

MSPEP: PROGRAMA PARA LA SÍNTESIS MÚLTIPLE Y SIMULTÁNEA DE PÉPTIDOS.

Carlos Martínez Ortiz*, Milenen Hernández Marín*, Ivonne Gómez Cordero*, Orlando Zulueta Rodríguez**, Antonio Melchor Rodríguez**

* Laboratorio de Síntesis de Péptidos, Centro de Inmunoensayo.

** Laboratorio de Purificaciones, Centro de Inmunoensayo.

Recibido: 12 de octubre de 2002

Aceptado: 24 de marzo de 2002

Palabras claves: Síntesis Péptidos, VIH, HCV, *Trypanosoma cruzi*, Programa.

Key words: Peptide synthesis, HIV, HCV, *Trypanosoma cruzi*, Software.

RESUMEN: Los péptidos sintéticos son de gran aplicabilidad en la actualidad por su utilización en el desarrollo de vacunas, como antígenos específicos en sistemas diagnósticos para la detección de anticuerpos y en el estudio de la estructura y la actividad de las diferentes zonas activas de los virus, entre otras aplicaciones. En este trabajo describimos la síntesis química en fase sólida de varios péptidos correspondientes a HCV, VIH, y *Trypanosoma cruzi*. El diseño de péptidos se realizó mediante programas de computación y consulta en base de datos de proteínas y con el objetivo de auxiliar la síntesis múltiple y simultánea de los péptidos en fase sólida se diseñó y desarrolló un nuevo programa (MSPEP). Esta aplicación se ejecuta sobre Microsoft Windows 95 utilizando las facilidades inherentes a esta plataforma gráfica e incluye nuevas opciones que no se encuentran en sistemas anteriores que se ejecutan sobre MS-DOS. Todos los péptidos sintetizados fueron evaluados en los ensayos ultramicroELISA respectivos, frente a muestras positivas caracterizadas para cada agente etiológico, obteniéndose una sensibilidad en HCV entre 77,7 y 100 %, en VIH del 53 y 100 % y en *Trypanosoma cruzi* de un 100 %. En todos los casos la especificidad fue de un 100 %. El programa desarrollado es de una gran utilidad en la síntesis de péptidos, debido a que garantiza rapidez y confiabilidad en los cálculos químicos, con un mínimo de error. Al ejecutarse sobre la plataforma de Windows amplía sus posibilidades, siendo más accesible y cómodo al usuario.

ABSTRACT: Synthetic peptide have great applicability at the present time for their usefulness in the development of vaccines, such as specific antigens in immunodiagnostic for the detection of antibodies, in the study of the structure and the activity of the different active areas of the virus, among other applications. In this work the synthesis of several peptides corresponding to HCV, HIV, and *Trypanosoma cruzi* were described. The peptide design was carried out by means of calculation programs and consultation in protein databases, and in order to help the multiple and simultaneous peptide synthesis in solid phase, a new software was designed and developed. This application is executed on Microsoft Windows 95 using the inherent facilities to this graphic platform and it includes new options that are not in previous systems which are executed on MS-DOS. All the synthesized peptides were evaluated in the corresponding

ultramicroELISA assays, with positive samples characterized for each etiologic agent, being obtained a sensitivity in HCV between 77,7 and 100 %, in HIV of 53 and 100 %, in *Trypanosoma cruzi*, it was of 100%. In all the cases a specificity of 100 % was obtained. The software developed is of a great utility in the peptide synthesis because it guarantees speed and reliability in the chemical calculations with a minimum of error. As it is executed on Windows platform, it enlarges the possibilities of being more accessible and comfortable to the user

INTRODUCCION

La síntesis química de péptidos ha alcanzado en los últimos años un desarrollo acelerado, en ello ha influido el descubrimiento de péptidos biológicamente activos, los cuales son de gran utilidad en el desarrollo de vacunas, como antígenos específicos en sistemas diagnósticos para la detección de anticuerpos, porque representa un paso importante en el desarrollo de técnicas de diagnóstico de nueva generación, en el estudio de la estructura y la actividad de las diferentes zonas activas de los virus, entre otras aplicaciones.

La síntesis de péptidos requiere de un análisis previo de las secuencias,

con el objetivo de localizar los determinantes antigénicos en las proteínas de los agentes etiológicos de interés.^{1,2} Este análisis de secuencia contiene los siguientes pasos:

- 1) Búsqueda de la secuencia en las bases de datos de proteínas.
- 2) Comparación con secuencias relacionadas y variaciones en las mismas.
- 3) Predicción de sitios antigénicos en las proteínas, basándose en las escalas de probabilidad establecida.

Una vez seleccionada la secuencia peptídica adecuada, se procede a la síntesis química en fase sólida.

