

Evaluación de un Radioinmunoanálisis de Digoxina con separación cromatográfica

*Dr. Guillermo Acebedo**

Hemos hecho la evaluación de un rápido radioinmunoanálisis de digoxina con una conveniente separación cromatográfica. La conveniencia de los resultados rápidos (Stat) y la precisión del método de AMES son evidentes. Hemos hecho algunas modificaciones, sin embargo los resultados clínicos serán publicados luego.

Palabras Claves: RIA, drogas, digoxina, cromatografía, toxicidad, resultados rápidos.

A Rapid RIA for Digoxin with convenient chromatographic separation of bound and free ligand has been evaluated. Nevertheless clinical results have been planned for another publication.

The convenience of stat results obtained with this method, with some minor modifications of the "Ames" procedure, appears evident in the discussion.

Key words :

R.I.A., Digoxin, Drugs.

Toxicity, Chromatography, Stat results.

* Investigador del CIDI, Profesor Asociado de Bioquímica y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín - Colombia.

Separatas : Doctor Guillermo Acebedo, A.A. 1178 CIDI, Medellín - Colombia

INTRODUCCION

Vincent Butler, de Columbia University (1) ha sido uno de los pioneros en el desarrollo de métodos de RIA para el seguimiento de niveles terapéuticos y tóxicos de Digoxina, en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y las arritmias.

El artículo de revisión sobre este tema publicado en *Seminars of Nuclear Medicine* (2) es valiosísimo, tanto para el clínico cardiovascular como para el bioquímico especializado en estos métodos.

El horizonte clínico del RIA (3) parece inagotable hasta hoy y la aplicación de estos métodos microanalíticos y ultrasensibles es particularmente útil en la dosificación y seguimiento de drogas potencialmente tóxicas como los glucósidos esteroideos, grupo en el cual se destaca la digoxina, cuya actividad como cardiotónico ha sido reconocida desde el siglo XVII (4).

Sólo a fines del S. XIX, sin embargo, comenzó un uso racional, con bases científicas de este agente de origen vegetal. Esta droga, como extracto de la digital, ha sido conocida desde tiempo de Paracelso, según nos refiere la Historia de la Medicina. Las variedades más conocidas en Colombia son la "digitalis purpurea" y la "digitalis lanata" de la Sabana de Bogotá. Hemos encontrado estas variedades en el Alto de Santa Elena (Ruta que conduce al Mpio. de Rionegro en el Depto. de Antioquia-Colombia).

En cuanto a la actividad farmacológica de esta droga queremos mencionar que el componente de azúcar en los glucósidos permite su fijación al miocardio y disminuye su efecto irritante sobre las mucosas, lo cual permite su aplicación oral. No obstante, su actividad fisiológica disminuye poco en ausencia del azúcar, mientras que en ausencia del aglucon o genina la eficacia se hace nula.

La actividad cardíaca normal está condicionada al equilibrio iónico Ca-K y se ha compro-

bado que la actividad de los digitales depende críticamente de este entorno electrolítico. (5)

Aunque la terapia con digitales empieza a reducirse un poco por el solo hecho de que se delimita su aplicación clínica específica y por el progresivo uso de vasodilatadores y diuréticos, su utilización racional exige el seguimiento estricto de los niveles circulantes de la droga 8 - 12 horas después de la administración oral de la dosis en uso terapéutico.

Esta droga sigue siendo el agente inotrópico oral de escogencia en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y en algunas arritmias. (8).

Materiales y Métodos

Los RIAs para digoxina se basan en los mismos principios generales pero difieren mayormente en la etapa de separación entre la droga ligada a su anticuerpo específico y la que permanece libre en el tubo de reacción. Esto después de haber realizado una corta incubación para la unión antígeno-anticuerpo deseada para el análisis (20 - 60 min. según el método).

Todos los métodos de separación en RIA han sido comparados para la mayoría de los ensayos publicados. El método con el uso del polímero PEG (polietilenglicol) que nosotros publicamos para T3 y T4 (6) es el mismo que el Dr. Butler aplicó para sus publicaciones sobre el RIA de Digoxina.

Otro método de separación muy difundido, ha sido el de carbón activado, que ofrece la desventaja de una difícil dosificación de la suspensión y el peligro de ligar inespecíficamente al complejo antígeno-anticuerpo. El método de segundo anticuerpo (doble) utilizado por nosotros para TSH (7), los de resinas de intercambio iónico (Mallinkrodt) y últimamente el de columna cromatográfica inserta en el tubo de ensayo, utilizado por

el actual método ligeramente modificado de la AMES, aparecen muy ventajosos por su facilidad de operación y su precisión y reproductibilidad.

