

J. MALLOL

Especialista en Radiofarmacia
Academia Iberoamericana de Farmacia

MANUAL DE RADIOFARMACIA



© J. Mallol, 2008

Reservados todos los derechos.

«No está permitida la reproducción total o parcial de este libro, ni su tratamiento informático, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, por fotocopia, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito de los titulares del Copyright.»

Ediciones Díaz de Santos

E-mail: ediciones@diazdesantos.es

Internet://<http://www.diazdesantos.es>

ISBN: 978-84-7978-854-4

Depósito legal: M. 5.797-2008

Diseño de cubierta: Ángel Calvete

Fotocomposición e impresión: Fernández Ciudad

Encuadernación: Rústica - Hilo

Impreso en España

Índice

Prefacio	XVII
Prólogo	XXI
1. Generalidades	1
1.1. Productos radiofarmacéuticos y radiofármacos	1
1.2. Utilización clínica de los radiofármacos	2
1.2.1. Exploraciones diagnósticas por la imagen	2
1.2.2. Exploraciones diagnósticas sin imagen	3
1.2.3. Radioterapia metabólica	4
1.3. Características de los radiofármacos	4
1.3.1. Inercia metabólica	5
1.3.2. Afinidad por el órgano diana	5
1.3.3. Vida media efectiva corta	6
1.3.4. Disponibilidad	6
1.3.5. Emisión radiactiva adecuada	7
1.4. Mecanismos de acción de los radiofármacos	8
1.4.1. Fagocitosis y bloqueo capilar	8
1.4.2. Secuestro celular	9

1.4.3. Cambio iónico	9
1.4.4. Simple difusión	9
1.4.5. Integración bioquímica o farmacológica	10
1.4.6. Analogía estructural	10
1.4.7. Proceso activo	10
1.5. Conservación y degradación de radiofármacos	11
Bibliografía	12
2. Producción de radionúclidos. Generadores	13
2.1. Introducción	13
2.2. Producción de radionúclidos en reactor nuclear	13
2.2.1. Activación neutrónica	14
2.2.2. Reacción de fisión	15
2.3. Ciclotrón	15
2.4. Dianas	16
2.5. Fundamentos del generador de radionúclidos	17
2.6. Generadores de radionúclidos	18
2.6.1. Generador de $^{113}\text{Sn}/^{113\text{m}}\text{In}$	18
2.6.2. Generador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$	19
2.6.3. Generador de $^{87}\text{Y}/^{87\text{m}}\text{Sr}$	19
2.7. Generadores utilizados en radiofarmacia	20
2.7.1. Generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	20
2.7.2. Generador de $^{81}\text{Rb}/^{81\text{m}}\text{Kr}$	24
2.8. Control de calidad del generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	24
2.8.1. Control físico-químico	25
2.8.2. Aspectos radiológicos	26
2.8.3. Control biológico	29
Bibliografía	31
3. Síntesis de moléculas marcadas	33
3.1. Trazadores radiactivos de uso <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	33

3.2. Técnicas de marcaje	34
3.2.1. Síntesis <i>in vitro</i>	34
3.2.2. Síntesis <i>in vivo</i>	35
3.3. Degradación y conservación de trazadores	35
3.4. Marcaje de moléculas con radioyodo	37
3.4.1. Isótopos de radioyodo utilizados	37
3.4.2. Reacciones de marcaje con radioyodo	38
3.5. Métodos de purificación tras el marcaje	40
3.6. Degradación y conservación de trazadores radioyoda- dos	41
3.7. Marcaje de moléculas con tecnecio. Propiedades gene- rales del ^{99m}Tc	41
3.7.1. Características físicas	42
3.7.2. Disponibilidad	42
3.7.3. Flexibilidad	42
3.8. Preparación de radiofármacos tecneciados	43
3.8.1. Indicaciones generales para el marcaje con tec- necio [^{99m}Tc]	44
3.8.2. Equipos reactivos	45
3.8.3. Pertecneciato [^{99m}Tc] de sodio	47
3.8.4. Incubación	48
3.8.5. Reacción de marcaje	48
3.8.6. Control de calidad	49
3.8.7. Dispensación	51
3.9. Marcaje con indio [^{111}In]	51
Bibliografía	52
4. Control de calidad de radiofármacos	53
4.1. Formas farmacéuticas	53
4.2. Controles físico-químicos	54
4.2.1. Estado físico del radiofármaco	54

4.2.2. Tamaño y número de partículas	54
4.2.3. pH	56
4.2.4. Tonicidad de las preparaciones inyectables	57
4.3. Controles radiológicos	57
4.3.1. Concentración radiactiva	57
4.3.2. Pureza radionucleídica	58
4.3.3. Pureza radioquímica	59
4.3.4. Actividad específica	63
4.4. Controles biológicos	64
4.4.1. Esterilidad	64
4.4.2. Apirogenicidad	65
4.4.3. Toxicidad	66
4.4.4. Ensayo de biodistribución	67
4.5. Controles industriales y hospitalarios	67
4.6. Pureza radioquímica de radiofármacos tecneciados ...	68
4.7. Reacciones adversas a los radiofármacos	72
4.8. Interacciones de radiofármacos con otros medicamen- tos	73
4.9. Contraindicaciones y precauciones especiales en el uso de radiofármacos	75
4.10. Diseño de un nuevo radiofármaco	78
4.10.1. Biodistribución	79
4.10.2. Mecanismo de acción	79
4.10.3. Vida media efectiva	79
4.10.4. Toxicidad	79
Bibliografía	81
5. Monografías de algunos radiofármacos	83
5.1. Radiofármacos yodados	84
5.1.1. Yoduro sódico [¹³¹ I, ¹²⁵ I, ¹²³ I]	84
5.1.2. Albúmina sérica yodada (SARI)	91

5.1.3.	Orto yodohipurato sódico [^{123}I , ^{131}I]	93
5.1.4.	Iobengano o metayodo bencil guanidin (MIBG- ^{123}I , MIBG- ^{131}I)	96
5.1.5.	Noryodocolesterol [^{131}I]	99
5.1.6.	Fibrinógeno [^{125}I]	101
5.2.	Radiofármacos tecneciados	103
5.2.1.	Pertecneciato ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$)	104
5.2.2.	Albúmina sérica humana (HSA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$)	107
5.2.3.	Radiofármacos particulados de albúmina: ma- croagregados y microesferas de albúmina (MAA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y MEA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$)	108
5.2.4.	Succímero de tecnecio (DMSA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$)	114
5.2.5.	Radiofármacos particulados: coloides y micro- coloides tecneciados	116
5.2.6.	Derivados del ácido iminodiacético (IDA) ...	121
5.2.7.	Pentetato de tecnecio (DTPA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$)	123
5.2.8.	Poliolios de tecnecio (Gluconato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, Glu- ceptato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$)	126
5.2.9.	Derivados del ácido fosfórico	127
5.2.10.	Otros radiofármacos tecneciados	131
5.3.	Radiofármacos de selenio [^{75}Se]	142
5.3.1.	Selenio [^{75}Se] norcolesterol	143
5.3.2.	Ácido [^{75}Se] tauroselcólico (SeHCAT)	145
5.4.	Radiofármacos de indio [^{111}In]	146
5.4.1.	Pentetato de indio [^{111}In]	147
5.4.2.	Penteteotrida de indio [^{111}In] (Octreoscan®) ...	148
5.4.3.	Cloruro de indio [^{111}In]	150
5.4.4.	Oxinato de indio (^{111}In -oxina)	151
5.5.	Otros radiofármacos de uso diagnóstico	152
5.5.1.	Citrato de Galio [^{67}Ga]	152
5.5.2.	Cloruro de Talio [^{201}Tl]	154
5.5.3.	Cápsulas de cianocobalamina [$^{58}\text{Co}/^{57}\text{Co}$ -jugo gástrico]	156

