



ESCUELA TÉCNICO PROFESIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD
clínica mompía

TEMA 6: APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE RADIOINMUNOANÁLISIS (I)

JÉSICA SÁNCHEZ MAZÓN, Especialista en Radiofísica Hospitalaria

TÉCNICAS DE RADIOFARMACIA

IMAGEN PARA EL DIAGNÓSTICO Y MEDICINA NUCLEAR

ÍNDICE

1. Aplicación de técnicas de radioinmunoanálisis
2. Concepto y fundamentos teóricos de los inmunoanálisis
3. Fundamentos teóricos de los radioinmunoanálisis
4. Recepción, conservación y almacenamiento de muestras biológicas
5. Reactivos principales: anticuerpos, trazadores, calibradores y métodos de separación de las fracciones unida y libre

1. APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE RIA

1. APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE RIA

Dentro de los procedimientos inmunológicos, los más útiles y prácticos son aquellos que **se basan en la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ac)**.

Existen diversos métodos basados en procedimientos distintos para visualizar la unión Ag-Ac



RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

Combina la **especificidad de las reacciones inmunes** (reacción entre antígeno Ag y anticuerpo Ac) y la **sensibilidad de los métodos radioisotópicos**

Permite el análisis cuantitativo de sustancias biológicas que se encuentran en muy baja concentración en diversos fluidos biológicos

2. CONCEPTO Y FUNDAMENTO TEÓRICO DE LOS INMUNOANÁLISIS (IA)

2. CONCEPTO Y FUNDAMENTO TEÓRICO DEL IA

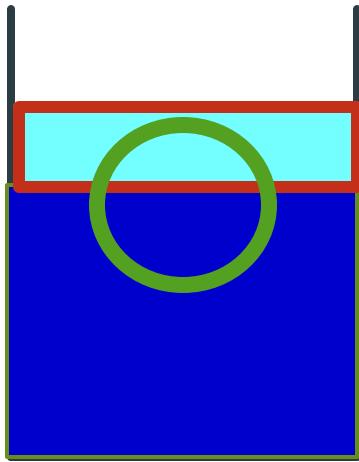
El radioinmunoanálisis (RIA) fue desarrollado de forma simultánea por Yalow y Berson en Estados Unidos y Ekins en Inglaterra a finales de los años 50 del pasado siglo XX.



2. CONCEPTO Y FUNDAMENTO TEÓRICO DEL IA

Ekins había desarrollado el concepto de
análisis de saturación

Reactivo



Sustancia problema
(Se combina de forma específica)

Sustancia problema sin reaccionar

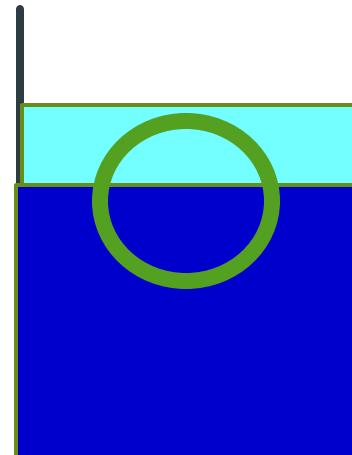
Retiramos una porción y **calculamos la proporción de ambas sustancias**
(combinada o libre)

2. CONCEPTO Y FUNDAMENTO TEÓRICO DEL IA

- Como **reactivo de unión específica** se pueden utilizar distintas sustancias: proteínas, **anticuerpos**, receptores citoplasmáticos, receptores de membrana celular, etc...
- Posteriormente a Ekins hubo una revolución en el desarrollo del RIA , cuya base común está en la **utilización de anticuerpos como reactivo específico.**