Hemos estudiado este estuche de la AMES por la disponibilidad de reactivos, comprados a esta firma, fabricados en Jerusalem, Israel.

Los componentes del estuche son :

1. Digoxina— 125
2. Estándares desde 0,6 hasta 4,6 ng/ml.
3. Anticuerpo contra un conjugado de digoxina (no especificado) obtenido en conejos.
4. Columnas cromatográficas para separación. Se trata de una resina no especificada, empaquetada en tubos plásticos.
5. Solución buffer de fosfato y EDTA disódico, a un pH de 7,4. Sin especificación de concentración del amortiguador.

Utilizamos, para la detección de material radiactivo (125) un contador gamma, manual comprado a Abbott, con una eficiencia de conteo de más del 90% para este radioisótopo. El conteo de fondo (background) fué de 20 a 30 CPM.

Las micropipetas utilizadas son de la marca Centauro, con puntas plásticas desechables compradas a "Laboratorios Ltda."

Resultados

Habiendo seguido a la letra el método recomendado por la AMES,(9) encontramos útil la modificación de añadir los 0,6 ml. de buffer para dilución, al final de la incubación, es decir, antes de aplicar las columnas cromatográficas para separación. Esto hace más inteligible el efecto de dilución para terminar la incubación y permite un pipeteo más cómodo y exacto que cuando las columnas ya lo estorban.

La reproductibilidad del método dentro del mismo análisis; fué del orden de 40%. Entre

diversos análisis, no la confirmamos, por carencia de reactivos del mismo lote, pero sería aparentemente buena de acuerdo con los resultados del paralelismo que publicamos entre las dos curvas estándar realizadas en diversas semanas de trabajo.

La sensibilidad del método fué muy buena para un desplazamiento de un 10% de la droga ligada: 0,25 - 0,3 ng/ml.

El método gráfico que utilizamos es diferente al recomendado por AMES, puesto que estamos acostumbrados al control de calidad que requiere seguir el enlace específico y la llamada curva de desplazamiento de pendiente negativa, tanto para el gráfico manual como para el computarizado (7). El seguimiento de la droga libre, en estos casos, lo encontramos desventajoso.

Obsérvese la prueba de paralelismo de dos curvas estándar realizadas en dos semanas diferentes. Gráfico No. 1

Contrariamente a lo que esperábamos, este método de separación mantiene una perfecta independencia del efecto de las proteínas de un "pool" de plasma normal que utilizamos para comparar. Obsérvese la superposición de las rectas en escala semilogarítmica. Gráfico No. 2.

Hay que destacar que en las curvas estándar notamos una tendencia a disminuir notablemente la pendiente con niveles por encima de 3ng./ml. De esto continuar, recomendaríamos el uso de sólo 30 microlitros de suero sanguíneo en determinaciones clínicas como las que haremos en el futuro próximo para publicación.

Discusión

Sería precipitado y objetable científica y clínicamente el publicar resultados clínicos del seguimiento de niveles de digoxina en sangre, sin haber evaluado escrupulosamente un método en nuestros laboratorios, acostumbrados como estamos a esta disciplina y al diseño de estos mismos métodos micro y ultramicroa-