5.5.4. Radiofármacos derivados de cromo [⁵¹ Cr]	157
5.5.5. Gases radiactivos	159
5.5.6. Anticuerpos monoclonales	161
5.5.7. Células sanguíneas marcadas	161
5.5.8. Radiofármacos emisores de positrones	165
5.6. Radiofármacos de uso terapéutico	169
5.6.1. Fosfato [³² P] de sodio	169
5.6.2. Radiofármacos analgésicos	170
5.6.3. Radiofármacos de tratamiento articular	173
5.6.4. Radiofármacos para inmunorradioterapia	175
Bibliografía	176
6. Utilización clínica de los radiofármacos	177
6.1. Exploraciones gammagráficas	177
6.1.1. Exploraciones gammagráficas: generalidades .	177
6.1.2. Instrumentación en las exploraciones gamma- gráficas	178
6.1.3. Exploraciones de hígado y bazo	181
6.1.4. Exploraciones del sistema urinario	184
6.1.5. Exploraciones del sistema cardiovascular	186
6.1.6. Exploraciones pulmonares	188
6.1.7. Exploraciones tiroideas	191
6.1.8. Exploraciones óseas y de médula ósea	192
6.1.9. Exploraciones de procesos inflamatorios y tu- morales	195
6.1.10. Exploraciones del aparato digestivo	195
6.1.11. Glándulas adrenales	197
6.1.12. Exploraciones cerebrales	197
6.1.13. Otras exploraciones	198
6.2. Exploraciones no gammagráficas con radiofármacos	199
6.2.1. Introducción	199
6.2.2. Captación y descarga tiroidea	200

6.2.3. Absorción de vitamina B ₁₂ (Test de Schilling)	201
6.2.4. Rinorrea y otorrea	202
6.2.5. Renograma	203
6.2.6. Hematología nuclear	203
6.2.7. Ferrocínética	206
6.2.8. Absorción intestinal de calcio	206
6.3. Radioterapia metabólica por radiofármacos	207
6.3.1. Generalidades	207
6.3.2. Tratamiento de patologías tiroideas	209
6.3.3. Tratamiento de policitemia vera y leucemia ...	211
6.3.4. Tratamiento intraarticular e intracavitario	211
6.3.5. Tratamiento paliativo del dolor en metástasis óseas	212
6.3.6. Tratamiento de tumores adrenérgicos	213
6.3.7. Tratamiento del hepatocarcinoma	214
6.3.8. Inmunorradioterapia	214
Bibliografía	215
7. Técnicas analíticas radioinmunológicas	217
7.1. Radioinmunoensayo (RIA): definición y concepto	217
7.2. Elementos del RIA	218
7.2.1. Antígeno «frío»	218
7.2.2. Anticuerpo	219
7.2.3. Trazador radiactivo	221
7.2.4. Métodos de separación	223
7.3. Análisis inmunorradiométrico (IRMA)	225
7.4. Realización del radioinmunoensayo	226
7.5. Contaje de la radiactividad	230
7.6. Cálculo y representación del RIA	231
7.7. Pruebas de validación del RIA	232
7.7.1. Paralelismo	232

7.7.2. Recuperación	234
7.7.3. Correlación	234
7.8. Parámetros de control de calidad en el RIA	235
Bibliografía	236
8. Aspectos legales de los radiofármacos	237
8.1. Evolución histórica de los radiofármacos	237
8.2. Los radiofármacos como medicamentos	239
8.3. Registro de medicamentos radiofarmacéuticos	241
8.4. Aspectos legales de los medicamentos radiofarmacéuticos	243
8.4.1. Producción industrial	243
8.4.2. Ensayos clínicos	244
8.4.3. Registro sanitario	245
8.4.4. Distribución	246
8.4.5. Farmacopea	247
8.4.6. Farmacovigilancia	248
8.4.7. Radiofarmacia hospitalaria	249
8.4.8. Otros aspectos	250
8.4.9. Disposiciones sobre sustancias radiactivas	250
8.5. Normas de buena práctica radiofarmacéutica (BPR) a nivel hospitalario	252
8.5.1. Personal	253
8.5.2. Locales y equipos	254
8.5.3. Preparación de radiofármacos	255
8.5.4. Control de calidad	257
8.5.5. Documentación	258
8.6. Principales normas legales que regulan los medicamentos radiofarmacéuticos y las sustancias radiactivas	259
8.6.1. Directivas y reglamentos comunitarios	260
8.6.2. Leyes generales	262

8.6.3. Reales decretos	262
Bibliografía	263
9. Apéndices	265
A.1. Definiciones y unidades radiológicas	265
A.2. Conversión de unidades de actividad del sistema internacional (SI) al sistema clásico y viceversa	267
A.3. Monografías de la real farmacopea española de preparaciones radiofarmacéuticas (2002)	268
A.4. Características físicas de los radionúclidos empleados en radiofarmacia	270
A.5. Glosario de términos farmacéuticos y definiciones ...	271
Índice analítico	275

Prefacio

Mucho ha avanzado la Radiofarmacia desde que en 1989 se publicó mi primer libro sobre esta disciplina. En aquel tiempo su situación era muy dispar en Europa ya que había países en los que los productos radiofarmacéuticos no tenían consideración de medicamentos, y la formación en Radiofarmacia como disciplina era igualmente dispar.

Desde entonces la situación ha cambiado. Una Directiva comunitaria, la Directiva 89/343/CEE, vino a extender el carácter de medicamento a los productos radiofarmacéuticos en todos los países, y en una reunión celebrada en Rotterdam en abril del mismo año, organizada por el European Committee on Radiopharmaceuticals de la EANM y el Consejo de Europa, se establecieron los criterios mínimos para la formación en Radiofarmacia.

En España la Ley 25/1990, del Medicamento, recogió a los radiofármacos en su articulado reconociéndolos como medicamentos, y quedaron desde entonces en el ámbito de aplicación de los Reales Decretos adoptados en el desarrollo de la citada Ley: laboratorios farmacéuticos, distribución, ensayos clínicos, etc. En consecuencia, las firmas dedicadas a la distribución de productos radiofarmacéuticos debieron transformarse en laboratorios farma-

céuticos, y los productos debieron solicitar su autorización como medicamentos para poder ser comercializados en España, al igual que en los demás países de la Unión Europea.

Por otra parte, la formación especializada en Radiofarmacia comenzó en 1993 al ofertarse las primeras plazas para esta especialización, que aunque estaba reconocida desde 1982, no había tenido desarrollo oficial. Desde entonces Radiofarmacia se ha consolidado plenamente, pasando de ser una especialización de formación básicamente no hospitalaria a ser de formación básicamente hospitalaria, al igual que Farmacia Hospitalaria, Análisis Clínicos, Bioquímica Clínica, y Microbiología y Parasitología.

