

Bioquimia

Volumen 28
Volume

Número 1
Number

Marzo 2003
March

Artículo:

Péptidos sintéticos del *Trypanosoma cruzi* para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)



www.Medigraphic.com

Péptidos sintéticos del *Trypanosoma cruzi* para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas

Milenen Hernández-Marín^{1*}, Pedro Almenares-Guash², Carlos Martínez-Ortiz³,
Ivonne Gómez-Cordero¹, Antonio Melchor-Rodríguez³

¹ Laboratorio de Síntesis de Péptidos, ² Laboratorio de Retrovirus, ³ Laboratorio de Purificación de Proteínas. Centro de Inmunoensayo, Habana, Cuba.

* Sobretiros: Centro de Inmunoensayo: Calle 134 y Ave. 25, Cubanacán, Playa, Apto 6653, Ciudad de la Habana, Cuba.

e-mail: iqpeptidos@cie.sld.cu

Recibido: 06/06/2002 Aceptado: 15/11/2002

Resumen

El *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es un protozoo flagelado, que causa la enfermedad de Chagas. Una solución para el diagnóstico serológico de este mal, es la utilización de una tecnología para el diseño y obtención de péptidos sintéticos, lo que permite la disponibilidad de técnicas de diagnóstico con altos niveles de sensibilidad y especificidad. En este trabajo se expone la utilidad de dos péptidos (p17 y p18), obtenidos mediante síntesis química en fase sólida, que se corresponden con regiones inmunodominantes del *Trypanosoma cruzi*. El péptido p17 fue sintetizado como Carboxilo terminal (R-COOH) y como amidopéptido (R-CONH₂). Los péptidos fueron purificados mediante Cromatografía en Fase Reversa y los péptidos p17 (R-CONH₂) y p18 fueron caracterizados por espectrometría de masas MALDI-TOF. La actividad biológica de los péptidos fue probada en un ensayo inmunoenzimático. El péptido p17 (R-CONH₂) fue el de mayor rendimiento en la síntesis y el de mayor inmunoreactividad frente a sueros positivos Chagas, además no reaccionó con muestras positivas de *Leishmania*. Los resultados mostraron que los péptidos presentaron alta sensibilidad y especificidad y son de gran utilidad para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: Chagas, péptidos sintéticos, *Trypanosoma cruzi*.

Abstract

Chagas' disease is produced by one flagellate protozoan, the *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) using a technology for designing and obtaining synthetic peptides, which permits to achieve diagnostic techniques with high levels of sensitivity and specificity is a solution for serology diagnosis of Chagas' disease. This paper deals with use of two peptides (p17 and p18), obtained by chemical synthesis in solid phase, that corresponding to the immunodominant regions of *Trypanosoma cruzi*. The peptide p17 was synthesized as C-terminal (R-COOH) and amidopeptide (R-CONH₂). The peptides were purified by Reverse Phase Chromatography HPLC and p17 (R-CONH₂) and p18 peptides were characterized by mass spectrometry MALDI-TOF. A biological activity of peptides was assayed in an immunoenzymatic assay. The peptide p17 (R-CONH₂) had the best yield in chemical synthesis and immunoreactivity regarding to positive samples of Chagas, besides didn't react with positives samples to *Leishmania*. Results showed that peptides that were achieved have good sensitivity and specificity and they're very useful for diagnostic of Chagas disease.

Key words: Chagas, synthetic peptides, *Trypanosoma cruzi*.

Introducción

La enfermedad de Chagas o *Trypanosomiasis* Americana es uno de los problemas endémicos más importantes en América del Sur y Central.¹⁻⁴ Su agente etiológico es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*).

Esta enfermedad se transmite a través de insectos vectores,^{5,6} por transfusión de sangre de individuos infectados⁷ con el protozoo (responsable de alrededor del 20 % de los casos de Chagas), y por otros mecanismos de transmisión menos comunes: vía transplacentaria, el trasplante de órganos, la leche materna y accidentes de laboratorio, entre otros.

El diagnóstico del Mal de Chagas se determina mediante la detección del parásito o sus productos (métodos directos) y/o por

la detección de anticuerpos específicos contra el *Trypanosoma cruzi* (métodos indirectos).⁸ El criterio de selección de la técnica a utilizar está basado, primero en la fase clínica de la enfermedad en la que se desea realizar el diagnóstico y segundo en la factibilidad de realización exitosa de la prueba.

