

ARTÍCULO DE REVISIÓN

FACULTAD DE BIOLOGÍA, CENTRO DE ESTUDIOS DE PROTEÍNAS, UNIVERSIDAD DE LA HABANA

Inmunoensayos enzimáticos para detectar agentes infecciosos o sus productos: algunos diseños y aplicaciones

Anselmo J. Otero González

RESUMEN

Se hizo una valoración del impacto de los ensayos inmunoenzimáticos en la analítica de base inmunoquímica en las últimas 4 décadas, en la detección de agentes infecciosos o los productos asociado a su presencia y(o) actividad patogénica. Además se hace una incursión en algunos diseños y formatos que han tenido estos inmunoensayos desde los métodos electroquímicos de detección, los ensayos para detectar actividad proteolítica de origen microbiano y sus inhibidores como posibles blancos terapéuticos, los inmunoensayos directos de triple anticuerpo para lograr mayor sensibilidad, reveladores alternativos de la actividad enzimática, ensayos para el estudio de la serología viral con un mínimo de determinaciones, así como ensayos de competencia para evaluar la efectividad de candidatos vacunales basados en combinaciones peptídicas seleccionadas. Se concluyó con una rápida visión del futuro inmediato de este tipo de inmunoensayos a la luz de las tecnologías analíticas emergentes de detección.

Palabras clave: Reacción antígeno-anticuerpos, especificidad, inmunoensayos, agentes infecciosos, inmunodetección.

INTRODUCCIÓN

A casi 40 años de la publicación del primer inmunoensayo práctico revelado con una reacción enzimática y designado de modo exótico con un nombre de mujer¹ (moda que continuó después con otros diseños de ensayos de similar principio), esta variante de inmunoanálisis cuenta con niveles de detección corrientemente inferiores al nanogramo y las variantes miniaturizadas con sistemas de revelado amplificados están alcanzando la casi inimaginable cota de los atogramos. Ya desde finales de la década de los sesenta del siglo pasado se venía intentando la sustitución de los controvertidos

isótopos radiactivos como elementos de revelado en los inmunoensayos.² Pero es, en realidad, a partir de esta denominación de “ELISA” cuando ocurre una avalancha diversa y entusiasta de diseños originales y aplicaciones que han hecho de esta plataforma analítica una extraordinaria, práctica y masiva forma de cualificar y cuantificar antígenos y anticuerpos, sobre todo, después de la introducción de la versión microanalítica por *Alister Voller* a finales de la década de los setenta³ con su práctica y versátil modularidad

Esta revisión pretende incursionar y actualizar algunos formatos corrientemente utilizados para este tipo de ensayos, con el aporte de los resultados

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

del autor y su discusión en el contexto de otros similares que a lo largo de estos años han enriquecido el arsenal de variantes desde aquella de 1971, precursora y muy visionaria.

1. INMUNOENSAYOS DIRECTOS

1.1. Electroinmunoensayos. Inmunoensayo potenciométrico de enzima ligada (IPELI) para la detección del subtipo "ad" del antígeno de superficie de la hepatitis B como una alternativa a los inmunoensayos enzimáticos.

Los inmunoensayos electroquímicos pueden ser directos cuando se utilizan transductores potenciométricos, amperométricos o capacitivos que indican la reacción antígeno anticuerpo sin otra reacción acoplada o accesoria. Estos ensayos se basan en la detección de cambios en la densidad de carga o en la conductividad de la transducción. El hecho de trabajar sin marcadores para revelar la reacción es muy atractivo, sobre todo en el desarrollo de inmunosensores *in vivo* que permiten una evaluación en tiempo real con la deseada ausencia de reactivos peligrosos y con la posibilidad de utilizar anticuerpos de no muy alta afinidad. Ya hace más de 30 años Janata y otros detectaron un cambio de potencial con valor analítico cuando incubaron manano y concanavalina A inmovilizada en una membrana de PVC (*polyvinyl chloride*), que representa un antecedente importante para estos electroinmunoensayos de evaluación directa.⁴ En 1984, Keating y Rechnitz⁵ utilizaron un electrodo sensible a potasio con un conjugado dioxon-ionosforo en una membrana de PVC para detector anticuerpos anti-dioxina. Aun cuando algunas publicaciones han informado resultados con efectos similares, no quedaba completamente claro si el cambio de potencial es el resultado de un disturbio en el transporte de iones o es el producto de cambios de carga en la superficie de la interacción de las proteínas.⁶

En los inmunoensayos electroquímicos indirectos el evento de unión molecular es visualizado mediante una reacción auxiliar con un compuesto marcado. Los transductores amperométricos acoplados a la reacción son capaces de detectar 10^{-10} A en un rango lineal con potencióstatos comer-

ciales.⁷ Debido a que los anticuerpos y los antígenos no son electroquímicamente activos con el potencial REDOX en el rango apropiado, es necesario acoplar compuestos activos REDOX como marcadores para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo, de manera que cualquier unión inespecífica no contribuya a la señal de interés. En un ensayo amperométrico el compuesto REDOX marcador debe tener las propiedades siguientes: ser electroactivo en un rango de potencial entre 0 y 200 mV, no debe alterar el funcionamiento del electrodo, no tener reacciones colaterales con la matriz, ser estable en el tampón de reacción y tener disponibles grupos químicos activos para la conjugación.⁸

Los inmunoensayos electroquímicos indirectos también pueden ser enzimáticos de tipo homogéneos con el formato EMIT (*Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*, Syva, Palo Alto, Ca) o heterogéneos con el formato ELISA convencional. En este último caso, un transductor electroquímico sustituye al lector colorimétrico de microplacas, lo cual reduce los costos y permite lecturas de trabajos de campo. Los electrodos pueden ser integrados en el pocillo de reacción o la mezcla de reacción ser llevada a la celda de medición. Este es el caso de un inmunoensayo tipo *sandwich* para la hormona estimulante de tiroides (TSH) con la enzima fosfatasa alcalina (AP) como agente revelador. Después del lavado final, se añadió NADP+ (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) como sustrato. El NAD+ (*nicotinamide adenine dinucleotide*) producido se determinó por amplificación enzimática con alcohol deshidrogenasa (ADH) y diaforasa como enzima acoplada. En una versión comercial de ELISA amplificado (AmpliQ de Dako, NovoClone AELIA, Novo BioLabs) se utilizó INT-violeta como sustrato de la diaforasa.⁹ El ferricianuro al convertirse en ferrocianuro puede ser detectado de modo amperométrico. En configuraciones similares se reemplaza la ADH por la formiato deshidrogenasa, la glucosa deshidrogenasa, la carnitina deshidrogenasa o la glicerol deshidrogenasa.¹⁰

