

ARTÍCULO DE REVISIÓN

FACULTAD DE BIOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE LA HABANA

Los anticuerpos y su papel como herramientas analíticas en los ensayos inmunoenzimáticos

Anselmo J. Otero González¹

RESUMEN

En este trabajo se presentó la historia y evolución, desde el descubrimiento, de los anticuerpos, así como la elucidación de su compleja estructura y función que ha servido de base metodológica para crear paradigmas inimaginables en su momento, como la fina especificidad de reconocimiento; también derrumbar otros, aparentemente inamovibles, como la invariabilidad y universalidad del genoma celular. Se revisó la evolución de los sistemas analíticos basados en la reacción antígeno-anticuerpos para llegar al estado actual y problemática de las enfermedades infecciosas y el determinante papel que desempeñan en su control la detección y el monitoreo de agentes infecciosos. La extraordinaria capacidad de los anticuerpos para discriminar estructuras antigénicamente similares, les permite ser parte fundamental de los inmunoensayos como herramientas básicas de lo que es hoy día una disciplina productiva muy bien establecida: la Inmunotecnología.

Palabras clave: anticuerpos, especificidad, inmunoensayos, agentes infecciosos, inmunodetección.

1. LOS ANTICUERPOS. HISTORIA Y DESARROLLO DE SU CONOCIMIENTO

Los anticuerpos, junto a las enzimas, constituyen las dos maravillas proteicas de reconocimiento fino en el mundo biológico. Son capaces de contener una información secuencial que, transformada en espacial y funcional, las convierten en protagonistas de dos eventos trascendentales en la evolución: la biocatálisis y el reconocimiento específico. No es posible exagerar la importancia de estos mecanismos moleculares y, por tanto, de sus efectores directos.¹

Indudablemente que *Eduard Jenner* en 1796 al inmunizar con el virus *vaccinia* para proteger humanos contra la viruela y *Louis Pasteur* casi 100 años más tarde con sus cepas atenuadas del

virus de la rabia fueron los gigantes de pensamiento que adivinaron y prácticamente, por primera vez, demostraron que el organismo podía "defenderse" de las infecciones con "elementos" que debían estar presentes en los humores corporales.²

En la misma época en la que *Elie Metchnikoff* describía la fagocitosis como una respuesta defensiva celular, otros bacteriólogos se percataban de las respuestas del suero de los mamíferos contra los retos microbianos. *George Nuttall* observó en 1888 que algunas bacterias eran eliminadas por sangre animal desfibrinada, lo cual quedó apoyado poco más tarde por la demostración de *Hans Buchner* de que el suero puede ser definitivamente bactericida después de una exposición previa del animal con los microorganismos correspondientes, efecto que quedaba abolido mediante calentamiento

¹ Doctor en Ciencias. Investigador Titular. Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Ciudad de La Habana, Cuba.

a 55 °C por una hora. En consecuencia, este investigador llamó “alexinas” a la causa directa de esta acción en el suero.² *Jules Bordet* retomó estas observaciones en 1893, mientras estudiaba la lisis de *Vibrio cholerae* en el peritoneo de cobayos inmunizados con cultivos de bacteria muerta (fenómeno Pfeiffer) y demostró que las alexinas de Buchner, que hoy se conocen como complemento, debían tener una contraparte funcional en el suero como elementos específicos que finalmente resultaron los anticuerpos.⁴

Genialmente intuitivos también por *Paul Ehrlich*⁵ en el siglo XIX, quien presentó, además, una elegantísima y adelantada teoría de su generación, los anticuerpos fueron originalmente demostrados de forma funcional por *Shibasaburo Kitasato* y *Emil von Behring* (primer Premio Nobel en Medicina y Fisiología) en su relación directa y neutralizante de las toxinas diftérica y tetánica, cuando encontraron que animales inmunizados con dosis subletales de toxina producían un suero que neutralizaba la toxina y podía conferir protección a animales normales retados con dosis letales. A estas alturas, ellos no sospechaban siquiera cual era la estructura química de tales herramientas moleculares.⁶ De igual manera las “aglutininas” de *Karl Landsteiner* responsables del rechazo sanguíneo resultaron, finalmente, ser anticuerpos.⁷

Como parte central de la inmunidad humoral predicha por *Buchner* y brillantemente defendida por *Ehrlich* en su momento,⁸ los anticuerpos transitaban por etapas difíciles en la interpretación cabal de su estructura y función que fueron paralelas al desarrollo de los procedimientos posteriores de purificación y caracterización de las proteínas.

