 kDa, 2.987,67 kDa, 2.806,98 kDa y 2.986,43 kDa, respectivamente.

Los péptidos estaban comprendidos entre los aminoácidos 2-60 para Core1 (31 aminoácidos) y

Core2 (20 aminoácidos); entre los aminoácidos 40-90, los péptidos Core3 (26 aminoácidos), Core4 (20 aminoácidos), Core5 (27 aminoácidos) y Core6 (20 aminoácidos), y entre los aminoácidos 100-130 el péptido Core7 (25 aminoácidos).

Se recubrieron las placas de 2 µg/ml con cada uno de los péptidos obtenidos y se analizó un panel de muestras procedentes del banco de sangre, previamente caracterizadas. Los resultados se muestran en la figura 1. Los resultados de los valores de las muestras analizadas se muestran en el cuadro 1 (muestras positivas) y en el cuadro 2 (muestras negativas).

El péptido Core1, que está comprendido entre las secuencias I: a.a. del 5-26, 87% y II: a.a. 13-32, 93% (15); entre las secuencias I: a.a. 1-18, 80%; II: a.a. 11-28, 84% y III: a.a. 21-38, 72% (16) y en la secuencia I: a.a. 2-62, con 92% (17), posee una reactividad de 90,27% (65/72), que coincide con lo informado, lo cual demuestra que este péptido tiene gran antigenicidad para el grupo de muestras analizadas. Este péptido se caracterizó por espectrometría de masas MALDI-TOF. El peso molecular obtenido fue de 3.474,73 kDa, que coincide con el valor teórico (3.479,47 kDa).

El péptido Core2, comprendido en la secuencia III: a.a. 37-56, 67% (15), mostró una reactividad de 86,11% (62/72), siendo superior a los valores informados, pero inferior a la mostrada por el péptido Core1.

Por su parte, Core3, comprendido entre las secuencias IV: a.a. 49-68, 67% (15), III: a.a. 21-38, 72% y IV: a.a. 51-68, 68% (16), mostró una reactividad de 70,83% (51/72), valor que coincide con lo informado.

El péptido Core4, que se encuentra en la secuencia IV: a.a. 49-68, 67% (15), posee una reactividad de 58,3% (42/72), valor también comprendido entre los informados.

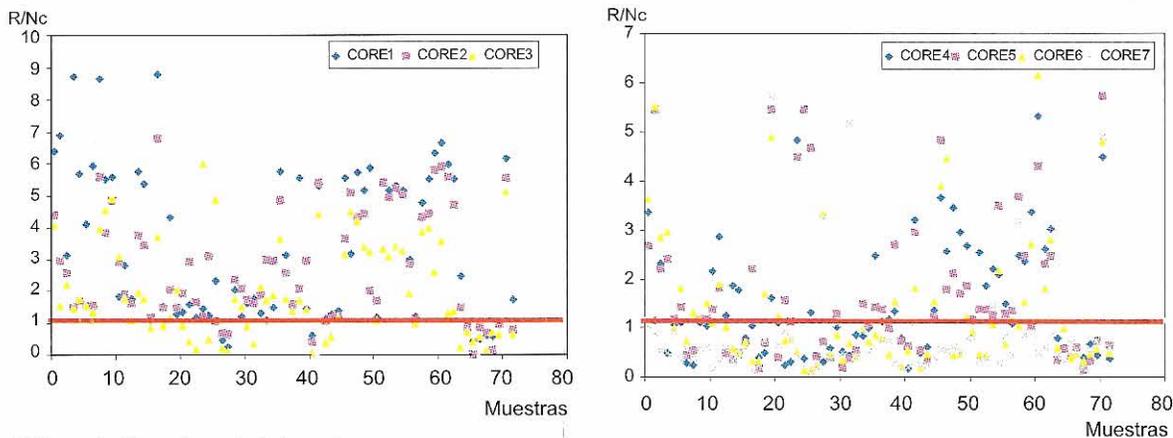
El péptido Core5, que está comprendido entre las secuencias IV: a.a. 49-68, 67% y V: a.a. 61-80, 47% (15) y en la secuencia IV: a.a. 51-68, 68% (16), aunque no se comporta como Core1, mostró también una buena reactividad (62,5%) para las muestras de banco (45/72).

