

Determinación de las concentraciones séricas de digoxina por radioinmunoensayo. Valoración y aplicaciones del método analítico

M. Triola*, J. Honorato**, C. Sampol**, D. Martínez Caro*

R E S U M E N

Se analizan las distintas técnicas de laboratorio para la determinación de las concentraciones séricas de digoxina, haciendo hincapié en la técnica del radioinmunoensayo.

Se estudian los inconvenientes y ventajas que presenta esta técnica, analizándose las curvas standard obtenidas en nuestras determinaciones (n=39), viendo que es reproducible en todos los casos con un alto grado de similitud. Se analizan las posibles fuentes de error de esta microtécnica, sugiriendo una modificación en la fase de decantado, con la que ha disminuido el índice de repeticiones en nuestro laboratorio.

Por último, se presentan los criterios de valoración actual de los niveles séricos de digoxina, utilizados en nuestro laboratorio y se apuntan las nuevas vías de investigación farmacológica que permite esta técnica analítica.

INTRODUCCIÓN

Aunque hace ya dos siglos que Withering describió las propiedades que tiene la digital sobre el corazón e incluso sus efectos tóxicos³¹, hasta los últimos cincuenta años, no se habían realizado perfeccionamientos importantes con vistas a un mejor tratamiento digitálico y a una disminución en la frecuencia de aparición de intoxicaciones digitálicas. Estos progresos incluyen la introducción de nuevos glucósidos sintéticos mucho más purificados,

una mejor comprensión de los mecanismos de acción, de sus efectos deseables e indeseables y de su absorción metabolismo y eliminación.

Dentro de estas investigaciones, el uso de glucósidos marcados con radioisótopos, permitió la medición por primera vez de los glucósidos cardíacos tanto en sangre como en distintos tejidos^{10 a 13, 22 y 23}.

Desde entonces, han sido descritos, muchos métodos para la determinación de las concentraciones séricas de digoxina. Los

* Dpto. Cardiovascular y Torácico.

** Dpto. de Farmacología Clínica.

métodos más usados hasta la actualidad han sido:

- 1) Análisis por desplazamiento enzimático de isótopos ⁴.
- 2) La cromatografía de gases ³⁰.
- 3) Por análisis de un derivado de dilución isotópica doble ²¹.
- 4) Por inhibición de la captación de Rb⁸⁶ por los hematíes ¹⁹, ²⁰.
- 5) Por inhibición de la Na-K-ATPasa ⁵.
- 6) Por radioinmunoensayo.

Este último método, fue posible, después de que en 1967 BUTLER ⁷ consiguiera desarrollar anticuerpos antidigoxina en conejos y fueran titulados posteriormente ²⁵. Tras estos trabajos iniciales y utilizando técnicas de radioinmuno-ensayo ya introducidas para la determinación de insulina ³² renina y otras hormonas peptídicas, en 1969 ³ se pudo comenzar a utilizar esta nueva técnica de laboratorio, que ha pasado a ser la más utilizada en la actualidad para la determinación de las concentraciones séricas de digoxina.

La técnica de determinación de digoxina sérica por radioinmunoensayo se basa en una reacción competitiva entre la digoxina sérica y la digoxina radiomarcada respecto a los anticuerpos (figura 1). La cantidad standard de digoxina marcada, unida a

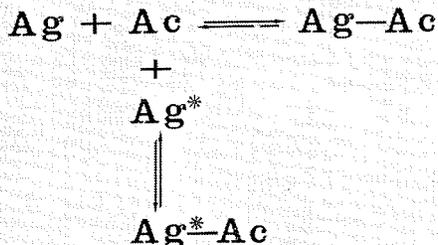


Figura 1.— Reacción competitiva que se produce en el medio de reacción.