La mayoría de los ensayos ELISA comerciales emplean en fase sólida antígenos obtenidos por lisis de epimastogote o tripomastigote del *T. cruzi*.^{9,10} Estas pruebas presentan buen sensibilidad, pero tienen como inconveniente que presentan reacciones inespecíficas con *Leishmania*, por lo que se obtienen frecuentemente falsos positivos.^{11,12}

Una solución al problema del diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas es el uso de péptidos recombinantes¹³ o de

péptidos sintéticos,¹⁴⁻¹⁷ diseñados, para obtener una prueba de diagnóstico que garantice resultados con altos niveles de sensibilidad y especificidad.

El objetivo del presente trabajo fue la evaluación de dos péptidos sintéticos que corresponden con regiones altamente antigénicas del *T. cruzi*, para demostrar su utilidad en el inmunodiagnóstico del mal de Chagas.

Materiales y métodos

Todos los disolventes (diclorometano: DCM, 2-propanol, *N,N'*-dimetilformamida: DMF) y los reactivos (ácido trifluoracético: TFA, *N*-etil-diisopropilamina: DIEA, *N,N'*-diisopropilcarbodiimida: DIPCDI, dimetilsulfuro, 1,2-etanoditiol, *p*-cresol, anisol) utilizados, fueron puros para síntesis (Merck). El ácido fluorhídrico se utilizó puro para síntesis (Fluka).

El acetonitrilo y ácido trifluoracético empleados en la purificación de los péptidos fueron puros para análisis (BDH).

El diclorometano se destiló y conservó sobre tamices moleculares de 0.4 nm. La *N,N'*-dimetilformamida se conservó sobre tamices moleculares de 0.3 nm.

Los derivados de L-aminoácidos (Boc-aminoácidos) utilizados en la síntesis de los péptidos fueron de alta pureza (Bachem).

En la síntesis de péptidos se empleó el grupo protector *tert*-butiloxycarbonilo (Boc) para la protección del grupo α amino terminal. Para los aminoácidos trifuncionales los grupos protectores de las cadenas laterales fueron: el grupo benzilo (Bzl) para ácido aspártico, ácido glutámico, serina y treonina; el grupo 4-metoxibencilo (Mob) para cisteína; el grupo dinitrofenilo (DNP) para histidina; el grupo *orto*-cloro-benzilcarbonilo para lisina; el grupo tosilo (Tos) para arginina; el grupo 2,6-dicloro-benzilo para tirosina y el grupo formilo (For) para triptófano. No tenían protección los aminoácidos alanina, fenilalanina, glicina, isoleucina, leucina, asparagina, glutamina, prolina y valina.

Se disolvieron los Boc-aminoácidos en la cantidad de disolvente calculada (0.2 mol/L), teniendo en cuenta que todos los aminoácidos utilizados se disuelven en DCM, excepto la histidina, leucina, triptófano y arginina, que se disolvieron en DCM:DMF (90:10 %). La asparagina y la glutamina que se pesan y se disuelven junto con el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) en DMF, justamente al momento de su uso. Además, se preparan al momento las soluciones de metionina y triptófano.

Como soporte sólido se empleó la resina 4-metil-bencilhidrilamina (MBHA 1.1 mmol/g, 100-200 mesh, Bachem).

Síntesis química de péptidos en fase sólida

Los péptidos se obtuvieron mediante síntesis química en fase sólida,¹⁸ por la estrategia Boc en bolsas de polipropileno. Las reacciones de acoplamiento se realizaron a temperatura ambiente, por activación del grupo carboxilo de cada aminoácido con *N,N'*-diisopropilcarbodiimida¹⁹ a 0.2 mol/L en DCM y fueron verificados por el ensayo cualitativo de la ninhidrina. El grupo Boc fue eliminado con ácido trifluoracético (37.5%) en diclorometano. La desprotección final se realizó mediante reacción con ácido fluorhídrico,^{20,21} se extrajeron los péptidos de la resina con una solución acuosa de ácido acético al 30% y se liofilizaron.

Purificación de los péptidos

Los péptidos se purificaron por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa (RP-HPLC, Pharmacia, LKB). En una columna RP18 (Pharmacia) se aplicaron 200 μ L 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), una velocidad de flujo de 0.5 mL/min; una velocidad del papel de 2 mm/min; una sensibilidad de 1 AUFS y una temperatura de 22 °C.

