

CAPÍTULO 4

Técnicas Analíticas

4.1 INTRODUCCIÓN

Históricamente, el desarrollo de nuevos métodos analíticos ha dependido de la aparición de nuevas tecnologías y de su introducción en el laboratorio clínico. Así, por ejemplo, los primeros métodos desarrollados fueron los gravimétricos, que surgieron al aparecer las primeras balanzas con el suficiente grado de exactitud. Con posterioridad, el empleo de una cristalería bien calibrada hizo posible la aparición y difusión de los métodos volumétricos, que ofrecían más posibilidades desde el punto de vista de su aplicación práctica. La invención del fotómetro, a finales del siglo XIX, significó un extraordinario avance al permitir la introducción de métodos basados en la absorción de la luz por una sustancia coloreada, o la detección del grado de dispersión de ésta, al pasar por una suspensión turbia. La aparición en el transcurso del siglo XX, de equipos que permiten la separación selectiva de los componentes de una muestra, como es el caso de la cromatografía y la electroforesis, la introducción de los electrodos para medición electrométrica, el desarrollo de los procedimientos de inmunoanálisis, y la entrada de los analizadores químicos y hematológicos, así como la automatización de casi todos los procesos del laboratorio (con la excepción de la toma de muestras), son algunos ejemplos del incesante desarrollo de la tecnología aplicada al diagnóstico clínico. El objetivo de este capítulo es dar a conocer los fundamentos técnicos en los que se basan los principales métodos de análisis del laboratorio, a partir de los cuales, con la ayuda de la robótica y de la informática, han surgido los autoanalizadores actuales. En la parte final de este capítulo se presentan los principales sistemas de automatización en un laboratorio moderno.

En el laboratorio proyectado hay una cartera de servicios en la que se pueden desarrollar más de 600 técnicas analíticas, estando la gran mayoría de ellas fundamentadas en los métodos y técnicas que se desarrollan en este capítulo.

4.2 FOTOMETRÍA Y ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN

Principios generales

La absorción y emisión de energía en el espectro electromagnético tiene lugar en “paquetes” separados de fotones. Se puede representar la energía radiante como una sucesión de ondas. La longitud de éstas permite dividir el espectro electromagnético en regiones.

Rayos gamma < 0,1 nm	Infrarrojo 800 nm – 0.4 mm
Rayos X 0.1 - 100 nm	Microondas 0.4 mm - 25 cm
Ultravioleta 100 - 400 nm	Ondas de radio > 25 cm
Visible 400 - 800 nm	

Tabla 1: Espectro electromagnético

La intensidad de poder radiante es proporcional al número de fotones por segundo que son propagados por el rayo. Un haz que posee radiación de una única longitud de onda, se denomina monocromático; si contiene radiación de varias longitudes, se denomina policromático. Como se puede observar en el cuadro presentado antes, la luz visible representa solo una parte muy pequeña del espectro electromagnético.

Si un haz de energía radiante incide sobre una sustancia, puede suceder que:

1. La atraviese casi sin pérdida de energía.
2. La dirección de propagación se altere por reflexión, refracción o difracción.
3. La energía sea absorbida total o parcialmente (transferencia de energía al medio).

Dos leyes fundamentales rigen la práctica de la fotometría: la ley de Lambert, que establece que la disminución del poder radiante de un haz de luz monocromática que pasa a través de un medio absorbente, es proporcional al poder radiante del haz, y la ley

de Beer, que establece que la energía radiante de un haz de luz monocromática disminuye en proporción directa con el incremento de la concentración de la sustancia absorbente. El principio básico de casi todos los métodos basados en la ley de Lambert-Beer, consiste en la comparación de la absorción o la transmitancia de energía radiante (a una longitud de onda determinada, por una solución que se ha de investigar), con uno o varios calibradores (soluciones de la concentración conocida del analito).

Componentes básicos

Los componentes básicos de un equipo de medición de absorción, son los siguientes:

1. Fuente de energía radiante. Se emplean lámparas de Wolframio (W), xenón (Xe), argón (Hg), o deuterio (D₂).
2. Selector de banda. Pueden ser filtros de absorción o de interferencia, prismas o red de difracción.
3. Detector. Una fotocelda, un fototubo o un fotomultiplicador, en dependencia del equipo.
4. Elementos asociados. Tales como lentes, espejos, diafragmas y cubetas para las muestras.
5. Galvanómetro.

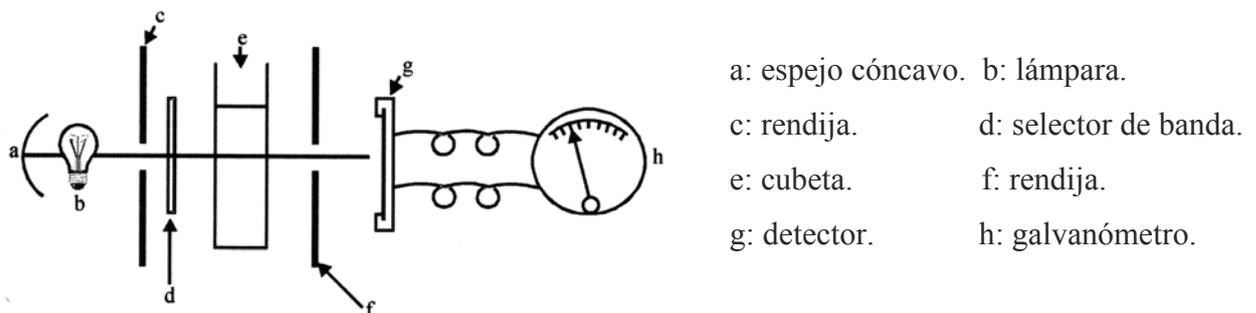


Figura 15: Componentes básicos de un equipo de medición de absorción de la luz (espectrofotómetro o colorímetro).

La función de la fuente de luz es iluminar con la intensidad requerida. Para trabajar en la zona visible, se emplea la lámpara de Wolframio. Para la zona ultravioleta, se utiliza la de deuterio, mientras que cuando se requieren elevados niveles de iluminación, son necesarias las de arco de xenón o de vapor de Hg. Éstas se calientan y requieren un aislamiento térmico, además su vida útil es corta.