En lugar del p-nitrofenilfosfato (PNPP) habitualmente utilizado en los inmunoensayos que se revelan con fosfatasa alcalina o el NADP+ ya mencionado, el p-aminofenilfosfato (p-APP) es también con frecuencia usado en la determinación

electroquímica de la AP. El producto enzimático es p-aminofenol (p-AP) que puede ser medido con muy alta sensibilidad mediante un electrodo de carbón vidriado. El método fue propuesto por *Kulys* y otros en 1980 e introducido en una inmunoensayo por el grupo de *Heineman y Halsall*.¹¹ Este mismo grupo, 10 años más tarde, utilizó un electrodo de disco rotatorio directamente a una microgota de 50 μL en la detección electroquímica de IgG de ratón como modelo analítico en un inmunoensayo basado en microesferas.¹²

El inmunoensayo potenciométrico IPELI,¹³ que se desarrolló en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas de Cuba por los años ochenta intentó sustituir la lectura colorimétrica por una potenciométrica sobre la base de la ecuación de Nernst con la reacción REDOX del ABTS, que se reduce a expensas de la oxidación del peróxido de hidrógeno a agua. Naturalmente, el carácter artesanal del dispositivo utilizado solo permite la comparación con la variante colorimétrica tradicional para la peroxidada, basada en el cromógeno orto-fenilendiamina (OPD). El concepto electroquímico de la detección hace a esta independiente de la turbidez de la muestra, miniaturizable en términos de volumen, también automatizable si se diseña y construye un dispositivo capaz de medir la diferencia de potencial en placas tipo suma con quizá menos de 5 μL de muestra. Por otra parte la sensibilidad puede, en términos de detectabilidad, ser aumentada de manera notable, porque la actividad REDOX de fondo es mínima. A más de 20 años de informado y con el advenimiento de las nanotecnologías de miniaturización, este enfoque refuerza la pertinencia de ese intento de incursionar en otro concepto inmunoanalítico diferente al tradicional espectrofotométrico.

1.2. Inmunoensayos para detectar actividad proteolítica. Inmunoensayo de tipo ELISA para detectar inhibidores de la proteasa aspártica expresada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Existe un amplio rango de métodos disponibles para la evaluación de actividad de endoproteinasas (y de modo potencial para sus inhibidores) que utilizan sustratos proteicos y peptídicos.¹⁴ Algunos de ellos están basados en la detección de los pro-

ductos de la proteólisis¹⁵ o, por el contrario, del sustrato remanente.¹⁶ Estos ensayos con frecuencia miden la liberación de marcadores coloreados en el sustrato proteico o cuantifican aminoácidos o péptidos precipitados en medio ácido. Todos requieren tratamiento y relativamente grandes volúmenes a los efectos de una escala analítica. La sensibilidad puede ser aumentada con la utilización de sustratos a los que se ha unido de manera covalente compuestos cromogénicos o fluorogénicos en las regiones C terminales de los péptidos¹⁷ o isótopos radioactivos.¹⁸ Estos ensayos demandan usualmente la acción de proteinasas específicas, requieren equipo especializado y costoso e implican riesgos de operación además de presentar alta variabilidad entre muestras, así como premura en la detección debido a la inestabilidad de los productos.

Un enfoque diferente centra su atención en los inmunoensayos tipo ELISA y los anticuerpos específicos contra una región específica del sustrato que resulta excluyente después de la proteólisis.¹⁹ Un enfoque de similar estructura pero que no involucra anticuerpos utiliza un conjugado estrep-tavidina-fosfatasa alcalina para detectar el sustrato antes biotinilado.²⁰

La detección, con fines terapéuticos, de la actividad inhibidora de proteasas de forma rápida y masiva, sobre todo relacionada con entidades epidémicas y pandémicas, ha sido enfrentada mediante inmunoensayos que cumplen con estas expectativas de pesquisaje. En este sentido se ha informado un ELISA para la detección de actividad proteolítica y su inhibición de la proteasa aspártica del VIH, con un sustrato inmovilizado relacionado a la proteína gag. En estas condiciones, el pestatín fue capaz de inhibir la proteólisis y rendir una señal discriminadora con suficiente sensibilidad como para enfrentar candidatos extractos naturales y sintéticos.²¹

Se ha generalizado la denominación cat-ELISA para referirse a los inmunoensayos que intentan evaluar la actividad catalítica o su inhibición en fase sólida. Con este enfoque se informó de un ensayo para evaluar la actividad proteolítica aspártica del VIH y la evaluación de potenciales péptidos sintéticos inhibidores. Este inmunoensayo cuantitativo en fase sólida fijó un sustrato biotinilado por el extremo c-terminal con un extracto crudo

de enzima y un anticuerpo altamente específico el extremo c-terminal del producto de escisión. Una curva estándar sirvió de base para estimar la actividad enzimática y los autores aseguran que el método es menos costoso y más sensible que el convencional, cromatográfico.²²

Ya en 1991 el grupo de *Maurizio Denaro* en la Universidad de Milán había informado de un inmunoensayo tipo ELISA para detectar inhibidores de la proteasa aspártica del VIH, en mezclas tan complejas como fracciones de fermentación microbiana a partir de un péptido con la secuencia apropiada y un anticuerpo monoclonal (AcM). El fragmento escindido está conjugado con beta galactosidasa, por lo que la actividad inhibidora se evalúa como la aparición de actividad beta galactosidásica en lugar de la disminución de la actividad proteolítica, lo que aporta una ventaja analítica al sistema además de un procesamiento rápido y masivo de muestras.²³

Lo más interesante, desde el punto de vista inmunoquímico, en el ensayo descrito en el artículo de *Gutiérrez* y otros²⁴ es, entre otras cosas, la excelente curva lineal de calibración que se pudo lograr con el péptido de interés proteolítico DU1 en un rango entre 0,25 y 0,46 nmol/L, lo que ofrece un escenario apropiado para evaluar la proteólisis (disminución en la intensidad de la reacción) y la inhibición (recuperación de la intensidad de la reacción).

Lo puntos críticos de la puesta a punto fueron, primero, el pretratamiento de las muestras que provenían de extractos de invertebrados organismos marinos, con la consiguiente carga salina, tarea nada sencilla por la cantidad de combinaciones ensayadas y, en segundo lugar, el compromiso analítico entre la concentración adecuada de péptido DU1 (4,6 nmol/L) y su relación señal-fondo, la disminución de la señal por la proteólisis hasta un rango con la sensibilidad necesaria para con un valor de corte, razonablemente objetivo, detectar actividad recuperadora de la señal como evidencia de la inhibición de la enzima.

La capacidad del péptido DU1 de unirse a la estreptavidina y de ser reconocida por el AcM 322, sin reacciones cruzadas con el recubrimiento de biotina ni con el bloqueo garantizó un fondo excelente para estimar la sensibilidad del sistema en términos de cantidad mínima detectada (121 pmol/L).

La independencia estructural del sitio de corte proteolítico y el sitio de reconocimiento inmunoquímico en el péptido DU1, permite la utilización de este diseño en la búsqueda de inhibidores para otras proteasas e inclusive puede contener la secuencia de más de un sitio de corte simultáneo, que otorga cierta universalidad solo condicionada por la capacidad física y catalítica de la construcción.²⁵

1.3. Inmunoensayos de triple anticuerpo.

Inmunoensayo de tipo TAS-ELISA con anticuerpo monoclonal de captura para la detección temprana de antígenos del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la sigatoka negra en el banano.