Caracterización de los péptidos

La caracterización de los péptidos p17 (R-CONH₂) y p18, fue mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption of Ions Time-of-Flight).²² En un espectrómetro de masas Bruker Protein TOF-TM (USA) se aplicó un campo eléctrico de 3 nanosegundos, a una longitud de onda de 337 nm y sobre la muestra incidió una luz láser a una intensidad de 50 μ J. La matriz empleada fue el ácido α -ciano-4-hidroxycinámico.

Recubrimiento de las placas UltramicroElisa (UMELISA)

Cada péptido se diluyó en disolución reguladora carbonato-bicarbonato, 0.05 mol/L; pH 9.6, a una concentración de 2 μ g/mL. Con esta disolución se recubrió la fase sólida empleada, placas de poliestireno con capacidad para 30 μ L (placas UMELISA, Greiner labortechnik, Alemania), se añadió un volumen 15 μ L/pocillo y se incubó durante 3 h a 37 °C. La fase sólida se lavó con una disolución amortiguadora de PBS-T (8 g de NaCl; 1.215 g de Na₂HPO₄ • 2H₂O; 0.2 g de KH₂PO₄; 0.2 g de Na₂SO₄; 0.5 mL de Tween-20; para un volumen de 1 000 mL de agua destilada y pH de 7.3-7.5). A continuación se bloqueó con una disolución de preservio (BSA al 1 % en PBS-Tween), durante toda la noche a temperatura ambiente. Las placas se conservaron a 4 °C, con una cubierta protectora, hasta el momento de su uso.

El antígeno natural (extracto total de *T. cruzi*) de la cepa Y, procedente de Brasil, se diluyó en disolución reguladora carbonato-bicarbonato, 0.05 mol/L; pH 9.6, a una concentración de 7 μ g/mL. Con esta disolución se recubrió la fase sólida empleada, placas de poliestireno con capacidad para 30 μ L (placas UMELISA, Greiner labortechnik, Alemania), se añadió un volumen 15 μ L/pocillo y se

incubó durante 3 h a 37 °C. La fase sólida se lavó 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). A continuación se bloqueó con una disolución de preserve (BSA al 1 % en PBS-Tween), durante toda la noche a temperatura ambiente. Las placas se conservaron a 4 °C, con una cubierta protectora, hasta el momento de su uso.

Prueba de actividad biológica de los péptidos sintéticos del *T. cruzi* en un ensayo UltramicroELISA (UMELISA).

Para la prueba de los péptidos sintéticos, las muestras a evaluar se diluyeron 1:20 en disolución amortiguadora Tris-HCl (15 mmol/L de Tris; pH 7.8 y 0.05 % Tween-20) en suero de carnero al 20 %, y se incubaron 30 min a 37 °C en las placas de reacción. Después de lavar tres veces con una disolución amortiguadora Tris-HCl, con el objetivo de eliminar los componentes no fijados, se adicionó un conjugado anti-IgG humana en carnero marcada con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania). Se incubó nuevamente durante 30 min a 37 °C y se realizó un nuevo lavado en las mismas condiciones, para eliminar el conjugado en exceso. Se añadió entonces el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferilfosfato (Koch Light Ltd. Haverhill, Suffolk, England), el que resultó hidrolizado por la enzima del conjugado, 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). En todos los experimentos, se incluyeron controles positivos y negativos, y las muestras se analizaron por duplicado.

Prueba de actividad biológica del antígeno natural de *T. cruzi* en un ensayo UltramicroELISA (UMELISA)

Las muestras a evaluar se diluyeron 1:40 en disolución amortiguadora Tris-HCl (15 mmol/L de Tris; pH 7.8 y 0.05 % Tween-20) en suero de carnero al 20 %, y se incubaron 30 min a 37 °C en las placas de reacción. Después de lavar tres veces con una disolución amortiguadora Tris-HCl, con el objetivo de eliminar los componentes no fijados, se adicionó un conjugado anti-IgG humana en carnero marcada con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania). Se incubó nuevamente durante 30 min a 37 °C y se realizó un nuevo lavado en las mismas condiciones, para eliminar el conjugado en exceso. Se añadió entonces el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferilfosfato (Koch Light Ltd. Haverhill, Suffolk, England), el que resultó hidrolizado por la enzima del conjugado, 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). En todos los experimentos, se incluyeron controles positivos y negativos, y las muestras se analizaron por duplicado.