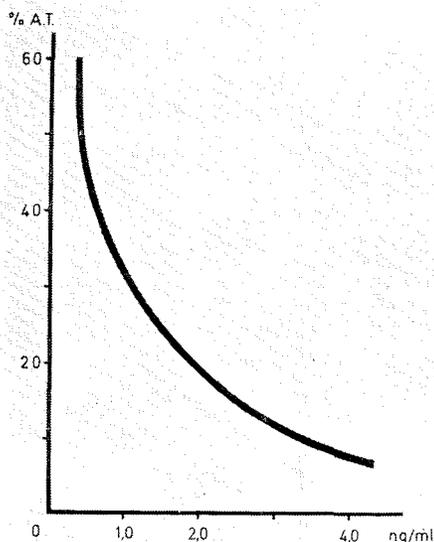


Figura 2.— Curva de la concentración en relación al porcentaje de actividad total supuestos infinitos puntos conocidos.

otros anticuerpos, irá disminuyendo a medida que se produzcan incrementos de digoxina no marcada en el tubo analizado, pudiendo así obtener una curva standard al conocer varias concentraciones de digoxina.

La curva standard que obtendríamos conociendo infinitas concentraciones, sería similar a la representada en la figura 2. En ella vemos que, a medida que aumenta la valor cociente entre la digoxina marcada ligada al anticuerpo y la digoxina marcada libre va disminuyendo. Esta curva es característica para cada laboratorio, dependiendo entre otros factores de la titulación y afinidad de los anticuerpos.

La dificultad y laboriosidad para obtener unos anticuerpos valiosos y su correcta titulación, ha hecho, que fueran preparados por distintos laboratorios químicos, equipos para realizar las determinaciones incluyendo todos los reactivos necesarios.

El propósito de este trabajo es analizar nuestra experiencia con esta nueva técnica analítica, estudiando sus aplicaciones prácticas y los problemas que pueda plantear.

MATERIAL Y MÉTODOS

Desde Junio de 1975 venimos utilizando el «Digoxín I-125 Imusay[®]» preparado por los Laboratorios Abbott, para determinar las concentraciones séricas de digoxina. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas por lo menos cuatro horas después de la administración de la última dosis de digoxina, separando el suero por centrifugación y conservándolo congelado hasta el momento de realizar el análisis.

Todas las determinaciones se han realizado en tubos de un solo uso y por duplicado, utilizando en las manipulaciones mi-

cro pipetas automáticas con puntas desechables de 0,1 y 0,3 ml.

Las determinaciones han sido realizadas siempre por las mismas personas para evitar diferencias en la técnica. La técnica utilizada es la descrita por el laboratorio con una ligera modificación en la fase de decantado. En la figura 3 puede verse un esquema de la técnica utilizada.

En todas las determinaciones, se construyó una curva standard mediante el análisis de los sueros standard suministrados por el laboratorio y con concentraciones conocidas de 0,0; 0,5; 1,0; 2,04; 4,0 monogramos (ng/ml).

El conteo de la radioactividad del precipitado, se realizó con un contador Nuclear Chicago, para radiaciones gamma y durante un minuto cada tubo.