Reactivo → AC

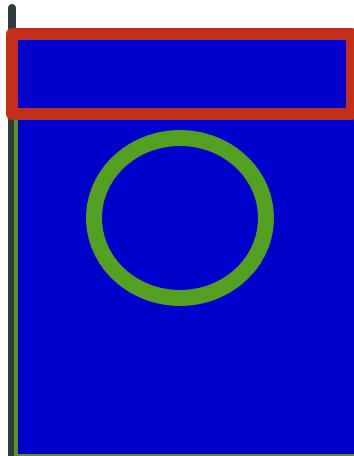
Sustancia problema → AG



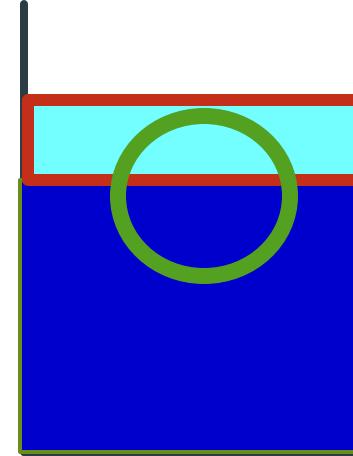
2. CONCEPTO Y FUNDAMENTO TEÓRICO DEL IA

Los inmunoanálisis pueden subdividirse en dos clases principales:

- **Tipo I:** se emplea un exceso de anticuerpo sobre el elemento analizado y **se marca el anticuerpo reactivo**.
- **Tipo II:** la cantidad de anticuerpo es menor que la del elemento analizado y **se marca la sustancia analizada** .



Tipo I



Tipo II

2. CONCEPTO Y FUNDAMENTO TEÓRICO DEL IA

Características de los ensayos tipo I y tipo II

TABLA 2

Ensayo tipo I	Ensayo tipo II
La sensibilidad máxima se alcanza cuando la cantidad de anticuerpo tiende al infinito	La sensibilidad máxima se alcanza cuando la concentración del anticuerpo tiende a cero
La sensibilidad teórica del método se corresponde a la de una molécula de la sustancia a determinar	La sensibilidad teórica máxima es dímero
Los antigenos de reacción cruzada serán equipotentes en un sistema con exceso de anticuerpo	El antigeno de reacción cruzada tiene una potencia relativa que depende de la tasa de constantes de equilibrio de la sustancia analizada y dicho antigeno
La reacción Ag-Ac está poco influida por sustancias ajenas (sales, urea, etc., presentes en la muestra y reactivos)	El análisis está regulado por la constante de equilibrio de la reacción entre la sustancia determinada, y el anticuerpo y la sensibilidad depende de la constante de afinidad del anticuerpo
El tiempo de análisis es relativamente rápido	La reacción analítica es lenta, ya que debe alcanzarse el equilibrio

Modificado de Ekins.