Los dispositivos para la dispersión de la luz limitan la longitud de onda de la que incide sobre la muestra, a la banda en que se produce la absorción. Los filtros se construyen de gelatina, líquido o cristal coloreados y el ancho de banda seleccionado es de 40 a 50 nm. Con los filtros de interferencia (un espaciador dieléctrico transparente colocado entre películas semitransparentes de argón) se obtienen bandas más estrechas de 10 a 15 nm. Por su parte, los prismas dispersan la luz policromática según su índice de refracción, y seleccionan una longitud de onda determinada. El poder dispersante de un prisma es proporcional al grosor de su base. La red o rejilla consiste en una serie de muescas o canales paralelos, alineados en breves intervalos (hasta 10000 en 1 cm) sobre una superficie muy pulida (aluminio, por ejemplo), con ello se logra una selección en un margen estrecho de la longitud de onda deseada.

El detector es el encargado de transformar la energía radiante en energía eléctrica, que será registrada por el galvanómetro. La fotocelda es una placa de metal sobre la cual se deposita una fina capa de un semiconductor. Éste, a su vez, está cubierto con una capa de plata que actúa como electrodo colector, en la interfase se generan los electrones que fluyen hacia el galvanómetro. El fototubo posee un electrodo negativo similar al descrito y un ánodo que lo enmarca, sellados en un tubo al vacío. El más sensible y de más rápida respuesta es el fotomultiplicador, que combina la emisión fotocatódica con la amplificación en cascada de los electrones emitidos.

Se denominan fotolorímetros a los equipos que emplean filtros para la dispersión de la luz, y espectrofotómetros los que poseen para ese fin un prisma o una red de difracción. Los primeros no se utilizan en la zona ultravioleta del espectro. Su fuente de luz es la lámpara de wolframio. El detector es una fotocelda y las cubetas pueden ser de vidrio o plásticas. Los espectrofotómetros por lo general cubren el rayo ultravioleta cercano y por lo tanto requieren, además de la lámpara de wolframio, una de deuterio y cubetas de cuarzo (el vidrio y el plástico absorben la radiación ultravioleta).

La luz se amplifica con espejos y el detector es un fototubo o un fotomultiplicador. En la actualidad se fabrican equipos de doble haz, en los cuales la radiación original es separada en dos haces, por medio de una combinación de espejos y rendijas, e incide por separado sobre la muestra y la solución de referencia.

4.3 TURBIDIMETRÍA Y NEFELOMETRÍA

Cuando un haz de luz golpea una partícula en suspensión, una parte de la luz es reflejada, otra absorbida, otra desviada y el resto es transmitida. La turbidimetría mide la reducción de la intensidad de la luz en su paso a través de una suspensión, a causa de las partículas presentes en ésta, y cuantifica la luz residual transmitida. La nefelometría mide la luz desviada en diversos ángulos (entre 15° y 90°) por las partículas presentes en esta suspensión.

La sensibilidad de la turbidimetría está limitada por la exactitud y sensibilidad del instrumento utilizado para la medición, y depende de la capacidad del detector para registrar pequeños cambios en la intensidad de la luz. Las lecturas realizadas en longitudes de onda bajas, en un espectrofotómetro de buena calidad, permiten obtener buenos resultados.

Para la nefelometría es necesario emplear un equipo con características específicas, que recibe el nombre de nefelómetro. Sus componentes básicos son:

1. Fuente de luz: los modelos más antiguos empleaban la lámpara de wolframio. En la actualidad se usan lámparas de arco de mercurio (Hg), diodos emisores o láser de helio-neón, de baja potencia.
2. Sistema colimador (innecesario con la lámpara de láser), cuya función es la de concentrar el rayo de luz en haces paralelos.
3. Selector de longitud de onda.
4. Cubeta de medición.
5. Detector (fotomultiplicador).

6. Galvanómetro.

Los primeros equipos de este tipo efectuaban la medición de la luz en un ángulo de 90°, pero hoy se prefiere trabajar con la detección en ángulo más pequeño, lo cual confiere una mayor sensibilidad.

4.4 FLUORIMETRÍA

El fenómeno de la fluorescencia consiste en la propiedad de algunas sustancias de absorber la radiación electromagnética en una longitud de onda (espectro de excitación), y de emitirla de inmediato (en forma de fotones) en otra (espectro de emisión). El espectro de emisión constituye una característica intrínseca de cada sustancia, y la intensidad de emisión es proporcional a la concentración de la sustancia. Los equipos para la medición de la fluorescencia se denominan fluorímetros. En general, el patrón de construcción es el siguiente:

1. Lámpara de arco de mercurio (Hg) o xenón (Xe).
2. Lente de cuarzo o de vidrio.
3. Rendija.
4. Filtro primario (longitud de onda de excitación).
5. Cubeta para la muestra.
6. Filtro secundario (longitud de onda de emisión).
7. Fotomultiplicador.
8. Galvanómetro.

En línea recta con la lámpara, el filtro primario, y la cubeta, se sitúa una superficie de absorción de luz. El detector y el filtro secundario están en una línea que forma un ángulo con la anterior.

4.5 REFLECTOMETRÍA

Vinculado con la llamada química seca, este método analítico permite medir, por reflexión de la luz en una determinada longitud de onda, los cambios en la intensidad de coloración de una tira. La incorporación de un microprocesador al equipo, permite simplificar en grado sumo e incluso omitir, muchos pasos en el procedimiento operativo y en la calibración. La facilidad de operación de los instrumentos de este tipo, unida al pequeño espacio requerido para el almacenamiento de las tiras reactivas, y al hecho de que la calibración del equipo es estable por largo tiempo, hace que este método se considere ideal en el laboratorio.

Estructura y principios de funcionamiento de una tira de química seca

La química seca se basa en la estabilización de los componentes de la reacción necesarios para el análisis (indicadores, enzimas y reactivos auxiliares), por pretratamiento y secado de las respectivas soluciones, en papel de filtro, fijado a su vez sobre una tira de material sintético. Estos dispositivos se emplean desde hace décadas para el análisis cualitativo de muestras de orina, pero en el último cuarto del siglo XX se amplió de manera considerable su uso para la cuantificación de diversos analitos en muestras biológicas, por reflectometría.