Con el objetivo de auxiliar la síntesis múltiple y simultánea de péptidos, en fase sólida, se diseñó y desarrolló un nuevo programa (MSPep), el cual garantiza realizar los cálculos químicos con mayor rapidez y con el mínimo de error.^{3,4} Esta aplicación se ejecuta sobre Microsoft Windows 95 utilizando las facilidades inherentes a esta plataforma gráfica e incluye nuevas opciones que no se encuentran en sistemas anteriores que se ejecutan sobre MS-DOS.

Mediante la síntesis química de péptidos en fase sólida se han obtenido en nuestro laboratorio péptidos sintéticos correspondientes a varias regiones del virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)^{5,6}, virus de la hepatitis C (HCV)^{7,8}, *Trypanosoma cruzi*⁹ y otros en proceso de desarrollo. Todos estos péptidos han sido aplicados en diferentes ensayos diagnósticos, lo que ha permitido mejorar la calidad de los ya existentes y desarrollar nuevas pruebas diagnósticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Programa para la síntesis múltiple y simultánea de péptidos: MSPep

El sistema se instrumentó utilizando el lenguaje *Object Pascal de Borland Delphi* versión 3.0 dada las facilidades que brinda *Delphi* como herramienta de programación visual para la creación de una interfaz amena y flexible.⁴ Además, el *Object Pascal de Delphi* es un lenguaje orientado a objetos que

refleja la naturaleza única de la Programación Orientada a Objetos (POO) de construir sobre pilares conceptuales importantes del diseño de programas: abstracción, herencia, polimorfismo, ocultamiento de información y modularidad. Brinda clases para el acceso a bases de datos y la visualización de información almacenada en ellas, así como facilidades para la manipulación de excepciones y el uso de la programación guiada por eventos, que permite mantener un número reducido de clases, ya que en muchos casos evita la herencia.

El programa le permite al usuario definir los siguientes parámetros:

- a) grado de sustitución de la resina (meq/g)
- b) cantidad de resina (mg),
- c) concentración de aminoácidos (mol/L),
- d) exceso de cada uno de los reactivos (X),
- e) volumen de reacción (mL)
- f) peso molecular de los aminoácidos protegidos (g/mol).

Los cálculos para la desprotección de los péptidos se hacen tomando en cuenta las concentraciones de ácido fluorhídrico (HF) (altas o bajas), donde se utilizan cuatro mezclas de agentes nucleofílicos en dependencia de la composición de aminoácidos del péptido.

Para calcular el peso molecular del péptido se realiza la sumatoria de los pesos moleculares de los aminoácidos que lo forman, menos el peso de una molécula de H₂O.

Para el cálculo del Punto Isoeléctrico (PI), se empleó un algoritmo novedoso que simula una valoración ácido-base teniendo en cuenta los pK de los residuos cargados del péptido.¹⁰⁻¹²

Síntesis de péptidos

Los péptidos fueron obtenidos mediante síntesis química en fase sólida¹³ empleando la estrategia Boc (*tert*-butiloxicarbonilo) en bolsas de polipropileno. Las reacciones de acoplamiento se realizaron a temperatura ambiente, por activación del grupo carboxilo de cada aminoácido con *N,N'*-diisopropilcarbodiimida¹⁴ a 0,2 mol/L en diclorometano y fueron verificados por el ensayo cualitativo

de la ninhidrina.¹⁵ El grupo Boc fue eliminado con ácido trifluoroacético 37,5 % en diclorometano. La eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales y la ruptura del péptido de la resina se realizó mediante el procedimiento "Low-High HF", utilizando ácido fluorhídrico.^{16,17} Posteriormente, las bolsas se lavaron con éter dietílico, se secaron al vacío y se extrajeron los péptidos de la resina con ácido acético 30 % en agua destilada. El extracto final se diluyó con agua y se liofilizó.

Purificación de los péptidos

Los péptidos se purificaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa (RP- HPLC, *Pharmacia*, LKB).¹⁸ En una columna RP18 (*Pharmacia*) se aplicaron 200 µL de la muestra (0,2 mg/ mL), se eluyó con el empleo de un sistema de gradiente A/B de 0 a 60 % B (A TFA 0,1% (V/V) y acetonitrilo 2 % (V/V) en H₂O; B TFA 0,05 % (V/V) en acetonitrilo), un flujo de 0,5 mL/min; una velocidad del papel de 2 mm/min; una sensibilidad de 1 unidad de absorbancia, a 22 °C.

Caracterización de los péptidos

La caracterización de los péptidos, se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption of Ions Time-of-Flight*).^{19,20} En un espectrómetro de masas *Bruker Protein TOF- TM* (USA) se bombardeó la muestra con luz láser, se aplicó un campo eléctrico de 3 ns, a una longitud de onda de 337 nm. La matriz empleada fue el ácido ciano-4-hidroxicinámico (Sigma).