2. CONCEPTO Y FUNDAMENTO TEÓRICO DEL IA

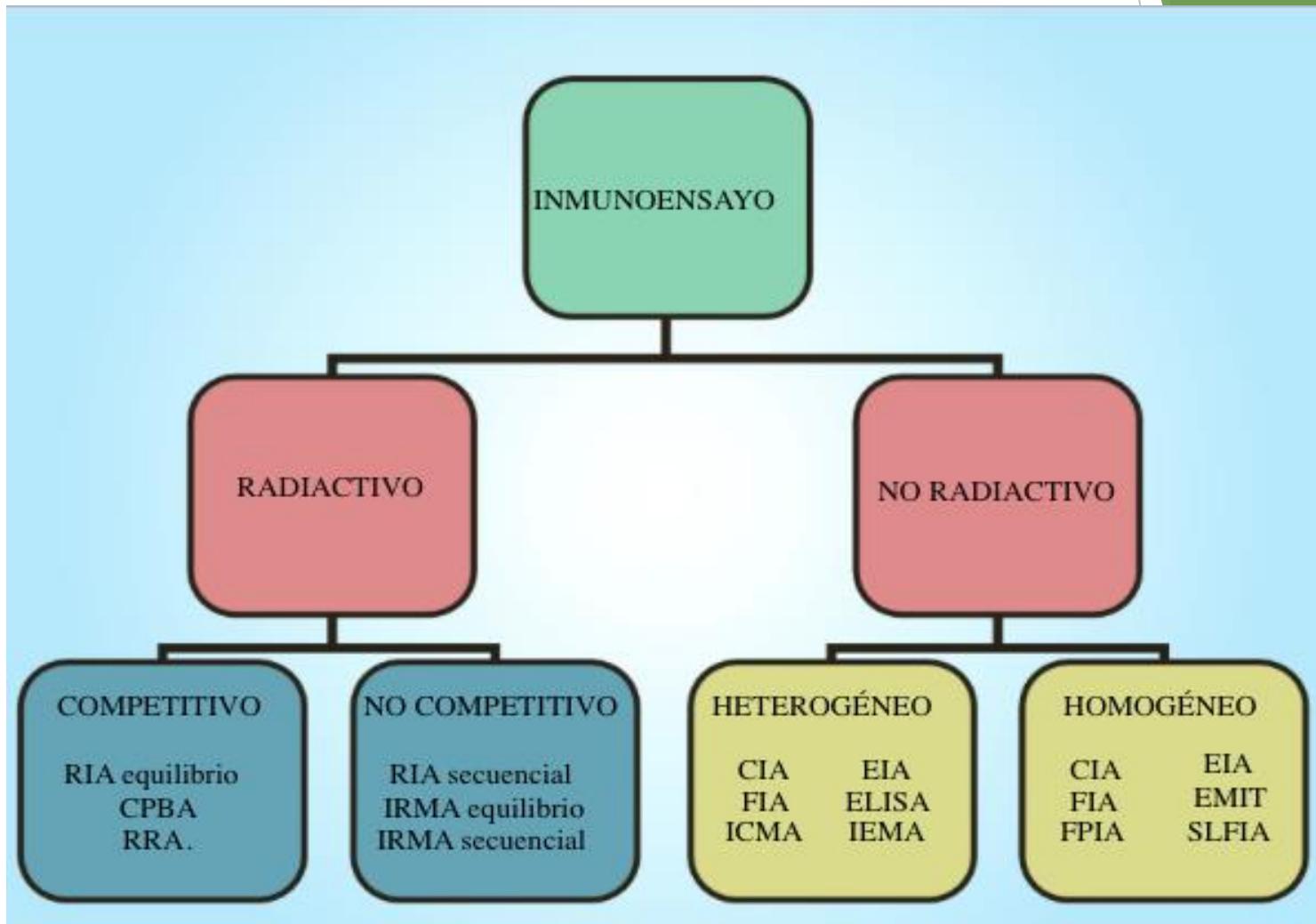
Los inmunoensayos pueden subdividirse en dos clases principales:

- **Homogéneos**: si el compuesto marcado se comporta de forma diferente según esté libre o ligado y, por tanto, **no es necesaria la separación física de las dos fracciones**.
- **Heterogéneos**: si es **necesaria la separación de fracciones**, al no comportarse de forma diferente.

Tipos de inmunoensayos			TABLA 3
	Homogéneo	Heterogéneo	
Isotópico (RIA)		RIA IRMA _e	
Enzimático (EIA)	EMIT	ELISA ^{nc} MEIA	
Fluorogénico (FIA)	FPIA SLFIA FETI	DELFIA ^{nc}	
Luminiscente (LIA)		SPALT ICMA _e	

2. CONCEPTO Y FUNDAMENTO TEÓRICO DEL IA

Métodos immunoanalíticos análogos al RIA, pero utilizando **marcadores enzimáticos**



3. CONCEPTO Y FUNDAMENTO TEÓRICO DE LOS RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LOS RIA

El principio en el que se basa el RIA:

LIGANDO NATIVO (L): una cantidad desconocida de sustancia, que en RIA se corresponde con la sustancia antigénica (Ag) presente en la muestra que hay que determinar.

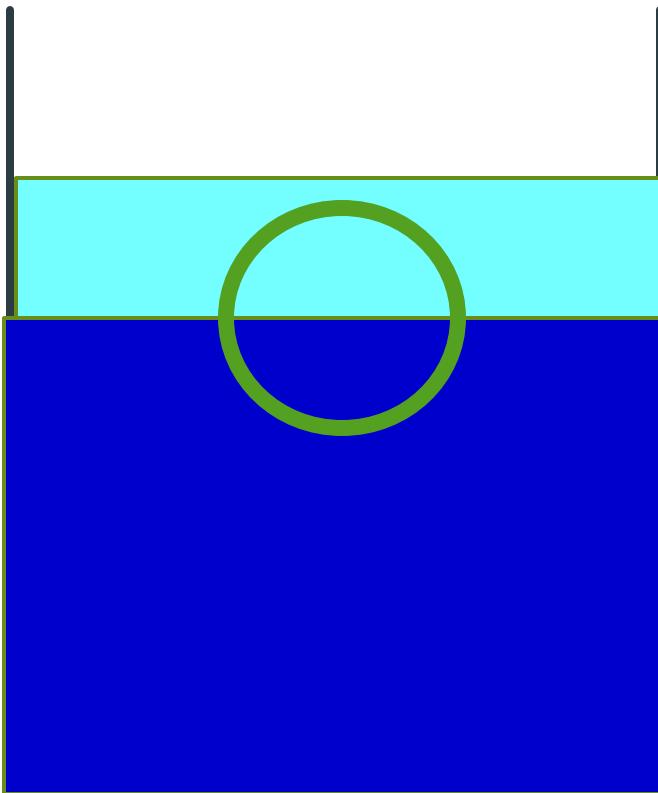
LIGANDO MARCADO (L*): cantidad conocida de la misma sustancia antigénica pero marcada con el radioisótopo