La Radiofarmacia también ha penetrado en la docencia universitaria a nivel de Licenciatura, y actualmente son varias las Facultades de Farmacia que la incluyen específicamente como asignatura. Situación similar se da en los países iberoamericanos, en los que la Radiofarmacia se oferta en numerosas universidades y es una actividad plenamente consolidada.

Actualmente, la reciente Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, ha supuesto el espaldarazo de la Radiofarmacia al establecer que toda la preparación extemporánea de radiofármacos, el fraccionamiento de los mismos en dosis unitarias, o la preparación no industrial de radiofármacos PET, solo puede realizarse en una Unidad de Radiofarmacia autorizada, y bajo la responsabilidad de un facultativo especialista en Radiofarmacia.

Los cambios acaecidos desde 1989 en torno a los radiofármacos y a la Radiofarmacia no siempre han sido fáciles, y se han encontrado resistencias en numerosas ocasiones. Pero el devenir de la Historia es difícil de soslayar, y la situación de los radiofármacos y de la Radiofarmacia en España tiende a normalizarse con la de los demás países de nuestro entorno, como pretendía la Directiva 89/343/CEE antes mencionada.

Este libro va dirigido fundamentalmente a los estudiantes y a los residentes de Radiofarmacia, e intenta aportar una visión

general de la disciplina y de su aplicación práctica. Por ello no se incluye una bibliografía detallada, normalmente fuera del alcance de los estudiantes, sino que en cada capítulo se incluye una relación de lecturas complementarias, normalmente basadas en libros más asequibles a través de las bibliotecas de los centros universitarios y hospitalarios, que orientarán al que desee profundizar más en un tema puntual.

Aunque los datos que se citan en el libro, especialmente en los capítulos dedicados a la descripción monográfica de los radiofármacos y a su utilización clínica, se basan en las monografías de Farmacopea y en la Ficha Técnica aprobada de cada uno de los productos radiofarmacéuticos, esta obra solo tiene carácter docente. El empleo de radiofármacos tiene que ceñirse a los datos consignados en la monografía vigente de la Farmacopea, y en la Ficha Técnica autorizada en cada momento.

Quizá sorprenda que las actividades se siguen expresando en los dos sistemas de unidades, en bequerelios y en curios, al igual que en las monografías de la USP. Esto se debe a que las unidades tradicionales, el curio y sus submúltiplos, se siguen utilizando profusamente, aunque las unidades oficiales en la actualidad son el bequerelio y sus múltiplos.

Quiero agradecer a mi compañera Isabel Freile, médico especialista en Medicina Nuclear, la ayuda prestada en la supervisión la parte clínica de esta obra para dar la información necesaria al público a quien va dirigida, los estudiantes y residentes de Radiofarmacia. Igualmente quiero agradecer a Rafael Quesada y a Adolfo García su colaboración en la preparación de las ilustraciones.

Si el libro que aparece ahora contribuye de alguna forma a la expansión de la Radiofarmacia como disciplina sanitaria, y facilita la formación de profesionales y especialistas, me podrá dar por satisfecho.

Dr. J. MALLOL

Prólogo

Me parece importante, para resaltar la necesidad de esta publicación, iniciar este prólogo con la cita de Bárbara Tuchman: «Sin libros, la historia calla, la literatura enmudece, la ciencia se paraliza,...». Gracias a este libro seguro que se va a evitar que la ciencia de la Radiofarmacia se paralice en los países de habla hispana. Sin ningún género de dudas, era necesario actualizar los conocimientos existentes sobre Radiofarmacia, debido no sólo al extraordinario avance en esta ciencia, sino también por la necesidad de textos para la formación de especialistas.

Se ha escrito mucho sobre Radiofarmacia y su importancia, desde que se creó dicha especialidad en nuestro país, pero hemos encontrado un déficit de textos en español sobre esta materia. En consecuencia, era necesario tener una obra de categoría en nuestro idioma.

Este libro constituye una actualizada recopilación tanto de los radiofármacos actualmente conocidos como de su aplicación clínica.

Me parece muy adecuada la sistematización de la obra. Se inicia con un primer capítulo relativo a consideraciones gene-

rales sobre productos radiofarmacéuticos y radiofármacos; continúa con su utilización clínica tanto en exploraciones diagnósticas por imagen, como en las exploraciones diagnósticas sin imagen y en radioterapia metabólica. Se consideran las propiedades y características de los radiofármacos, el mecanismo de acción de los mismos así como su conservación y degradación. Según mi modesto entender uno de los capítulos más interesantes se corresponde con las monografías relativas a los principales radiofármacos conocidos. Muy interesante también, la utilización clínica de los radiofármacos, las técnicas analíticas y los aspectos legales, de enorme actualidad, pues en numerosas ocasiones se nos escapan estos datos, con la necesidad de que existan este tipo de manuales a los que podamos acudir. Parece oportuno la existencia de un capítulo sobre técnicas analíticas radioinmunológicas, aun cuando, según mi entender, estas técnicas han perdido importancia al existir metodología igualmente específica, pero de menor riesgo y a coste inferior. Finaliza con un complemento de apéndices enormemente útiles.

Para poder llegar a adquirir iniciativa científica es necesario poseer una adecuada formación de base; aspectos y objetivos sobradamente conseguidos en este libro. Es importante resaltar la actualización existente sobre estas materias, valor añadido para este libro, y que no solo es útil para el estudiante sino para el especialista en Radiofarmacia. En este sentido, sirve como manual que recoge la información existente hasta el momento. Es posible que hubiera sido mejor una aportación de contenido en bibliografía más específica y extensa, por citar un ejemplo, en los ensayos de apirogenicidad, donde se recomienda la técnica del LAL, remitiéndonos a la Farmacopea Europea. Esto no implica que estas referencias bibliográficas deban de ser exhaustivas, pues sabemos la dificultad para lograrlo.

Cuando un autor se embarca en la noble misión de escribir un libro, la primera pregunta que se le ocurre es conocer cual es la contribución, qué se pretende conseguir con ese manual y su aportación, en este caso dentro del campo sanitario, para a con-

tinuación analizar si se consiguen los objetivos previstos. A mi entender, estos se consiguen plenamente; de cualquier forma existen especialistas en esta materia, quienes a la larga dictaminarán sobre el valor y utilidad de esta obra.

Unas breves palabras para agradecer a nuestro académico Jesús Mallol el enorme esfuerzo realizado por contribuir a que los que nos expresamos en español podamos disponer de tan magnífica publicación, al tiempo que comentarle que debe sentirse feliz, pues el manual contribuye de forma precisa al conocimiento de la Radiofarmacia como disciplina sanitaria y estoy seguro de que va a contribuir de forma eficaz en la formación de los futuros profesionales y especialistas de tan importante materia.

Profesor A. RAMOS CORMENZANA
Presidente de la Academia Iberoamericana de Farmacia

Órgano	Dosis absorbidas (mGy/MBq)
Vejiga	0,065
Riñones	0,0044
Hígado	0,0013
Ovarios	0,0043
Testículos	0,0028
Dosis efectiva equivalente (mSv/MBq)	0,0063

5.2.8. Polioles de tecnecio (Gluconato-^{99m}Tc, Gluceptato-^{99m}Tc)

Son dos radiofármacos muy similares que, tras el marcaje con ^{99m}Tc, pueden emplearse en exploraciones de morfología y función renal. El gluconato de tecnecio está descrito en una monografía específica de la Farmacopea Europea; el gluceptato de tecnecio tiene monografía en la USP 29.