Los componentes estructurales de la tira son: un soporte de material sintético con un código magnético en un extremo, sobre el soporte del material sintético, un material de transporte del plasma, una serie de capas que contienen material separador (por lo general, fibra de vidrio) y reactivos, recubierto todo con una capa protectora. La muestra de sangre es depositada sobre el material separador, que retiene los eritrocitos y permite la difusión del plasma hacia el material de transporte. De aquí, asciende por capilaridad a través de las capas embebidas con los reactivos, en las cuales se lleva a cabo la reacción. Los tiempos de preincubación y de reacción, así como la temperatura necesaria, son controlados por el equipo. Algunos sistemas poseen dos compartimientos en la tira, uno para la muestra, y otro para un calibrador acuoso.

Principios de funcionamiento del reflectómetro

El corazón del reflectómetro está constituido por la llamada esfera de Ulbricht, la cual contiene una fuente de emisión de luz en una determinada longitud de onda, constituida en algunos sistemas por un diodo y en otros, por una lámpara de arco de xenón. El rayo emitido incide sobre el área de lectura de la tira y es reflejado por ésta. Los detectores comparan la intensidad de la luz emitida por el diodo emisor con la de la luz reflejada. Mientras mayor sea esta última, menor será la concentración del analito. Algunos sistemas solo pueden realizar determinaciones colorimétricas, mientras que otros pueden llevar a cabo análisis enzimáticos.

Toda la información que el equipo requiere, está contenida en el código magnético de la tira: identificación del analito, duración de la fase de preincubación y de reacción, longitud de onda requerida, número de mediciones e intervalo entre ellas, cálculo de los resultados y factores de conversión.

4.6 POTENCIOMETRÍA

La potenciometría consiste en medir la diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en una solución, bajo condiciones de corriente cero. Uno de los electrodos es sensible al componente que se pretende medir, y responde a los cambios de actividad de éste en la solución (electrodo indicador). El otro posee un potencial que es independiente de la composición de la solución, y que por lo tanto, permanece inalterado (electrodo de referencia).

Las principales aplicaciones al trabajo habitual del laboratorio clínico son los equipos medidores de pH (para la preparación de soluciones tampón, por ejemplo), los electrodos para la medición del pH y de la pCO₂ de los equipos analizadores de gases en sangre, y los electrodos ion-selectivo (ISE). En el caso de estos últimos, la respuesta de la celda electroquímica se basa en la interacción entre una membrana selectiva, y el analito que altera el potencial de esta. La selectividad, por lo tanto, depende de la especificidad de la membrana.

4.7 MICROSCOPIA ÓPTICA

El microscopio de luz consta, en esencia, de dos sistemas de lentes separados (el objetivo y el ocular), un sistema de condensador, una platina y una fuente de luz. El aumento total es igual al cociente de los aumentos obtenidos con cada uno de ambos sistemas de lentes. La imagen que llega al ojo (imagen virtual) se ve invertida.

Se conoce como apertura numérica, la cantidad de luz que entra al objetivo a través del campo microscópico o al condensador procedente de la fuente de luz, es constante para cada lente, y depende del radio y de la longitud focal de la lente. En la práctica deben ser iguales las aperturas numéricas del objetivo y del condensador. Si se coloca aceite entre el objetivo y la preparación, la velocidad de la luz disminuye y se incrementa la apertura numérica. El poder resolutivo o límite útil de aumento, está dado por la capacidad de las lentes a determinado aumento de distinguir entre dos objetos separados, y revelar detalles finos. Es decir, es directamente proporcional a la apertura numérica. Los componentes básicos del microscopio de luz son:

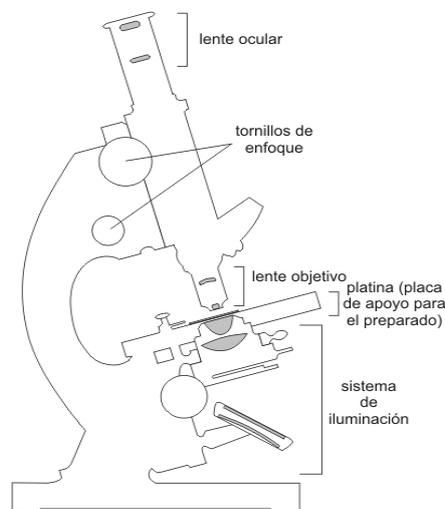


Figura 16: Componentes del microscopio de luz.

4.8 EQUIPOS DE FRACCIONAMIENTO O SEPARACIÓN

Los métodos de fraccionamiento se emplean cada vez con mayor amplitud en el laboratorio clínico, tanto en el trabajo asistencial como en la investigación. En general, se aprovechan determinados fenómenos físicos para separar distintos componentes

presentes en las muestras: la migración en un campo eléctrico en el caso de la electroforesis, la adsorción o diferencia de afinidad en el caso de la cromatografía. Esta última no estará implantada en el laboratorio diseñado, por lo que no es objeto de estudio.

Electroforesis

Se entiende por electroforesis, la migración de una partícula cargada, en un medio a través del cual circula una fuerza electromotriz. En el caso de las proteínas, es necesario tener en cuenta el pH del medio, pues a determinado valor de este, no tiene lugar la migración. Este valor de pH recibe el nombre de punto isoeléctrico, y varía de una proteína a otra. La intensidad de la fuerza electromotriz es otro factor crítico a tener en cuenta. La corriente debe ser directa o continua (no alterna), y se puede trabajar a un voltaje o amperaje constantes. El equipo empleado para lograr la conversión de corriente alterna en corriente continua recibe el nombre de fuente rectificadora o fuente de poder. El factor tiempo, es decir, la duración de la corrida electroforética, se estandariza en dependencia de la técnica y del equipo empleado.