Investigadores agudos como *Almroth Wright* captaron muy rápido (1904), la idea de que los anticuerpos podían circular de modo libre en la sangre y que llegaban, incluso, a rodear a las bacterias que eran finalmente destruidas por los fagocitos; se introdujo así el concepto y el término de opsonización.⁹

En la década de los veinte del siglo pasado *Michael Heidelberger* y *Oswald Avery* observaron que aquellas “antitoxinas” de *von Behring* y *Kitasato* precipitaban a los antígenos correspondientes y comprobaron que podían ser (o contener) proteínas; esto fue confirmado años más tarde, al profundizarse sobre la naturaleza química de la

interacción entre los antígenos y los anticuerpos, en un detallado estudio realizado por *John Marrack* y publicado en 1938.¹⁰ Ya por aquella época *Arné Tiselius* se dedicaba, visionariamente, en su legendario aparato de electroforesis en fase fluida en Uppsala, a comprobar que las proteínas relacionadas a la inmunidad de los conejos se encontraban en la fracción gamma del suero.¹¹

No fue hasta la década de los cuarenta en que una mayor claridad funcional pudo ser encontrada en la interacción de los anticuerpos con sus antígenos, cuando *Linnus Pauling* apoyó la clarividente teoría de “llave cerradura” ya antes sostenida por *Ehrlich* y propuso, de modo sorprendente, que más que un enlace químico, esa relación dependía de la forma espacial de acomodamiento. Además, afirmó que era caracterizada por fuerzas débiles como las electrostáticas, las de *van der Waals* y los puentes de hidrógeno, con lo cual introdujo de forma brillante el concepto de ajuste biomolecular,¹² tan trascendental para comprender “la lógica molecular de los seres vivos” al decir de *Albert Lehninger* en su famoso primer volumen de Bioquímica.

En 1948 son descubiertos los linfocitos B que después de ciertas transformaciones celulares son los responsables directos de segregar anticuerpos funcionales, se tuvo entonces la primera relación citológica para estos efectores moleculares.¹³ En la década de los cincuenta *Niels Jerne* introdujo el concepto de selección clonal que fue certeramente modificado por *Mac Burnett*, quien ofreció con su propuesta de teoría de la selección clonal,¹⁴ una solución ingeniosa y momentánea a la candente controversia entre instrucción y repertorio preestablecido.

A partir de este momento la atención se concentró, por supuesto, en descubrir la estructura de estas proteínas efectoras de la inmunidad humoral que permitía semejante maravilla de reconocimiento fino. La década de los sesenta se inaugura con un esclarecedor resultado en el que *Edelman* y *Gally* informan acerca de la existencia de la cadena ligera en la estructura de los anticuerpos, lo cual apuntó definitivamente a que estas moléculas, como se esperaba, constituían una estructura multimérica. En ese trabajo se informaba también la estrecha relación de estas cadenas ligeras con las proteínas segregadas en la orina de los

pacientes con mieloma múltiple, llamadas proteínas de Bence-Jones en honor a su descubridor *Henry Bence Jones* en 1845.¹⁵

Edelman, en sus investigaciones posteriores, llegó a descubrir que las cadenas de los anticuerpos estaban unidas por puentes disulfuro¹⁶ y por último en Rodney Porter encontró que los anticuerpos tenían un fragmento muy relacionado al reconocimiento antigénico y, por tanto, responsable de la especificidad y la afinidad; además, otro encargado de las funciones biológicas o de destino final de la acción inmune integrada.¹⁷ Ambos investigadores recibieron el premio Nobel en 1972 por su extraordinario aporte en la explicación de la estructura y función de los anticuerpos.