El gluconato se marca fácilmente con tecnecio. La pureza radioquímica se controla por cromatografía en capa fina de sílicagel y metil-etil-cetona (ITLC-SG/MEK); el radiofármaco permanece en el origen. El pH del medicamento está comprendido entre 4 y 8.

Las actividades a administrar para la realización de exploraciones renales son de 74 a 370 MBq (2 a 10 mCi) por vía endovenosa. También, como indicación secundaria, pueden emplearse estos radiofármacos en exploraciones cerebrales (imagen cerebral, angiografía cerebral) en dosis de 370 a 740 MBq (10 a 20 mCi). Las dosis pediátricas se ajustan por el peso o la superficie corporal.

Aunque de escasa frecuencia, hay descritos casos de reacciones adversas de tipo alérgico; las manifestaciones incluyen disnea, enrojecimiento, urticaria, taquicardia e hipotensión, etc.

Tras la administración endovenosa el 50% de la dosis inyectada se encuentra unida a proteínas. La fracción libre es eliminada por filtración glomerular, mientras que la fracción unida a proteínas se elimina lentamente por secreción tubular, de forma que se produce un acúmulo de actividad en el túbulo distal proximal de las nefronas. No se conoce con certeza si la actividad inyectada se elimina como radiofármaco inalterado o como metabolitos de este.

Las dosis de radiación absorbidas por el paciente tras la administración de estos radiofármacos (gluconato o gluceptato tecnecios) en un paciente adulto son las indicadas a continuación:

Órgano	Dosis absorbidas (mGy/MBq)
Vejiga	0,056
Riñones	0,049
Hígado	0,0027
Ovarios	0,0045
Testículos	0,0029
Dosis efectiva equivalente (mSv/MBq)	0,009

5.2.9. Derivados del ácido fosfórico

Los compuestos que contienen en su molécula grupos fosfato tienen capacidad para formar complejos con el ^{99m}Tc . Los radiofármacos más utilizados son el pirofosfato y los derivados del ácido fosfónico.

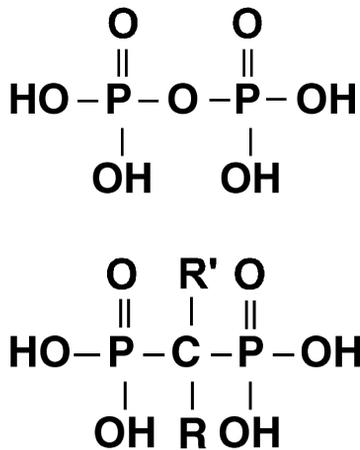


Figura 5.8. Estructuras moleculares del pirofosfato (superior) y difosfonato (inferior), ambas derivadas del ácido fosfórico. Por sustitución de R y R' con distintos radicales en la estructura de difosfonato se obtienen los diversos compuestos utilizados como radiofármacos tras su marcaje con $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

5.2.9.1. Derivados de difosfonato

Los derivados difosfonatos son compuestos derivados del ácido fosfórico que se marcan fácilmente con tecnecio y tienen una gran afinidad por el hueso, depositándose sobre los cristales de hidroxiapatita por un fenómeno de cambio iónico.

Los derivados de difosfonato más utilizados como radiofármacos tecneciados son:

- Medronato o metilen difosfonato (MDP).
- Oxidronato o hidroxidifosfonato (HDP).
- Propanodicarboxi difosfonato (DPD).

El medronato de tecnecio está descrito en la Farmacopea Europea. El medicamento debe ser una solución límpida, con un pH comprendido entre 3,5 y 7,5, y puede contener aditivos (agentes antimicrobianos, antioxidantes, tampón, etc.).

El marcaje del medronato, y de los demás derivados difosfonatos, no ofrece dificultades especiales. Tras la reacción de marcaje hay que controlar la pureza radioquímica, que debe ser superior al 95%. Este control puede realizarse por cromatografía en capa fina de sílicagel y metil-etil-cetona como fase móvil, como indica la Farmacopea. En este sistema el radiofármaco tiene un $R_f = 0$.

El medronato de tecnecio, al igual que los demás derivados de difosfonato, se emplea en exploraciones óseas, para delimitar áreas de osteogénesis alterada.

La dosis típica para un paciente adulto es de 500 MBq (13,5 mCi) por vía intravenosa, pudiendo oscilar entre 300 y 700 MBq (8 a 19 mCi); la administración de otras actividades debe estar justificada. La dosis pediátrica puede ajustarse en función del peso del paciente o de su superficie corporal.

Numerosos medicamentos pueden alterar la biodistribución de estos radiofármacos. Así se han detectado acumulaciones extraóseas en casos de administración simultánea de compuestos de hierro, difosfonatos, agentes citostáticos e inmunosupresores, antiácidos derivados de aluminio, contrastes radiográficos, antibióticos, antiinflamatorios, gluconato cálcico inyectable, heparina, y ácido γ -amino caproico.

Aunque la toxicidad del medronato y medicamentos afines es reducida, se han descrito casos de reacciones adversas debidas a hipersensibilidad; también se conocen casos de hipotensión, náuseas, vómitos, vasodilatación periférica, etc.

Tras la administración, el medicamento se distribuye y es captado por el hueso, que llega a captar hasta el 50% de la dosis inyectada una hora después de la administración, y permanece casi constante hasta las 72 horas. La fracción circulante del radiofármaco se elimina principalmente por la orina, eliminándose más del 40% de la dosis en las dos horas siguientes a la administración. Una vía secundaria de eliminación, que oca-

sionalmente puede resultar considerable y afectar a la calidad de la exploración gammagráfica, es el sudor.

Las dosis de radiación resultantes de la exploración con difosfonatos dependen de la edad del paciente, de la función renal, de la captación ósea, etc. La dosimetría estimada en la exploración con medronato, en un paciente adulto con función renal normal, es la siguiente:

Órgano	Dosis absorbidas (mGy/MBq)
Hueso	0,063
Vejiga	0,050
Riñones	0,007
Ovarios	0,0035
Testículos	0,0024
Médula ósea	0,0096
Dosis efectiva equivalente (mSv/MBq)	0,008

Las dosis absorbidas tras la administración de los demás derivados de difosfonato son semejantes a las debidas a la administración de medronato- ^{99m}Tc .

5.2.9.2. Pirofosfato (PYP)

El pirofosfato se marca bien con pertecneciato [^{99m}Tc], con Sn^{2+} como agente reductor, con un rendimiento de marcaje superior al 95%. Tras la administración endovenosa se localiza en el tejido óseo, acumulándose en función de la actividad metabólica del hueso, aunque esta utilización ha sido totalmente desplazada por los difosfonatos; también se deposita sobre el

miocardio en zonas infartadas, por lo que en ocasiones el pirofosfato de tecnecio se ha empleado en la detección y valoración del infarto de miocardio. El pirofosfato se elimina por la orina.