Muestras de sueros

Se estudiaron 20 muestras de sueros positivos a Chagas procedentes del Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfer-

medad de Chagas "Dr Mario Fátala Chaben", Buenos Aires, Argentina, positivas a anticuerpos al *Trypanosoma cruzi* mediante Inmuno-fluorescencia indirecta (IFI) y Hemaglutinación indirecta (IHA).

Además se evaluaron 20 muestras positivas a *Leishmania*, de pacientes definidos clínica e inmunológicamente, procedentes de Colombia y 20 muestras de donantes sanos de un banco de sangre (Banco de Marianao, La Habana, Cuba).

Nivel de corte

El nivel de corte utilizado para la evaluación de la antigenicidad de los péptidos sintéticos y el antígeno natural fue de 0.3.

El valor de relación (VR) se definió

$$VR = Fi \text{ BB/P BB}$$

Donde:

Fi Fluorescencia de la muestra

BB Valor promedio del Blanco

P Menor valor de fluorescencia de los duplicados del Control Positivo.

Todos los valores numéricos fueron la media de los duplicados, expresados como el valor de relación para cada muestra respecto al nivel de corte (VR/NC). Las muestras fueron consideradas positivas cuando (VR/NC) ≥ 1 .

Resultados

Caracterización de los péptidos sintéticos

En el presente trabajo se seleccionaron dos regiones altamente antigénicas del *T. cruzi*, para la síntesis de dos secuencias de péptidos correspondientes a estas regiones. Así, se sintetizaron los péptidos p17 y p18.

El péptido p17 se sintetizó como amidopéptido (p17 (R-CONH₂)) y como carboxilo terminal libre (p17 R-COOH). El péptido p18 sólo se obtuvo como amidopéptido. Los rendimientos obtenidos para los amidopéptidos p17 (R-CONH₂) y p18 fueron del 95 y 90% respectivamente, mientras que el rendimiento del péptido p17 (R-COOH) fue de un 85 %.

La pureza de los péptidos sintetizados fue comprobada por cromatografía en fase reversa (RP-HPLC). En todos los casos se obtuvo una señal única, que se correspondió con la máxima actividad en el ensayo UMELISA.

Los amidopéptidos p17 y p18 se caracterizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF, y se corroboró que las masas moleculares experimentales $[M+H]^+ = 2272$ y $[M+2H]^2 = 3707$, se correspondieron con las calculadas ($M+Z = 2271 \text{ m/z}$) y ($M+Z = 3705$).

Prueba actividad biológica de los péptidos sintéticos y el antígeno natural

La evaluación de los péptidos sintéticos (p17 (R-COOH), p17(R-CONH₂), p18) y el antígeno natural en un ensayo inmunoenzimático, se llevó a cabo empleando 20 muestras