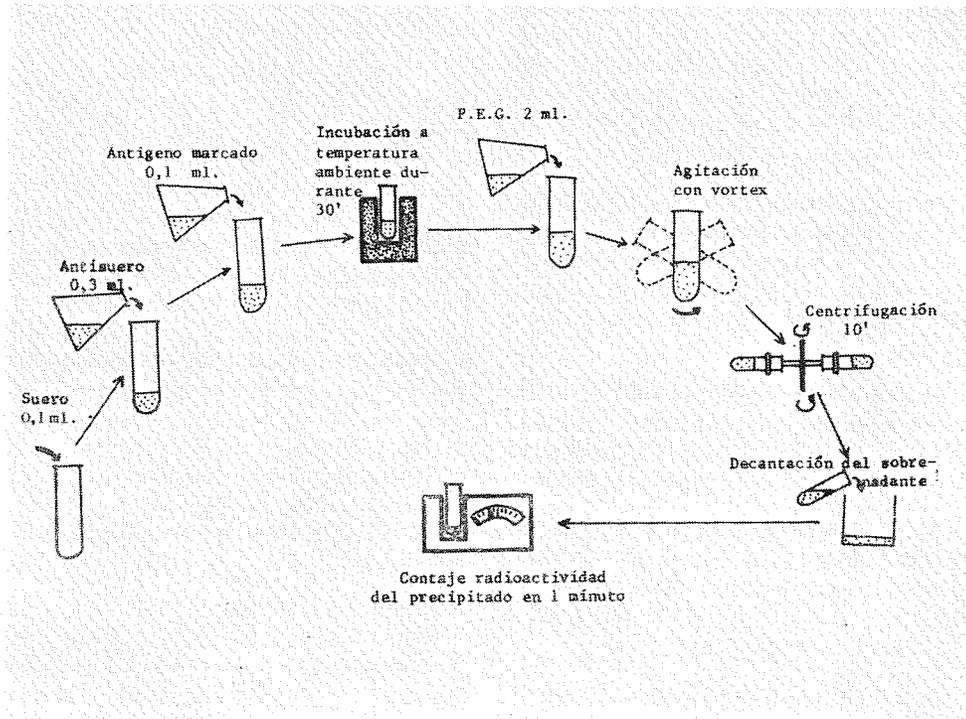


Figura 3.— Esquema mostrando la técnica seguida para la determinación de la digoxinemia.

TABLA I

VALORES MEDIOS DE LAS CURVAS STANDARD

Standard	0'0 ng/ml.	0'5 ng/ml.	1'0 ng/ml.	2'0ng/ml.	4'0 ng/ml
\bar{x}	64'83	56'53	43'71	21'11	11'71
Sx	3'33	4'39	4'69	3'15	1'13
\bar{Sx}	0'53	0'70	0'75	0'50	0'18

RESULTADOS

El análisis de las curvas standard de las 39 determinaciones realizadas no mostró diferencias importantes; expresándose los valores medios del porcentaje de la actividad total para cada punto de la curva standard en la tabla n.º 1. En la figura n.º 4, podemos ver la curva standard media con el error standard de la media.

En las determinaciones 25 a 28 encontramos una pendiente menor entre los puntos 2,0 ng/ml. y 4,0 ng/ml. debido a un fallo en la pipeta, comprobándose que la cantidad analizada era ligeramente superior a 0,1 ml.

Se han debido repetir el 15,3 % de las determinaciones, por encontrar diferencias entre los dos tubos de cada muestra, superiores a un 10 % de la media entre ellos.

Los niveles de digoxina encontrados han sido valorados siempre teniendo en cuenta la edad, el estado de la función renal, la dosis administrada y el tiempo transcurrido desde la última dosis.

En los pacientes que no habían recibido nunca digoxina los niveles séricos encontrados, han sido siempre menores de 0,3 ng/ml. Las intoxicaciones digitálicas estu-

diadas han tenido siempre concentraciones superiores a 2,5 ng/ml. En la mayoría de los pacientes con tratamiento digitálico sostenido y con buena respuesta al tratamiento, hemos encontrado concentraciones entre 1,0 y 2,5 ng/ml.

DISCUSIÓN

Como ya se ha planteado anteriormente, con este trabajo no buscamos los resultados concretos con determinados grupos de pacientes, sino el análisis del método analítico utilizado. Tal como se ha podido observar en la figura 4, la curva standard es reproducible en todas las determinaciones con un alto grado de similitud; lo cual, habla a favor de la validez de este método analítico. De todas formas se trata de una microtécnica analítica y, como nos lo muestra el porcentaje de repeticiones, está sujeta a múltiples fuentes de error que deben ser evitadas.

Estas fuentes de error pueden tener, fundamentalmente, dos orígenes: el operador y la manipulación. Es útil recalcar la importancia de que las determinaciones sean realizadas siempre por los mismos operadores, ya que, así, se lograron evitar diferencias personales de hábito, existiendo,