Recubrimiento de las placas

Cada péptido purificado se diluyó en disolución reguladora carbonato-bicarbonato, 0,05 mol/L; pH 9,6; a una concentración de 2 µg/mL. Con esta disolución, se recubrieron placas de poliestireno (placas UMELISA, *Greiner labortechnik*, Alemania), a 15 µL/pocillo y se incubaron durante 3 h a 37 °C. La fase sólida se lavó con una disolución amortiguadora de DSAF-Tween 20 (disolución salina amortiguadora de fosfato; 8 g de NaCl;

1,215g de Na₂HPO₄ • 2H₂O; 0,2g de KH₂PO₄; 0,2g de NaN₃; 0,5mL de Tween-20; para 1000 mL de agua destilada y pH de 7,3 a 7,5). A continuación, se bloqueó con una disolución de preservo (BSA al 1 % en DSAF-Tween 20), durante toda la noche a temperatura ambiente. Las placas se conservaron a 4 °C, con una cubierta protectora, hasta el momento de su uso.

Ensayo UMELISA

Las muestras se diluyeron 1:20 con suero de carnero al 20 % en Tris hidroximetilmetilamina HCl (15 mmol/L de Tris; pH 7,8 y 0,05 % Tween-20) para una concentración final de 5% y se incubaron 30 min a 37 °C en las placas de reacción. Después de lavar tres veces con la disolución reguladora Tris-HCl, se adicionó un conjugado Anti-IgG humana en carnero marcada con fosfatasa alcalina (*Böehringer Mannheim GmbH*, Alemania). Se incubó nuevamente durante 30 min a 37 °C y se realizó un nuevo lavado en las mismas condiciones, se añadió entonces el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferilfosfato (*Koch Light Ltd. Haverhill, Suffolk*, Inglaterra) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La fluorescencia emitida fue medida en un fluorímetro de la

serie SUMA® (PR-521, Centro de Inmunoensayo, Cuba).^{21,22} En todos los experimentos, se incluyeron controles positivos y negativos y las muestras se analizaron por duplicado.

Muestras de sueros

En la evaluación de los péptidos de VIH se analizaron 15 muestras del Panel de Bajo Título PRB-106, seis muestras del Panel de Seroconversión PRB-952 y cinco muestras del Panel de Seroconversión PRB-917, (*Boston Biomedica Inc.*), confirmadas por el ensayo *Western Blot* (WB). Para evaluar la especificidad de los péptidos sintéticos se analizaron 30 muestras de donantes del Banco de Sangre de Marianao (Ciudad de la Habana, Cuba).

Para evaluar los péptidos de HCV se analizaron las muestras de los paneles PVH103 y PVH204 de la *Boston Biomedica Inc.* Para evaluar la especificidad de los péptidos sintéticos se analizaron 34 muestras positivas por VDRL y 4 negativas.

Se estudiaron 20 muestras de sueros positivos a Chagas procedentes del Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas “Dr Mario Fatała Chaben”, Buenos Aires, Argentina y además, para evaluar la especifici-

dad de los péptidos sintéticos se analizaron 20 muestras positivas a *Leishmania* y 20 muestras de donantes sanos de un banco de sangre.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Basándonos en programas de síntesis, entre ellos Peptide Builder Light Versión 1.0 de la Biopeptide Co. LLC y Synthetica de MassData Database Systems, se desarrolló el MSPep que contiene todas las opciones incluidas en programas anteriores tales como, el cálculo de los volúmenes de solventes y la cantidad de aminoácidos para ser usados en toda la síntesis y en cada acoplamiento individual. El programa incorpora pantallas con la secuencia de cada péptido a sintetizar, el peso molecular de cada uno de los aminoácidos y sus características (Fig. 1). Permite crear las listas de chequeo de aminoácido contra bolsa y viceversa, lo que posibilita realizar en el proceso de síntesis el chequeo de cada acoplamiento, se pueden calcular las mezclas empleadas para concentraciones altas y bajas de HF en el proceso de desprotección y ruptura de los péptidos y el peso molecular de los mismos (Fig. 1).

