



TÉCNICAS Y MÉTODOS DE

LABORATORIO CLÍNICO

3.^a edición

JOSÉ MANUEL
GONZÁLEZ DE BUITRAGO



TÉCNICAS Y MÉTODOS DE LABORATORIO CLÍNICO



*Rincon
Médico*



Para Descargar más Libros Visita:

www.RinconMedico.me



www.facebook.com/rinconmedico.me

TÉCNICAS Y MÉTODOS DE LABORATORIO CLÍNICO

José Manuel González de Buitrago

Catedrático de Bioquímica de Escuela Universitaria,
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,
Universidad de Salamanca;
Jefe de Sección de Bioquímica, Servicio de Bioquímica,
Hospital Universitario, Salamanca

Rinconmedico.me

3.^a EDICIÓN



**ELSEVIER
MASSON**

Ámsterdam Barcelona Beijing Boston Filadelfia Londres Madrid
México Milán Múnich Orlando París Roma Sídney Tokio Toronto



ELSEVIER
MASSON

Primera edición 1990
Segunda edición 2004
Tercera edición 2010

© 2010 Elsevier España, S.L.
Es una publicación **MASSON**
Travessera de Gràcia, 17-21
08021 Barcelona, España

Fotocopiar es un delito (Art. 270 C.P.)

Para que existan libros es necesario el trabajo de un importante colectivo (autores, traductores, dibujantes, correctores, impresores, editores...). El principal beneficiario de ese esfuerzo es el lector que aprovecha su contenido.

Quien fotocopia un libro, en las circunstancias previstas por la ley, delinque y contribuye a la «no» existencia de nuevas ediciones. Además, a corto plazo, encarece el precio de las ya existentes.

Este libro está legalmente protegido por los derechos de propiedad intelectual. Cualquier uso fuera de los límites establecidos por la legislación vigente, sin el consentimiento del editor, es ilegal. Esto se aplica en particular a la reproducción, fotocopia, traducción, grabación o cualquier otro sistema de recuperación y almacenaje de información.

ISBN: 978-84-458-2029-2

Depósito legal: xxxxxxxxxxxxxxxx

Coordinación y producción editorial: **GEA CONSULTORÍA EDITORIAL, S.L.**

Impreso por xxxxxxxxxxxxxxxx

Advertencia

La medicina es un área en constante evolución. Aunque deben seguirse unas precauciones de seguridad estándar, a medida que aumenten nuestros conocimientos gracias a la investigación básica y clínica habrá que introducir cambios en los tratamientos y en los fármacos. En consecuencia, se recomienda a los lectores que analicen los últimos datos aportados por los fabricantes sobre cada fármaco para comprobar las dosis recomendadas, la vía y duración de la administración y las contraindicaciones. Es responsabilidad ineludible del médico determinar las dosis y el tratamiento más indicados para cada paciente, en función de su experiencia y del conocimiento de cada caso concreto. Ni los editores ni los directores asumen responsabilidad alguna por los daños que pudieran generarse a personas o propiedades como consecuencia del contenido de esta obra.

El editor

PRÓLOGO A LA TERCERA EDICIÓN

La bioquímica clínica en particular y el laboratorio clínico en general se han desarrollado sobre todo por los avances que han tenido lugar en los últimos años en áreas como la biología molecular, la citometría de flujo, la proteómica y los sistemas informáticos, que han permitido la automatización del laboratorio clínico.

En los próximos años tendremos una novedad importante: el acceso a la especialidad por troncos, donde el tronco de Laboratorio Clínico incluye, además de la bioquímica, los análisis clínicos, la hematología, la microbiología y la inmunología. Disponer de un texto de *Técnicas y métodos de laboratorio clínico*, como el que ahora se edita en su tercera edición, que abarque todas las materias indicadas es realmente excepcional y será de gran utilidad tanto a los licenciados que elijan el tronco de Laboratorio Clínico como a los profesionales especialistas y futuros técnicos de laboratorio.

El profesor González de Buitrago posee una gran capacidad de trabajo y es conocedor profundo de las técnicas de laboratorio clínico y de las aplicaciones de estos conocimientos a la clínica. Es, además, una persona excelente, siempre dispuesto a ayudar a los demás. Todo esto lo pueden corroborar los que han sido sus alumnos, así como sus compañeros en la universidad y el hospital.