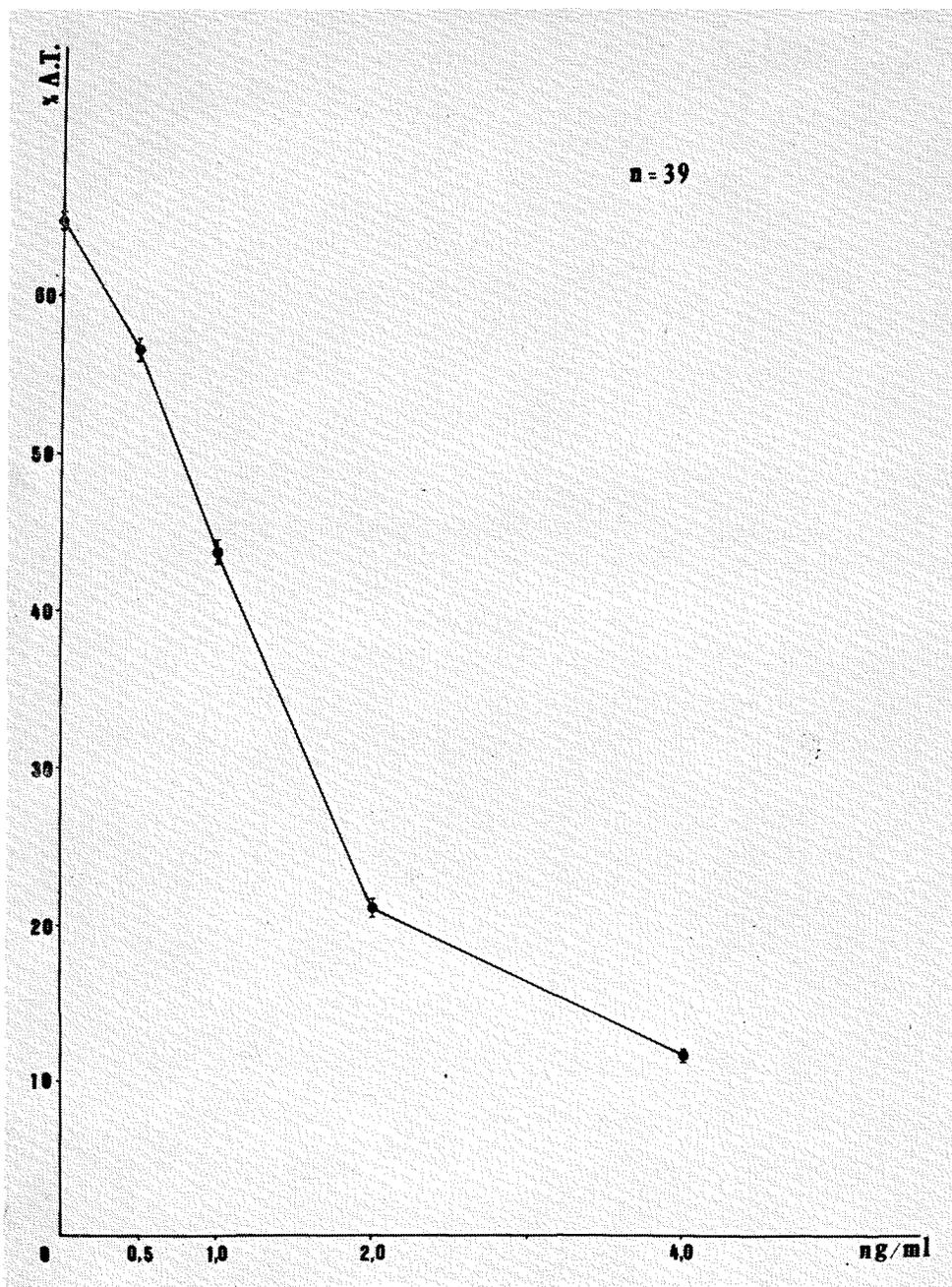


Figura 4.— Representación de los valores medios de los puntos de las curvas standard con el error standard de la media.

TABLA II

FACTORES BAJA CONCENTRACION SERICA

1. DOSIFICACION INSUFICIENTE.
 2. NO TOMAR REGULARMENTE LA MEDICACION.
 3. CONTENIDO POBRE DE LA TABLETA.
 4. INEFICACIA BIOLOGICA DE LA DIGOXINA EN ALGUNOS PREPARACIONES COMERCIALES.
 5. HIPERTIROIDISMO.
 6. SINDROMES MALA ABSORCION.
 7. ALTERACIONES METABOLISMO DIGITAL
 - IDIOPATICAS.
 - FARMACOLOGICAS.
-

además, una mayor seguridad en la perfecta observación de una metódica minuciosa y una atención intensa por el hábito ya adquirido. Las posibles fuentes de error en

la manipulación son diversas y pueden deberse entre otros motivos a deficiencias en las micropipetas, aspirar aire al pipetear, pipeteo incorrecto (en las paredes del tubo),

TABLA III

**VALORACION DE LAS CONCENTRACIONES
SERICAS DE DIGOXINA**

0'3 ng/ml.	NIVELES DESPRECIABLES.
0'3 - 1'0 ng/ml.	" BAJOS.
1'0 - 2'5 ng/ml.*	" TERAPEUTICOS.
2'5 ng/ml.	" POTENCIALMENTE TOXICOS.