Vídeo

Compiten por una limitada cantidad de **anticuerpos específicos** (Ac) contra los antígenos

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LOS RIA

Reactivos → AC



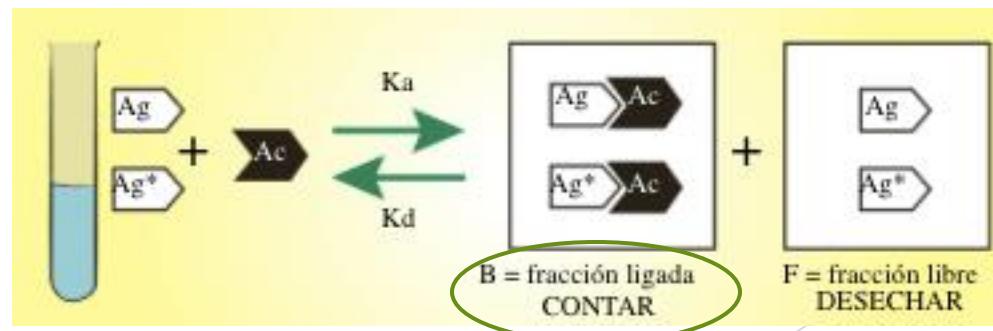
Sustancia problema → AG



3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LOS RIA

Después de una incubación, y de acuerdo con la ley de acción de masas, se establece el equilibrio entre las distintas fracciones:

- ligando nativo no marcado (L)
- ligando marcado (L^*),
- ligandos nativos unidos a anticuerpos (L-Ac)
- ligandos marcados unidos a anticuerpos (L^*-Ac)
- anticuerpos libres (Ac)



Se cuenta sólo una de las fracciones

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LOS RIA

- Después de separar los ligandos unidos (B) de los ligandos libres (F), se determina la relación existente entre ellos (B/F).
- La fracción de L*- Ac es tanto más pequeña cuanto más elevada sea la concentración de L que exista en la muestra.
- Se determina la cantidad desconocida de la sustancia problema por comparación con diferentes estándares (curva de calibración)

vídeo

4. RECEPCIÓN, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

4. RECEPCIÓN, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Todo proceso analítico se compone, en principio, **de tres fases**:

- (1) Toma de muestra,
- (2) Proceso analítico propiamente dicho
- (3) Comprobación de los resultados analíticos

(1) Toma de la muestra:

- Sirve para obtener **una muestra aleatoria** (cantidad parcial) que puede aceptarse como **representativa del espécimen**, que es el material líquido, sólido o gaseoso que se envía al laboratorio para su análisis
- Cada técnica analítica necesita que la **muestra reúna una serie de condiciones**
- Se debe conocer qué tipo de muestra (sangre completa, plasma, suero) es necesaria para una determinación dada, la cantidad y las condiciones de extracción y conservación

4. RECEPCIÓN, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

- En los análisis de RIA la toma de muestra será, habitualmente, la extracción de sangre, que se hará mediante **venopunción**
- La muestra, la mayor parte de las veces, debe ser de **suero o plasma**

Plasma: “sangre” a la que le hemos quitado las células sanguíneas

Suero: “sangre” a la que se le han quitado las células sanguíneas y el fibrinógeno, ya que se ha dejado coagular

4. RECEPCIÓN, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

¿Cómo se obtiene el plasma?

1. Extraer la sangre
2. Se añade un anticoagulante al tubo de recogida
3. Separar los dos componentes mediante centrifugación

¿Cómo se obtiene el suero?