Cuadro 1. Resultados de los péptidos de la región estructural frente a muestras positivas.

Muestras	Core1	Core2	Core3	Core4	Core5	Core6	Core7
5	6,42	4,43	4,12	3,38	2,71	3,67	1,04
9	6,92	3,00	1,58	1,17	5,46	5,54	0,90
51	3,17	2,58	2,25	2,33	2,21	2,88	0,54
354	8,75	1,50	1,46	0,50	2,42	3,00	0,50
358	5,71	1,71	1,79	1,08	1,20	1,01	0,93
359	4,13	1,58	1,58	1,13	1,45	1,83	0,38
364	5,96	1,58	1,38	0,29	0,46	0,75	0,58
370	8,67	5,63	4,00	0,25	0,54	1,33	0,42
390	5,54	3,88	4,58	1,13	1,20	1,18	0,59
3901	5,63	4,88	4,96	1,05	1,20	1,54	0,63
253	1,88	2,96	3,13	2,17	1,40	1,12	0,17
304	2,83	1,92	1,79	2,88	1,83	1,92	0,33
474	1,79	1,67	1,13	1,25	0,50	1,02	0,60
511	5,79	3,79	2,00	1,88	0,38	0,58	0,33
511	5,42	3,46	1,79	1,79	0,50	0,50	0,46
518	1,13	1,21	0,88	0,80	0,71	0,71	0,58
578	8,79	6,79	3,75	1,04	2,23	0,34	0,13
584	1,54	1,50	0,96	0,42	0,18	0,34	0,26
643	4,33	2,08	1,21	0,50	0,71	1,71	0,75
676	1,29	1,50	2,08	1,63	5,46	4,92	5,75
3423	1,38	1,96	0,96	1,13	0,42	1,25	0,67
MM6	1,62	2,94	0,46	0,25	1,59	0,75	0,93
MM7	1,20	1,68	0,22	0,32	1,15	0,77	0,75
VOL9	1,46	1,23	6,02	4,85	4,50	0,52	0,43
J06	1,25	3,12	0,53	0,38	5,47	0,15	0,23
J07	2,36	1,09	4,92	1,33	4,69	0,15	0,12
JH11	0,49	0,70	0,26	0,43	0,44	0,25	0,22
204-5	0,27	0,68	0,15	0,32	0,73	3,36	3,28
204-18	2,07	2,39	1,77	0,59	0,42	0,49	0,41
204-19	1,24	2,11	1,53	1,03	1,30	0,87	1,11
103-8	1,65	1,74	0,92	0,54	0,20	0,38	0,51
4	1,80	1,66	0,40	0,47	0,39	0,70	5,20
111	1,35	1,91	2,17	0,86	0,54	0,43	0,42
P07	1,14	3,00	1,77	0,84	1,50	0,99	0,94
902-11	1,51	2,97	1,90	1,01	1,10	0,73	0,52
26	5,80	4,870	3,670	2,500	1,45	0,86	1,13
80	3,15	2,600	1,780	1,150	1,39	0,80	0,75
92	1,50	1,600	1,400	1,200	1,00	0,47	0,75
149	5,57	2,11	1,760	1,340	2,72	1,55	0,297
506	1,48	2,98	1,430	0,800	0,75	0,23	0,163
1069	0,63	0,42	0,093	0,186	0,65	0,55	0,203
2622	5,32	5,45	4,460	3,230	2,97	1,82	1,120
2640	1,15	1,10	0,417	0,513	0,55	0,20	0,250
2809	1,30	1,200	0,587	0,623	0,38	0,47	0,25
2869	1,42	1,240	1,200	1,38	1,23	1,55	0,41
3170	5,56	3,697	3,193	3,674	4,85	3,93	0,577
4062	3,19	5,13	4,530	2,58	1,80	4,49	0,560
4077	5,74	4,34	4,230	3,470	2,13	0,46	0,617
4182	5,20	4,45	3,450	2,980	1,71	0,50	0,537
4229	5,90	2,04	3,270	2,700	1,88	1,23	0,800
6634	1,20	1,71	1,130	1,170	1,20	0,93	0,82
7049	5,43	5,430	3,380	2,560	1,39	0,49	0,36
7049	5,20	4,970	3,120	1,870	1,40	0,45	0,39
7350	5,35	5,250	3,450	2,230	1,29	1,11	1,45
7730	5,18	5,070	3,290	2,100	3,51	2,20	0,30
8840	3,00	2,890	1,980	1,500	1,30	0,68	0,84
9602	1,24	1,120	1,030	1,100	1,38	1,20	0,45

Cuadro 1. Resultados de los péptidos de la región estructural frente a muestras positivas (continuación).