La electroforesis que más se emplea en el laboratorio clínico (conocida como electroforesis de zona) tiene lugar en una cubeta que contiene una solución tampón, y se emplean diversos soportes como el papel de filtro, el acetato de celulosa, los geles de agar, de almidón y de poliacrilamida. El papel de filtro fue en otros tiempos el más difundido, pero se reveló insuficiente para un fraccionamiento más fino del conglomerado proteico, por lo que debió ser sustituido por sistemas físico-químicos como los geles, que actúan como filtros moleculares. Además, la migración en papel se encuentra sometida a factores tales como: evaporación, capilaridad, acción del potencial, trama y calidad del papel. Casi todos estos factores se obvian con el empleo del acetato de celulosa, mientras que los geles permiten lograr fraccionamientos con una excelente resolución y separación en un tiempo muy corto, además del ya mencionado efecto de tamiz molecular. La electroforesis en gel de poliacrilamida permite aumentar el fraccionamiento de mezclas proteicas, y combinar el fenómeno de la migración con el de ultrafiltración molecular al poder obtener geles sintéticos con trama de poro efectivo que puede ser ajustada a voluntad. La corrida se efectúa en tubos o placas de gel ubicados de manera vertical. La muestra se introduce en la zona de poro grande, se concentra en la

zona intermedia, y se separa en la zona de poro fino por la acción del tamiz molecular. En la preparación de la solución tampón, se diferencian un ion rápido (con movilidad mayor que la de cualquier proteína), y un ion de arrastre (con movilidad inferior a cualquiera de estas). Con ello se logra un gradiente de voltaje y uno de pH (González, 2004).

La valoración de la intensidad de color sobre la tira del proteinograma, sin destrucción de éste, se logra empleando el densitómetro, que mide por transparencia o por reflexión la intensidad de la zona coloreada. El aparato está constituido por una fotocelda a la que llega un haz de luz proveniente de una fuente luminosa, que es delimitada antes por un colimador. Su paso a través de la tira determina la absorción de luz en relación proporcional con la cantidad de colorante fijado a la proteína, lo que se expresa de manera gráfica en una curva. En la actualidad, se cuenta con densitómetros de rayos láser, acoplados a microprocesadores o a una computadora con programas de aplicación específicos.

4.9 CENTRIFUGACIÓN

La centrífuga es un instrumento empleado para separar componentes de una suspensión, aplicando la fuerza gravitacional incrementada por rotación rápida de la muestra (fuerza centrífuga). El esquema de construcción es sencillo: un motor que hace girar un eje al cual se fijan los brazos en número variable, en el extremo de estos brazos se encuentran los cabezales que soportan a los portatubos. La centrífuga puede ser de cabezal fijo (formando un ángulo con el brazo) o de cabezal colgante, que al girar hace que el tubo quede horizontal en relación con este. En general, el sistema de cabezal fijo alcanza mayor velocidad de rotación, la cual se mide en revoluciones por minuto (rpm). La velocidad de la centrífuga debe ser controlada con una frecuencia trimestral, al igual que el tiempo, pues constituye un índice de deterioro del equipo, además de que puede ser una fuente de error. Para este control, se emplea un tacómetro eléctrico o uno de agua (menos preciso). Es imprescindible para la prolongación de la vida útil del equipo, balancear los tubos que se colocan en su interior. Algunos modelos modernos están programados para no funcionar si existe un mínimo desbalance.

Determinación de la fuerza centrífuga relativa (FCR)

Los parámetros que se deben tener en cuenta para centrifugar una muestra son la velocidad y el tiempo de duración del proceso. Resulta más objetivo hablar de fuerza centrífuga relativa, porque existen muchos modelos y tamaños distintos en el mercado.

La ecuación para obtenerla es:

$$FCR = (1,119 \times 10^{-5}) \cdot (\text{rpm})^2 \cdot r$$

Donde r es la distancia en centímetros, desde el eje hasta la mitad del tubo en posición de giro. Y (rpm) es la velocidad de giro de la centrifuga.

Existe una amplia variedad de modelos de centrifugas de uso común. En el laboratorio de análisis clínicos su principal uso es la separación del suero o del plasma de los elementos formes de la sangre, o para cualquier otro tipo de separación preparativa.

4.10 FLUORESCENCIA

La fluorescencia es una variante muy particular de los inmunoensayos que, por su gran especificidad, sensibilidad, y la introducción de tecnologías automatizadas, ha alcanzado un alto grado de desarrollo. Esta técnica se basa, como su nombre lo indica, en la utilización de sustancias que son capaces de absorber energía luminosa y emitirla a otra longitud de onda (fluorescencia). Su principal desventaja es que muchos otros compuestos presentes en el suero son capaces de emitir fluorescencia, como la bilirrubina y algunas proteínas. Por esta razón se han desarrollado tecnologías basadas en lo que se ha denominado fluorescencia de tiempo prolongado.

Las variantes más extendidas de esta técnica son:

Ensayo inmunofluorescente (FIA). La sustancia fluorescente es un quelato de Europio o de alguna otra tierra rara, cuya cualidad permite recibir el haz de luz y emitir la fluorescencia durante un tiempo 800 veces más prolongado.

Ensayo de inmunofluorescencia polarizada (FPIA). El haz de luz atraviesa un prisma que no permite pasar más que una longitud de onda, por lo cual el rayo de luz emergente es unidireccional.

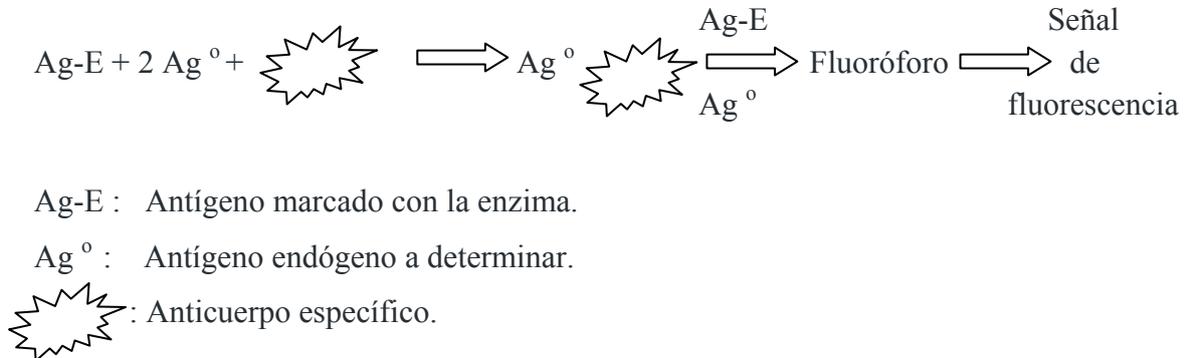


Figura 17: Reacción básica de los métodos fluorescentes.