Con el advenimiento de la *tecnología de hibridomas*, la posibilidad de disponer de anticuerpos de estructura homogénea (idiotipo e isotipo) y afinidad constante con un razonable o exigente grado de pureza según la aplicación de destino, cambió por completo los conceptos de variabilidad e inestabilidad de las tradicionales preparaciones de anticuerpos policlonales tan dependientes de la fuente animal. Por otra parte, este advenimiento abrió nuevos horizontes en el mapeo epitópico superficial (caracterización molecular) de microorganismos y células superiores, introduciendo una nueva dimensión en el análisis biológico, que llega inclusive a convertir a estas preparaciones monoclonales en herramientas para la demostración de mecanismos de acción en procesos bioquímicos e inmunológicos.²⁶

La clásica disyuntiva, muy difícil de encarar con anticuerpos policlonales, para distinguir epítopes exclusivos en un agente infeccioso que comparte otros epítopes presentes en flora normal no patogénica, pudo ser resuelta de manera racional y efectiva con el establecimiento de la tecnología de hibridomas, que permite obtener las líneas celulares productoras de AcMs. Efectivamente, es posible sin la necesidad de purificar los epítopes exclusivos, inmunizar con los patógenos completos y en el paso de evaluación de los sobrenadantes de los hibridomas, pesquisar la reactividad de los AcMs contra los microorganismos patógenos y los no patógenos de forma paralela. Solo serán seleccionados los anticuerpos que reaccionen con

epítopes relacionados, de modo exclusivo, con las especies patógenas de interés.

El tema de la elección de los antígenos, inclusive los epítopes, sobre los cuales generar una respuesta de anticuerpos con fines analíticos y(o) diagnósticos está, naturalmente, muy relacionado con la complejidad de ciclo infectivo del patógeno. De hecho los parásitos protozoarios y multicelulares que interactúan con los vertebrados han tenido la capacidad de retar y condicionar la respuesta inmune del hospedero, muy a favor de estos invasores y en detrimento de los organismos parasitados, como ocurre con el *Plasmodium* (malaria), el *Trypanosoma* (enfermedad de Chagas) y la *Leishmania* (leishmaniasis), que han convertido su complejo ciclo de vida en un formidable factor de virulencia en términos de desestabilización y desorientación de la respuesta inmune.

Aunque en el reino vegetal aún no se ha descubierto una franca respuesta adaptativa, con ciertos indicios ya de ella, la respuesta innata frente a las infecciones microbianas está firmemente establecida, inclusive con una cascada de inducción de señal muy semejante a la encontrada para células animales.²⁷

Los hongos, sin llegar a estas ingeniosas y efectivas transformaciones antigénicas de los parásitos protozoarios, pueden presentar, en sus diferentes fases reproductivas, alternativas a tener en cuenta con respecto a qué tipo de antígenos se deben considerar para generar anticuerpos, sobre todo monoclonales.

Mycosphaerella fijiensis Morelet, agente etiológico de la sigatoka negra en bananos y plátanos, enfermedad devastadora para este cultivo, descubierta en las Islas Fidji en 1963 y que apareció en América en 1972. Su control se basa en la aplicación de fungicidas muy tóxicos para los animales y el ecosistema. La detección temprana de la infección en ausencia de síntomas permitiría una aplicación mucho más racional y segura de sustancias antifúngicas.²⁸

Los inmunoensayos con anticuerpos que reconocen estructuras fúngicas exclusivas de forma específica y sensibles, pueden detectar antígenos tempranos que ofrezcan una valoración de la intensidad y pronósticos de una infección asintomática. Por lo tanto, la elección de los antígenos

sobre los cuales generar los anticuerpos se convierte en la primera tarea de diseño del inmunoensayo.²⁹

En el caso de este hongo, la fuente para la consideración de los antígenos provienen de:

- a) Extracto de micelio de hongo cultivado *in vitro*.
- b) Extracto de micelio proveniente de infección natural o experimental.
- c) Proteínas fúngicas segregadas en el cultivo *in vitro*.
- d) Conidias.
- e) Ascosporas.

Si el origen de la infección en época lluviosa es una o varias ascosporas o conidias en época seca que penetran en la hoja por los estomas, parece razonable pensar que los anticuerpos de captura reconozcan proteínas de estas estructuras como candidatos tempranos de infección. Obviamente, estos antígenos aparecerán de nuevo en la fase necrótica avanzada, cuando un nuevo lote de esporas muy abundante esté preparado para proseguir la propagación a nuevas plantas. La pregunta es: ¿la abundancia de esporas en un área foliar determinada es suficiente para que el inmunoensayo logre la detectabilidad suficiente para un criterio analítico?

Esto nos lleva a la intención de que ese anticuerpo policlonal o esas mezclas de AcMs como anticuerpos de captura reconozcan también antígenos de micelio y proteínas segregadas que permiten al hongo abrirse camino en las estructuras titulares de las hojas. La utilización de extracto de micelio como antígeno tiene la ventaja de incluir también a las proteínas segregadas que provienen de él. Esta fue la estrategia utilizada en el artículo de Otero y otros para generar AcMs, donde se logra un hibridoma que segrega una monoclonal, la cual reconoce una proteína de alto peso molecular que pudiera ser una enzima.³⁰

En este caso el tema de la sensibilidad analítica (detectabilidad del ensayo) puede manejarse con la cantidad de tejido foliar utilizado para hacer la prueba, lo cual naturalmente incluiría una etapa de extracción, concentración y clarificación más o menos compleja, en dependencia del concepto que se establezca de "estadio temprano". Esta consideración será la que decida, aun trabajando en el

límite de sensibilidad del ensayo, cuán útil será la prueba para diagnosticar la infección antes que aparezcan las lesiones características de esta enfermedad.

La utilización, en este artículo, de un sistema de 3 anticuerpos (TAS-ELISA) de 3 especies mejoró notablemente la detectabilidad por amplificación, cuando se comparó la variante del conjugado directo con la policlonal de conejo. Esta modalidad TAS-ELISA se encuentra bastante extendida en aplicaciones inmunoanalíticas comerciales, por ejemplo, de la firma Agdia de EE. UU., que presenta una amplia variedad de ensayos para el diagnóstico y la detección de agentes infecciosos en plantas.

2. INMUNOENSAYOS INDIRECTOS

2.1. Reveladores del conjugado enzimático.

Introducción de un sustrato de enzima peroxidasa para revelado de conjugado de fosfatasa alcalina en inmunoensayo tipo ELISA, el cual incluye a un anticuerpo monoclonal que reconoce al subtipo "ad" del antígeno de superficie de la hepatitis B.