Muestras	Core1	Core2	Core3	Core4	Core5	Core6	Core7
E1662	4,80	4,360	3,890	2,500	3,71	1,05	3,20
E6627	5,54	4,470	4,030	2,370	2,49	1,55	0,87
P07	6,33	5,82	2,63	3,38	1,04	2,75	0,87
13	6,67	5,92	3,63	5,33	4,33	6,17	0,50
111	6,00	5,63	1,33	2,63	2,34	1,83	0,63
4	5,54	4,75	1,42	3,04	2,50	2,83	0,88
43	2,50	1,50	0,29	0,79	0,38	0,63	0,46
358PM	1,04	0,89	0,75	0,597	0,58	1,00	0,34
9	0,46	0,02	0,46	0,432	0,42	0,42	0,71
204-19	0,54	0,88	0,58	0,6	0,63	0,50	0,54
103-3	0,63	0,71	0,17	0,42	0,17	0,33	0,21
103-6	0,58	0,17	0,75	0,68	0,33	0,50	0,54
1685	1,00	0,97	0,67	0,45	0,75	0,58	0,75
358	6,17	5,58	5,17	4,50	5,75	4,83	4,92
305	1,75	0,79	0,67	0,38	0,67	0,50	0,63



R/Nc: relación sobre nivel de corte
 Muestras: número de muestras analizadas

Figura 1. Resultados de los péptidos de la región del núcleo del HCV con muestras positivas.

El péptido Core6, comprendido en la secuencia IV: a.a. 51-68, 68% (16), posee una reactividad de 48,613% (35/72), valor muy similar a lo informado.

El péptido Core7 fue capaz de reconocer solamente un 13,8% (10/72), por lo que pudimos concluir que no es antigénico para el grupo de muestras analizadas. Esta secuencia coincide con la V: a.a.101-118, 72% (16); sin embargo, no se obtienen los resultados mencionados.

Exceptuando el péptido Core7, la reactividad de los péptidos obtenidos por nosotros osciló entre 48 y 96%, lo que coincide con lo informado por

Deleys y colaboradores, 1992 (47-93%); Sallberg y colaboradores, 1992 (68-84%); Nakagiri e Ichihara, 1995 (92%), e Ishida y colaboradores, 1993 (97,5%).

El no reconocimiento de las muestras reportadas como positivas por parte de los péptidos se puede deber a que los anticuerpos de las muestras no reconozcan ninguno de los determinantes antigénicos presentes en los péptidos; que los títulos de anticuerpos no sean lo suficientemente altos en correspondencia con la concentración del antígeno en fase sólida, o que la disposición espacial de los determinantes antigénicos, al

Cuadro 2. Resultados de los péptidos de la región estructural frente a muestras negativas.