Las aplicaciones son las mismas de los inmunoensayos mencionados hasta ahora, es decir, para la medición de sustancias en pequeñas concentraciones. Es importante notar que se han desarrollado numerosos fluoroinmunoensayos para la detección de drogas, medicamentos y otras moléculas pequeñas.

4.11 LUMINISCENCIA

Los ensayos luminiscentes (LIA) han sido muy usados. La diferencia con los métodos anteriores radica en que la señal es emitida por sustancias luminosas, las cuales se miden fácilmente en un luminómetro. Al inicio de estos ensayos fueron usadas sustancias naturales, que utilizaban células de insectos que poseían el sistema luciferinaluciferasa, por eso se les denominó ensayos bioluminiscentes.

Las reacciones básicas en los ensayos de luminiscencia son:

Fluoróforos	Método
Quelatos de Europio	DELFIA
Quelatos de Terbio	SLFIA
Fluorescencia	FIA
Ficoeritrinas	FIA

Las variantes más extendidas son las quimiluminiscencias, en las que la señal luminosa se emite por una reacción química. Las más usadas son:

Quimiluminiscencia intensificada. El haz luminoso tiene tal poder, que una pequeña exposición de este es posible medirla de manera adecuada.

Quimiluminiscencia amplificada. Similar a la anterior, solo que, en lugar de intensidad de la señal luminosa, se utiliza la ampliación de esta, y puede ser medida durante más tiempo o varias veces.

Electroquimioluminiscencia. Se basa en que la quimiluminiscencia emitida es producida por un salto electrónico en la cámara de reacción. Véase la siguiente figura.

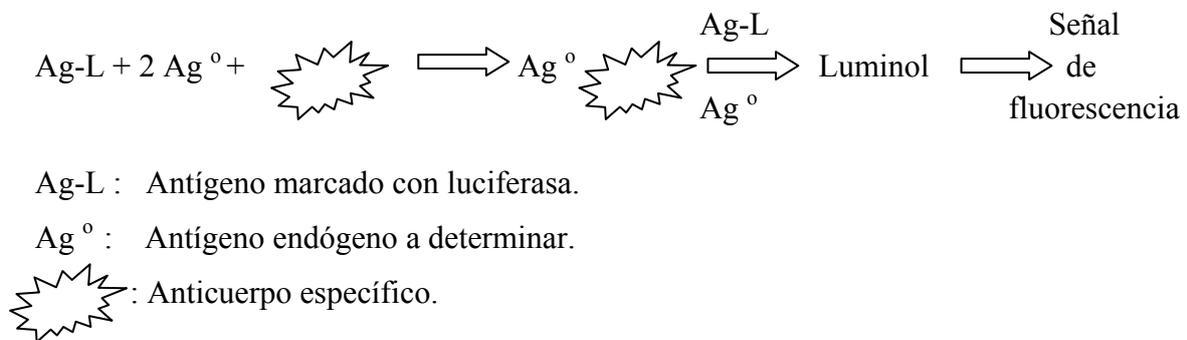


Figura 18: Reacción básica de los métodos luminiscentes.

4.12 AUTOMATIZACIÓN DEL LABORATORIO

La automatización del laboratorio clínico en los últimos treinta años puede calificarse de explosiva. Las nuevas aplicaciones de técnicas ya conocidas, y la incorporación de la informática y la robótica, han invadido todos los campos diagnósticos que conforman el actual laboratorio clínico multidisciplinario. Por citar solo un ejemplo, los autoanalizadores, en cualquiera de sus variantes y diseños, han llevado los valores de precisión y exactitud a límites que jamás habrían sido alcanzados si se trabajara sin este desarrollo tecnológico. A esto se une el aumento de la productividad y la disminución, a corto y medio plazo, de los costos. La automatización en el laboratorio clínico se refiere a los procesos analíticos que son realizados por equipos, con la menor participación posible del ser humano. Muchas tecnologías

desarrolladas en los últimos treinta años tuvieron como resultado la aparición de una generación de sistemas analíticos en los cuales el instrumento, su funcionamiento, y los reactivos constituyen una unidad funcional. Las operaciones realizadas por los analistas pasaron a ser ejecutadas por el sistema. Este desarrollo tecnológico en el campo del diagnóstico por parte del laboratorio clínico tiene en la actualidad más fuerza que nunca.

Analizadores químicos

La historia de la automatización en los laboratorios comenzó en los primeros años de la década del 50 del siglo XX, cuando Leonard Skeggs, bioquímico de la Western Reserve University en Cleveland, Ohio, se dio a la tarea de encontrar una solución al aumento en la carga de trabajo, unida a la escasez de personal cualificado, que tuvo que enfrentar los laboratorios. Las causas de tal aumento fueron las siguientes:

- Aumento de la población después de la II Guerra Mundial.
- Nuevas tecnologías de la era espacial.
- Expansión de los programas de construcción de hospitales de gran tamaño: con más de 1000 camas.
- Disposición de un mayor número de pruebas diagnósticas.

Después de algunos años de intenso trabajo, Skeggs logró alcanzar la meta que se había propuesto y presentó su protocolo a varias compañías. La producción comenzó en el año 1954. Había surgido el primer analizador y tenía el mérito de ser un producto de origen químico-clínico, no había sido tomado de ninguna otra disciplina. Sin estos equipos no hubiera sido posible, ni imaginarse siquiera, enfrentar la carga de trabajo de los laboratorios actuales, obligados a prestar servicio en hospitales de 1000 camas o más, y a atender también a los pacientes ambulatorios de territorios extensos.