Estos estudios estructurales se habían limitado a las inmunoglobulinas G y M pero muy rápidamente en 1967 es descubierta la IgA secretora, con la expansión de todo un campo de acción efectora de los anticuerpos en las mucosas.¹⁸ Un poco antes había sido descrita la IgD¹⁹ y para completar el cuadro de las clases de inmunoglobulinas, los esposos *Ishikawa* identifican a la IgE como un anticuerpo muy relacionado con las alergias agudas.²⁰

En estos momentos, una vez comprendida la estructura y función de los anticuerpos, quedaba un asunto realmente intrigante que parecía retar a las bases mismas de la biología celular y la genética molecular ¿Cómo era posible la generación de un repertorio de más de 100 millones de especificidades para proteínas con un único y constante arsenal genético celular? Esto no era posible con los conceptos tradicionales de que todas las células tienen “siempre” la misma dotación genética a menos que sean gaméticas o que sufran mutaciones “no naturales”. *Susumu Tonegawa* demostró que los linfocitos B “reordenan” su dotación genética en la maduración previa al encuentro con el antígeno, para dar una brillante explicación inmunogenética a la distribución clonal; esto le valió un premio Nobel en 1987.²¹

En 1975 *Goerge Kohler* y *César Milstein*, también en un esfuerzo por comprender las bases genéticas de la diversidad de los anticuerpos, perfeccionaron las técnicas de fusión celular por complementación y selección bioquímica; de esta manera revolucionaron las investigaciones biomédicas y la inmunoanalítica con la tecnología de

hibridomas²² para generar anticuerpos monoclonales (AcMs), por lo que recibieron el premio Nobel en 1984.

Posteriores avances tecnológicos y científicos han brindado la posibilidad de disponer de anticuerpos catalíticos (“abzimas”), cuando se hicieron realidad las predicciones de *Linus Pauling* en la década de los cuarenta¹² respecto al mecanismo de acción de anticuerpos y las enzimas y llevar adelante la idea de que un paratopo puede ser un “bolsillo catalítico” para un estado de activación.²³

Hoy día los anticuerpos recombinantes y sus fragmentos son una realidad en la analítica, el diagnóstico, la inmunoterapia y la imaginología, que lleva el concepto de selección a su estado del arte (selección artificial) y asume que la disponibilidad real del repertorio puede suprimir la necesidad de la inmunización; esto, en la práctica, sigue siendo un tema muy controversial.²⁴

Los *intrabodies* o anticuerpos intracelulares se definen como moléculas de inmunoglobulinas que, expresadas intracelularmente, son dirigidas hacia compartimentos subcelulares definidos. Su potencial aplicación terapéutica incluye tumores, agentes infecciosos, trasplantes y otras enfermedades asociadas a una sobreexpresión de proteínas o mutagénesis.²⁵

Por último en este recuento histórico de los anticuerpos, los *nanobodies* aparecen como un hallazgo interesante en camellos y llamas que tienen una circulación de anticuerpos simplificados capaces de infiltrar, por su pequeña talla, a una variedad de estructuras tisulares y que pueden ser obtenidas de modo muy eficiente a bajo costo.²⁶

2. LOS INMUNOENSAYOS Y SUS POSIBILIDADES ANALÍTICAS PARA LA DETECCIÓN DE AGENTES INFECCIOSOS

Los inmunoensayos son técnicas analíticas que tienen como base la reacción antígeno-anticuerpo, la cual introduce un importante elemento de selectividad (especificidad) para moléculas con información antigénica nativa o sin esta. Hoy día cuenta con niveles de detección inferiores a un nanogramo y las variantes miniaturizadas con sistemas de revelado amplificados están ya bajando el picogramo.

Han sido utilizados por más de 50 años para la detección y cuantificación de una amplia variedad de analitos en el diagnóstico clínico,²⁷ inspección alimentaria²⁸ y los análisis ambientales.²⁹ Aunque las versiones originales del inmunoensayo radioisotópico (RIA)³⁰ y el ensayo de enzima ligada a inmunoabsorbente (ELISA)³¹ fueron desarrollados en tubos, la forma más versátil y práctica ha resultado en placas de microtitulación para lectores automatizados durante y después de la década de los ochenta.