Actualmente el pirofosfato solo se emplea en el marcaje de eritrocitos, útiles en la realización de estudios angiogramáficos para la evaluación de la fracción de eyección, función ventricular, perfusión de diversos órganos, etc. Los eritrocitos marcados también pueden emplearse en la determinación del volumen sanguíneo, o desnaturalizarse para realizar estudios esplénicos.

El marcaje de los eritrocitos puede realizarse por métodos *in vivo*, *in vitro*, o mixto, según se indica más adelante, al describir los radiofármacos basados en muestras autólogas.

Inyectando una dosis de 10 a 15 mg de PYP/Sn²⁺ seguida de una dosis endovenosa de pertecnecio se pueden marcar los hematíes *in vivo*. Este marcaje de los hematíes permite utilizarlos como agentes para la exploración cardiovascular.

Las dosis a inyectar, biodistribución, propiedades farmacocinéticas, y dosimetría interna, dependerán de la indicación clínica concreta y de la forma de administración.

5.2.10. Otros radiofármacos tecneciados

Se agrupan aquí algunos radiofármacos tecneciados que se preparan a partir de equipos reactivos no incluidos en los apartados anteriores. Se trata de productos incorporados recientemente, entre los que destacan sestamibi (Cardiolite®), tiatida (MAG-3®), exametazima (Ceretek®), y bicisato (Neurolite®).

5.2.10.1. Sestamibi (Cardiolite®)

Aunque se han empleado diversos derivados de la estructura del isonitrilo, actualmente el que se emplea y está autori-

zado es el tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrilo) cobre (I) tetrafluoroborato, o sestamibi (Cardiolite®), no descrito en la Farmacopea Europea pero que tiene una monografía específica en la USP 29.

El marcaje necesita una incubación del equipo reactivo en agua hirviendo durante 10 minutos tras la adición de la actividad necesaria de eluido del generador, dejándose enfriar luego hasta temperatura ambiente. Durante la incubación en el baño hirviente es importante tener en cuenta la posible sobrepresión en el vial, que se evita extrayendo un volumen de aire del vial tras la adición del pertecneiato con la misma jeringa, nunca mediante una aguja de ventilación.

Tras el marcaje con ^{99m}Tc se forma un complejo, el ^{99m}Tc - (MIBI) $^{6+}$ o ^{99m}Tc -sestamibi, complejo catiónico sextavalente que se acumula en el miocardio. Por su biodistribución puede ser empleado en exploraciones de diagnóstico y localización de infarto de miocardio, y en la evaluación de la función ventricular global en primer paso, para determinar la fracción de eyección; para el diagnóstico de cardiopatía isquémica puede combinarse con la prueba de esfuerzo.

También se emplea en el diagnóstico de cáncer de mama, y en el diagnóstico de casos de hiperparatiroidismo.

Tras el marcaje es necesario verificar la pureza radioquímica del radiofármaco. Este control se puede realizar por cromatografía en capa fina de óxido de aluminio y etanol absoluto, como indica el fabricante. Un método alternativo es la cromatografía en capa fina de sílicagel y tampón citrato 0,1 M de pH = 5,0; en este sistema el radiofármaco queda en el origen. La pureza radioquímica debe ser superior al 90%.

Las dosis de ^{99m}Tc -sestamibi recomendadas para un paciente de 70 kg dependen de la exploración a realizar. Así, para el diagnóstico de infarto de miocardio y cardiopatía isquémica, las dosis son de 185 a 740 MBq (5 a 20 mCi); para la evaluación de la función ventricular global son 740 a 925 MBq (20 a

25 mCi) inyectados en bolo. Para diferenciar la isquemia del infarto se requieren dos inyecciones, una en esfuerzo y otra en reposo, administradas entre sí con seis horas de diferencia como mínimo; para el diagnóstico de infarto basta una inyección en reposo.

Las dosis a administrar para la exploración de mama son de 740-925 MBq (20-25 mCi) inyectados en bolo; para la exploración de paratiroides se administran de 185-740 MBq (5-20 mCi), también en bolo.

Conviene que el paciente esté en ligero ayuno antes de la exploración, y que realice una comida tras la administración del medicamento para facilitar la eliminación fecal.

Tras la administración endovenosa el ^{99m}Tc -sestamibi se acumula en el miocardio en forma análoga al ^{201}Tl , en función proporcional a la irrigación regional. El corazón fija hacia el 1,5% de la dosis inyectada en esfuerzo y 1,2% en reposo. La captación no se bloquea al inhibir la bomba de sodio, pero se modifica por la hipoxia. No se conocen interacciones con otros medicamentos.

La eliminación se realiza mayoritariamente por vía hepatobiliar, aunque también son importantes la eliminación urinaria (hacia el 27% de la dosis inyectada en 24 horas), y la fecal (33% en 48 horas).

Las dosis absorbidas por el paciente durante la exploración dependen del estado de esfuerzo o reposo. Las dosis estimadas para un paciente adulto de 70 kg, en función de la actividad administrada y del régimen esfuerzo/reposo, son las indicadas a continuación:

Órgano	Dosis absorbidas (mGy/MBq)	
	Reposo	Esfuerzo
Vesícula biliar	0,018	0,026
Intestino delgado	0,027	0,022
Intestino grueso superior	0,050	0,040
Intestino grueso inferior	0,036	0,029
Pared corazón	0,004	0,005
Riñones	0,018	0,015
Ovarios	0,014	0,011
Testículos	0,003	0,003
Vejiga	0,018	0,014
Cuerpo entero	0,004	0,003
Dosis efectiva equivalente (mSv/MBq)	0,014	0,012

5.2.10.2. Tiatida (MAG-3®)

El radiofármaco se obtiene por marcaje con ^{99m}Tc del benzil mercapto acetil triglicina (MAG-3®), y se denomina tiatida o mertiatida, descrito en la Farmacopea Europea.

El marcaje debe realizarse con una solución de pertecneciato de alta concentración radiactiva y alta actividad específica. La reacción se realiza mediante incubación en agua hirviendo durante 10 minutos, tras la cual se enfría el vial en agua fría. La posible sobrepresión se evita extrayendo un volumen de aire del vial tras la adición del pertecneciato, nunca mediante una aguja de ventilación.

Antes de la administración se realiza el control de la pureza radioquímica, que debe ser superior al 90%. Se controla con un cartucho Sep-Pak, y no debe haber más del 10% de impurezas lipofílicas e hidrofílicas.

Tras la administración la tiatida es rápidamente aclarada de la sangre por vía renal, por lo que se emplea como agente diagnóstico en la evaluación del flujo sanguíneo renal, tránsito tubular y función renal de uno o ambos riñones. Su comportamiento es similar al del ácido o-yodohipúrico. No está indicada en el estudio del flujo plasmático renal efectivo en casos de alteración severa de la función renal.

No hay una eliminación extrarrenal apreciable, aunque algunas impurezas radioquímicas pueden ser eliminadas por vía biliar, pudiendo interferir en el estudio de la función renal.

La dosis de tiatida a administrar en adultos puede variar de 37 a 185 MBq (1 a 5 mCi) por vía endovenosa en función de la exploración que se pretenda realizar: flujo sanguíneo renal y transporte a través de los uréteres, transporte intrarrenal, renografía. En niños no está aún establecida la posología.

