

*SERVICIO DE MEDICINA NUCLEAR, HOSPITAL REGIONAL
"REINA SOFIA". CORDOBA

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA, HOSPITAL
REGIONAL "REINA SOFIA". CORDOBA

***DIPESA, MADRID

VALIDACION DE DOS RADIOINMUNOENSAYOS CLINICOS DE
HORMONAS TIROIDEAS (T_3 y T_4) PARA EL ANALISIS DE MUESTRAS
DE RATA.

Mallol, J.*, López F.** y Rodríguez, A.***

RESUMEN

Para emplear un método de radioinmunoensayo (RIA) en el análisis de muestras de diferente naturaleza de las muestras para las que fue desarrollado y validado, aunque haya identidad antigénica, es necesario validar nuevamente el método para comprobar la ausencia de interferencias analíticas.

Se han realizado pruebas de validación (paralelismo, recuperación, precipitación inespecífica) en dos métodos comerciales de RIA para la determinación clínica de hormonas tiroideas (T_3 y T_4) al aplicarlos al análisis de muestras de suero de rata.

El RIA de T_4 no muestra paralelismo entre las muestras analizadas y la curva patrón, y la recuperación alcanza valores de 147,5%. De ello deducimos que en el RIA de T_4 ensayado hay interferencias analíticas que no permiten la obtención de resultados válidos si se analizan muestras de suero de rata.

El RIA de T_3 ensayado cumple satisfactoriamente la prueba de paralelismo, la de recuperación, y la precipitación inespecífica es similar en las muestras de suero de rata y en la curva patrón. Por ello el RIA de T_3 ensayado es válido para el análisis de muestras de suero de rata.

SUMMARY

When a radioimmunoassay method is used to analyze samples of a type different than these for which it was developed, the method needs to be validated to assess the absence of analytical interferences even if antigenic identity exist.

We have performed validation tests (parallelism, recovery and non specific binding) when applying two commercial RIA methods for clinical determination of thyroid hormones (T_3 , T_4) to rat serum samples.

The T_4 shows lack of parallelism between the samples analyzed and the standard

curve, the recovery reaches values of 147,5%, so we infer the existence of analytical interferences in the RIA assayed wich precludes obtaining valid results when used to analyze rat serum samples.

The T_3 RIA assayed fullfills to satisfaction the parallelism test, the average recovery obtained is 95,7% and NSB in rat serum is similar to that of the standard curve, so we conclude this T_3 RIA is able for the sample analysis of rat serum

I. INTRODUCCION

El radioinmunoensayo (RIA) es una técnica analítica basada en la reacción antígeno-anticuerpo que permite la valoración de cantidades muy pequeñas de sustancias antigénicas. En estas técnicas la cuantificación se realiza por comparación del comportamiento de las muestras problema con el de las soluciones empleadas como patrón. Para que esta comparación sea posible es necesario que la reacción antígeno-anticuerpo tenga la misma cinética en las soluciones patrón y en las muestras problema, es decir, que además de haber identidad antigénica y realizar la reacción en las mismas condiciones de tiempo, temperatura, etc., es necesario que exista una gran similitud entre la naturaleza de las muestras problema y la de las soluciones patrón.

Un kit de RIA, al ser desarrollado, ha sido validado para el fin específico para el que fue diseñado y trabajando en las condiciones descritas en su protocolo. Si se introduce cualquier variación respecto a estas condiciones el método debe ser nuevamente validado para descartar la existencia de interferencias analíticas que puedan invalidar los resultados que se obtengan. Así, al determinar los niveles de hormonas tiroideas en muestras de suero de rata empleando un método de RIA desarrollado para el análisis clínico de estas hormonas en muestras de suero o plasma humano es necesario validar nuevamente el método para comprobar que el resultado analítico no está alterado por interferencias y artefactos analíticos (1).

Las pruebas de validación tienen por objeto el comprobar que el resultado obtenido en una determinación es correcto, o bien el detectar las posibles interferencias analíticas que puedan influir sobre el método falseando los resultados que se alcancen.

El objeto de este trabajo fue el comprobar la posibilidad de analizar muestras de suero de rata empleando unos métodos de RIA desarrollados para el análisis de hormonas tiroideas en suero humano.

II. MATERIAL Y METODOS

Se han validado dos métodos de RIA comerciales para la determinación clínica de hormonas tiroideas, tiroxina (T_4) y triyodotironina (T_3), de doble anticuerpo, en el análisis de muestras de suero de rata. Los métodos ensayados han sido Total T_3 Double Antibody y Total T_4 Double Antibody, de Diagnostic Products Corporation (DPC).

El protocolo de validación seguido incluye las pruebas de paralelismo, recuperación, y precipitación inespecífica (2).