* 1'5 - 2'0 ng/ml. niveles de digoxina óptimos.

centrifugación insuficiente, decantado deficiente...

Nosotros, creemos que el decantado simple en un vaso, es una fuente de error no despreciable, pues quedará siempre algo de sobrenadante, que contaminará el precipitado. Para disminuir este posible error, nosotros dejamos escurrir los tubos sobre papel absorbente durante, aproximadamente, medio minuto después del decantado, logrando así una menor contaminación radioactiva del precipitado.

Los criterios que seguimos en la actualidad para la valoración de las concentraciones séricas de digoxina se muestran en la Tabla 2 y son bastante concordantes con las expresadas por otros autores ^{1, 6, 9, 14, 15, 24} y ²⁶ a ²⁸. De todas formas, debe recordarse que las concentraciones séricas

guardan una estrecha relación con el tiempo transcurrido desde la última dosis.

El hallazgo de niveles bajos en pacientes con tratamiento digitalico sostenido, hace necesario el análisis de una serie de posibles factores ^{2, 18}, que se muestran en la tabla 3.

Además de la aplicación mencionada para el control de pacientes digitalizados, esta técnica ha ido adquiriendo importancia en la investigación farmacológica y farmacodinámica de la digoxina y sus derivados, sin tener que recurrir al empleo de digoxina marcada con isótopos radioactivos. En este campo de los estudios farmacológicos, se han llevado a cabo también modificaciones en la técnica, que han permitido la determinación de las concentraciones de digoxina en orina y en distintos tejidos ^{8, 16, 17, 29}.

SUMMARY

The different laboratory technich for the determination of digoxin serum concentrations are analysed. Special emphasis is placed on the radioimmunoassay technic.

The advantages and disadvantages of this technic are studied and the standard curves obtained in our determinations (n = 39) are analysed. It can be seen that they can be reproduced in all cases with a high degree

of similarity. The possible causes of error in this microtechnic are also analysed and a modification in the decanting fase, with which the number of repetitions in our laboratory has decreased, is suggested.

Finally the criteria for the actual evaluation of the seric digoxin levels used in our laboratory are described and new possibilities in pharmacological investigation by this technic are mentioned.