Los primeros analizadores que aparecieron en el mercado fueron los de flujo continuo. En este tipo de analizador, las muestras se desplazaban una detrás de otra, separadas por burbujas de aire en el interior de pequeñas mangueras flexibles (± 3 mm de diámetro). Durante su recorrido, las proteínas presentes se eliminaban (diálisis) y

también era posible la incubación, al pasar las mangueras por un baño María con la temperatura requerida. Los analizadores continuos alcanzaron una gran capacidad de procesamiento de muestras (750 muestras/h), y eran capaces de realizar en cada muestra más de 15 determinaciones. A pesar de haber constituido un importante paso de avance, este tipo de analizador tenía algunos inconvenientes que condujeron a que no se continuara su fabricación. Entre ellos destacaban:

Arrastre. Se trata de la contaminación que produce una muestra con valor elevado de un componente, sobre la que le sigue. Una muestra hiperglicémica contamina a la siguiente normoglicémica. Esto ocurría para todos los componentes que se determinaban en el analizador.

Selectividad. Un analizador es selectivo cuando el operador tiene la posibilidad de programarle al equipo qué análisis debe realizar a cada una de las muestras. Estos equipos carecían de selectividad.

Cinética enzimática. Las determinaciones enzimáticas requieren una o más lecturas fotométricas en períodos determinados. Estos analizadores no eran capaces de realizar este tipo de reacción.

A estos inconvenientes se sumaban los frecuentes desperfectos mecánicos de las bombas peristálticas que le imprimían movimiento a las muestras en el interior de las mangueras.

Años más tarde (1975), apareció en el mercado una versión más depurada de los analizadores químicos. Conocidos como analizadores discontinuos, desde el punto de vista metodológico imitan las etapas de los análisis que eran realizados de forma manual. Por ejemplo, la pipeta de muestras aspira la cantidad de muestra requerida tantas veces como determinaciones tenga indicadas el paciente, y la deposita en cubetas de reacción independientes. Ninguna muestra entra en contacto con la siguiente y esto los identifica como analizadores discretos. Son discontinuos porque las muestras y reactivos no viajan uno detrás de otros por el interior de las mangueras. A estas características se suman las siguientes:

- No existe arrastre (muestras y reactivos independientes).

- Son selectivos. El operador programa los análisis que se le hacen a cada muestra, por medio del teclado de una computadora.
- Los desperfectos mecánicos no son frecuentes.

Por la importancia que tiene la selectividad en los analizadores químicos, es necesario detenerse en esta propiedad. Los analizadores de flujo continuo, por razones de diseño, impedían que el usuario pudiera seleccionar los análisis que se le iban a realizar a cada muestra. Esto originó serios problemas de carácter ético y económico. Como el equipo le realizaba a todas las muestras el total de análisis que tenía diseñados, a todos los pacientes se les realizaban determinaciones que no habían sido indicadas por el médico de asistencia y que carecían de interés clínico en muchos pacientes. Ello trajo como consecuencia:

- La creación de los perfiles de análisis no justificados, pues obedecían a exigencias del analizador y no tenían en cuenta el interés clínico-diagnóstico.
- Diagnósticos que no obedecían a un cuadro clínico, sino al valor elevado de un componente que no era de interés clínico en ese paciente, pero que solo por estar elevado obligaba a averiguar la causa de esa elevación.
- La elevación de los costos por el gasto que implicaba el empleo de reactivos costosos en determinaciones que no eran necesarias.
- La prolongación del estadió hospitalario.

Los analizadores químicos –discontinuos y discretos– utilizan reactivos líquidos que se colocan en un área determinada, por lo general refrigerada (de 4 a 8 °C) y envasados en frascos de polietileno suministrados por el fabricante. A esto se refiere cuando se dice que el analizador utiliza el sistema de química húmeda (*wet chemistry*) para diferenciarse de otro grupo de analizadores que utilizan la química seca (*dry chemistry*). En los primeros, los reactivos en estado líquido se vierten sobre las muestras. En los segundos, la muestra se vierte sobre un soporte constituido por varias capas fotográficas (de 3 a 6), impregnadas de reactivos (González, 2004).

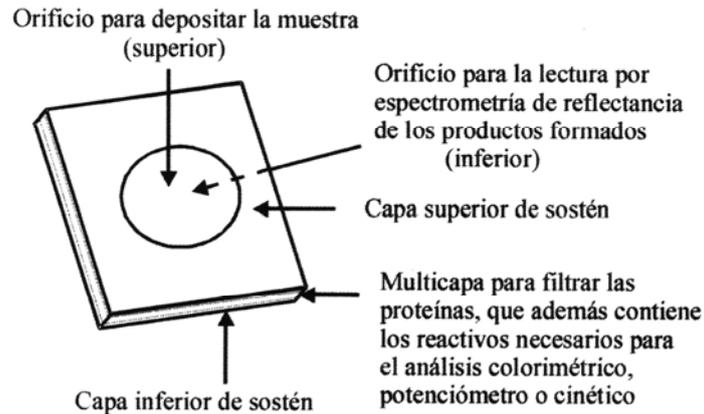


Figura 19: Representación del soporte para una muestra en analizador de química seca.

Los resultados de la automatización de las técnicas en el laboratorio clínico, son muy importantes en cuanto aumento de la calidad y disminución de los costos. El acortamiento en los tiempos de entrega de los resultados y la fusión de distintos sistemas automatizados, están favoreciendo de forma decisiva la atención médica.

La versatilidad del equipamiento automático se debe en gran medida al desarrollo de la informática y de otras tecnologías:

- Aplicaciones de diferentes medidas para el aseguramiento de la calidad.
- Uso de métodos fotométricos, fluorimétricos, quimioluminiscentes, electroquímicos y de la fotometría de reflectancia.
- La posibilidad de incorporar la inteligencia artificial y, por esta vía, brindar información sobre el funcionamiento del equipo. Siendo capaz de seleccionar los resultados y de transferirlos a una red de procesadores, para que estén a la disposición de los médicos de cada una de las estaciones terminales cercanas o distantes.
- Los microprocesadores que, entre sus múltiples funciones, le permiten al equipo la adquisición de datos, su organización y exposición al operador en la pantalla (monitor o display), así como interactuar con él por medio del teclado. Estos equipos (es decir, los microprocesadores) marcaron el cambio de la mecanización en automatización y permitieron compactar

los equipos al sustituir válvulas, interruptores, y cronómetros con el programa de computación (software).