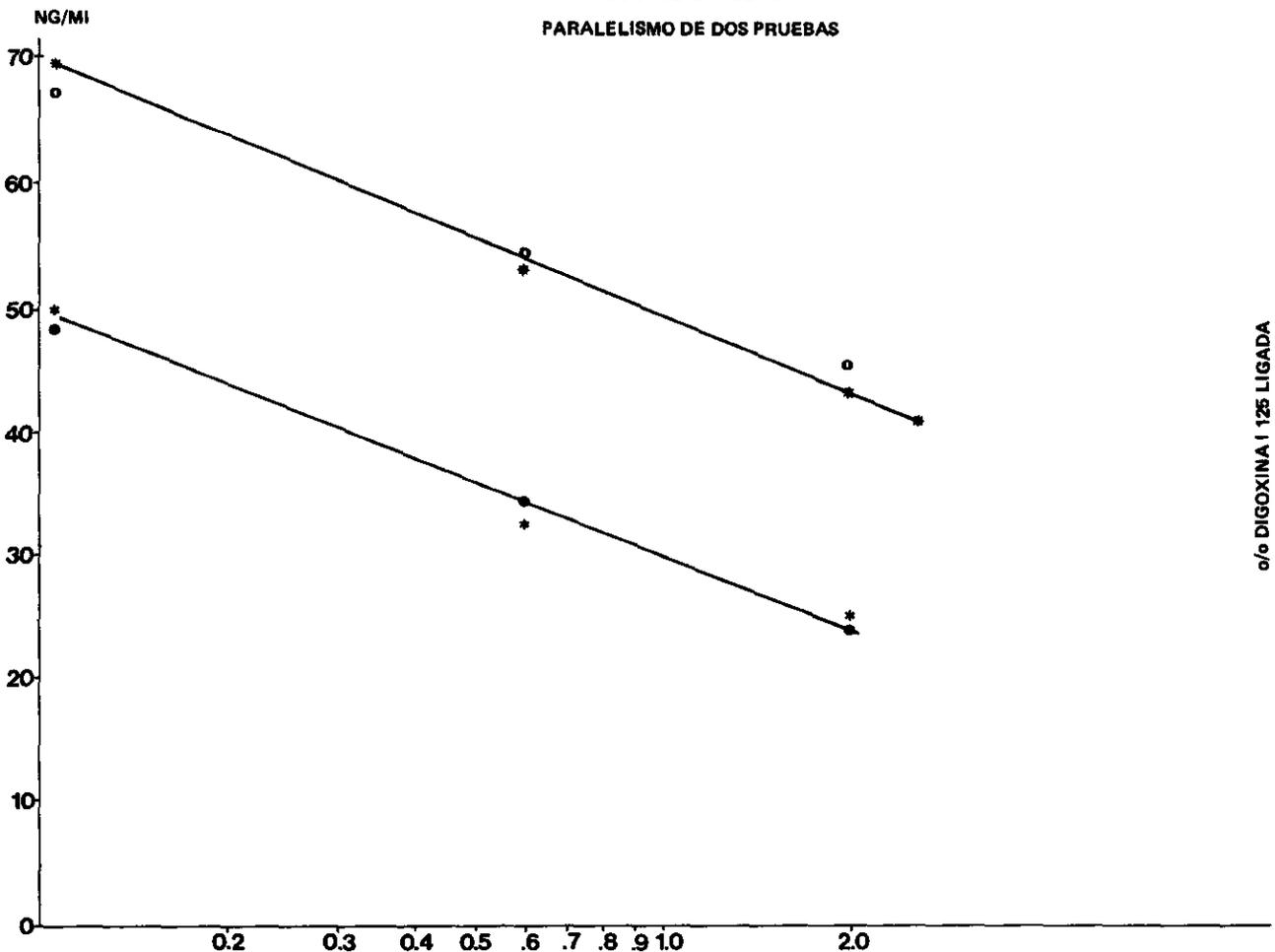
nalíticos (7). El objetivo de esta publicación es el de demostrar los requisitos mínimos para que un método analítico (comercial o no) se convierta en un instrumento confiable para trabajo clínico e investigativo, no sólo por su valor intrínseco sino por la destreza necesaria en el personal de laboratorio para su estricto control de calidad, por razones expuestas en una anterior publicación.(3).

Hay que abonar al método aquí evaluado, que se destaca por su rapidez, necesarísima en estos casos para obtener una información clínica expedita y por su práctica etapa de separa-

ción, que infortunadamente lo limita al número de columnas que presenta el estuche de reactivos.

En la próxima publicación compararemos este método de separación con el de PEG, (Poli-etilenglicol) tan familiar para nosotros. Avanzaremos en más detalles clínicos, cuando el Proyecto de Investigaciones Biomédicas del CIDI autorice el seguimiento de un grupo de pacientes tratados con Digoxina, en los hospitales asociados a la Facultad de Medicina de la U.P.B.