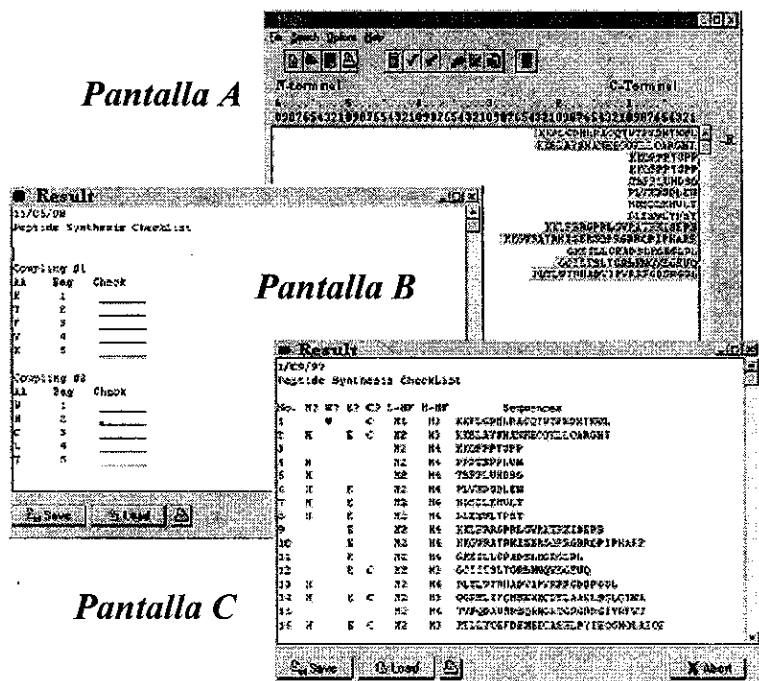


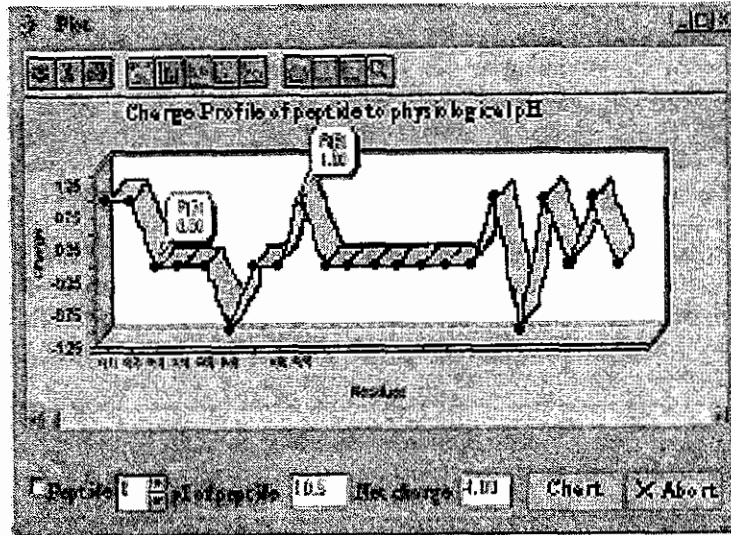
Fig. 1. Pantallas del programa MSPep: A: secuencia de los péptidos a sintetizar, B: listas de chequeo del acoplamiento y C: datos para el proceso de desprotección “Low-High HF”

Esta aplicación también tiene opciones para el control de calidad tales como tablas para el chequeo de los acoplamientos en la prueba de ninhidrina y para características ge-

nerales de la síntesis. Se puede monitorear la purificación de los péptidos en HPLC mediante una tarjeta de adquisición de datos conectada a un puerto serie de la

computadora. Otra de sus utilidades es que permite obtener gráficos de secuencia de aminoácidos contra carga y el cálculo de la carga neta y el punto isoeléctrico de los péptidos (Fig. 2).

Fig. 2. Gráfico de secuencia de aminoácidos contra carga y cálculo de carga neta y punto isoeléctrico de los péptidos



Se sintetizaron dos péptidos correspondientes a la proteína de membrana gp41 del VIH-1; gp41 (A) y gp41 (H-18), las secuencias de los dos péptidos fueron seleccionadas a partir del aislamiento Bru HIV-1.²³ La pureza de los

péptidos fue comprobada por Cromatografía RP- HPLC y resultó del 95 % (Fig. 3). Además, se caracterizaron por Espectrometría de Masas MALDI-TOF. El péptido gp41(A) con Masa Molecular Calculada: 3448.69 y Masa Molecular

obtenida: 3452.3 y el péptido gp41 (H-18) con Masa Molecular Calculada: 3954.09 y Masa Molecular obtenida: 3953.53 (Fig. 4).