BIBLIOGRAFÍA

1. BELLER G. A., SMITH T. W., ABELMANN W. H., HABER E. y HOOD W. B.: *Digitalis intoxication. A prospective clinical study with serum level correlations.* *New Eng. J. Med.* 284: 989, 1971.
2. BENTLEY J. D., BURNETT G. H., CONLIN R. L. y WASSERBURGER R. H.: *Clinical application of serum digitoxin levels. A simplified plasma determination.* *Circ.* 41: 67, 1970.
3. BERSON S. A. y YALOW R. S.: *Radiounmunoassays of peptide hormones in plasma.* *New Eng. J. Med.* 277: 640, 1967.
4. BROOKER G. y JELLIFFE R. W.: *Serum digoxin levels in toxic and montoxic patients by enzymatic isotope displacement.* *Clin. Res.* 18: 299, 1970.
5. BURNETT G. H. y CONKLIN R. C.: *The enzymatic assay of plasma digitoxin levels.* *J. Lab. Clin. Med.* 71: 1040, 1968.
6. BUTLER V. P.: *Determinación de la digital en sangre.* *Progr. Enf. Cardiovasc.* 12: 634, 1972.
7. BUTLER V. P. y CHEN J. P.: *Digoxin - specific antibodies.* *Proc. Nat. Acad. Scr. U. S. A.* 57: 71, 1967.
8. COLTART J., HOWARD M. y CHAMBERLAIN D.: *Myocardial and strelatal muscle concentrations of digoxin in patients on long - term therapy.* *Brit. Med. J.* 2: 318, 1972.
9. CHAMBERLAIN D. A., WHITE R. J., HOWARD M. R. y SMITH T. W.: *Plasma digoxin concentration un patients with atrial fibrillation.* *Brit. Med. J.* 3: 429, 1970.
10. DOHERTY J. E.: *The clinical pharmacology of digitalis glycosides. A review.* *Amer. J. Med. Sc.* 255: 382, 1968.
11. DOHERTY J. E. y PERKINS W. H.: *Tissue concentration and turnover of triated digoxin in dogs.* *Amer. J. Cardiol.* 17: 47, 1966.
12. DOHERTY J. E., PERKINS W. H. y FLANIGAN W. J.: *The distribution and concentration of trifiated digoxin un farman tissues.* *Ann. Intern. Med.* 66: 116, 1967.
13. DOHERTY J. E., PERKINS W. H. y MITCHELL O. K.S: *Triated digoxin studies in human subjects.* *Arch. Intern. Med.* iChicagoj 108: 531, 1961.
14. EVERED D. C., CHAPMAN C.: *Plasma digoxin y radiounmuno assay.* *Canad. Med. Ass. J.* 105: 170, 1971.
15. EVERED D. C., CHAPMAN C. y HAYTER C. J.: *Measurement of plasma digoxin concentration by radiounmunoassay.* *Brit. Med. J.* 3: 427, 1970.
16. GULLNER H. G., STINSON E. B., HARRISON D. C. y KALMAN S. M.: *Correlation of serum concentrations with heart concentration of digoxin un human subjects.* *Circ. TQS CTA,* 1974.
17. KRASULA R. W., MASTREITER A. R., LEVITSKY S., YANAGI R. y SOYKA L. F.: *Serum, atrial and urinaly digoxin levels during cardiopulmonar y byass un children.* *Circ.* 49: 1047, 1974.
18. CINDENBAUM J., MELLOW M. H., BLACKTONE M. O. y BUTLER V. P.: *Variation in biological a vailability of digoxin from four preparations.* *New. Eng. J. Med.* 285: 1344, 1971.
19. LOWENSTEIN J. M.: *A method for measuring plasma levels of digitals glycosides.* *Circ.* 31: 228, 1965.
20. LOWENSTEIN J. M. y CORRILL E. M.: *An improved method for measuring plasma and tissue concentrations of digitalis glycosides.* *J. Lab. Clin. Med.* 67: 1048, 1966.
21. LUKAS D. S. y PETERSON R. E.: *Double isotope dilution derivate assay of digitoxin in plasma, urine, and stool of patients maintained on the drug.* *J. Clin. Invest.* 45: 782, 1966.
22. MARCUS F. I., KAPADIA G. I. y KAPADIA G.: *The metabolism of digoxin in normal subjects.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 145: 203, 1964.
23. MARCUS F. I., BUKHALTER L., CUCCIAC. PAWLOVICH J. y KAPADIA G. G.: *Administration of triated digoxin with and without a loading dose: A metabolic study.* *Circ.* 34: 865, 1966.
24. OLIVER G. C., PARKER B. M. y PARKER C. W.: *Radiounmunoassay for digoxin. Technic and clinical application.* *Amer. J. Med.* 51: 186, 1971.
25. SMITH T. M. y BUTLER V. P. y HABER E.: *Characterization of high affinity and specificity for the digitalis glycoside digoxin.* *Biochemistry* 9: 33, 1970.
26. SMITH T. W. y HABER E.: *Digoxin intoxication: The relation ship of clinical presentation to serum digoxin concentration.* *J. Clin. Invest.* 49: 2377, 1970.
27. SMITH T. W. y HABER E.: *The current status of cardiac glycoside assay techniques.* In: *Progress in cardiology* Vol. 2: 49. Ed. Lea & Febiger. Londres 1973.
28. SINGH R. B., RAI A. N., DUBE K. P., SRIVASTAU A. K., SOMANI P. N. y KATIYAR B. C.: *Radiounmunoassay of serum digoxin in relation to digoxin intoxication.* *Brid. Heart. J.* 37: 619, 1975.
29. STEINESS E.: *Renal Tubular secretion of digoxin.* *Circ.* 50: 108, 1974.
30. WATSON E. y KALMAR S. M.: *Assay of digoxin in plasma by gas chromatography.* *J. Chromatog.* 56: 209, 1971.
31. WHITHERING W.: *An account of the fox-glove and some of its medical uses, with practical remartis on drops y and other diseases.* *Med. Classics.* 2: 295, 1937.
32. YALOW R. S. y BERSON S. A.: *Immunoassay of plasma insulin.* *Meth. Biochem. Anal.* 12: 69, 1964.