El futuro inmediato de los inmunoensayos contempla la búsqueda de mayor sensibilidad, automatización, miniaturización con el uso de micromatrices que permitan el análisis de un alto número de muestras y la multidetección con una única muestra.³² De esta manera existen ya analizadores sofisticados que procesan un alto número de muestras en muy poco tiempo en formatos homogéneos o heterogéneos, en tubos plásticos o pocillos de placas que contienen 96, 384 o 1 536 posibilidades analíticas. Con el objetivo de reducir los costos e incrementar la capacidad de procesamiento, hoy es posible, con la ayuda de sistemas de pipeteo piezoeléctrico y producción de tecnología de chips, trabajar con placas de microtitulación de 4 cm² y 625 pocillos con volúmenes de 50 a 100 nL en lo que se ha dado en llamar ensayos de *microspot* o tecnología de *nanochips* con el objetivo final de detectar cientos de analitos en la misma muestra.³³ Sin embargo, en contraste con el análisis de DNA, en el cual es posible pre-determinar diferentes especificidades con sondas de nucleótidos químicamente sintetizadas, la generación de anticuerpos para cada analito necesita mucho más trabajo previo. Por ejemplo, en el diagnóstico clínico la determinación de numerosos analitos simultáneamente en el mismo *spot* es un problema a resolver.³⁴

Por causa de que un *spot* inmunoreactivo en un *chip* tiene generalmente un área menor que 10 μm,² los beneficios primarios de la miniaturización de los inmunométodos resultan la brusca reducción en el consumo de reactivos como ocurrió con el Sistema Ultra Micro Analítico SUMA en Cuba en la década de los ochenta,³⁵ cuando revolucionó los conceptos de inmunoensayo al reducir el volumen de reacción a 10 μL. También la miniaturización se favorece mediante la utilización

de anticuerpos con especificidad amplia para reconocer patrones estereotipados en lugar de especificidades finas, algo parecido a los que hace la inmunidad innata con los patrones asociados a la patogenicidad y, por supuesto, la posibilidad de una alta multiplicidad de determinaciones con una única muestra que parece ser el objetivo “dorado” de cualquier multianálisis automatizado. En 1999 *Weller* y otros³⁶ informaron de un inmunoensayo óptico con 1 600 *spots* en 1,8 cm² para el control ambiental de diferentes plaguicidas. Con un volumen de 2 nL de solución de anticuerpo a 10 μg/mL por *spot* y 1 000 *spots* por cada *chip*, la cantidad total de anticuerpo utilizado se calcula en solo 20 ng.

Además del multianálisis masivo también es conveniente la posibilidad del unianálisis con tecnología apropiada en lugares donde no hay tecnología costosa y complicada. Las tiras reactivas que brindan información semicuantitativa derivarán necesariamente al concepto de inmunosensor, que puede ser definido como un dispositivo en el que un inmunorreactivo se encuentra muy relacionado a un transductor físico-químico o de otro tipo. Mientras los sistemas de inmunosensores comercialmente disponibles como BIAcore (Biosensor, Uppsala, Suecia) e Iasys (Affinity Sensors, Cambridge, UK) son muy caros y complejos desde el punto de vista técnico, han tenido éxito en proyectos de investigación para estudiar cinéticamente reacciones de afinidad; los intentos de popularizar sistemas biosensores para uso común o personal no están a la vista. Los dispositivos electro-inmunoquímicos son en general baratos, sensibles, miniaturizables y no demandan fuente de energía independiente, parecen ser el futuro inmediato de estas aplicaciones. Ejemplos de ello son el sensor enzimático de tamaño de bolígrafo MediSense Pen 2 de Abbott (EE. UU.) y Biosen (EKF, Magdeburg, Alemania) para la determinación de glucosa. Si los transductores electroquímicos pudieran ser utilizados de una manera similar a los inmunoensayos o a los inmunosensores, seguro encontrarán su nicho de mercado, en especial para muestras muy coloreadas u opacas que dificultan su análisis espectrofotométrico en un ensayo homogéneo.³⁷ Los directivos de la empresa Tecno-SUMA de Cuba acaban de anunciar públicamente una próxima incursión en este sentido.