En cualquier caso, el paciente debe estar bien hidratado al comenzar la exploración, y tras ella conviene orinar frecuentemente para disminuir la exposición a la radiación.

Las dosis de radiación absorbidas en la exploración diagnóstica con tiatida dependen del estado de hidratación del paciente y de la función renal. Las dosis indicadas a continuación son las estimadas cuando se produce un vaciamiento de la vejiga en las dos horas tras la administración del radiofármaco.

Órgano	Dosis absorbidas (mGy/MBq)
Vejiga	0,057
Vesícula biliar	0,043
Riñones	0,017
Hígado	0,005
Ovarios	0,003
Testículos	0,002
Cuerpo entero	0,001
Dosis efectiva equivalente (mSv/MBq)	0,011

5.2.10.3. Exametazima (Ceretek®)

El radiofármaco es una solución inyectable de exametilén-p-amino oxima (HM-PAO), o exametazima, marcada con ^{99m}Tc . El radiofármaco, que tiene monografía en la USP 29, se prepara por el marcaje extemporáneo de un vial de Ceretek®. La preparación del radiofármaco no presenta problemas especiales, excepto que el pertecnecio que se emplee, además de cumplir las especificaciones de la Farmacopea Europea, debe ser de alta concentración radiactiva, procedente de un generador eluido en las 24 horas anteriores, para tener la suficiente actividad específica, y tener menos de dos horas desde la elución.

Con el marcaje se forma un complejo muy liposoluble (complejo primario), responsable del comportamiento de este medicamento, pero inestable, ya que va modificando su estructura de forma espontánea para originar otro complejo no liposoluble (complejo secundario); el radiofármaco solo tiene un periodo de validez de 30 minutos tras la preparación. Para aumentar el periodo de validez del medicamento se ha desarrollado una modificación de este, estabilizada con sales de co-

Con estos agentes citados la separación final se logra por centrifugación, con lo que se precipita una de las fracciones, generalmente la unida al anticuerpo, quedando en solución en el líquido sobrenadante la fracción libre. Esta se puede eliminar por decantación, o mejor aún por aspiración. La decantación es más rápida pero aumenta el error del método por aumentar la variabilidad de la radiactividad retenida por el tubo de ensayo y por poder sufrir pérdidas del precipitado, además de aumentar el peligro de contaminación del contador por las posibles gotitas que pueden salpicar al tubo por fuera. La aspiración del sobrenadante con una pipeta Pasteur conectada a una bomba o una trompa de vacío reduce notablemente estos peligros, aunque esta operación debe ser muy cuidadosa para aspirar todo el sobrenadante sin arrastrar el precipitado.

Un nuevo método desarrollado comercialmente para algunos métodos de RIA emplea el anticuerpo adsorbido sobre partículas muy pequeñas con núcleo férrico, que tras la incubación con el antígeno y el trazador se pueden separar aplicando a la gradilla un campo magnético con un imán apropiado. Así precipitarán por fuerza magnética las partículas de hierro arrastrando a los complejos antígeno-anticuerpo formados.

Intentando simplificar las técnicas de RIA para hacerlas más asequibles a las determinaciones rutinarias, ahorrando pasos de pipeteo, incubaciones, centrifugación, etc., se desarrollaron las técnicas del anticuerpo en fase sólida. Para ello se unen las moléculas de anticuerpo a un soporte sólido e inerte, como una esferita de vidrio o la misma pared del tubo de ensayo en que se va a incubar la mezcla del RIA. Una vez alcanzado el equilibrio tras la incubación se aspira la fase líquida con los elementos que no han reaccionado, quedando en la pared del tubo la fracción de radiactividad ligada por el anticuerpo.

7.3. ANÁLISIS INMUNORRADIOMÉTRICO (IRMA)

Basándose en los anticuerpos en fase sólida unidos al tubo de ensayo se ha desarrollado una técnica analítica como alternativa al radioinmunoensayo, el análisis inmunorradiométrico (IRMA).

El IRMA es una técnica analítica basada en el empleo de un trazador radiactivo, pero es no competitiva. La muestra, o la solución calibrada, se incuba en un tubo de ensayo que posee el anticuerpo unido a la pared del tubo, y a continuación se añade un segundo anticuerpo marcado con un radionúclido, normalmente ^{125}I . Así se forma un *sandwich* en el que la cantidad de trazador retenida aumenta con la presencia de antígeno. Por ello la técnica es no competitiva.

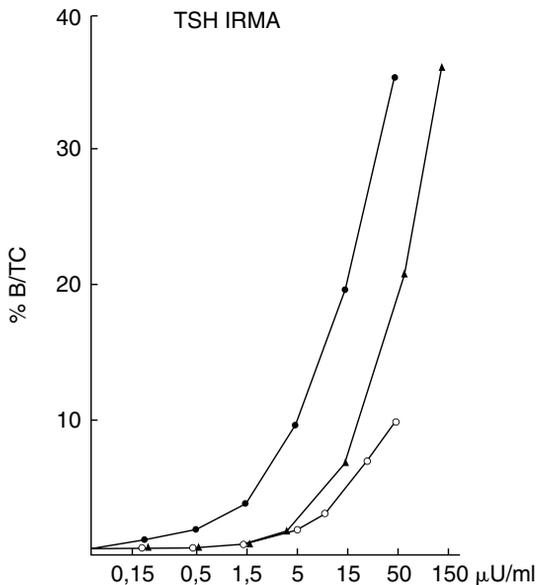


Figura 7.1. Representación de la curva patrón de tres métodos inmunorradiométricos (IRMA) para la determinación de la hormona tirotrópica (TSH). Al ser el IRMA un ensayo no competitivo la fracción de trazador radiactivo aumenta al aumentar la cantidad de antígeno.

En el IRMA los reactivos que se añaden a la muestra están en exceso, de forma que la cantidad de radiactividad empleada en cada tubo es notablemente mayor que en el RIA. Por ello tras la incubación es necesario lavar varias veces el tubo para eliminar el exceso de radiactividad que no ha reaccionado, ya que al tener esa radiactividad por tubo, una cantidad pequeña retenida puede representar un error significativo.

Al ser una técnica no competitiva la curva de calibración del IRMA es inversa a la del RIA, ya que la fracción de radiactividad ligada aumenta con la cantidad de antígeno presente en la muestra.

En el orden práctico el IRMA no ha significado una mejora sustancial respecto a los logros del RIA.

7.4. REALIZACIÓN DEL RADIOINMUNOENSAYO

La realización del radioinmunoensayo (RIA) incluye la preparación de la curva de calibración, proceso de las muestras problema, y cálculo de los resultados.

En los tubos de ensayo en los que se va a realizar el RIA se pipetearán los diferentes componentes del ensayo: alícuota de la muestra problema o de la solución patrón, volumen constante de la solución del trazador y del anticuerpo, tampón del ensayo si fuese necesario, etc. Tras el pipeteo de las distintas sustancias se asegura la mezcla completa de los diferentes componentes por agitación de los tubos. Después de la incubación necesaria se añade el medio de separación y se procede a la separación efectiva de la fracción de la actividad ligada por el anticuerpo.

Además de los tubos de las soluciones patrones y de las muestras problema hay que añadir tubos para determinar tres parámetros del RIA que son el «cero», la precipitación inespecífica y la actividad total.