La prueba de paralelismo se realiza analizando diferentes alícuotas de una serie de muestras de suero de rata, completando el volumen total con suero salino fisiológico. Así, en el RIA de T_4 se analizaron alícuotas de 12,5 y 25 μ l de cada muestra, y en el RIA de T_3 fueron de 50 y 100 μ l, con la curva patrón la fracción de radiactividad ligada en cada alícuota por el anticuerpo.

La recuperación se determinó analizando alícuotas de las mismas muestras a las que se habían añadido cantidades conocidas de la hormona a determinar, comprobando tras el análisis si el valor obtenido en la determinación coincide con el esperado tras la adición de la hormona a determinar.

La precipitación inespecífica (NSB) mide la fracción de trazador radiactivo que precipita en ausencia de anticuerpo por uniones inespecíficas del trazador a otras moléculas diferentes del anticuerpo. El NSB debe ser similar en la curva patrón y en las muestras problema para que ambas sean comparables. El NSB se determina, tanto en la curva patrón como en las muestras problema, incluyendo algunas alícuotas en las que se sustituye el anticuerpo por un volumen equivalente de una solución inerte, carente de ese anticuerpo.

Como comprobación del comportamiento del RIA de T_3 y la reproducibilidad de los resultados también se han determinado las concentraciones de T_3 en sueros de ratas normales e hipotiroideas tras tiroidectomía quirúrgica y radiológica (3). Las ratas utilizadas en estas experiencias fueron ejemplares de la raza Wistar.

III. RESULTADOS

A. Radioinmunoensayo de T_4

El paralelismo obtenido en el RIA de T_4 con muestras de suero de rata no es satisfactorio. La Figura 1 representa los resultados obtenidos en esta prueba, en la que se representa el desplazamiento del trazador radiactivo en las muestras problema y en la curva patrón.

Los resultados de la prueba de recuperación están recogidos en la Tabla I.

Con el RIA de T_4 no se ha realizado la determinación de la precipitación inespecífica (NSB), ni se ha determinado el valor de esta hormona en sueros de ratas normales y tiroidectomizadas.

TABLA I

Resultados de la prueba de recuperación en los RIA de T_3 y T_4 ensayados. Se indica la fracción de hormona recuperada respecto a la añadida, expresando el valor medio y el error estándar.

RIA	% recuperado (M \pm S.E.)	rango
T_3	95,7 \pm 3,5	88,5 - 105,3
T_4	114,8 \pm 11,9	94,5 - 147,5

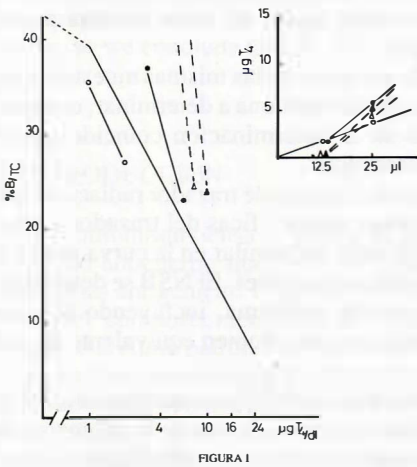


FIGURA I
Prueba de paralelismo entre la curva patrón del RIA de T_4 y las curvas obtenidas con alícuotas de suero de rata de diferente volumen (12,5 y 25 μ l). La figura superior muestra la falta de proporcionalidad entre la cantidad de hormona determinada y el volumen de la alícuota analizada.

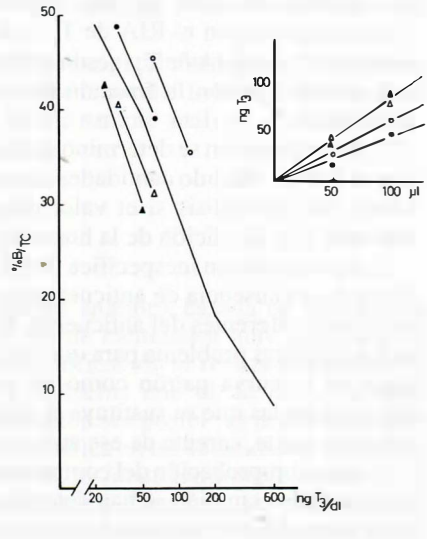


FIGURA II
Representación del paralelismo obtenido entre la curva patrón del RIA de T_3 y las muestras de suero de rata analizadas en alícuotas de dos volúmenes (50 y 100 μ l).

B. Radioinmunoensayo de T_3

El paralelismo encontrado en el RIA de T_3 con muestras de suero de rata es correcto. Los resultados de esta prueba son los representados en la Figura 2.