1. Hay que dejar que la sangre extraída se coagule en el tubo de recogida
2. Se separan los dos componentes mediante centrifugación

Una vez separado el suero o el plasma, **debemos extraerlo mediante aspiración** para colocarlo en tubos de ensayo identificados para su análisis o conservación

4. RECEPCIÓN, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

¿Cómo conservamos el suero y plasma sanguíneos?

- **Hasta 24 horas**, sin que se presenten modificaciones significativas



4°C y con el recipiente cerrado.

- **Más de 24 horas**



Se deben congelar* (desarrollo bacteriano y la propia degradación de la muestra)

4. RECEPCIÓN, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

(2) Proceso analítico:

- Hay que descongelar las muestras para que estén en **estado líquido y a temperatura ambiente** en el momento de su utilización.
- Todo el material de examen que llega al laboratorio está **potencialmente infectado y constituye un foco de riesgo para el personal.**
- Como principal medida preventiva se recomienda la **máxima limpieza, el uso de guantes y la prohibición de comer y beber en el laboratorio.**

(3) Comprobación de los resultados analíticos

5. REACTIVOS PRINCIPALES: AC, TRAZADORES, CALIBRDORES Y MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES LIBRE Y UNIDA

5. REACTIVOS PRINCIPALES

Para la ejecución práctica de un RIA necesitamos una serie de **reactivos o componentes básicos**, aparte de la muestra:

- El trazador
- El anticuerpo
- Los estándares que constituyen la curva de calibración
- Los reactivos para efectuar la separación de la fracción libre de la unida

5.1 EL LIGANDO NATIVO

5.1 EL LIGANDO NATIVO

Hasta ahora, cuando nos hemos referido al ligando nativo lo hemos hecho en referencia a **la sustancia a determinar**

A partir de ahora:

- Sustancia que queremos determinar en la muestra (**Lm**)
+
- Patrones o estándares (**Lp**) que nos van a permitir construir la curva de calibración del ensayo

Los patrones o estándares (**Lp**) **son soluciones de concentraciones conocidas** frente a las que se van a comparar las muestras, sometiéndolos al mismo proceso que a éstas

5.2 EL LIGANDO MARCADO

5.2 EL LIGANDO MARCADO

- **RIA clásico** → sustancia similar a la que se quiere determinar, salvo que está marcada con un radioisótopo



TRAZADOR

El radioisótopo a utilizar para marcar este ligando se elige en función de diversos **factores**:

- Disponibilidad del antígeno en forma pura
- Fácil reproducibilidad del marcaje
- Estabilidad del marcaje

5.2 EL LIGANDO MARCADO

Marcadores radioisotópicos más utilizados:

- ^{125}I (para antígenos proteicos)
- ^3H (para antígenos no proteicos y sobre todo hormonas esteroideas)
- ^{57}Co para la determinación de la vitamina B12

5.2 EL LIGANDO MARCADO

^{125}I es el más usado por las siguientes características:

- Emisor gamma
- Buena eficiencia de conteo
- Largo periodo de semidesintegración (60 días)

¿Qué características ha de tener el ligando marcado?

- Gran pureza
- Alta actividad específica (Bq/g)

5.2 EL LIGANDO MARCADO

Una vez marcado el antígeno con el radionúclido:

1. Hemos de conocer la **cantidad de ligando marcado** que es necesaria para el ensayo de alta sensibilidad



Reducirla al mínimo

¿Cómo se hace? **Curvas de titulación**

2. Valorar la **inmunorreactividad del ligando marcado**



Degradación durante el marcaje **Aumenta la unión inespecífica**

Fracción de trazador que, en ausencia de anticuerpo en el sistema, se comporta de la misma manera que si estuviese ligado al anticuerpo.

5.3 EL ANTICUERPO

5.3 EL ANTICUERPO (AC)

(También llamado antisuero en RIA)

- Altamente específico
- Ser incapaz de discriminar entre el ligando nativo y el ligando marcado
- Alta afinidad de combinación → **Sensibilidad del ensayo**

¿Cómo se consigue?

- Producción muy **cuidadosa**.
- Estos anticuerpos pueden ser producidos *in vivo* o **in vitro**, siendo actualmente esta última la más empleada.