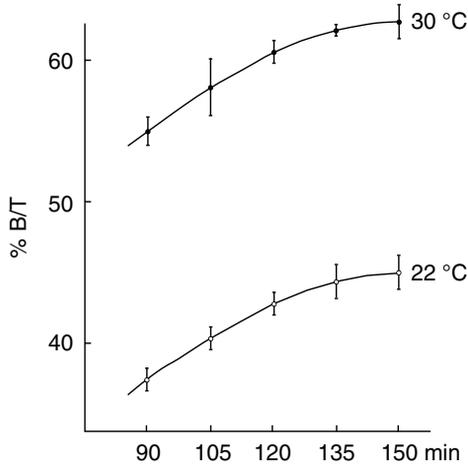


Figura 7.2. Representación de la fracción de trazador radiactivo unido al anticuerpo a diferentes tiempos de incubación y a dos temperaturas distintas. Se aprecia la importancia de tratar a todos los tubos igual para que puedan ser comparados entre sí, ya que diferencias en las condiciones de incubación (tiempo, temperatura), al igual que en los volúmenes de reactivos pipeteados, introducirán errores significativos.

El «cero» (*maximal binding* o MB) se prepara pipeteando un par de tubos con un volumen de solvente igual a la de las soluciones patrón, sea suero o plasma, sangre total, orina, tampón, etc., pero libre de la presencia del antígeno. Será uno de los parámetros de control del RIA.

Cuando se añade el medio de separación en el RIA y se produce la precipitación y la separación final, no toda la radiactividad que queda retenida en el tubo corresponde a la ligada por el anticuerpo, sino que una fracción se debe a actividad contaminante del tubo de ensayo y a trazador precipitado de forma inespecífica por fenómenos de adsorción, de unión a otros compuestos diferentes del anticuerpo, etc. Para determinar la cantidad de precipitación inespecífica (NSB) se disponen unos tubos en la curva de RIA en los que se pipetean todos los componentes del ensayo salvo el anticuerpo, que se sustituye por un volumen equivalente del solvente en el que está disuelto

el anticuerpo o de un medio similar carente de anticuerpo. La radiactividad que precipite en la separación en estos tubos no será debida a acción del anticuerpo.

La fracción de NSB se determina normalmente en la solución «cero», aunque puede determinarse en cualquiera de los puntos de la curva, y en ocasiones hay que determinarla para cada una de las muestras analizadas.

La importancia que el NSB puede representar en el resultado del RIA si no se calcula y se resta de la actividad precipitada depende del valor de esa fracción NSB y de la concentración de antígeno en la muestra analizada. Así, en una muestra con poco antígeno en la que la actividad ligada es alta, el NSB influye relativamente poco, pero si la fracción de radiactividad no es muy alta el NSB adquiere una importancia proporcionalmente mayor.

De la radiactividad que se añade a los tubos de ensayo para realizar el RIA solo quedará una fracción tras la separación final. Para conocer la radiactividad inicial que se incubó en los tubos se preparan unos tubos de ensayo en los que solo se pipetea la alícuota de trazador, sin añadir anticuerpo ni antígeno y sin separarlos finalmente. Su misión solo es servir de referencia de la actividad pipeteada a cada tubo.

Cada parámetro, punto de la curva y muestra problema debe pipetearse al menos por duplicado, aumentando en algunos casos concretos a la realización por triplicado o cuadruplicado. Esto se debe a la necesidad de escoger finalmente un punto medio representativo para disminuir los errores de pipeteo y del método, desechando los duplicados muy diferentes entre sí como indicativos de error superior al aceptable. A efectos prácticos se maneja la media aritmética del resultado de los diferentes duplicados o triplicados si son coincidentes.

Los diferentes pasos en la realización del RIA deben realizarse sucesivamente y sin interrupciones, por la misma persona, y se debe emplear el mismo material para disminuir el error todo lo posible.

Tabla 7.1. Esquema de un radioinmunoensayo. Protocolo típico de un radioinmunoensayo en el que la curva patrón incluye tubos de actividad total y se determina la precipitación inespecífica. Todas las soluciones patrón y las muestras problema están por duplicado.

Tubos (pares)	Función	Patrón o muestra	Tampón	Trazador	Anticuerpo
1, 2	referencia (TC)	–	–	100 μ l	–
3, 4	«cero» (MB)	–	25 μ l	100 μ l	100 μ l
5, 6	NSB	25 μ l	100 μ l	100 μ l	–
7, 8...17, 18	patrones	25 μ l	–	100 μ l	100 μ l
19, 20...	muestras	25 μ l	–	100 μ l	100 μ l

Aunque el orden de adición de los diferentes reactivos en principio puede ser cualquiera, normalmente es preferible pipetear en primer lugar el antígeno «frío» (solución patrón o muestra problema) y el trazador, y a continuación el anticuerpo, para que la formación de complejos antígeno-anticuerpo se inicie simultáneamente con el antígeno y con el trazador y se alcance antes el equilibrio. El tiempo y las condiciones de incubación serán las que necesite el anticuerpo para reaccionar y alcanzar el equilibrio.

Dado que los volúmenes de las alícuotas que normalmente se pipetea en el RIA son muy pequeños, de microlitros, se requiere la utilización de material muy preciso y convenientemente calibrado.

El requisito esencial en la correcta realización del RIA es que las condiciones de reacción sean idénticas en todos los tubos para que los tubos de las muestras a analizar sean realmente comparables con la curva patrón, para lo que se necesita que las soluciones de los diferentes reactivos que se van a pipetear tengan exactamente la misma composición en todos los

tubos del RIA. Para ello, si hay que utilizar un reactivo de diferentes viales o lotes se puede conseguir su homogeneidad mezclándolos previamente, con lo que el reactivo tendrá la misma composición y concentración en todos los tubos.

7.5. CONTAJE DE LA RADIATIVIDAD

Para proceder al cálculo del RIA para determinar la concentración de antígeno en las muestras problema se cuenta la radiactividad retenida en cada tubo. El conteo de la radiactividad se realiza en contadores apropiados según el tipo de emisión del radionúclido, γ o β .

Los contadores de radiactividad más comunes son los de centelleo, que constan fundamentalmente de un detector de la radiación de que se trate acoplado a un preamplificador, amplificador, un discriminador de impulsos, un sistema de registro, etc.

El detector de centelleo, parte fundamental del contador, está compuesto por una sustancia fluorescente y un tubo fotomultiplicador asociado. La sustancia fluorescente o centelleador es una sustancia apropiada con la que interacciona la radiación emitiendo un destello luminoso, es decir, transforma la radiación absorbida en impulsos luminosos. El fotomultiplicador asociado posee un fotocátodo que libera electrones por la acción de la luz emitida por el centelleador, y un sistema de díodos que amplía la respuesta electrónica hasta un rango adecuado.

Como centelleadores se emplean cristales de NaI activado con Tl en la detección de radiación γ (centelleo sólido), y para la radiación β se emplean líquidos orgánicos fluorescentes como terfenilo, antraceno o xileno, en los que se disuelve la muestra a contar (centelleo líquido).

Para aumentar el rendimiento de conteo del contador de centelleo sólido, su eficiencia, el detector generalmente no es

plano, sino que posee un orificio en el que se introduce el tubo a contar y así poder detectar la radiactividad emitida en casi todas las direcciones del espacio; este sería el contador de pozo.