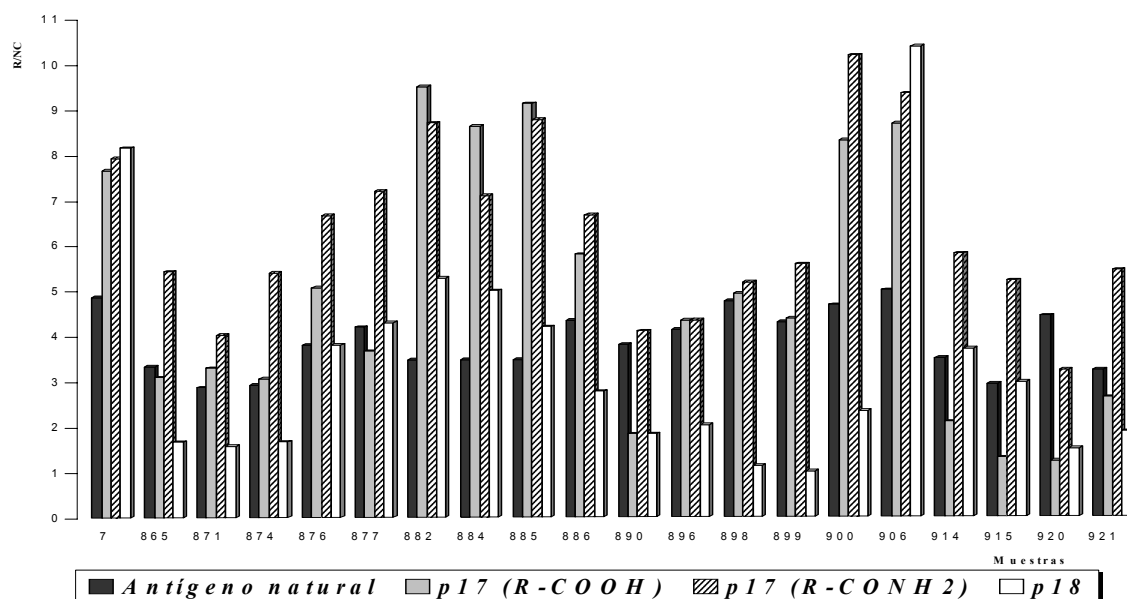


Figura 1. Comportamiento de los péptidos sintéticos del *Trypanosoma cruzi* p17 (R-COOH), p17 (R-CONH₂), p18 y el antígeno natural frente a 20 muestras positivas a Chagas procedentes del Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas “Dr Mario Fatala Chaben”, Buenos Aires, Argentina. Las muestras fueron consideradas positivas cuando (R/NC) ≥ 1 .

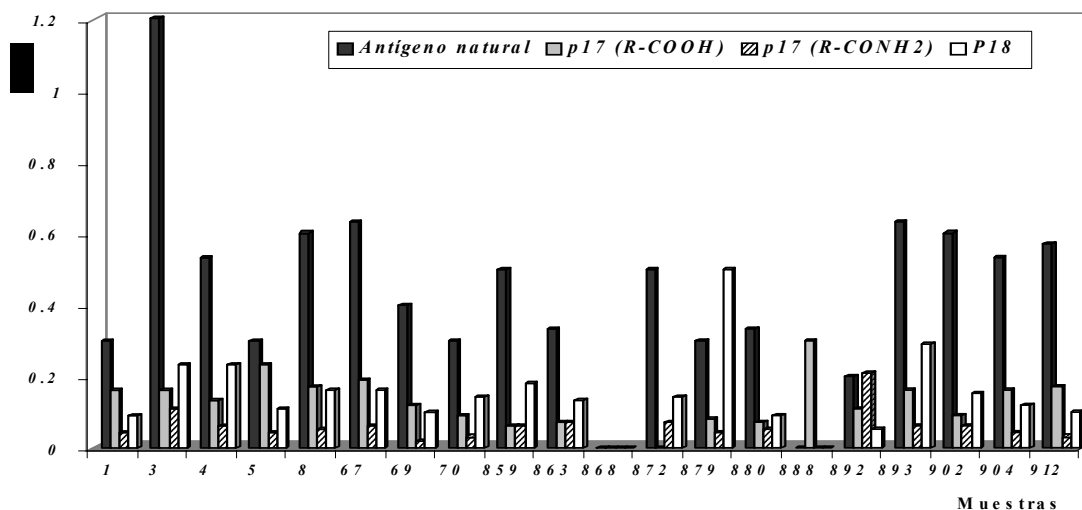


Figura 2. Comportamiento de los péptidos sintéticos del *Trypanosoma cruzi* p17 (R-COOH), p17 (R-CONH₂), p18 y el antígeno natural frente a 20 muestras negativas de donantes de un banco de sangre. Las muestras fueron consideradas positivas cuando (R/NC) ≥ 1 .

positivas a Chagas, procedentes del Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas “Dr Mario Fatala Chaben”, Buenos Aires, Argentina. (Figura 1).

Como se observa los tres péptidos sintéticos y el antígeno natural lograron una sensibilidad del 100 % frente a las muestras positivas a Chagas (VR/NC >1). No obstante, el amidopéptido p17 (R-CONH₂) fue el de mayor inmunoreactividad con valores de (VR/NC) entre 8 y 3.5 comparado con los péptidos p17 (R-COOH) que tuvo valores de (VR/NC) entre 7.8 a 1.5; el péptido p18 con valores de (VR/NC)

entre 8 y 1.5 y el antígeno natural presentó valores de (VR/NC) entre 5 y 3. Con el péptido sintético p17 (R-CONH₂) el valor de (VR/NC) para los sueros positivos fue 2 veces mayor que los obtenidos con el antígeno natural, lo que demuestra una mejor discriminación entre muestras positivas y negativas.