En los ensayos no competitivos (*sandwich* o ensayos de saturación secuencial) se utiliza un significativo exceso de anticuerpos con respecto a la concentración de antígeno. En este caso, la difusión resulta un fenómeno tan decisivo como la avidéz o afinidad de las inmunoglobulinas involucradas. Mientras que la menor concentración de analito detectable en los ensayos de competencia está en el orden de 10^7 moléculas por mililitro, un ensayo no competitivo es potencialmente capaz de detectar concentraciones menores en varios órdenes de magnitud.³¹ Por otra parte, debido al exceso de uno de los componentes analíticos, el ensayo no competitivo es habitualmente más rápido que su equivalente competitivo.³²

En los ensayos tipo ELISA no competitivos de tipo *sandwich* para cuantificar antígenos o indirecto del tipo serológico para estimar el título de anticuerpos, la reacción final involucra a un compuesto cromógeno que genera un producto coloreado cuya concentración es, en un cierto rango manejable, proporcional a la concentración del

analito. Por lo tanto, la elección de este revelador tendrá una influencia en la sensibilidad del sistema en términos de cantidad mínima detectable. Las enzimas que, durante años, han sido más frecuentemente utilizadas en los inmunoensayos son la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina de intestino bovino. Con respecto a la peroxidasa, algunos autores sostienen que la relación cromógeno-producto con el par peróxido-agua es tan estrecha, que deben considerarse a esos compuestos como parte de un sustrato complejo para la peroxidasa. Esta enzima utiliza como sustrato al peróxido de hidrógeno que se oxida a agua y la contraparte que intercambia electrones en el evento REDOX puede ser el cromógeno 3,3,5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), el ortofenilendiamina (OPD) y el 2,2'-azinobis[3-etilbenziltiazolino-6-ácido sulfónico] (ABTS). Este último, cuya fórmula general es $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ y masa molar 514,62 g/mol, es un cromógeno soluble en agua asociado que rinde un producto de punto final de color verde. Presenta 2 picos en su espectro de absorción, 410 nm y 650 nm. El ABTS es menos sensible que el OPD y el TMB en aplicaciones de ELISA, pero esa misma propiedad puede ser en algunas circunstancias beneficiosa, si una mayor sensibilidad produce fondos inadmisibles. Por otra parte, ABTS tiene un desarrollo de color más lento (20 min) que los otros cromógenos, lo cual también puede ser favorable por la misma razón.³³

Un estudio de la firma KPL (Gaithersburg, MD, EE. UU.) referido en su reporte de servicio técnico ML-108-03, comparó los cromógenos TMB, OPD y ABTS de acuerdo con su comportamiento en un ELISA de 2 pasos con IgG humana como recubrimiento, y un conjugado anti IgG peroxidasa en condiciones de detención y no detención de la reacción enzimática. Ellos concluyeron que el TMB fue el cromógeno de mayor señal, seguido de OPD y ABTS cuando se añadió solución detenedora. Con respecto a la relación positivo-negativo la diferencia no fue tan marcada, lo cual demuestra que la mayor sensibilidad no necesariamente está relacionada con la mayor señal de absorbancia obtenida. Por otra parte TMB y OPD requieren 2 filtros diferentes para reacciones detenidas y no detenidas, a diferencia de ABTS que requiere solo un filtro para las 2 variantes de punto final; este, además, es un compuesto no peligroso

para los operadores del ensayo y a los efectos de su desecho.

En un reciente inmunoensayo enzimático tipo ELISA-PCR,³⁴ después de la optimización de la reacción, se evaluaron estos 3 mismos compuestos. El cromógeno que aportó más sensibilidad al ensayo en términos de la relación señal-fondo fue el ABTS, el cual genera un producto de color verde-azul con total independencia del DNA que proviene del extracto fúngico crudo o purificado. El ABTS, además, mostró el menor fondo y la más clara y legible condición aun a la dilución de 1:250 del conjugado de peroxidasa. El OPD fue menos sensible con un mayor fondo debido a su mayor sensibilidad a la luz y la inestabilidad del cromógeno.³⁵ El color naranja incipiente del OPD fue difícil distinguir del amarillo del fondo y las reacciones negativas. El cromógeno menos sensible fue el TMB debido a su alto fondo. La combinación de ABTS con SDS resultó la más apropiada y estos autores auguran que será una alternativa muy ventajosa en el futuro de los inmunoensayos que utilicen conjugados de peroxidasa.

Una posible aplicación al uso del ABTS³⁶ como sustrato alternativo al paranitrofenil fosfato en conjugados de fosfatasa alcalina se basa en que los inmunoensayos en los cuales el analito se encuentra en un extracto vegetal, no pueden ser detectados a partir de conjugados de peroxidasa, debido al alto contenido de esta enzima en los tejidos vegetales que por supuesto contaminará, aun en trazas, la secuencia inmunoquímica, que provoca falsos positivos generalizados en todo el ensayo. Resultan muy conocidos los habituales bajos y desalentadores niveles de intensidad del color del paranitrofenol, que es el compuesto coloreado resultante de la acción enzimática de la fosfatasa alcalina sobre el paranitrofenil fosfato. Esto hace que los revelados basados en este par enzima-sustrato sean difíciles de evaluar visualmente debido a la subjetividad, por la poca diferencia entre débiles positivos, negativos y blancos.

Los inmunoensayos visuales son en particular atractivos en fitopatología, cuando se piensa en pruebas masivas que requieren una rápida y enérgica decisión en el campo. En estos casos sería posible y quizá deseable introducir el ABTS como cromógeno, el cual ofrece mayor absorbancia neta y mejor relación positivo-negativo que el

sustrato colorimétrico tradicional para la fosfatasa alcalina.

2.2. Serología diagnóstica viral con dilución única del suero. Aplicación de la estimación del título de anticuerpos contra citomegalovirus, virus herpes simple y adenovirus, con una sola dilución del suero y una curva estándar mediante la aplicación del sistema ultra microanalítico (SUMA).

Las enfermedades infecciosas pueden ser diagnosticadas por métodos inmunoquímicos mediante la detección de antígeno circulante (o extraído de tejidos) en ensayos de tipo directo o *sándwich*, en los cuales se precisa determinar cuantitativamente la existencia de un marcador cuya concentración correlacione con el avance de la infección como es el caso del antígeno de superficie de la hepatitis B.³⁷ Algunos agentes infecciosos experimentan, como parte de su estrategia de incubación y(o) evasión, períodos de ausencia antigénica en los fluidos corporales o se encuentran en los tejidos en zonas de difícil recuperación. Entonces el diagnóstico acude a los efectores de la respuesta inmune que esos agentes han provocado, tras su entrada y tránsito por el organismo inmunológicamente competente. En general, la presencia (IgM) o la variación del título (IgG) de los anticuerpos específicos a un determinado agente infeccioso aportan una medida de la evolución de la infección, además, permite tener una certeza de que el desarrollo de la respuesta inmune está relacionada con la sospecha de infección de un determinado microorganismo y ante un cuadro clínico específico.³⁸