- Aplicación de los métodos matemáticos y estadísticos (quimiometría) a las determinaciones químicas.
- Uso de los sensores que responden a los estímulos físicos con un impulso y que pueden ser electroquímicos y ópticos.
- Uso del código de barras para la identificación única de muestras y pacientes.
- Aplicación de la robótica, que consiste en el uso de robots durante el transcurso de procesos, transportación, manipulación individual de las muestras y mezclas de reacción. Ya es una realidad que la robótica aumenta la eficiencia de los laboratorios y libera de tareas rutinarias a los profesionales que trabajan en él. Un sencillo ejemplo lo constituye el brazo que sujeta a la pipeta de muestras de un analizador químico.

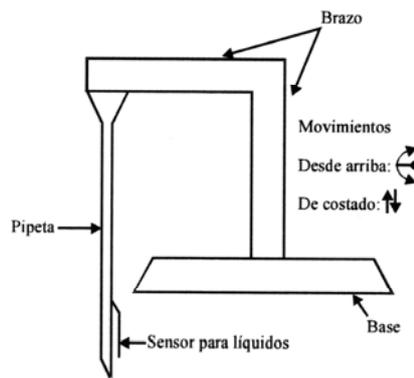


Figura 20: Movimiento del brazo que sostiene la pipeta de muestra de un analizador químico.

Analizadores hematológicos

Los avances mencionados se aplican también a los analizadores o complejos hematológicos, los cuales se diferencian de los químicos por la singularidad de algunas técnicas hematológicas. Los primeros equipos que aparecieron en el mercado hace más de cuatro décadas, solo eran capaces de realizar recuentos celulares (eritrocitos y

leucocitos). Para ello utilizaban un principio descubierto por la firma norteamericana Coulter (apertura-impedancia), en el que se basó toda una generación de estos analizadores. Durante años, los principios utilizados se fueron perfeccionando para sumar a la etapa de los recuentos globales, la de la identificación de los tipos celulares o recuentos diferenciales. Los sistemas patrones de reconocimiento que se crearon fueron los siguientes (González, 2004):

Apertura-impedancia (sistema Coulter). En este sistema, las células se suspenden en una solución diluyente que tiene como característica principal una conductividad fija. Cuando estas células pasan a través de una pequeña abertura u orificio, se produce un cambio en la impedancia (resistencia) de una corriente eléctrica constante que atraviesa esta abertura. Los impulsos producidos se registran y permiten calcular, según el número de interrupciones, la cantidad de células. Este principio para los recuentos celulares, aún se mantiene vigente.

Dispersión de la luz. Este principio siguió al anterior. La muestra de sangre diluida pasa a través de un detector celular colocado en el paso de luz de un rayo luminoso muy estrecho. Cuando las células pasan, interrumpen la luz y el número de estas interrupciones es registrado por un detector, obteniéndose así el recuento de células. El diámetro celular se logra por la dispersión de la luz, la cual es una suma de un conjunto de propiedades celulares como el volumen, el contorno y la granulosidad. De todas ellas, el tamaño es la más importante. Algunos instrumentos alcanzaron un buen perfeccionamiento en su parte óptica tras el uso de un rayo láser monocromático. De esta forma quedó resuelto el recuento diferencial de leucocitos, limitado a tres subpoblaciones: neutrófilos, monocitos y linfocitos. Este recuento, aunque limitado, era válido desde el punto de vista clínico. Cualquier anomalía era detectada por el esquema de distribución que aparecía en la pantalla, y por una alarma sonora.

Citometría de flujo. La introducción de la citometría de flujo enriqueció mucho más las posibilidades de los analizadores hematológicos. Esta técnica permite la identificación, caracterización y aislamiento de células por medios ópticos, basándose en las propiedades físicas, químicas o inmunológicas. Entre las propiedades se incluyen: el tamaño, la forma, el contenido de ADN, la distribución de antígenos y la actividad enzimática.

En los años 50 del siglo XX, las limitaciones del microscopio de luz y de las determinaciones bioquímicas, obligaron a emprender la búsqueda de otras técnicas que permitieran obtener información sobre células aisladas y subpoblaciones celulares. Dos décadas después, la citometría de flujo era una realidad y comenzaron a aparecer los primeros analizadores hematológicos que utilizaban este principio. Su perfeccionamiento les añadió a estos equipos la posibilidad de realizar un recuento diferencial de seis poblaciones, un recuento absoluto para cada una de ellas, y detectar las desviaciones a la izquierda (presencia de leucocitos con núcleos no segmentados). Para realizar los recuentos, los eritrocitos son lisados. A continuación, los leucocitos son estabilizados y coloreados, para evidenciar su actividad peroxidásica y de esta forma identificarlos (absorbancia de la luz) y conocer su tamaño (dispersión de la luz), cuando son registrados al pasar las células independientes, una tras otra entre dos detectores. Las poblaciones celulares se muestran en una pantalla, el eje vertical indica el tamaño celular, y el horizontal la intensidad de la coloración peroxidásica. Los linfocitos y las células grandes no coloreadas (blastos) no se desplazan horizontalmente y, por lo tanto, son medidas solo por su tamaño y a lo largo del eje vertical (izquierda). Los monocitos tienen una actividad peroxidásica discreta y un tamaño moderado, por lo que aparecen en el centro de la pantalla. Los neutrófilos, algo menores, pero con una actividad peroxidásica intensa, aparecen a la derecha y ocupan la parte media y superior de la pantalla. Los eosinófilos, menores que los monocitos y los neutrófilos, pero con la actividad peroxidásica más elevada, aparecen a la derecha y en el extremo inferior. Los basófilos son detectados como grandes células, en un canal separado, después que el resto de los leucocitos han sido despojados de su citoplasma. Una idea de todo esto se refleja en la siguiente figura.

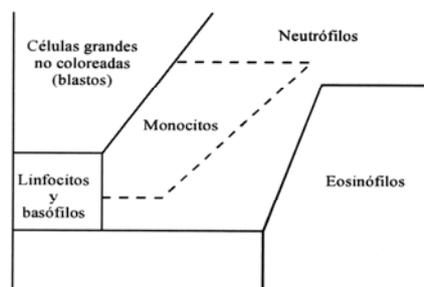


Figura 21: Esquema de la ubicación celular (leucocitos) en la pantalla de un analizador hematológico capaz de realizar recuentos celulares diferenciales según el principio de la citometría de flujo.