Para determinar la especificidad de los péptidos sintéticos comparada con el antígeno natural, se evaluaron 20 muestras de donantes sanos de un banco de sangre, como se observa en la figura 2. Todas las muestras evaluadas resultaron negativas para todos los antígenos.

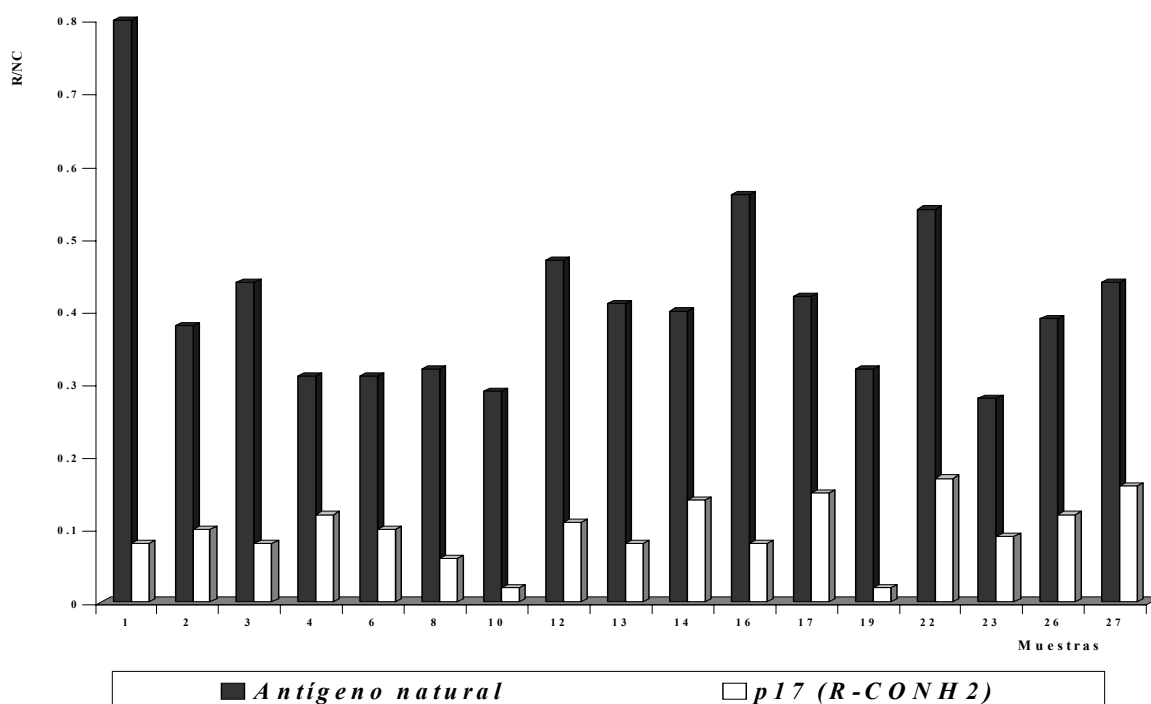


Figura 3. Comportamiento del péptido sintético p17(R-CONH₂) y el antígeno natural frente a 17 muestras positivas a *Leishmania*. Las muestras fueron consideradas positivas cuando (R/NC) $\geq$ 1.

Teniendo en cuenta, los resultados de las evaluaciones de los tres péptidos sintéticos, se decidió comprobar la existencia de reacción cruzada del amido péptido p17 (el de mayor reactividad frente a muestras positivas a Chagas) con 17 muestras positivas a *Leishmania* y los resultados fueron comparados con el antígeno natural (Figura 3).

Para las muestras de pacientes con Leishmaniasis, el péptido sintético p17 (CONH₂) presentó un 100% de especificidad comparado con el antígeno natural. La positividad para el antígeno natural fue de un 6% (1/17).

Discusión

En la actualidad varios investigadores en el mundo han identificado determinantes antigénicos en el *T. cruzi*. Con el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante han sido obtenidas por esta metodología varias proteínas aisladas y secuenciadas, teniendo una gran aplicación en el desarrollo de vacunas así como en el inmunodiagnóstico.^{23,24}

En la literatura aparecen reportes del uso de péptidos sintéticos, correspondientes a regiones inmunodominantes del *T. cruzi*, en el inmunodiagnóstico del mal de Chagas, entre ellos un Inmunoensayo que utiliza como antígeno un péptido sintético que incluye tres epítomos específicos del *T. cruzi*. Este ensayo se comparó con uno convencional que utiliza antígeno natural y se obtuvo como resultado una sensibilidad del 93.5 % para el antígeno natural y un