De esta manera, un ensayo tipo ELISA indirecto compuesto, en la fase sólida, por un antígeno apropiado y representativo del reto antigénico de la infección natural es necesario para detectar anticuerpos que el organismo infectado está generando contra este agente (representado por este antígeno) y que se unirán a él específicamente. El revelado dependerá de si el analista está interesado en determinar anticuerpos de la clase IgM si el patrón de infección es apropiado para estimación de una infección reciente³⁹ o en la evolución

mediata de los títulos de IgG, si es que se requiere la evaluación de una seroconversión o la elevación del título específico de IgG en varios órdenes de magnitud en el transcurso de 2 semanas.⁴⁰

Esta determinación de título de anticuerpo IgG específico requiere que se realicen a la muestra de suero al menos 4 diluciones en un rango apropiado, de manera que la magnitud indirecta cuantificada (densidad óptica en caso de ELISA) disminuya significativamente por debajo de un valor prefijado. Este valor es establecido mediante un histograma de frecuencias que relaciona valores medidos en el mismo ensayo en una población de individuos sanos y enfermos y al que se denomina “valor de corte”. La definición de casos sanos y enfermos se establece mediante una prueba de máxima confianza a la que le llama “prueba de oro” y se considera la “verdad absoluta” mientras no se pruebe o establezca lo contrario. De esta manera, la mayor dilución del suero que ofrezca una densidad óptica superior al valor de corte, será determinada como el “título” de anticuerpos específicos al agente cuyo antígeno fue vinculado a la fase sólida del ensayo. Como puede apreciarse, este valor es una aproximación por defecto a un “título real” que sería interpolado en el sitio exacto de intersección de la línea de valor de corte con la curva de dilución. Si la prueba se repite en el transcurso de 2 semanas y el título específico se incrementa en al menos 4 veces (diluciones seriadas dobles), entonces el médico puede tener una certeza de que el paciente está desarrollando una respuesta humoral frente a un agente infeccioso responsable del cuadro clínico que presenta.

El hecho de tener que realizar 4 diluciones a cada suero para estimar el título por interpolación de la curva con el valor de corte, indudablemente, encarece la prueba porque consume 4 posibilidades diagnósticas en la placa de ELISA. Para solucionar este inconveniente se han realizado intentos por hacer una estimación del título específico de un suero por ELISA utilizando una única dilución.⁴¹ Este procedimiento consiste en escoger un panel de sueros de amplio espectro de reactividad en términos de título específico a un agente determinado y recalcularlo su título por interpolación directa en la curva de titulación; se esta forma se calcula lo que se ha llamado el “título a punto final”, que no es más que el verdadero título y no la aproxima-

ción por defecto que se acostumbra a hacer para comparar después con una próxima titulación y evaluar una seroconversión. La estimación del título a punto final se facilita si, estadísticamente, a la curva de dilución del suero se aplica logaritmo a cada eje (densidad óptica y recíproco de la dilución) y una regresión lineal interpolando el valor de corte en la ecuación correspondiente. Una vez compilados los títulos a punto final de este panel de sueros representativos del espectro de reactividad de la prueba es posible, para cada dilución ensayada, confeccionar una curva estándar, que relaciona los logaritmos de los recíprocos de los títulos a punto final en el eje de las abscisas con el logaritmo de las densidades ópticas en el eje de las ordenadas de cada determinación. Un detallado análisis de regresión y factibilidad puede permitir al analista seleccionar la curva estándar más precisa y operativamente practicable. Con esta curva es posible entonces evaluar en el ensayo de ELISA una sola dilución del suero problema, para una vez conocida la densidad óptica correspondiente llevarla a la curva estándar y encontrar por interpolación el título a punto final que caracteriza a ese suero. Como los médicos no están acostumbrados a maniobrar títulos a punto final, el analista puede hacer una aproximación por defecto de este valor y entregar como diagnóstico un título discreto que le sirva al especialista para estimar, después de una segunda prueba, si hay seroconversión.

Este enfoque fue aplicado, en los años noventa, en el laboratorio de diagnóstico serológico viral en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” a los ensayos montados en el sistema ultra microanalítico (SUMA)⁴² para la titulación de sueros (IgG específica) contra citomegalovirus⁴³, herpes simple⁴⁴ y adenovirus.⁴⁵ En el caso de citomegalovirus, a manera de ejemplo, las determinaciones de título a punto final fueron calculadas a partir de regresiones lineales de curvas de dilución, con coeficientes de determinación siempre mayores que 0,95. La curva estándar escogida para la dilución de 1/40, a partir de un panel de sueros de amplio espectro de reacción, demostró una regresión lineal con un coeficiente de determinación r^2 de 0,93. Con esta curva fue posible estimar los títulos a punto final de sueros problemas con una única dilución y compararlos con la determinación del título por el método clásico de 4 diluciones. Se encontró

una correlación estrecha entre ambas evaluaciones caracterizadas por un coeficiente de determinación r_s de Spearman de 0,92, para la estimación de la asociación entre magnitudes continuas y discretas.

Estos resultados demuestran que es posible utilizar una única dilución del suero, en un sistema analítico tan sensible y demandante de habilidades técnicas como el SUMA, para estimar los títulos específicos de IgG en agentes infecciosos cuyos patrones de respuesta inmunológica permitan estimar una conversión sérica, como indicador diagnóstico de infección en curso con la consiguiente optimización del espacio en la placa y disminución de costos en el ensayo sin sacrificar valor diagnóstico.

3. INMUNOENSAYOS DE COMPETENCIA

Evaluación de la avidéz en respuestas humorales vacunales. Estudio de la avidéz en respuestas humorales vacunales. Inmunoensayo de tipo ELISA de competencia para estimar la avidéz de los anticuerpos que reconocen péptidos de virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) en pacientes vacunados con gp160 recombinante.

La avidéz de una preparación policlonal de anticuerpos por su antígeno correspondiente ha tenido durante años, además de su inherente y crucial importancia fisiológica, un papel fundamental en la calidad y sensibilidad de estos anticuerpos en los ensayos diagnósticos a los que han sido destinados. Por esta razón, desde su generación en los animales de experimentación, ha sido posible provocar la maduración de la respuesta para estos propósitos mediante un apropiado protocolo de inmunización. Aunque es posible, naturalmente, evaluar de forma previa la avidéz de estas preparaciones en una prueba particular, su propia introducción en el ensayo definitivo dirá la última palabra en cuanto a sensibilidad y calidad analítica.³ En el caso de los AcMs, como su afinidad puede encontrarse en el rango de 10^5 - 10^{12} M⁻¹, los inmunoensayos competitivos utilizando anticuerpos con una $K_d = 10^{-12}$ M alcanzan su más alta sensibilidad en el rango picomolar.⁴⁶

Mientras que la afinidad es una medición termodinámica de la interacción de antígeno y anticuerpo medida en el equilibrio, la avidéz es una medida más relativa de la fortaleza de la interacción, enriquecida por el efecto bonificador de la policlonalidad; es una función de la valencia antigénica, la valencia de anticuerpo, la concentración de ambos y de la afinidad individual de los anticuerpos integrantes de la preparación policlonal.⁴⁷