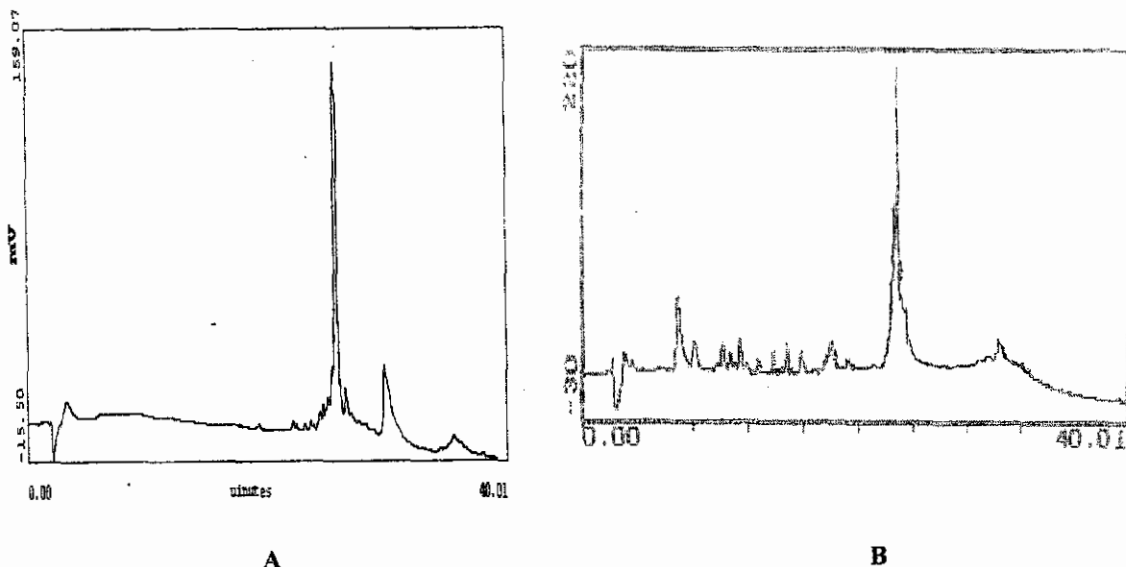


Fig. 3. Perfiles cromatográficos de los péptidos sintéticos de la proteína gp41 del VIH-1 : (A) gp41(A) y (B) gp41(H-18) del VIH-1.

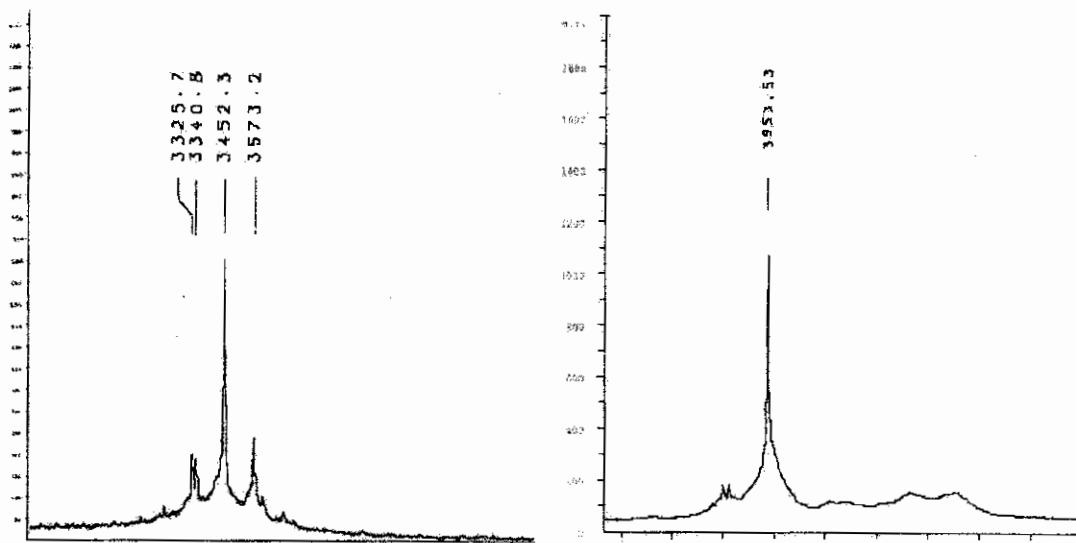


Fig. 4. Espectros de masas (MALDI-TOF) de los péptidos de la proteína gp41 del VIH-1 : (A) gp41(A) y (B) gp41(H-18) del VIH-1.

Con los péptidos gp41 (A) y gp41 (H-18), se obtuvo una sensibilidad del 53 % y 100 % respectivamente, para el grupo de muestras positivas

de los Paneles de Seroconversión y un 100 % de especificidad para las muestras negativas (Fig. 5). Las muestras fueron consideradas

positivas cuando el valor de relación sobre el nivel de corte fue mayor o igual a 1 (VR/NC \geq 1).