El detector va incluido en un sistema electrónico complejo, normalmente acoplado a un sistema informático que permite contar las muestras y realizar cálculos con el resultado del contaje.

Existen también contadores específicos para la lectura de muestras de RIA, que disponen de una serie de detectores independientes capaces de leer muchos tubos simultáneamente dispuestos en gradillas de plástico especiales. El contador, previamente programado, reconoce la función de cada tubo por la posición que ocupa para establecer la curva patrón y dar el resultado de las muestras directamente.

7.6. CÁLCULO Y REPRESENTACIÓN DEL RIA

Como se ha indicado anteriormente, la cuantificación del RIA se realiza normalmente en base a la fracción de trazador que queda retenida por el anticuerpo en forma de complejo an-

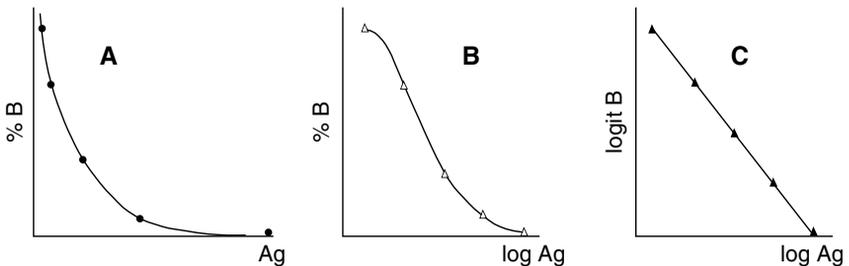


Figura 7.3. Diversas formas de representar la curva patrón del radioinmunoensayo (RIA): representación decimal (A), semilogarítmica (B) y transformación logit (C). Al ser un método competitivo, la fracción de trazador radiactivo unido al anticuerpo disminuye al aumentar la cantidad de antígeno presente en el tubo.

tígeno-anticuerpo radiactivo. La cantidad de antígeno presente en las muestras problema se determinará por comparación con la fracción de radiactividad ligada por el anticuerpo en las soluciones patrón. La comparación de las muestras desconocidas con la curva patrón debe hacerse siempre por interpolación entre concentraciones calibradas conocidas, nunca por extrapolación, ya que no se puede predecir el comportamiento de la reacción fuera de los puntos conocidos.

La representación y cuantificación del RIA necesita relacionar la fracción de radiactividad ligada al anticuerpo con la concentración de antígeno. Esta relación se puede establecer de varias formas: relación lineal, escala logarítmica o semilogarítmica, transformación logit, etc.

7.7. PRUEBAS DE VALIDACIÓN DEL RIA

Al desarrollar, adaptar o modificar un método de RIA es necesario realizar una serie de pruebas de validación para comprobar que los resultados obtenidos con ese método son correctos. Estas pruebas son, al menos, las de paralelismo, recuperación, y correlación con otros métodos.

7.7.1. Paralelismo

La reacción del anticuerpo con el antígeno y el trazador debe producirse en las mismas condiciones y con idénticas características en las soluciones patrón y en las muestras problema para que sean comparables. Esto quiere decir que con diluciones crecientes en un medio inerte a partir de una muestra problema con una alta concentración del antígeno que se va a determinar, se obtendrán una serie de fracciones de radiactividad ligada, que al ser representados formarán una curva similar a la obtenida con las soluciones patrón, es decir, habrá paralelismo.

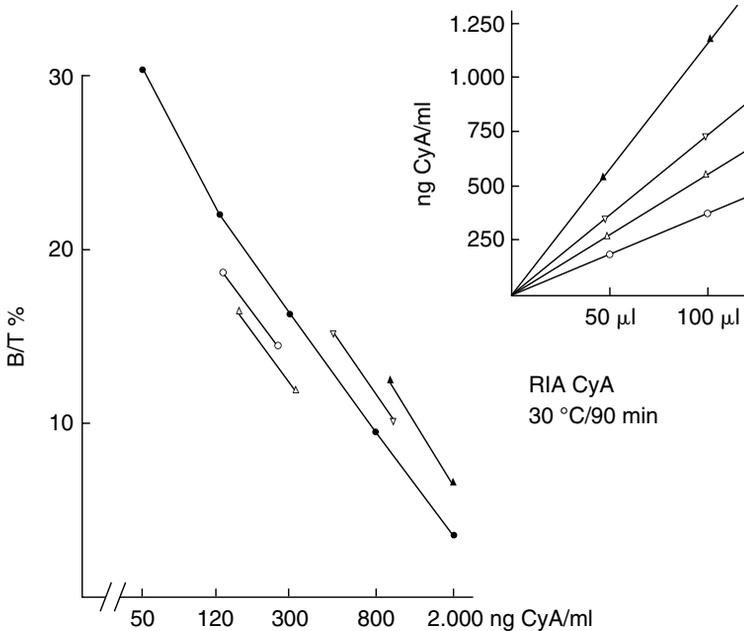


Figura 7.4. Prueba de paralelismo en la validación de un método de radioinmunoensayo de ciclosporina A (CyA). Se observa que la representación del desplazamiento de las muestras analizadas a diferentes diluciones es paralelo a la curva patrón, por lo que la cantidad de CyA es directamente proporcional al volumen de la alícuota analizada.

En la práctica lo que se hace es analizar una serie de muestras a dos o tres diluciones, y al representar la fracción de actividad ligada por cada una de las diluciones debe obtenerse una curva similar a la curva patrón, paralela al tramo al que se enfrenta.

El paralelismo indica que la reacción antígeno-anticuerpo se desarrolla con la misma cinética en la curva patrón y en las muestras problema, sin que se detecten interferencias analíticas. En este caso la cantidad de antígeno detectado en una muestra será proporcional al volumen de la alícuota analizada, y la concentración que se determine será independiente del volumen de la alícuota que se analice, mientras que en caso de no

haber paralelismo la cantidad de antígeno que se determine dependerá del volumen de la alícuota analizada, y la concentración que se determine estará también influenciada por la cantidad de muestra que se analice.

La falta de paralelismo es causa suficiente para invalidar un método analítico.

7.7.2. Recuperación

La prueba de recuperación consiste en enriquecer algunas muestras con el antígeno que se está determinando, añadido en cantidades conocidas. Analizando simultáneamente las muestras originales y las mismas muestras tras enriquecerlas en el antígeno se comprobará si el incremento en la concentración de antígeno detectada coincide con el valor esperado, determinándose la fracción del antígeno detectado respecto al añadido.

Las fracciones recuperadas deben tener un valor próximo al 100%. Desviaciones altas respecto a este valor, tanto por exceso como por defecto, indican interferencias analíticas significativas. En algunos métodos analíticos con interferencias analíticas se han encontrado recuperaciones superiores al 300%.

7.7.3. Correlación

Consiste en valorar en una serie de muestras el antígeno que se quiere determinar por dos métodos diferentes simultáneamente, el método que se quiere validar y otro método analítico fiable que se toma como referencia. Con los valores obtenidos por los métodos empleados se obtendrá una recta de regresión.

Una correlación alta indicará coincidencia entre los valores obtenidos por ambos métodos; una mala correlación revelará