La evaluación de la avidéz de una respuesta humoral en respuesta a una infección es un evento de crucial importancia en el seguimiento y control de las infecciones, que puede decidir la estrategia de vacunación si el agente infeccioso provoca una reacción neutralizante potenciada por la avidéz de sus anticuerpos específicos. La avidéz de una preparación o respuesta policlonal puede medirse en un inmunoensayo mediante antígenos radio-marcados,⁴⁸ a través de un agente caotrópico como la urea o el tiocianato que provocan el desprendimiento de antígeno inmovilizado y su anticuerpo específico y determinando lo que queda en la fase sólida,⁴⁹ también mediante ensayos de competencia en los cuales el antígeno marcado compete con el nativo por los anticuerpos o el antígeno soluble compete con el antígeno unido a la fase sólida por anticuerpos que también están en la fase fluida.⁵⁰

Con respecto al papel de la avidéz de la respuesta de anticuerpos contra el VIH y su relación con la protección,⁵¹ la atención ha sido centrada además en los títulos neutralizantes naturales o provocados por vacunación.⁵² Las respuestas de anticuerpos inducidas por la glucoproteína de la envoltura (Env) de los lentivirus SIV⁵³ y de la anemia infecciosa equina⁵⁴ maduran lento. La maduración en función de la protección se define como el desarrollo de una avidéz significativa, altos títulos de anticuerpos neutralizantes y algún grado de actividad neutralizante cruzada. Mientras que los títulos de anticuerpos se incrementan durante varias semanas de la infección y los anticuerpos neutralizantes lo hacen durante varios meses, la avidéz de los antiseros policlonales se incrementa más lentamente y alcanzan sus máximos valores entre 6 y 8 meses después de la infección. Este incremento de la avidéz es coincidente con la amplitud de la respuesta neutralizante protectora a los virus heterólogos.⁵³ Una maduración lenta en

la avidéz y el desarrollo de anticuerpos de neutralización cruzada después de los 8 y 12 meses, se ha observado en individuos infectados con el VIH.⁵⁵ Por el contrario la avidéz de la respuesta de anticuerpos en una infección causada por un virus diferente a los lentivirus como el virus de la hepatitis C,⁵⁶ es alcanzada rápido y se manifiesta alta en intensidad en períodos de algunos meses e inclusive en algunas semanas.

El protocolo inicial del inmunoensayo de avidéz informado en el artículo de *Broliden* y otros⁵⁷ mostraba bastante poca robustez en términos de la definición del blanco que, en este tipo de ensayo, se definía 100 % de reacción sin competencia, sobre el cual será necesario calcular la afinidad relativa así como la determinación de la dilución de los sueros para ejecutar los ensayos de competencia. También fue necesario diseñar un procesamiento estadístico riguroso, para llegar a resultados confiables en cuanto a la afinidad relativa como medida de la avidéz de los anticuerpos de los pacientes seropositivos inmunizados con gp160 recombinante. El inmunoensayo de competencia para estudiar la avidéz se montó sobre un diseño anterior para péptidos sintéticos del lazo V3 de la gp120 del VIH,⁵⁸ el cual tenía la característica de no necesitar bloqueo debido a la compactación del recubrimiento peptídico que impedía a los anticuerpos del suero y los del conjugado su acceso al soporte sólido de la placa.

EL número de repeticiones del blanco de competencia (PBS-tween en lugar de péptidos en solución compitiendo por el péptido) fue aumentado a 5 en cada placa para garantizar una cifra estadísticamente robusta sobre la cual calcular 50 % de señal máxima. Sucedió lo mismo con la concentración de péptido en solución que definió el otro extremo de la curva de competencia o señal mínima, cuando el péptido unido a la fase sólida no tuvo oportunidad de recibir los anticuerpos del suero por estar saturados de péptido en solución. Estos 2 niveles extremos de señal son el resultado de valores asintóticos muy difíciles de estandarizar mediante promedios, sobre todo el inferior, cuando la señal tiene al fondo del experimento que es la reacción donde se utiliza como blanco PBS-Tween en lugar de la mezcla anticuerpos y péptidos en competencia. Otro aspecto inte-

resante de la puesta a punto es la selección de la dilución de anticuerpo para lograr una competencia comparable entre muestras de suero. En este sentido, el protocolo original de *Steward*⁴⁷ indica que debe utilizarse una dilución del suero que rinda una absorbancia de 0,5 unidades y en el artículo de *Broliden* y otros se indica un rango entre 0,5 y 1,0 unidades.

La práctica demostró que cuando se fijó una dilución de los sueros mucho más precisa a partir de valores de $1,0 \pm 0,1$ unidades de absorbancia, se obtuvieron valores mucho más consistentes y reproducibles en las concentraciones molares inhibitorias. La interpolación estadística (y no gráfica) permitió una mayor precisión en la determinación de esta concentración, que en definitiva fue importante en el análisis de la significación en el incremento de la avidéz. Llama la atención el tratamiento lineal de la inhibición por competencia cuando el tratamiento sigmoidal (ecuación de Boltzman) pudo aplicado ampliando el rango de análisis pero, en realidad, el segmento lineal de la curva contuvo suficientes puntos de inhibición como para ser considerado, simplificando los cálculos, naturalmente.

La optimización de este inmunoensayo de competencia para determinar la avidéz, y junto a otras determinaciones, la funcionalidad de una respuesta humoral que se intenta sea protectora, demuestra que los parámetros de control de calidad del ensayo y la robustez del tratamiento estadístico pueden ser decisivos para obtener los resultados consistentes y reproducibles que se pretendió con su elección en el protocolo de investigación.

4. CONCLUSIÓN

Los inmunoensayos enzimáticos de tercera generación determinan (detectan y[o] cuantifican) analitos sin enriquecimiento o concentración, purificación o pretratamiento, procedimientos que con frecuencia dificultan y encarecen a los métodos analíticos y que son imprescindibles para procedimientos estandarizados y reconocidos como la cromatografía líquida de alta presión, la cromatografía gaseosa o la espectrometría de masas. De forma especial en el diagnóstico clínico donde es necesario analizar muestras

muy complejas como sangre total, suero o plasma, orina y heces que contienen una gran cantidad de sustancias, orgánicas y biomoleculares, los inmunoensayos representan frecuentemente una alternativa muy deseable en cuanto a tiempo y sensibilidad.

La tendencia actual a la miniaturización seguirá siendo una importante consideración en el diseño y desarrollo de ensayos y analizadores. Los sistemas de alto flujo de pesquaje para el descubrimiento de nuevas drogas y los análisis a gran escala para los estudios genéticos necesitarán de estos conceptos de miniaturización. Existen numerosos ejemplos de ensayos y procesos analíticos que han sido adaptados con éxito al formato *microchip* y el objetivo tener un laboratorio en un chip parece estar al alcance de la mano. Los microchips fabricados en plástico posibilitan ya la sustitución de los materiales completos en los dispositivos siliconados. Hoy día el desarrollo de las nanotecnologías en el terreno de la analítica es una realidad con la introducción de los nanochips.

