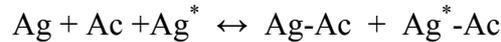


## PRÁCTICA N° 4

### 4.1. RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

Técnica analítica competitiva en la que la molécula antigénica que se quiere determinar compete con un trazador radiactivo por unirse a un anticuerpo específico



Manteniendo constantes las cantidades de trazador y de anticuerpo en este sistema en equilibrio, el que se forme mayor o menor proporción de del complejo Antígeno-Anticuerpo “frío” o radiactivo dependerá únicamente de la cantidad de Antígeno frío.

Con cantidades conocidas de Ag se construye una curva patrón. La representación y cuantificación del RIA se lleva a cabo relacionando la fracción de radiactividad ligada al anticuerpo con la concentración del antígeno. Existen varios métodos de representación de la curva patrón: lineal, logarítmica, logit.

El RIA es una técnica analítica que por su doble condición de ser inmunológica e isotópica es específica y de gran sensibilidad, por lo tanto se utiliza para determinar un gran número de parámetros biológicos que se encuentran en concentraciones muy bajas.

### EJERCICIO PRÁCTICO

#### Cuantificación de Aldosterona en suero y orina

La Aldosterona es la principal hormona mineralo-corticoide en el hombre. Tiene un peso molecular de 360.4. Sintetizada en la zona glomerular y en las suprarrenales, controla la regulación del metabolismo hidromineral. Su secreción depende de numerosos factores, en especial del sistema renina-angiotensina.

	Rango
Suero o plasma: Posición ortostática	50-225 pg/mL
Decúbito supino	8-150 pg/mL
Orina 24h	3-20µg/24h

## EJERCICIO PRÁCTICO

### DETERMINACIÓN DE ALDOSTERONA POR RIA

Muestras : Suero y Orina

Tratamiento de las muestras:

Muestra de suero: Refrigerar a 2-8°C si se utiliza dentro de las 24h. o congelar a -20°C si se tarda más tiempo en realizar el análisis.

Muestra de Orina: Recoger orina de 24h y medir la diuresis. Mezclar y tomar una muestra a la que se le añada 1g de Ác.bórico/100 mL de orina, conservar en nevera de 2-8°C si el análisis se realiza dentro de las 24h o congelar a -20°C para conservar más tiempo.

Hidrólisis de la orina: Mezclar 500 µL de orina con 1mL de HCl 0.1N. Tapar los tubos e incubar a 30±2°C durante 15-20h.

Tubo	Standard 0	Standards,Control o Muestra	Aldosterona- <sup>125</sup> I	
1	200 µL	-----	500 µL	Mezclar
2	200 µL	-----	500 µL	
3	200 µL	-----	500 µL	
4	-----	200 µL Standard 1	500 µL	
5	-----	200 µL Standard 1	500 µL	
6	-----	200 µL Standard 1	500 µL	
7	-----	200 µL Standard 2	500 µL	
8	-----	200 µL Standard 2	500 µL	
9	-----	200 µL Standard 2	500 µL	
10	-----	200 µL Standard 3	500 µL	
11	-----	200 µL Standard 3	500 µL	
12	-----	200 µL Standard 3	500 µL	
13	-----	200 µL Standard 4	500 µL	
14	-----	200 µL Standard 4	500 µL	
15	-----	200 µL Standard 4	500 µL	
16	-----	200 µL Standard 5	500 µL	
17	-----	200 µL Standard 5	500 µL	
18	-----	200 µL Standard 5	500 µL	
19	-----	200 µL Control	500 µL	
20	-----	200 µL Control	500 µL	
21	-----	200 µL Suero	500 µL	
22	-----	200 µL Suero	500 µL	
23	200 µL	10 µL Orina hidrolizada	500 µL	
24	200 µL	10 µL Orina hidrolizada	500 µL	

Contar los tubos

Resultado del conteo:

Tubo	cpm	Media	B/B <sub>0</sub> %	Concentración (pg/mL)
1	24804			0
2	24810			0
3	24800			0
4	20340			30
5	20352			30
6	20346			30
7	18200			71
8	18190			71
9	18170			71
10	13890			195
11	13882			195
12	13886			195
13	9400			530
14	9390			530
15	9397			530
16	5878			1400
17	5875			1400
18	5883			1400
19	16248			
20	16241			
21	9724			
22	9720			
23	18920			
24	18928			

Calcular  $B/B_0 \% = \text{Std (cpm) o Suero(cpm) u Orina(cpm) / Std 0 (cpm)} \times 100$

Representar gráficamente  $B/B_0$  frente a concentración e interpolar el valor de las muestras y el control.

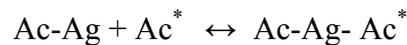
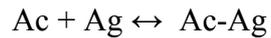
Multiplicar por 63 el valor obtenido en la curva para la orina (factor 3 del hidrolizado multiplicado por el factor 21 de la dilución 210/10).

La concentración de Aldosterona expresada en  $\text{pg/mL} \times \text{mL orina/24h} \times 10^{-6} = \mu\text{g/24h}$

La conversión de  $\mu\text{g}$  de Aldosterona en nmol es:  $1\mu\text{g}=2.77 \text{ nmol}$

## 4.2. ANÁLISIS INMUNORRADIOMÉTRICO (IRMA)

Técnica analítica inmunológica que utiliza un anticuerpo marcado. Un exceso de anticuerpo en fase sólida se hace reaccionar con el antígeno a medir, tras la incubación se elimina el Ag libre y se agrega un anticuerpo radiomarcado en exceso que se unirá a un segundo determinante del Ag. Finalmente se elimina el anticuerpo radiactivo libre y se cuenta la radiactividad del complejo *anticuerpo frío-antígeno-anticuerpo radiactivo*.



Estos análisis, llamados también “en sándwich” son más sensibles que los de competición, pues en teoría se mide todo el antígeno presente en la muestra

### PRÁCTICA A REALIZAR

#### Valoración de Tiroglobulina en suero

Se prepara una serie de concentraciones de Ag estándar, las muestras problema y un control.

Siguiendo el protocolo del kit utilizado se realiza la marcha analítica. Finalizada ésta, se procede al contaje de los tubos estándar. Con los valores obtenidos se realiza la gráfica patrón correspondiente y por interpolación de los contajes de las muestras y el control se determina la concentración de las mismas.

### RESULTADOS