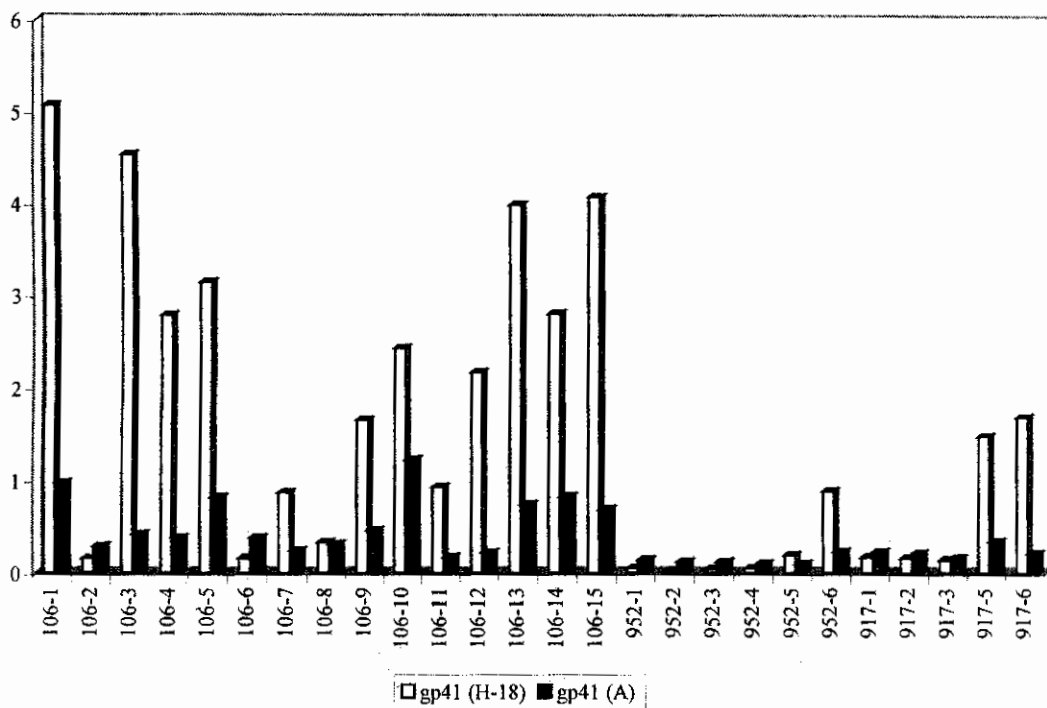


Fig. 5. Reactividad de los péptidos gp41 (H-18) y gp41 (A) frente muestras de los Paneles de Seroconversión de Boston Biomedical Inc.

Con el objetivo de determinar la especificidad de los dos péptidos de VIH, se analizaron 30 muestras de sueros de donantes de un banco de sangre, obteniéndose 100 % de especificidad.

Se sintetizaron dos péptidos de HCV, Core1 y quimérico NS4-NS5,

representativos del núcleo y la regiones no estructurales NS4 y NS5 respectivamente. La pureza de los péptidos fue comprobada por Cromatografía RP- HPLC y resultó del 95 %. Además, se caracterizaron por Espectrometría de Masas MALDI-TOF, en el péptido Core1

la masa molecular obtenida fue de 3474,73 y la calculada de 3479,47; para el péptido quimérico NS4-NS5 la masa molecular obtenida fue de 3731,48 y la calculada de 3728,53.

Los resultados con los péptidos de HCV (Core1 y quimérico NS4-NS5) se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de los péptidos de HCV frente a los paneles de la Boston Biomédica Inc.

PÉPTIDOS	PANEL PVH103		PANEL PVH205	
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
Core1	87,5 % (7/8)	100 % (7/7)	100 % (13/13)	100 % (11/11)
NS4-NS5	77,7 % (7/9)	100 % (1/1)	84,2 % (16/19)	100 % (2/2)

Sonmez y cols. en 1997, hicieron referencia a reacciones falsas positivas de pacientes con sífilis en un ensayo de HCV (ELISA de 2^{da} generación de *Ortho Diagnostic*) y de pacientes con hepatitis C en un ensayo de sífilis (VDRL) lo que puede ser debido a la interacción inespecífica con los anticuerpos IgM o IgG de las muestras analizadas.²⁴ Para verificar si las muestras positivas a sífilis eran reactivas

frente a los péptidos sintéticos de HCV, se analizaron 34 muestras positivas por VDRL y 4 negativas. Ninguna de las muestras reportadas como positivas para sífilis, fue positiva para los péptidos sintéticos, obteniéndose 100 % de especificidad.

La evaluación de tres péptidos del *Trypanosoma cruzi* sintetizados (p17 (R-COOH), p17(R-CONH₂), p18) y el antígeno natural en un ensayo

inmunoenzimático, se llevó a cabo empleando 20 muestras positivas a Chagas, procedentes del Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr Mario Fatała Chaben", Buenos Aires, Argentina (Fig. 6). Las muestras fueron consideradas positivas cuando el valor de relación sobre el nivel de corte fue mayor o igual a 1 (VR/NC ≥ 1).