Técnica del hibridoma (Kohler y Milstein en 1975)

Obtención de AC monoclonales de gran especificidad a partir de células híbridas

5.3 EL ANTICUERPO (AC)

Los antisueros deben reunir unas características:

1. Título de anticuerpo
2. Afinidad del anticuerpo
3. Especificidad del anticuerpo



5.3 EL ANTICUERPO (AC)

1. **Título de anticuerpo**: es aquella dilución del anticuerpo que liga el 50 % del antígeno marcado (L^*) bajo unas condiciones determinadas.

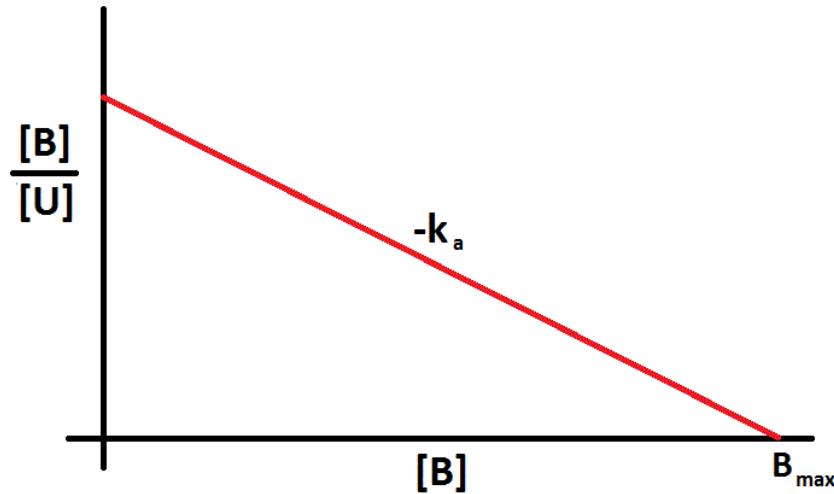
¿Cómo se calcula?

- Diluciones seriadas del anticuerpo
- Se incuba con una cantidad fija de antígeno marcado
- Se separan las fases libre (F) y unida (B)
- Se realiza el contaje para conocer aquella dilución que ligue entre el 30-50 % o bien presente un cociente B/F de 0,7-1,5.

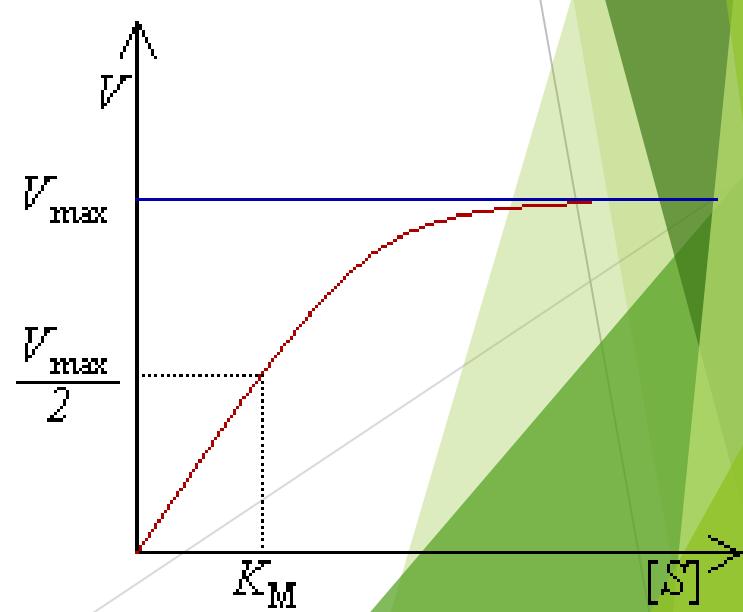
5.3 EL ANTICUERPO (AC)

2. Afinidad del anticuerpo: fuerza con la que el anticuerpo liga al antígeno y normalmente se expresa como constante de afinidad, (inversa de la concentración de antígeno que liga el 50 % del anticuerpo)
¿Cómo se mide?