La Tabla I muestra los resultados obtenidos en la prueba de recuperación.

En la comprobación del NSB, en las muestras de suero de rata se encontró una precipitación inespecífica del $2,2 \pm 0,1$ % de la actividad total ($M \pm S.E.$), mientras que en la curva patrón el NSB fue de $1,9 \pm 0,2$ % de la actividad total.

La Tabla II muestra los resultados obtenidos al determinar los niveles de T_3 en sueros de ratas normales y tiroidectomizadas.

TABLA II

Valores de T_3 en sueros de ratas normales e hipotiroideas tras tiroidectomía. Se expresa el número de datos, el valor medio y el error estandar de cada grupo. La diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

ratas	n	T_3 (ng/dl)
controles	8	$89,4 \pm 2,0$
hipotiroides	6	$34,9 \pm 0,9$

IV. DISCUSION

Por los resultados obtenidos se deducen la existencia de fuertes interferencias analíticas en el RIA de T_4 al analizar muestras de suero de rata. Estas interferencias se ponen de manifiesto en la ausencia de paralelismo, señal de que la reacción antígeno-anticuerpo no se realiza con la misma cinética en la curva patrón y en las muestras problema. Por esta falta de paralelismo la concentración que se determine dependerá del volumen de la alícuota que se analice.

También la prueba de recuperación indica interferencias analíticas, ya que aparentemente se recupera más hormona de la que se añade a las muestras.

Estas interferencias analíticas invalidan el método para el análisis de sueros de rata, a pesar de la identidad antigenica que existe, ya que la T_4 tiene la misma estructura en el hombre y en la rata.

El RIA de T_3 , sin embargo, cumple satisfactoriamente las pruebas de validación realizadas: el paralelismo obtenido entre la curva patrón del RIA y las muestras problemas es correcto; la recuperación es próxima al 100 %, la precipitación inespecífica es similar en la curva patrón y en las muestras problema, etc.

Los resultados obtenidos con el RIA de T_3 al analizar muestras de suero de rata hipotiroidea tras su tiroidectomía quirúrgica, y ratas normales como controles, coinciden con los valores esperados en estos animales. La obtención de resultados coincidentes con los esperados también puede considerarse como una prueba de validación del método.

Las interferencias observadas en el RIA de T_4 al analizar las muestras de suero de rata pueden ser explicadas por la acción de las proteínas transportadoras. La T_4 circula unida a proteínas sericas, y esas proteínas, aún siendo similares en el suero humano y el de rata, tienen diferente capacidad y afinidad por la T_4 , de forma que el suero de rata y el humano no son equivalentes por la presencia de estas proteínas, siendo capaces de interferir en la reacción entre la T_4 y su anticuerpo. El hecho de que las mismas proteínas no induzcan interferencias en el RIA de T_3 se debe a que la T_3 se une a ellas con una afinidad mucho menor que la T_4 , por lo que no interfieren en la reacción entre la T_3 y su anticuerpo (4).

En conclusión, y basándonos en los resultados expuestos, estimamos que el método de RIA validado para la valoración de T_3 en suero de rata permite la obtención de resultados fiables, mientras que el método probado por la determinación de T_4 está sujeto a interferencias analíticas que impiden la obtención de resultados fiables.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el Hospital Regional "Reina Sofía" de Córdoba con el apoyo de su Comisión de Investigación.

Agradecemos a A. Martín la ayuda prestada en la realización de las determinaciones analíticas.

BIBLIOGRAFIA

- (1) MALLOL, J.; OBREGON, M.J. y MORREALE, G.: "Analytical artifacts in radioimmunoassay (RIA) of L-thyroxine in human milk". *Clin. Chem.*, 28: 1.277-1.285 (1982).
- (2) MALLOL, J.; LATRE, J.M.; MONTERO, A.; JIMENEZ, A.; CABALLERO, E.; GOMEZ, J. M. y VELASCO, T.: "Validación de un RIA para la monitorización de ciclosporina (CyA)". XIII Congreso Nacional de Medicina Nuclear. Murcia. *Rev. Esp. Med. Nucl.*, 6, Sup. 2: 42 (1987).
- (3) OBREGON, M. J.; MALLOL, J.; ESCOBAR DEL REY, F. y MORREALE, G.: "Presence of L-thyroxine and 3,5, 3'triiodothyronine in tissues from thyroidectomized rats". *Endocrinology*, 109: 908-913 (1981).
- (4) ROBBINS, J. y BARTALENA, L.: "Plasma transport of thyroid hormones", en *Thyroid Hormone Metabolism*, G. Hennemann, ed., pag. 3-38. Marcel Dekker Inc., New York (1986).