100% para el ensayo con péptido sintético.²⁵ Además, recientemente se reportó la síntesis de un péptido denominado R3 que se corresponde con los aminoácidos 120- 129 del autoantígeno Cha, el que mostró una sensibilidad del 92.4% y una especificidad del 100%, valores superiores a los obtenidos por otros autoantígenos reportados con anterioridad. Los niveles de anticuerpos anti-R3 se incrementó con la progresión de la enfermedad.²⁶

En el caso de los amidopéptidos los rendimientos fueron superiores que en el carboxilo terminal porque en la síntesis hay menos pérdida de péptido resina, ya que el procedimiento es menos complejo.

Como se observa los tres péptidos sintéticos y el antígeno natural lograron una sensibilidad del 100 % frente a las muestras positivas a Chagas (VR/NC >1). No obstante, el amidopéptido p17 (R-CONH₂) fue el de mayor inmunoreactividad con valores de (VR/NC) entre 8 y 3.5 comparado con los péptidos p17 (R-COOH) que tuvo valores de (VR/NC) entre 7.8 a 1.5; el péptido p18 con valores de (VR/NC) entre 8 y 1.5 y el antígeno natural presentó valores de (VR/NC) entre 5 y 3. Con el péptido sintético p17 (R-CONH₂) el valor de (VR/NC) para los sueros positivos fue 2 veces mayor que los obtenidos con el antígeno natural, lo que demuestra una mejor discriminación entre muestras positivas y negativas.

Los valores de VR/NC del péptido p17(R-CONH₂) fueron los mayores al compararlos contra el p17 (R-COOH, el p18 y el antígeno natural. El p17(R-CONH₂) es una secuencia repetitiva, lo que no

ocurre en el péptido p18, de ahí que sus valores de VR/NC sean mayores. En la literatura entre los péptidos sintéticos que han sido evaluados están los correspondientes a el antígeno SAPA y a secuencias repetitivas, con un porcentaje de sueros reactivos de 28% y 93% respectivamente, debido a que estas secuencias son muy antigénicas.²⁷ Los valores son mayores en el amidopéptido que en el carboxilo terminal libre, ya que la mayoría de los péptidos existen en la naturaleza en forma de amidopéptidos. Al compararlo con el antígeno natural esta diferencia en los valores puede estar determinada por la forma en que se adsorbe el péptido a la fase sólida empleada en el ensayo. Esta adsorción puede garantizar una disposición espacial de su secuencia que permite exponer sus determinantes antigénicos, lo cual no se ve favorecido en el antígeno natural, ya que debido a su estructura compleja estos determinantes antigénicos pudieran estar solapados.

La especificidad de los péptidos analizados fue de un 100%, lo que demuestra que estos péptidos son muy específicos a Chagas.

Los péptidos sintéticos no presentaron reacciones inespecíficas con los sueros de *Leishmania*, mientras el antígeno natural reaccionó con uno de ellos, lo que puede estar determinado porque el mismo contiene toda la secuencia del *T. cruzi*, favoreciendo reacciones inespecíficas debido a homología en la estructura o en la secuencia de aminoácidos con la de otros protozoos.

Los resultados demuestran la utilidad de estos péptidos sintéticos en el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Referencias

- Jorg ME, Tripanosomiasis cruzi humana o enfermedad de Chagas-Mazza. Rev Med Trop Sao Paulo 1978; 17 (1): 185-187.
- Mazzotti L, Díaz E. Resumen de los datos publicados sobre la enfermedad de Chagas en México. Rev Soc Mex Hist Nat 1949; 10(1): 103-105.
- Aras R, Veiga M, Gómez I, Mota G, Rodríguez B, Rabelo R, et al. Prevalence of Chagas' disease in Mulungu do Morro northeastern Brazil. Arq Bras Cardiol 2002; 78(5):441-443.
- Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97(5):603-612.
- Tay J, Biagi AMB. Localidades nuevas de triatóminos mexicanos y su infección natural por *Trypanosoma cruzi*. Rev Fac Med 1984; 6(1): 305-308.
- Dumonteil E, Gourbiere S, Barrera-Perez M, Rodríguez-Felix E, Ruiz-Pina H, Banos-López O, et al. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan peninsula of Mexico. Am J Trop Med Hyg 2002; 67(2):176-183.
- Schmunz G.A. Chagas disease and blood transfusion. Infect Imm Blood Transfusion 1995; 127(1): 125-128.
- Winkler MA, Brashear RJ, Hall HJ, Schur JD, Pan AA. Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the South western and western United States. II. Evaluation of a supplemental enzyme immunoassay and radioimmunoprecipitation assay for