Muestras	Core1	Core2	Core3	Core4	Core5	Core6	Core7
2	0,043	0,027	0,007	0,047	0,060	0,170	0,290
5	0,200	0,003	0,003	0,067	0,070	0,140	0,187
16	0,173	0,053	0,063	0,100	0,527	0,300	0,119
20	0,110	0,003	0,003	0,043	0,577	0,100	0,187
110	0,287	0,260	0,003	0,417	0,363	0,103	0,180
135	0,587	0,050	0,051	0,653	0,574	0,693	0,653
208	0,057	0,003	0,003	0,297	0,280	0,070	0,073
214	0,327	0,190	0,130	0,283	0,053	0,413	0,450
228	0,290	0,207	0,003	0,407	0,300	0,173	0,273
272	0,093	0,003	0,003	0,287	0,270	0,097	0,203
274	0,087	0,003	0,003	0,400	0,587	0,017	0,063
275	0,060	0,003	0,003	0,437	0,637	0,170	0,193
291	0,187	0,003	0,003	0,337	0,497	0,310	0,187
311	0,103	0,003	0,003	0,407	0,720	0,083	0,117
330	0,257	0,160	0,063	0,277	0,563	0,220	0,223
342	0,067	0,003	0,003	0,210	0,343	0,117	0,077
359	0,020	0,003	0,003	0,003	0,213	0,063	0,117
372	0,140	0,003	0,003	0,190	0,330	0,197	0,250
376	0,227	0,003	0,003	0,007	0,120	0,210	0,327
379	0,120	0,090	0,003	0,003	0,057	0,227	0,197
380	0,113	0,003	0,003	0,023	0,103	0,297	0,253
384	0,110	0,003	0,003	0,003	0,003	0,123	0,187
426	0,133	0,033	0,003	0,070	0,037	0,137	0,197
427	0,150	0,003	0,003	0,023	0,090	0,093	0,130
429	0,147	0,003	0,003	0,073	0,123	0,193	0,240
432	0,117	0,017	0,003	0,080	0,020	0,117	0,067
550	0,700	0,703	0,693	0,003	0,013	0,663	0,630
545	0,033	0,050	0,470	0,003	0,600	0,170	0,200
665	0,517	0,240	0,183	0,003	0,003	0,453	0,653
680	0,540	0,220	0,190	0,003	0,003	0,413	0,530
1088	0,420	0,380	0,280	0,027	0,030	0,397	0,450
2011	0,257	0,197	0,187	0,003	0,100	0,293	0,537
2778	0,780	0,657	0,680	0,057	0,097	0,807	0,700
2805	0,563	0,493	0,363	0,103	0,137	0,340	0,243
10786	0,733	0,403	0,517	0,020	0,053	0,503	0,550
10902	0,193	0,270	0,260	0,007	0,087	0,687	0,340
11111	0,413	0,410	0,427	0,003	0,037	0,637	0,350
7m1	0,097	0,003	0,003	0,033	0,057	0,227	0,303
7m2	0,020	0,003	0,003	0,003	0,047	0,143	0,160
8m	0,220	0,217	0,077	0,003	0,063	0,277	0,250
9m	0,633	0,300	0,050	0,187	0,137	0,407	0,337
Dr	0,143	0,077	0,210	0,003	0,120	0,563	0,407

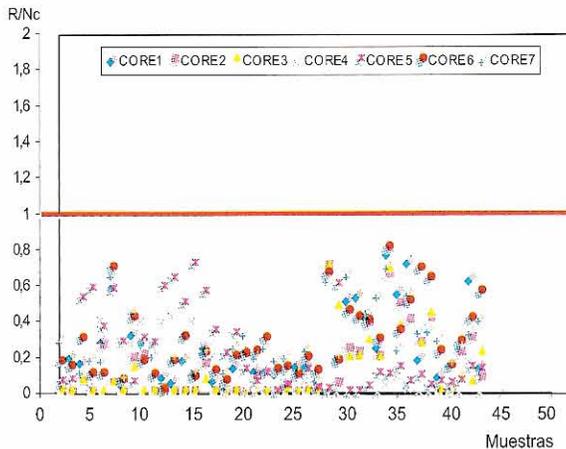
unirse a la fase sólida, no sea la adecuada y queden solapados.

La especificidad de todos los péptidos obtenidos al analizar 42 muestras informadas como negativas fue de 100%, resultados que se muestran en la figura 2.

Los resultados de especificidad y sensibilidad de cada uno de los péptidos de la región estructural se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Resultados de la especificidad y sensibilidad de los péptidos de la región estructural.

Péptidos	Muestras	Sensibilidad (%)	Muestras	Especificidad (%)
Core1	165/72	90,27	42/42	100
Core2	62/72	86,11	42/42	100
Core3	51/72	70,83	42/42	100
Core4	42/72	58,30	42/42	100
Core5	45/72	62,50	42/42	100
Core6	35/72	48,61	42/42	100
Core7	10/72	13,80	42/42	100



R/Nc: relación sobre nivel de corte
Muestras: número de muestras analizadas

Figura 2. Resultados de los péptidos de la región del núcleo del HCV con muestras negativas.