La cantidad de personas afectadas por enfermedades infecciosas es elevada de modo alarmante

y el grado de miseria que generan es tan dramático que supera de manera callada y en lo cotidiano los terribles efectos de cualquier catástrofe o tragedia natural de otro tipo que ocurran en un momento determinado. Estas afecciones se encuentran en un momento muy especial de la civilización humana por causa de factores como:

- a) La aparición o exacerbación de patógenos asociados al propio desarrollo (o subdesarrollo) como el hacinamiento en ciudades, los productos químicos ambientales, la alimentación, la industrialización, la deforestación, los cambios climáticos, la inmediatez de la transportación de muchas personas a grandes distancias, y otros.
- b) La aparición, emergencia o reemergencia de agentes infecciosos resistentes al tratamiento por el abuso de los antibióticos convencionales.
- c) El incremento de subpoblaciones de personas inmunodeprimidas de forma artificial (trasplantes, cáncer, enfermedades autoinmunes y alérgicas) o natural (sida, malaria, ancianidad, desnutrición, etcétera).
- d) Baja disponibilidad de vacunas y atención sanitaria deficiente o inexistente.
- e) Producción intensiva de animales y plantas, y la dispersión de agentes infecciosos por la manutención, transportación y mecanización asociadas.
- f) Invasión de ecosistemas, intervenciones epidemiológicas y reemplazo interespecífico asociado.
- g) Animales exóticos como mascotas y plantas exóticas en jardines particulares sin control fitosanitario.
- h) La utilización de agentes infecciosos como armas biológicas.

Si se tiene en cuenta la real amenaza de la emergencia o reemergencia de enfermedades causadas por microorganismos y utilización de agentes infecciosos como armas biológicas; se hace más perentoria la necesidad analítica, masiva e inmediata de detectar a estos agentes en individuos en riesgo con el objetivo de fortalecer la vigilancia epidemiológica. Durante los últimos 20 años se han desarrollado inmunométodos y equipamiento que han aumentado la sensibilidad, especificidad y la rapidez en la detección de estos agentes.³⁸

Los anticuerpos continúan siendo el reactivo más crítico y decisivo en los inmunoensayos destinados a detectar agentes infecciosos y, por tanto, a complementar el diagnóstico de estas enfermedades. La capacidad analítica de los anticuerpos, además de la inherente especificidad y robustez de la prueba en que se utilicen, depende de dos factores principales: la afinidad si se trata de un AcM o la avidez en caso de una preparación policlonal. El grado de pureza de estas preparaciones puede decidir la monoespecificidad o capacidad para no incluir anticuerpos que reaccionen con los contaminantes más frecuentes que acompañan al analito en el escenario de análisis para el caso de los policlonales y minimizar la reactividad contra epítopes no exclusivos del analito en el caso de los AcMs.³⁹

Los ensayos tipo ELISA a comienzos de la década de los setenta constituyeron una respuesta a la falta de sensibilidad de los inmunoensayos de segunda generación prevalecientes hasta el momento, y a la peligrosidad personal y ambiental de los muy sensibles inmunoensayos radioisotópicos para la detección de agentes infecciosos. Los inmunoensayos de enzima ligada se caracterizaron por su heterogeneidad (versiones artesanales y relativamente sencillas de poner a punto en un laboratorio convencional, sobre todo con el advenimiento de materiales y equipos modulares comerciales) y en versiones homogéneas basadas en molécula híbridas patentadas y ofrecidas en su conjunto como costosos estuches comerciales. Los AcMs han ido desplazando a las preparaciones policlonales, sobre todo en aquellos casos en los que la compartición de epítopes entre patógenos y comensales hace impracticable los métodos de absorción de inespecificidad.⁴⁰

La inmunocromatografía fue un concepto aplicable a los ensayos con anticuerpos en la década de los sesenta, principalmente para detectar proteínas séricas y después para drogas⁴¹ y otras proteínas. Esta generación de las llamadas “tiras reactivas” tipo “sandwich” basadas en el marcaje de anticuerpo con oro coloidal tiene varias limitaciones: solo se puede detectar un analito por tira, la sensibilidad varía según el analito (tipo de microorganismo) y la detección es subjetiva. El ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral intenta solventar algunas de estas dificultades mediante

un reactivo aumentador basado en una sal de plata.⁴² Avances recientes incluyen la detección con nanopartículas superparamagnéticas de óxido férrico,⁴³ lo cual hace que la señal sea permanente, la detección cuantitativa en milivoltios y la sensibilidad, comparable a la obtenida con radionúclidos y por nefelometría.