Los progresos en los inmunoensayos enzimáticos automatizados han sido impresionantes, pero mucho más se vislumbra debido a la necesidad imperiosa de análisis masivos. Muchos inmunoensayos homogéneos son hoy día, casi de modo inadvertido, integrados en los pesquajes rutinarios de química clínica. Muchos de los más demandantes inmunoensayos heterogéneos puestos a punto en sistemas especializados, ofrecen hoy atractivas opciones como operación continua y acceso aleatorio a una matriz de muestras, lo que permita el análisis puntual y no secuencial como era tradicional. No obstante estas innovaciones, todavía la calidad analítica de estos en inmunoensayos muy automatizados debe ser mejorada.

Nuevos y poderosos marcadores diagnósticos podrán ser introducidos, solo si los sistemas automatizados son lo suficiente confiables. Por supuesto, los mejores resultados de estas pruebas tendrán un costo inherente pero finalmente la automatización misma ayudará a reducirlo.

Las megacorporaciones emergentes en la industria del diagnóstico tienen amplios recursos para enfrentar estos retos, pero la comunidad de los laboratorios deberá ser tenaz para demandar la calidad necesaria a precios razonables.

Enzymatic immunoassays for the detection of infectious agents or their products: presentation of some designs and applications

ABSTRACT

This paper assessed the impact of the immunoenzymatic assays on the field of the immunochemistry-based analytics for the last 40 years, and on the detection of infectious agents or the products related to their presence and/or pathogenic activity. It also addressed some designs and formats of these immunoassays from electrochemical methods of detection, assays to determine proteolytic microbial activity and their inhibitors as possible therapeutic targets, more sensitive direct triple antibody systems, alternative enzymatic activity detectors, assays for viral serology of minimal determinations to competitive assays for evaluation of vaccinal candidate effectiveness based on selected peptide combinations. Finally, it provided a rapid overview of the near future of this type of immunoassays in the light of the emerging detection analytical technologies.

Key words: antigen-antibody reaction, specificity, immunoassays, infectious agents, immunodetection.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971;8:871-4.
2. Avrameas S, Ternynck TH. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunosorbents. *Immunochemistry*. 1969;6:53-66.
3. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organ*. 1976;53:55-65.
4. Janata J. An immunoelectrode. *J Am Chem Soc*. 1975;97:2914-6.
5. Keating MY, Rechnitz GA. Potentiometric digoxin antibody measurements with antigen-ionophore based membrane electrodes. *Anal Chem*. 1984;56:801-6.
6. Bergveld P. A critical evaluation of direct electrical protein detection methods. *Biosen. Bioelectron*. 1991;6:55-72.
7. Weber StG, Long JT. Detection limits and selectivity in electrochemical detectors. *Anal Chem*. 1988;60:903A-11A.
8. Jenkins SH, Halsall HB, Heinemann WR. Extending the detection limit of solid-phase electrochemical enzyme immunoassay to the attomole level. *Anal Biochem*. 1988;168:292-9.
9. Johannsson A, Ellis DH, Bates DL, Plumb AM, Stanley CJ. Enzyme amplification for immunoassays. Detection limit of one hundredth of an attomole. *J Immunol Methods*. 1986;87:7-11.
10. Tang X, Johansson G. Enzyme electrode for amplification of NAD/NADH using glycerol dehydrogenase and diaphorase with amperometric detection. *Anal Lett*. 1995;28:2595-606.
11. Tang HT, Lunte CF, Halsall HB, Heineman WR. p-Aminophenyl phosphate: an improved substrate for electrochemical enzyme immunoassay. *Anal Chim Acta*. 1988;214:187-95.
12. Wijayawardhana CA, Halsall HB, Heineman WR. Micro volume rotating disk electrode (RDE) amperometric detection for a bead-based immunoassay. *Anal Chim Acta*. 1999;399:3-11.