Por lo general, los analizadores hematológicos disponen de tres canales para realizar las determinaciones:

Canal A: determinación de la concentración de hemoglobina.

Canal B: recuentos celulares de eritrocitos, trombocitos y otros índices.

Canal C: recuento global y diferencial de leucocitos (canal de la peroxidasa).

Los analizadores hematológicos están diseñados para realizar hasta 28 determinaciones diferentes, entre las que se encuentran: hemoglobina, hematocrito, recuentos celulares globales, recuentos de reticulocitos, etc.

A estos analizadores, igual que ocurre con los químicos, se les ha incorporado la robótica. Como ejemplo se puede mencionar la posibilidad de realizar de forma automática las extensiones de sangre sobre portaobjetos y efectuar las coloraciones. La ayuda ofrecida por estos equipos es primordial, pues los profesionales del laboratorio solo tienen que examinar las extensiones en las que el analizador ha señalado, mediante la alarma sonora, la presencia de alguna anomalía en la cantidad o en el tipo de alguno de los elementos celulares.

En resumen, los analizadores hematológicos actuales combinan dos principios para realizar las determinaciones antes mencionadas: la apertura-impedancia y la citometría de flujo, para realizar los recuentos globales (eritrocitos, leucocitos y trombocitos), y el estudio de subpoblaciones celulares (recuentos diferenciales), respectivamente.

Automatización en hemostasia

En la década del 60 del siglo XX, los análisis para el estudio de la coagulación se encontraban limitados a la observación visual de la formación del coágulo o a su disolución, con el uso de pruebas como: el tiempo de sangrado, el tiempo de coagulación, el tiempo de protrombina, el tiempo parcial de tromboplastina (activado con caolín) y el tiempo de trombina. En los años 70 del mismo siglo, la automatización

de las llamadas pruebas de coagulación fue impulsada, entre otras razones, por la necesidad de estudiar, de forma masiva, aquellos pacientes sometidos a terapia anticoagulante, y de estudiar las alteraciones de la coagulación que acompañan a múltiples enfermedades humanas.

Los principios utilizados en los equipos automáticos para los estudios de la hemostasia son:

Detección del coágulo. Está basado en el uso de detectores ópticos de punto final que detectan el cambio de la luz transmitida cuando el plasma pasa de la fase líquida a la gelificada. El cambio luminoso puede ser registrado en una pantalla. También se usan detectores electromecánicos que poseen diminutos imanes en movimiento que se detienen al gelificarse el plasma, lo que indica el final de la reacción. Este es el principio más utilizado por su elevada sensibilidad.

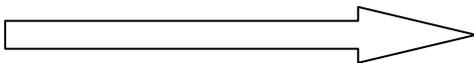
Ensayos cromogénicos. Los avances en los conocimientos de los mecanismos de la coagulación en el ser humano exigieron que las técnicas que terminan con la formación de un coágulo no fueran las únicas a disposición del laboratorio de hemostasia. En estas reacciones cualquier fallo en el proceso, debido a inhibidores o activadores, hacía difícil la interpretación de los resultados de las pruebas. De esta forma, aparecieron los ensayos cromogénicos que no son más que reacciones bioquímicas aisladas y específicas. En estas no se requiere una total estabilidad del sistema, como ocurre en las que terminan con la formación de un coágulo

Agregación trombocitaria. Los recuentos trombocíticos durante años se han realizado con el microscopio, y en los analizadores para el estudio de la hemostasia se ha utilizado el mismo principio que para los recuentos de eritrocitos en los estudios hematológicos. Sin embargo, estos recuentos no ofrecen ninguna información sobre la funcionalidad trombocitaria, lo cual, de una manera muy general, se expresa en la prueba que mide el tiempo de sangrado.

Inmunoquímica

Todos los métodos agrupados bajo la denominación común de inmunoensayos se basan en la reacción de una proteína (anticuerpo específico), con un antígeno marcado, y con un antígeno endógeno (el que se quiere determinar). Ambos antígenos compiten por la unión con el anticuerpo, y ello ha hecho que estas metodologías reciban también el nombre de ensayos de unión competitiva. Su introducción en la década de los 60 del siglo XX significó una verdadera revolución en el laboratorio médico. La sensibilidad del empleo de isótopos radiactivos primero, y de otros ligandos después, unido a la alta especificidad de las proteínas de unión, hizo posible alcanzar la sensibilidad y especificidad necesarias para medir con precisión las concentraciones fisiológicas de sustancias que se encuentran en el plasma: en microgramos, nanogramos y picogramos.

g	mg	μ g	ng	pg	fg
1	10 ⁻³	10 ⁻⁶	10 ⁻⁹	10 ⁻¹²	10 ⁻¹⁵

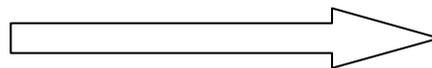


Técnicas químicas usuales

Fotocolorimetría

Espectrofotometría

Espectrofluorimetría



Técnicas de unión competitiva de proteínas

RIA, ELISA, FIA, LIA, IRMA, RRA

Figura 22: Niveles de detección de inmunoensayos y otras técnicas de laboratorio.

En la actualidad, los sistemas automatizados de inmunoensayo utilizan, fundamentalmente, técnicas no isotópicas, como los métodos fluorescentes, los luminiscentes y los enzimoimmunoensayos, entre otros. La selección del método que se vaya a emplear depende de varios factores, como son el tipo de muestra biológica que se tiene y sobre todo, de la relación costo-beneficio que se espera, así como de las posibilidades económicas con que se cuenta.

Por lo general, los equipos de última tecnología para inmunoensayo procesan volúmenes de muestras de alrededor de 90 muestras por hora, hasta 120 muestras por hora, con muy buena eficiencia. Estos pueden desarrollar varios ensayos para la misma muestra. Actualmente, se están imponiendo los autoanalizadores que usan quimioluminiscencia, por sus ventajas en cuanto a la sensibilidad de los métodos de lectura y la rapidez del procesado.