Los ensayos fluorométricos en tiempo sostenido (TRF) están basados en las propiedades fluorescentes únicas de los quelatos lantánidos,⁴⁴ los cuales producen una fluorescencia mantenida en el tiempo, que diferencia la señal positiva de modo muy significativo del fondo inespecífico del ensayo. Por otra parte, una vez ocurrida la reacción específica, el quelato se disocia de la molécula portadora y produce una amplificación de la señal que incrementa de manera notable la sensibilidad de los ensayos. Este sistema de revelado puede montarse en la plataforma típica del ELISA, que lo hace muy asimilable, por supuesto, si se dispone de la tecnología para utilizar y preparar los conjugados lantánidos. Existen ya aplicaciones de este sistema para detectar agentes infecciosos,⁴⁵ algunos de los cuales pueden llegar a lograr una detección multiepitópica.

La aplicación de la electroquimioluminiscencia (ECL) y la separación selectiva partículas magnéticas recubiertas con antígenos o anticuerpos (IMS), por su alta especificidad y sensibilidad, han permitido la aparición de varios sistemas de inmunoensayos comerciales.⁴⁶ Los ensayos electroquimioluminiscentes utilizan la plataforma ELISA de ensayo y la detección se lleva a cabo con el uso de un quelato del metal pesado rutenio (II) tris-bipiridil Ru(bpy)₃²⁺ conjugado al anticuerpo que junto a la tripropilamina (TPA) son oxidados y provocan la señal detectora.⁴⁷ Este sistema tan sensible ha sido aplicado a agentes infecciosos cuya detección muy temprana involucra serias implicaciones clínicas y epidemiológicas.⁴⁸

El análisis por inyección sobre flujo (FIA)⁴⁹ se ha desarrollado como una herramienta de análisis que permite el estudio continuo de muestras sobre flujo de solvente sostenido. Esto garantiza un escenario uniforme de comparación contra reactivos controlados por monitoreo constante, muy útil para monitorear procesos en línea. El inmunoFIA aprovecha el exquisito reconocimiento de los anticuerpos por sus antígenos con los mismos propósitos

analíticos, resulta un buen ejemplo un sistema para evaluar *in situ* la fermentación de hibridomas mediante la inyección y evaluación de antígeno a través de un conector estéril en la línea de producción.⁵⁰

3. CONCLUSIÓN

La historia del descubrimiento, descripción gradual y evolutiva de la estructura y función de los anticuerpos como herramienta fundamental de la respuesta inmune adaptativa ha constituido la base del desarrollo de una rama clave en lo que se ha denominado inmunotecnología. Las propiedades de reconocimiento fino y la extraordinaria diversidad de los anticuerpos en sus variantes policlonales (naturales), monoclonales (generados *in vitro*) así como sus variantes recombinantes y fragmentos expresados en fagos filamentosos, ha devenido en herramientas formidables para la identificación, detección y monitoreo de agentes infecciosos, parte de ellos (proteínas segregadas o toxinas) o el seguimiento de sus consecuencias inmunológicas directas como los propios anticuerpos generados ante una infección.

Esta mentalidad inmunoanalítica cualitativa o cuantitativa, donde la posibilidad de “crear” un inmunoensayo con fines académicos, investigativos o prácticos, pasa necesariamente por un conocimiento profundo de la estructura y función de los anticuerpos, sigue teniendo como componente fundamental a las inmunoglobulinas portadoras de esa extraordinaria cualidad que es la especificidad.

The antibodies and their role as analytic tools in immunoenzymatic assays

ABSTRACT

This paper presented the history and evolution of the antibodies since their discovery. It also elucidated their complex structure and function that have served at a given time as methodological basis for creating unimaginable paradigms such as fine recognition specificity, and also for destroying other apparently immutable ones as invariability and universality of the cellular genome. A review was made of the evolution of antigen-antibody reaction-based analytical systems up to the present, the situation of infectious diseases and the determining role that detection and monitoring of infectious agents play in their control. The extraordinary capability of antibodies to discriminate antigenically similar structures allows them to be fundamental tools

in immunoassays and also in a well-established discipline at present, that is, immunotechnology.