- confirmation of seroreactivity. Transfusion 1995; 35(3): 219-225.
- Ferreira A, Belem W Z R, Moura M E G, Camargo M E. Aspectos da padronização de testes sorológicos para doença de Chagas: um teste imunoenzimático para a triagem de doadores de sangue. Rev Inst Med Trop. S Paulo 1991; 33(2):123-128.
- Oelemann WMR, Teixeira MGM, Veríssimo Da Costa G C. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunoassay assays for diagnosis of Chagas' disease. J Clin Microbiol 1998; 36(9):2423-2427.
- Malchiodi EL, Chiaramante MG, Taranto NJ, Zwirner NW, Margni RA. 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 1994; 97(1): 417-420.
- Abramo C, Fontes CJ, Krettli AU. Cross-reactivity between antibodies in the sera of individuals with leishmaniasis, toxoplasmosis, and Chagas' disease and antigens of the blood-stage forms of *Plasmodium falciparum* determined by indirect immunofluorescence. Am J Trop Med Hyg 1995;53(2): 202-205.
- Ferreira AW, Belem ZR, Lemus AA, Reed SG, Campos-Neto A. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas'disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. J Clin Microbiol 2001; 39(12): 4390-4395.
- Peralta JM, Teixeira MG, Shreffler WG, Pereira JB, Burns JM, Sleath PR, et al. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunoassay using two synthetic peptides as antigens. J Clin Microbiol 1994; 32 (1): 971-994.
- Reed S G, inventor; Lasys Corporation, assignee. Peptide for diagnosis and immunizing against *T. cruzi* infections US Patent 5304371. 1992 Feb 14.
- Reed S G, inventor; Lazys Corporation, assignee. Peptide for detecting antibodies to a 260 KD *T. cruzi* antigen US Patent 5413912. 1993 Dec 17.
- Burns JM, Shreffler WG, Rosman DE, Sleath PR, March CJ, Reed SG. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci 1992; 89(4): 1239-1243.
- Merrifield RD. The synthesis of a tetrapeptide. J Am Chem Soc 1963; 85: 2149-2151.
- Hudson D. Methodological implications of simultaneous solid-phase peptide synthesis. I. Comparison of different coupling procedures. J Org Chem 1988; 53(1): 617-620.
- Houghten RA, Bray MK, De Graw ST, Kirby CJ. Simplified procedure for carrying out simultaneous multiple hydrogen fluoride cleavages of protected peptide resins. Int J Pept Protein Res 1986; 27(1): 673-675.
- Tam JP, Heath WF, Merrifield RB. SN2 deprotection of synthetic peptides with a low concentration of HF in dimethyl sulfide: evidence and application in peptide synthesis. J Am Chem Soc 1983; 105(1): 6442-6444.
- Bucknall M, Fung KY, Duncan MW. Practical quantitative biomedical applications of MALDI-TOF mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom 2002; 13(9):1015-27.
- Umezawa E S, Bastos S F, Camargo M E, Yamauchi L M, Santos M R, González A, et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. J Clin Microbiol 1999; 37(5):1554-1560.
- Oelemann W M R, Teixeira M G M, Veríssimo Da Costa G C. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunoassay assays for diagnosis of Chagas' disease. J Clin Microbiol 1998; 36(9):2423-2427.
- Betonico GN, Miranda EO, Silva DA, Houghton R, Reed SG, Campos-Neto A, et al. Evaluation of a synthetic tripeptide as antigen for detection of IgM and IgG antibodies to *Trypanosoma cruzi* in serum samples from patients with Chagas disease or viral diseases. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999;93(6):603-606.
- Girones N, Rodríguez CI, Basso B, Bellon JM, Resino S, Munoz-Fernández MA, et al. Antibodies to an epitope from the Cha human autoantigen are markers of Chagas' disease. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8(6):1039-43.
- Vergara U, Veloso C, González A, Lorca M. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas' disease using synthetic peptides. Am J Trop Med Hyg 1992;46(1):39-43.