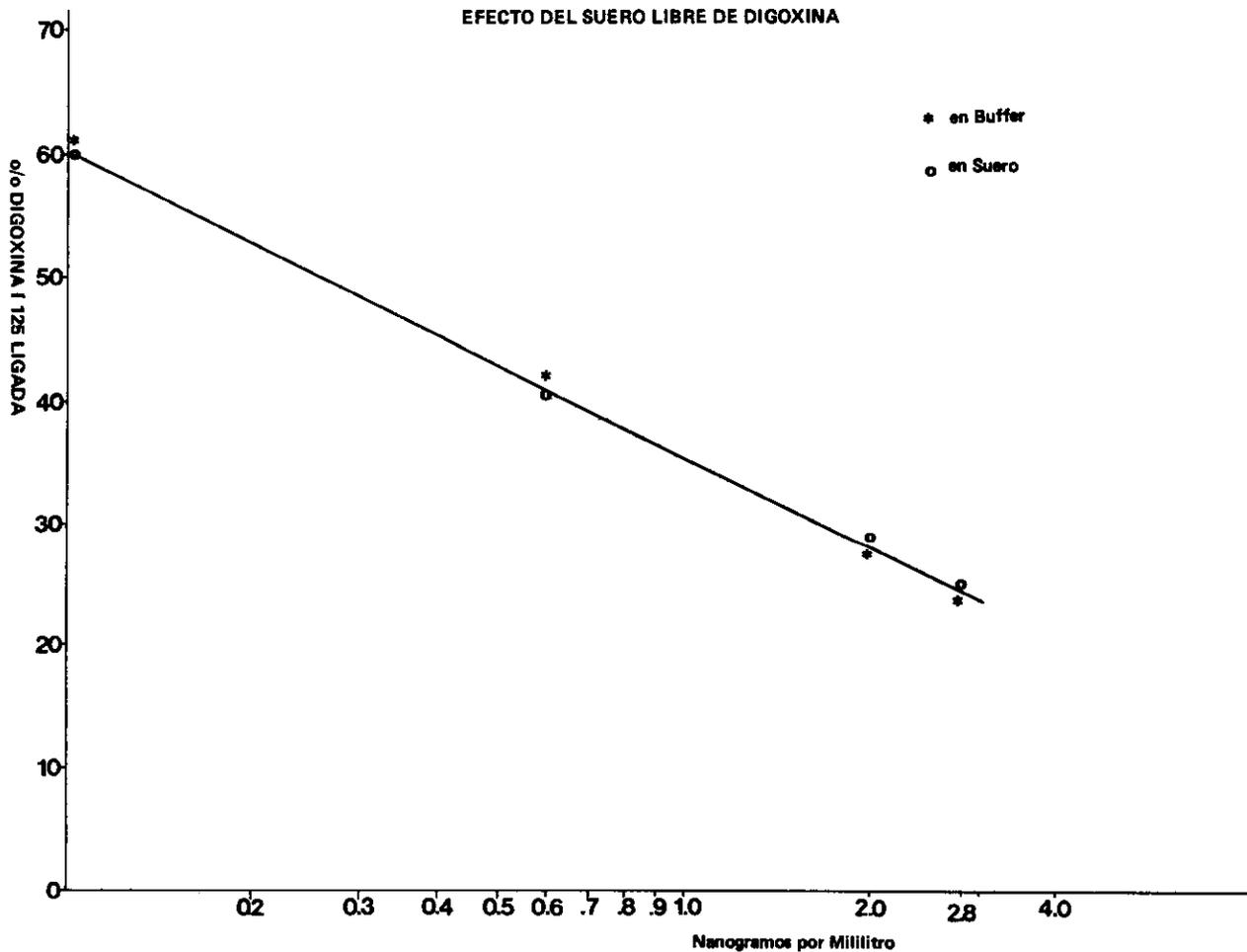
Gráfico No. 1
PARALELISMO DE DOS PRUEBAS



o/o DIGOXINA I 125 LIGADA

Gráfico No. 2

EFFECTO DEL SUERO LIBRE DE DIGOXINA



A los Ingenieros Enrique Posada R. (Jefe de Laboratorios) y Luis Oliverios Cárdenas M. del Proyecto de Contaminación Ambiental del CIDI, por su colaboración para dotar al laboratorio de RIA del futuro Proyecto de Investigaciones Biomédicas del CIDI.

A los Doctores Alberto Echavarría R., exdecano de la Facultad de Medicina de la U.P.B., Francisco Restrepo G. Director Académico de la U.P.B. y Manuel José Velásquez, jefe de Educación Médica de la Facultad de Medicina de la U.P.B.

A todos los colegas investigadores del CIDI.

REFERENCIAS

1. Butler, V. P.; T. Smith and E. Haber NEJM 281: 1212 (1969).
2. Shapiro, B.; Pitfalls In Digoxin RIA. In Seminars of Nuclear Medicine Vol. V: 328 (1975)
3. Acebedo, G. Medicina UPB. Vol. I: 27 (1981)
4. Mesey, K. "La Digital" Ed. Javeriana, Bogotá (1944)
5. Zondek. "Die Elektrolytes" Berlín (1927)
6. Werner, S.C.; Dr. Acebedo and I Radichevich ICEM 38: 493 (1974).
7. Acebedo, G.; A.Hayek and M. Brooks, BBRC 65: 449 (1975).
8. Fleisher, L.: In Current Therapy. Saunders (1981).
9. Rialyze, Digoxin. AMES. Div. of Miles Labs. (1979)
10. Pick, A., and D. Wayner. J. Inmuns. Meth. 32: 275 (1980).