Key words: antibodies, specificity, immunoassays, infectious agents, immunodetection.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Otero AJ. Producción de Anticuerpos Monoclonales. Tecnología de Hibridomas. En: Inmunología experimental. La Habana: Editorial Félix Varela; 1997. p. 271-283.
- Lombard M, Pastoret PP, Moulin AM. A brief history of vaccines and vaccination. *Rev Off Int Epizoot.* 2007;26:29-48.
- Isenberg HD. Microbiology and Immunology: Parent and (Adult) Offspring. *Clin Diag Lab Immunol.* 1990;6:287-8.
- Bordet J. Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le serum d'animaux injectés de sang defibrine. *Ann De l'Inst Pasteur.* 1898;12:688-95.
- Ehrlich P. Collected papers of Paul Ehrlich, compiled and edited by Himmelweit F. Vol 3. London: Pergamon Press; 1956. p.490-505.
- von Behring E, Kitasato S. On the acquisition of immunity against diphtheria and tetanus in animals (German). *Dtsch Med Wochensch.* 1890;16:1145-8.
- Karl Landsteiner. Die Spezifität der serologischen Reaktionen. Berlin: Springer-IV; 1933. p. 1-123.
- Metchnikoff E. Immunity in infective diseases (translated by F.G. Binnie). Cambridge, England: Cambridge University Press; 1905. p.1-592. ISBN 68025143
- Wright AE and Douglas SR. An experimental investigation of the role of the body fluids in connection with phagocytosis. *Proc R Soc London.* 1904;72:357-70.
- Marrack JR. Chemistry of antigens and antibodies, 2nd ed., London: HisMajesty's Stationery Office; 1938.
- Tiselius A, Kabat E. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *J Exp Med.* 1939;69:119-31.
- Pauling L. Fifty Years of Progress in Structural Chemistry and Molecular Biology. *Dædalus.* 1970;99:988-1015.
- Frageaus A. Antibody production in relation to the development of plasma cells. *Acta Med Scan.* 1948;204(suppl.):7-122.
- Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust J Sci.* 1957;20:67-9.
- Edelman GM, Gally JA. The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal gamma-globulins. *J Exp Med.* 1962;116:207-27.
- Edelman GM, Benacerraf B. On structural and functional relations between antibodies and proteins of the gamma system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1962;48:1035-42.
- Porter RR. Structural studies of immunoglobulins. *Science.* 1973;180:713-6.
- Tomasi TB, Bienenstock J. Secretory immunoglobulins. *Adv Immunol.* 1968;9:1-96.
- Rowe DS, Fahey JL. A new class of human immunoglobulins. *J Exp Med.* 1965;121:171-84.
- Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J Immunol.* 1966;97:75-85.
- Hozumi N, Tonegawa S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976;73:3628-32.
- Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495-7.
- Tramontano A, Janda KD, Lerner RA. Catalytic antibodies. *Science.* 1986;234:1566-70.
- Winter G, Milstein C. Man-Made Antibodies. *Nature.* 1991;349:293-9.
- Kontermann RE. Intrabodies as therapeutic agents. *Methods.* 2004;34:163-70.
- Reverts H, De Baetselier P, Muyldermans S. Nanobodies as Novel Agents for Cancer Therapy. *Expert Opinion Biological Therapy.* 2005;5:111-24.
- Andreotti PE, Ludwig GV, Peruski AH, Tuite JJ, Morse SS, Peruski LF. Immunoassays of infectious agents. *BioTechniques.* 2003;35:850-9.
- Gabaldon JA, Maquieira A, Puchades R. Current trends in immunoassay-based kits for pesticide analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1999;39:519-38.
- Sherry J. Environmental immunoassays and other bioanalytical methods: overview and update. *Chemosphere.* 1977;34:1011-25.
- Yellow RS, Berson SA. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature.* 1959;184:1648-9.
- Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971;8:871-4.
- Uithoven KA, Schmidt JC, Ballman ME. Rapid identification of biological warfare agents using an instrument employing a light addressable potentiometric sensor and a flow-through immunofiltration-enzyme assay system. *Biosens Bioelectron.* 2000;14:761-70.
- Ekins R, Chu RW. Microspot®, array-based, multianalyte binding assays: the ultimate microanalytical technology? En: Price CP, Newman DJ, editors. *Principals and practices of immunoassays.* 2nd ed. New York: Stockton; 1977. p. 625-46.
- Price CP. Progress in immunoassay technology. *Clin Chem Lab Med.* 1998;36:341-7.
- Körner H, Rodriguez L, Fernandez Yero JL, Schulze M, Horn A, Heredero L, et al. Maternal serum alpha-fetoprotein screening for neural tube defects and other disorders using an ultramicro-ELISA. Collaborative study in Cuba and in the German Democratic Republic. *Hum Genet.* 1986;73:60-3.
- Weller MG, Schuetz AJ, Winklmair M, Niessner R. Highly parallel affinity sensor for the detection of environmental contaminants in water. *Anal Chim Acta.* 1999;393:29-41.
- Warsinke A, Benkett A, Scheller-Fresenius WJ. Electrochemical immunoassays. *J Anal Chem.* 2000;366:622-34.
- Peruski LF, Peruski AH. Rapid diagnostic assays in the genomic biology era: detection and identification of infectious disease and biological weapon agents. *Biotechniques.* 2003;35:840-6.
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull WHO.* 1976;53:55-65.
- Wright PF, Nilsson E, Rooij EMV, Leleta M, Jeggo MH. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech.* 1993;12:435-50.
- McKenzie S. Whole blood assay of theophylline concentrations using immunochromatographic stick. *Arch Dis Child.* 1988;63:571-2.
- Horton JK, Swinburne S, O'Sullivan MJ. A novel, rapid, single-step immunochromatographic procedure for the detection of mouse immunoglobulin. *J Immunol Methods.* 1991;140:131-4.
- Valenti S, Sarkissian A, Giordano G, Dahl KD. A technique for sorting rat gonadotropes using anti-LH or anti-FSH antibodies