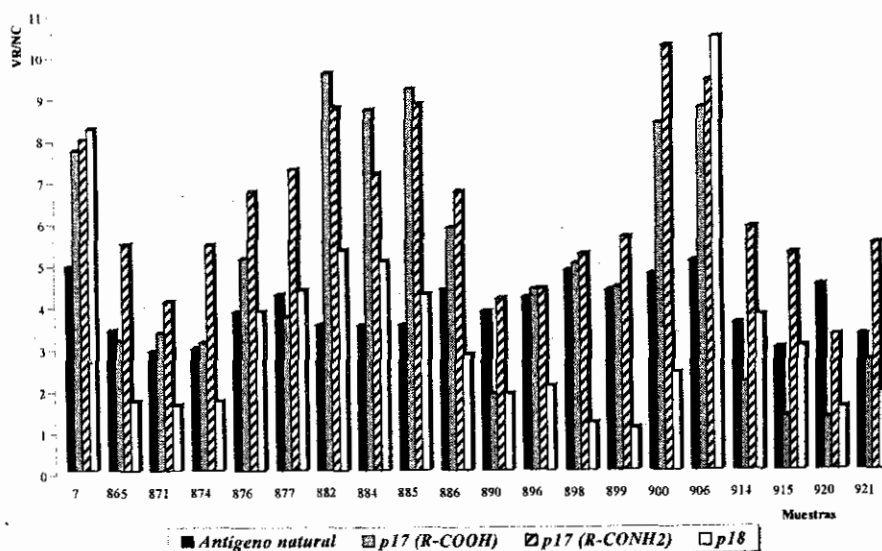


Fig. 6. Comportamiento de los péptidos sintéticos p17 (R-COOH), p17 (R-CONH₂), p18 y el antígeno natural del *Trypanosoma cruzi* frente a 20 muestras positivas a Chagas.

Con el péptido de mejores resultados p17 (R-COOH) se evaluó la especificidad. No se observó reactividad inespecífica frente a las muestras positivas a *Leishmania* (VR/NC<1), lo que demostró que la secuencia es antigénica y no presenta homología en la secuencia de aminoácidos, ni una estructura similar a la secuencia de *Leishmania*, que se corresponde con esta región, lo que garantiza una especificidad del 100 %.²⁵ Para las 20 muestras de donantes sanos de un banco de sangre, tampoco se obtuvo reactividad.

CONCLUSIONES

Se diseñó un programa que permite el cálculo rápido y fiable para las diferentes etapas de la síntesis de péptidos múltiple y simultánea. Para evaluar la efectividad de este programa se obtuvieron péptidos mediante síntesis química en fase sólida, de la región de transmembrana (gp41) del VIH-1, región del núcleo y las regiones no estructurales NS4 y NS5 del HCV y péptidos de regiones inmunodominantes del *Trypanosoma cruzi*, causante del mal de Chagas. Con todos los péptidos se obtuvo buena sensibilidad frente a muestras positivas caracterizadas y un 100% de especificidad.

Se demostró que el programa diseñado tiene una gran utilidad para facilitar los cálculos químicos necesarios para la síntesis química de varios péptidos de forma simultánea, y además la ventaja de ejecutarse sobre la plataforma de Windows amplía sus posibilidades, siendo más accesible y cómodo al usuario.

BIBLIOGRAFIA

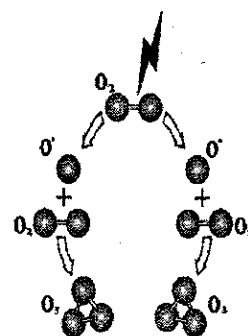
1. Chou P.Y., and Fasman G.D. Prediction of protein conformation. **Biochemistry**, **13**, 222, 1974.
2. Chou P.Y., Fasman G.D. Prediction of the secondary structure of protein from their amino acid sequence. **Adv. Enzymol.** **47**, 45-147, 1978
3. Houghten R.A., Degraw S.T., Bray M.K., Hoffmann S.R. and Frizzell N.D. Simultaneous Multiple Peptide Synthesis: The rapid preparation of large numbers of discrete peptides for biological, immunological, and methodological studies. **Biotechniques**, **4**(6), 522, 1986.
4. Mitchell E. Borland Pascal developer's guide. Ed. Que, Indianapolis, USA, 1993
5. Calarota S., Jansson M., Levi M., Broliden K., Libonatti O., Wigzell H., et al. Immuno-dominant glycoprotein 41 epitope identified by seroreactivity in HIV type-1 infected individuals. **AIDS Res Hum Retroviruses**, **8**, 705, 1996.
6. Rolf S., Florian R., Dietmar K., Graham E., Wolfgang H., Henklein P., et al. Interaction between a Fab fragment against gp41 of human immunodeficiency virus 1 and its peptide epitope: characterization using a peptide epitope library and molecular modeling. **Protein Eng**, **8**, 471, 1995.
7. Padrón G., Morales J. Bases moleculares para el estudio de las hepatitis virales, cap. El virus de la hepatitis C. En: *Elfos Scientiae*, Ciudad de la Habana, Cuba; 161-84, 1998.
8. Rosa C., Caborne S., Garetto F., Griva S., Rivella A., Calabresi G., et al. Epitope mapping of the NS4 and NS5 gene products of hepatitis C virus and the use of a chimeric NS4-NS5 synthetic peptide for serodiagnosis. **J Virol Methods**, **55**, 219-32, 1995.
9. Burns J.M., Shreffler W.G., Rosman D.E., Sleath P.R., March C.J., Reed S.G. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. **Proc Natl Acad Sci.**, **89**, 1239, 1992.
10. Ribeiro J.M., Sillero A. An algorithm for the computer calculation of the coefficients of a polynomial that allows determination of isoelectric points of proteins and other macromolecules. **Computers in Biology & Medicine**, **20**, 235, 1990.
11. Ribeiro JM. and Sillero A. A program to calculate the isoelectric point of macromolecules. **Computers in Biology & Medicine**, **21**, 131, 1991.
12. Sillero A., and Ribeiro JM. Isoelectric points of proteins: theoretical determination. **Analytical Biochemistry**, **179**, 319, 1989.
13. Merrifield R.D. The synthesis of a tetrapeptide. **J Am Chem Soc**, **85**, 2149, 1963.
14. Hudson D. Methodological implications of simultaneous solid-phase peptide synthesis. I. Comparison of different coupling procedures. **J Org Chem**, **53**, 617, 1988.
15. Sarin V.K., Kent S.V., Tam J.P., and Merrifield R.B. Quantitative Monitoring of Solid Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction. **Anal Biochem**, **117**, 147, 1981.
16. Tam J.P., Heath W.F., and Merrifield B. SN2 deprotection of synthetic peptides with a low concentration of HF in dimethyl sulfide: evidence and application in peptide synthesis. **J Am Chem Soc**, **105**, 6442, 1983.
17. Tam J.P., Heath W.F., Merrifield B. SN1 and SN2 mechanism for the deprotection of synthetic peptides by hydrogen fluoride. Studies to minimize the tyrosine alkylation side reaction. **Int J Pept Protein Res**, **21**, 57, 1983.
18. Hearn M.T. Protein purification. Principles high resolution methods and applications, chapter: High resolution reversed phase chromatography. Ed. Janson J.C., Rydén L., VCH, New York, 175-206, 1989.
19. Burlingame A.L., Boyd R.K., Gaskell S.J. Mass spectrometry. **Anal Chem**, **68**, 599R, 1996.
20. Biemann K. Mass spectrometry of peptides and proteins. **Annu Rev Biochem**, **61**, 977, 1992.
21. Ferreira A.W., Belem Z.R., Lemus A.A., Reed S.G., Campos A. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of