Como se puede observar, los péptidos cercanos a la región amino terminal, que es la más antigénica, son los que presentan la mayor reactividad; a medida que nos alejamos de esta zona hacia la región carboxilo-terminal, la reactividad va disminuyendo (3-5).

Agradecimientos

Al Departamento de Análisis Espectral del Instituto de Inmunología de Colombia por la colaboración prestada en la caracterización por espectrometría de masas de los péptidos sintetizados.

Referencias

1. **Gómez I.** Obtención y evaluación de péptidos sintéticos inmunodominantes de la región estructural y no estructural del virus de la hepatitis C (tesis). Universidad de La Habana, La Habana; 1999.
2. **Lunel F, Pawlotsky JM.** Hepatitis C virus. Virological diagnosis. *Pathol Biol* 1995;43:681-90.
3. **Bonino F, Baldi M, Brunetto MR.** Hepatitis C virus infection. In: Crivelli O, editor. *Progress in hepatitis research: hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), hepatitis delta virus (HDV)*. Sorin Biomedica 1994;49-61.
4. **Cuthbert JA.** Hepatitis C: progress and problems. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:505-32.
5. **Robinson JW, Rosas M, Guzmán F, Patarroyo ME, Moreno A.** Comparison of prevalence of anti-hepatitis C

virus antibodies in differing South American populations. *J Med Virol* 1996;50:188-92.

6. **Yoshihara N.** ELISA for diagnosis of infections by viruses. *Nippon Rinsho* 1995;53:2277-82.
7. **Chou PY, Fasman GD.** Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 1974;13:222-45.
8. **Merrifield RB.** Peptide synthesis. I. The synthesis of a tetropeptide. *J Am Chem Soc* 1963;85:2149.
9. **Houghten RA.** Simultaneous multiple peptide synthesis: the rapid preparation of large numbers of discrete peptides for biological, immunological and methodological studies. *Biotechniques* 1986;4:522.
10. **Stone KL, LoPresti MB, Myron J, DeAngelis R, Williams KR.** Enzymatic digestion of proteins and HPLC peptide isolation. In: *A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing*. London: Academic Press, Inc.; 1989. p.31-47.
11. **Holle A, Mayer FJ.** Matrix-assisted laser desorption on the REFLEX™ time of flight mass spectrometry system. *Mass Spectrometry* 1993;18-20.
12. **Boudet F, These J, Zouali M.** UV-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. *J Immunol Methods* 1991; 142:73-82.
13. **Gómez I, Cazanave J, Solís RL, Machado C, Bécquer D, Fernández JL.** A new UMELISA format for the quantification of maternal serum alpha-fetoprotein. *Biología Aplicada* 1996;13:109.
14. **Broughton PMG, Bergonzi C, Lindstedt G, Loeber JG, Malan PG.** Guidelines for the evaluation of diagnostic kits. General principles and outline procedures for the evaluation of kits for qualitative tests. Part 2. Paris: European Committee for Clinical Laboratory Standards; 1987.
15. **Deleys RJ, Pollet D, Maertens G, Van Heuverswyn H,** inventors; Innogenetics N.V., assignee. Synthetic antigens for the detection of antibodies to hepatitis C virus. US Patent No. 0489968 A1. 1992 March 16.
16. **Sällberg M, Ruden U, Wahren B, Magnus LO.** Immunodominant regions within the hepatitis C virus core and putative matrix proteins. *J Clin Microbiol* 1992;30: 1989-94.
17. **Nakagiri I, Ichihara K.** ELISA for anti-HCV antibody employing a shorter synthetic core region peptide. *J Virol Methods* 1995;52:195-207.
18. **Ishida C, Matsumoto K, Fukada K, Matsushita K, Shiraki H, Maeda Y.** Detection of antibodies to hepatitis C virus (HCV) structural proteins in anti-HCV-positive sera by an enzyme-linked immunosorbent assay using synthetic peptides as antigens. *J Clin Microbiol* 1993;31: 936-40.