- covalently attached to magnetic beads. *J Neuroendocrinol*. 1995;7:673-9.
44. Evangelista RA, Pollak A, Allore B, Templeton EF, Morton RC, Diamandis EP. A new europium chelate for protein labelling and time-resolved fluorometric applications. *Clin Biochem*. 1988;21:173-8.
 45. Peruski AH, Johnson LHIII, Peruski LF. Rapid and sensitive detection of biological warfare agents using time-resolved fluorescence assays. *J Immunol Methods*. 2002;263:35-41.
 46. Yu H. Comparative studies of magnetic particle-based solid phase fluorogenic and electrochemiluminescent immunoassay. *J Immunol Methods*. 1998;218:1-8.
 47. Yang H, Leland JK, Yost D, Massey RJ. Electrochemiluminescence: a new diagnostic and research tool. ECL detection technology promises scientists new "yardsticks" for quantification. *Biotechnology*. 1994;12:193-4.
 48. Gatto-Menking DL, Yu H, Bruno JG, Goode MT, Miller M, Zulich AW. Sensitive detection of biotoxoids and bacterial spores using an immunomagnetic electrochemiluminescence sensor. *Biosens Bioelectron*. 1995;10:501-7.
 49. Puchades R, Maquieira A, Atienza J, Herrero MA. State of the art in on-line techniques coupled to flow injection analysis FIA/on-line. A critical review. *J Automatic Chem*. 1990;12:163-73.
 50. Stocklein W, Blasey H, Ross A, Scrimps R. Immuno Flow Injection analysis. Cordoba, Spain: Proceedings of the International Symposium in Liquid Chromatography and Flow Injection Analysis (HPLC/FIA); 1989. p. 48.

Recibido: 16 de octubre de 2009. Aprobado: 15 de febrero de 2010.
Dr. C. *Anselmo J. Otero González*. Laboratorio de Inmunología y péptidos antimicrobianos. Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Ciudad de La Habana, Cuba. Calle 25 entre J e I. Vedado, municipio Plaza. Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf.: 8324830. Correo electrónico: aoterog@infomed.sld.cu