22. Chagas' disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. **J. Clin. Microbiol.** 39, 4390, 2001.
23. UMELISA HCV. Para la detección de anticuerpos al virus de la hepatitis C en suero humano, plasma o sangre seca sobre papel de filtro. No. Registro D9307-07, 2001.
24. Wain S., Sonigo P., Danos O., Cole S., Alizon M. Nucleotide sequence of the AIDS virus, **LAV. Cell**, 40, 9, 1985.
25. Sonmez E., Ozerai I.H., Senol M., Kizilkaya N., Sahin K., Ozbilge H. False positive reaction between syphilis and Hepatitis C infection. **J. Med. Science**, 33(11):724, 1997.
26. Malchiodi E.L., Chiaramante M.G., Taranto N.J., Zwirner N.W. and Margni R.A. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections causal by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). **Clin Exp Immunol**, 97, 417, 1994.

EL OZONO Y EL AGUA OZONIZADA

El Ozono

El ozono es un gas inestable, de olor penetrante, cuyas moléculas están formadas por tres átomos de oxígeno. En la naturaleza, existe fundamentalmente en las capas altas de la atmósfera, formando la llamada "capa de ozono", que protege a nuestro planeta al impedir el paso de la radiación ultravioleta cuya energía pudiera ser perjudicial para la vida. El ozono se produce industrialmente a partir de oxígeno, mediante una descarga eléctrica silente de alto voltaje, al hacer pasar entre dos electrodos un flujo de aire u oxígeno puro.



El ozono posee un gran poder virucida, bactericida y fungicida. Su capacidad de desinfección es mucho mayor que la de otros desinfectantes que se emplean actualmente. Su elevada reactividad con un gran número de sustancias permite su aplicación en usos importantes, por ejemplo para la desinfección de agua para consumo humano, para la eliminación de color y olor, para el aumento de la biodegradabilidad de contaminantes naturales e industriales en aguas y aguas residuales, etcétera.

El agua ozonizada y sus propiedades

Teniendo en cuenta las propiedades del ozono antes mencionadas, la ozonización se ha convertido en uno de los métodos más avanzados para la desinfección de agua de consumo humano, ya que el ozono al ponerse en contacto con un agua contaminada con microorganismos (hongos, bacterias, virus, quistes de parásitos) los destruye, permitiendo la eliminación total de agentes transmisores de enfermedades y mejorando considerablemente también la calidad organoléptica del agua (al eliminar olor, color y sabor desagradables).

Se ha demostrado la gran efectividad del ozono en la destrucción de microorganismos tales como quistes de *Giardia lamblia* y bacterias como *Cryptosporidium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Escherichia Coli*, los cuales se encuentran con frecuencia en el agua. También se conoce que el ozono es capaz de reducir sensiblemente la presencia de hierro y manganeso que dan color y sabor al agua.