Gráfica de Scatchard*



Hipérbola de Michaelis- Menten

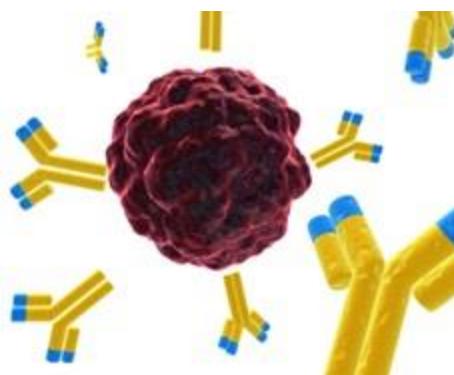


5.3 EL ANTICUERPO (AC)

3. Especificidad del anticuerpo: es la capacidad de un anticuerpo de distinguir entre varios antígenos de estructuras similares.

¿Cómo se calcula?

Estudios de **reacción cruzada** con otros antígenos de estructura química muy similar o parecida.



5.4 LOS MÉTODOS DE PARTICIÓN

5.4 LOS MÉTODOS DE PARTICIÓN

Una vez que se ha establecido la reacción entre el ligando nativo (L), el ligando marcado (L^*) y el anticuerpo (Ac) formando complejos



Las fases libres (F) y ligadas (B) deben ser separadas para contar su radiactividad.



PARTICIÓN

Se dispone de **múltiples métodos** para lograr la partición.

5.4 LOS MÉTODOS DE PARTICIÓN

El método ideal debe:

1. Conseguir una **completa separación** de la fracción ligada (B) y libre (F)
2. Que no se vea influenciado por las diversas sustancias presentes en la reacción
3. Que sea **reproducible, sencillo, barato y técnicamente rápido**
4. Que **no interfiera en la reacción Ag-Ac.**

Se basan en las diferentes propiedades fisicoquímicas existentes entre el antígeno y el complejo antígeno-anticuerpo

5.4 LOS MÉTODOS DE PARTICIÓN

Métodos más empleados:

1. Métodos de adsorción del antígeno libre
2. Métodos de precipitación inespecífica del complejo Ag-Ac
3. Métodos de precipitación específica del complejo Ag-Ac
4. Métodos de separación en fase sólida
5. Otros métodos

5.4 LOS MÉTODOS DE PARTICIÓN

1. Métodos de adsorción del antígeno libre:

Consiste en la **adsorción del antígeno libre en la superficie porosa de diversas sustancias.**

La separación de ambas fases se produce mediante una posterior **centrifugación y decantación**

2. Métodos de precipitación inespecífica del complejo Ag-Ac:

Concentraciones elevadas de sales inorgánicas atrapan las moléculas de agua de la solución, insolubilizando el complejo Ag-Ac y precipitando.

Como en el método anterior, la separación de ambas fases se produce mediante una posterior **centrifugación y decantación**

5.4 LOS MÉTODOS DE PARTICIÓN

3. Métodos de precipitación específica del complejo Ag-Ac:

Doble anticuerpo*

- El más usado en RIA
- **Adición de un segundo anticuerpo (Ac2)** dirigido contra el anticuerpo (Ac1)
- Se produce un complejo Ag*-Ac1-Ac2 que es insoluble y precipita.
- La separación de ambas fases se produce mediante una posterior **centrifugación y decantación**

Proteina A

- Utiliza una proteína adosada a la pared celular de la bacteria *Estafilococcus* y es capaz de reconocer moléculas de la matriz extracelular
- Capacidad de reconocimiento de anticuerpos
- Similar pero **más complejo**

5.4 LOS MÉTODOS DE PARTICIÓN

4. Métodos de separación en fase sólida:

El anticuerpo está adsorbido o ligado químicamente a una matriz sólida insoluble.

Los sistemas más empleados son:

- los tubos revestidos de anticuerpo (tubos coated)
- los anticuerpos adsorvidos a esferas o discos de plástico.

La separación física de las fracciones libre (F) y ligada (B) se hace mediante el **lavado de los tubos, las esferas o los discos**.

5.4 LOS MÉTODOS DE PARTICIÓN

5. Otros métodos:

Actualmente menos usados, la separación de la fracción unida y libre puede hacerse mediante

- Filtración en gel
- Electroforesis
- Gel de poliacrilamida
- Cromatografía...

En definitiva...

En la partición se separarán la fracción libre (F) de la unida (B) con objeto de poder “contar” una de ellas de forma individualizada.