13. Otero AJ, Rodríguez I, Rodríguez BL, Pascual C. Inmunoensayo potenciométrico de enzima ligada (IPELI) para la detección del subtipo "ad" del antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg). *Interferón Biotecnol.* 1989;6:299-301.
14. Bickerstaff GF, Zhou H. Protease activity and autolysis (autolysis) assays using Coomassie blue dye binding. *Anal Biochem.* 1993;210:155-8.
15. Hatakeyama T, Kohzaki H, Yamasaki N. A microassay for proteases using succinylcasein as a substrate. *Anal Biochem.* 1992;204:181-4.
16. Burokerkilgore M, Wang KKW. A coomassie brilliant blue G-250-based colorimetric assay for measuring activity of calpain and other proteases. *Anal Biochem.* 1993;208:387-92.
17. Barret AJ, Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. In: Lorand L, editor. *Methods in Enzymology.* New York: Academic Press; 1981; p. 535-61.
18. Murray PF, Silberstein S, Cantore ML, Passeron S. A radioactive method for the measurement of trypsin and trypsin-like activities. *Anal Biochem.* 1989;179:56-9.
19. Dupont D, Lugand D, Rolet-Repecaud O, Degelaen J. ELISA to detect proteolysis of ultrahigh-temperature milk upon storage. *J Agric Food Chem.* 2007;55:6857-62.
20. Koritsas VM, Atkinson HJ. An assay for detecting nanogram levels of proteolytic enzymes. *Anal Biochem.* 1995;227:22-6.
21. Mansfeld HW, Schulz S, Grütz G, von Baehr R, Ansoerge S. Detection of inhibition of HIV-1 protease activity by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Immunol Methods.* 1993;161:151-5.
22. Fournout S, Roquet F, Salhi SL, Seyer R, Valverde V, Masson JM, et al. Development and standardization of an immunoprecipitated solid phase assay for HIV-1 aspartyl protease activity and its application to the evaluation of inhibitors. *Anal Chem.* 1997;69:1746-52.
23. Sarubbi E, Nolli L, Andronico F, Stella S, Saddler G, Selva E, et al. A high throughput assay for inhibitors of HIV-1 protease. Screening of microbial metabolites, FEBS. *Lett.* 1991;279:265-9.
24. Gutierrez OA, Salas E, Hernandez Y, Lissi EA, Castrillo G, Reyes O, et al. An Immunoenzymatic Solid-Phase Assay for Quantitative Determination of HIV-1 Protease Activity. *Anal Biochem.* 2002;307:18-24.
25. Salas E, Ramirez A, Otero-Bilbao A, Vazquez R, Reyes O, Mendiola J, et al. A heterogeneous enzymatic immunoassay for the quantification of Plasmepsin II activity and the evaluation of its inhibitors. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;34:833-40.
26. Kennett RH, Bechtold KB, McKearn TJ. Reflections of Nine Years of Monoclonal Antibodies and Hybridomas. In: Kennett RH, Bechtold K, McKearn TJ, editors. *Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines. Progress and Applications.* New York and London: Plenum Press; 1984. p. 3-14.
27. Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, et al. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature.* 2002;415:977-83.
28. Balint-Kurti PJ, Churchil ACL. Towards a molecular understanding of *Mycosphaerella* / banana interactions. In: Jain SM, Swennen R, editors. *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations.* Plymouth: Science Publishers; 2004. p. 147-60.
29. Melby JM, Stave JW. ELISA evaluation of banana black Sigatoka disease status. *J Clin Ligand Assay.* 1994;18:166-70.
30. Otero AJ, Sarracent J, Hernández H, Sánchez M, Muirragui D, Villamar M, et al. Monoclonal antibody-based TAS-ELISA for quantitative detection of *Mycosphaerella fijiensis* antigens. *J Phytopathol.* 2007;155:713-9.
31. Ekins R. A shadow over immunoassay. *Nature.* 1989;340:256-8.
32. Gosling JP. A decade of development in immunoassay methodology. *Clin Chem.* 1990;36:1408-27.
33. Paing MM, Stutts AB, Kohout TA, Lefkowitz RJ, Trejo J. β -Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or down-regulation. *J Biol Chem.* 2002;277:1292-300.
34. Somai BM, Keinath AP. Development of PCR-ELISA for detection and differentiation of *Didymella bryoniae* from related phoma species. *Plant Dis.* 2002;86:710-6.
35. Porstmann B, Porstmann T, Nugel E. Comparison of chromogens for the determination of horseradish peroxidase as a marker in enzyme immunoassay. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1981;19:435-9.
36. Otero A, Rodríguez I, Falero G. 2,3,5-tryphenyl tetrazolium chloride (TTC) reduction as exponential phase marker for mammalian cells in culture and for myeloma hybridization experiments. *Cytotechnol.* 1991;6:137-42.
37. Hall J, Jilg W, Hottenträger B, Bonnar P, Fang C, Baker L. Performance of a chemiluminescent immunoassay for HBsAg on the new high-throughput and fully automated ACS: Centaur™ system. *Clin Lab.* 1998;44:349-54.
38. Voller A, Bidwell DE. Enzyme-immunoassays for antibodies in measles, cytomegalovirus infections and after rubella vaccination. *Br J Exp Pathol.* 1976;57:243-7.
39. Filice GA, Yeager AS, Remington JS. Diagnostic significance of immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii* detected after separation of immunoglobulin M from immunoglobulin G antibodies. *J Clin Microbiol.* 1980;12:336-42.
40. Griner PF, Mayewski RJ, Mushlin AI. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures: principles and applications. *Ann Intern Med.* 1981;94:557-92.
41. Van Loon AM, Van der Logt JTM, Van der Venn J. Enzyme Linked Immunosorbent Assay for measurement of antibody against Cytomegalovirus and Rubella virus in a single serum dilution. *J. Clin Pathol.* 1981;34:665-9.
42. 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.
43. Jomarrón L, Otero AJ, Alvarez M, Marrero M, Laferté J, Rogés G. Design of a pattern curve for the measurement of IgG antibodies against human Cytomegalovirus in a single serum dilution by ultramicroELISA. *Biotecnología Aplicada.* 1993;10:200-3.
44. Ribas MA, Otero A, Alvarez M, Marrero M, Vázquez S. Design of a pattern curve for the measurement of IgG antibodies against human Herpes simple virus in a single serum dilution by ultramicroELISA. *Rev Cubana Med Trop.* 1994;44:32-6.
45. Laferté J, Savón C, Goyenechea A, Vázquez V, Otero A, Tejero Y, et al. Estimación del título de anticuerpos IgG a Adenovirus utilizando una curva patrón y un ensayo de ultramicroELISA indirecto. *Rev Cubana Med Trop.* 1996;48:102-8.
46. Steward MD. Overview: introduction to methods used to study the affinity and kinetics of antibody:antigen reactions. In: Weir MD, editor. *Handbook of Experimental Immunology.* Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1986. p. 1-30.
47. Richmond JFL, Lu S, Santoro JC, Weng J, Shiu-Lok Hu, Montefiori DC, et al. Studies of the neutralizing activity and avidity of anti-human immunodeficiency virus Type 1 Env antibody elicited by DNA priming and protein boosting. *J Virol.* 1998;72:9092-100.

48. William R, Usinger D, Lucas AH. Avidity as a determinant of the protective efficacy of human antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides. *Infect Immunol.* 1999;67:2366-70.
49. Gray BM, Shaw DR. Artifacts with the thiocyanate elution method for estimating relative antibody avidity. *J Immunol Methods.* 1993;157:269-71.
50. Steward MW, Stanley CM, Dimarchi R, Mulcahy G, Doel TR. High-affinity antibody induced by immunization with a synthetic peptide is associated with protection of cattle against foot-and-mouth disease. *Immunology.* 1991;72:99-103.
51. Binley JM, Arshad H, Fouts TR, Moore JP. An investigation of the high-avidity antibody response to glycoprotein 120 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS. Res Hum Retroviruses.* 1997;13:1007-15.
52. Girard M, van der Ryst E, Barré-Sinoussi F, Nara P, Tartaglia J, Paoletti E, et al. Challenge of chimpanzees immunized with a recombinant canarypox-HIV-1 virus. *Virology.* 1997;232:98-104.
53. Cole KS, Rowles JL, Jagerski BA, Murphey-Corb M, Unangst T, Clements JE, et al. Evolution of envelope-specific antibody responses in monkeys experimentally infected or immunized with simian immunodeficiency virus and its association with the development of protective immunity. *J Virol.* 1997;71:5069-79.
54. Hammond SA, Cook SJ, Lichtenstein DL, Issel CJ, Montelaro RC. Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process. *J Virol.* 1997;71:3840-52.
55. Moog C, Fleury HJA, Pellegrin I, Kirn A, Aubertin AM. Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol.* 1997;71:3734-41.
56. Ward KN, Dhaliwal W, Ashworth KL, Clutterbuck EJ, Teo CG. Measurement of antibody avidity for hepatitis C virus distinguishes primary antibody responses from passively acquired antibody. *J Med Virol.* 1994;43:367-72.
57. Broliden K, Hinkula J, Bratt G, Persson C, Otero AJ, Ekstrom A, et al. Analyses of functional antibody responses in HIV-1 infected individuals after vaccination with r-gp 160. *Clin Diag Virol.* 1996;6:115-26.
58. Broliden PA, Makitalo B, Akkerblom L, Rosen J, Broliden K, Utter G, et al. Identification of aminoacids in the V3 region of gp120 critical for virus neutralization by human HIV-1 specific antibodies. *Immunology.* 1991;73:371-6.

Recibido: 23 de octubre de 2009. Aprobado: 5 de mayo de 2010.
 Dr. C. *Anselmo J. Otero González*. Laboratorio de Inmunoanalítica 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