RAIMUNDO GOBERNA ORTIZ

Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular,
Universidad de Sevilla;
Jefe del Servicio de Bioquímica Clínica,
Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla)

PRÓLOGO A LA PRIMERA EDICIÓN

Escribir un libro sobre los aspectos prácticos de un laboratorio clínico resulta una tarea difícil y propia de una persona de gran profesionalidad y entusiasmo. Dos dificultades destacan en la elaboración de un libro destinado a servir de guía en el quehacer diario de un laboratorio clínico. Una, la tendencia lógica del científico a perseguir el núcleo de las cosas, dejando siempre a otros el desarrollo de sus aplicaciones prácticas. Otra, el desánimo de pensar que toda operación práctica es mejor aprenderla haciéndola que estudiar «la teoría de la práctica». Sin embargo, ambas dificultades sólo tienen origen en nuestra más honda psicología, sin otra utilidad que la engañosa del mínimo esfuerzo. Porque, ¿cuántas veces hemos tenido que repetir una serie de experimentos por no haber leído con detenimiento el protocolo de trabajo? ¿Cuánto hemos agradecido que un conocedor de la técnica que empezamos a manejar, ignorante de nuestro estatus profesional, haya comenzado desde el principio a explicarnos las bases del método que tenemos entre manos? ¿Cuánto podemos aprender de alguien que, sin importarle el nivel desde donde tiene que comenzar, ni las complicaciones que, finalmente, tendrá que alcanzar, nos describe el método desde sus fundamentos hasta sus últimos trucos prácticos? Es verdad que esta clase de «maestros» son difíciles de encontrar pues, además de profundos conocimientos científicos, deben reunir la imprescindible humildad para «comenzar por el principio», junto a la generosidad de no considerar al novicio como un merecedor de ser profesado en los últimos secretos de la técnica.

Entre las personas que cumplen estas características se encuentra José Manuel González de Buitrago, que en este libro nos explica con claridad, pero con seriedad, las técnicas más usuales en un laboratorio clínico. Nada queda fuera del enfoque de su libro; en él podemos conocer desde lo más obvio —frecuentemente lo más ignorado— hasta los «más esotéricos» detalles técnicos. De hecho, este libro es una unidad en sí mismo, sin requerir segundas partes ni complementos. Será muy útil para los técnicos de laboratorio a quienes va destinado, pero servirá de consulta imprescindible para aquellos profesionales —médicos, farmacéuticos, biólogos, químicos, etc.— que intenten familiarizarse con las técnicas más usuales de un laboratorio clínico, sin olvidar a los alumnos de las materias sanitarias, que encontrarán en él la guía imprescindible para abordar el trabajo práctico de laboratorio.

Salamanca

JOSÉ MARÍA MEDINA JIMÉNEZ

Director del Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular,
Universidad de Salamanca

PREFACIO

Como todas las ciencias biomédicas, las ciencias del laboratorio clínico han experimentado un cambio importante durante los últimos años. En esta nueva edición de *Técnicas y métodos de laboratorio clínico* se han incorporado los últimos avances producidos. Se han mantenido las cinco partes principales de la obra: «Principios básicos del laboratorio», «Bioquímica», «Hematología», «Inmunología» y «Microbiología». La parte de «Principios básicos» contiene los mismos capítulos, cuyo contenido se ha actualizado. En la parte de «Bioquímica» se han fusionado algunos capítulos, otros se han dividido y, finalmente, se han añadido tres nuevos, dedicados al análisis de orina, a las técnicas proteómicas y a las pruebas cerca del paciente. En la parte de «Hematología», el capítulo dedicado a los analizadores hematológicos se ha incorporado al de técnicas y métodos hematológicos básicos, y se ha añadido un capítulo nuevo, dedicado al banco de sangre y los biobancos. En la parte de «Inmunología» se han unido las técnicas inmunoquímicas y los inmunoanálisis, y se ha añadido un capítulo nuevo dedicado a las técnicas de alergia. Por último, en la parte de «Microbiología» se han mantenido los mismos capítulos.

Además, se han actualizado todas las técnicas y, en muchas ocasiones, se ha modificado el planteamiento de la exposición con objeto de facilitar el conocimiento y el aprendizaje del lector. El texto pretende ser útil a estudiantes y profesionales del laboratorio clínico y a los residentes del tronco de Laboratorio Clínico —médicos, farmacéuticos, químicos, biólogos y bioquímicos— del nuevo sistema de formación especializada en Ciencias de la Salud.

JOSÉ MANUEL GONZÁLEZ DE BUITRAGO

Organización del laboratorio clínico

INTRODUCCIÓN

El término laboratorio clínico designa los lugares donde se realizan las determinaciones analíticas en muestras biológicas humanas cuya finalidad es el diagnóstico, seguimiento o control del tratamiento de las enfermedades, e incluye áreas de bioquímica, hematología, microbiología e inmunología. En este capítulo se presentan las principales características de los laboratorios clínicos, en cuanto a su organización, su estructura, el personal que trabaja en ellos y la gestión económica.

ESTRUCTURA ORGANIZATIVA

Los laboratorios clínicos se encuentran en centros asistenciales, como los hospitales, o externos para la atención de los pacientes ambulatorios. No existe un solo patrón de organización para los laboratorios clínicos y su estructura depende fundamentalmente del tamaño y de si son hospitalarios o externos. Las tendencias actuales sobre los laboratorios clínicos se dirigen hacia laboratorios grandes con una capacidad elevada de procesamiento de especímenes y una gran diversidad de determinaciones analíticas. En estos laboratorios son menores los costes por prueba y es posible una organización mejor, con tiempos de respuesta más cortos.

Tradicionalmente, los laboratorios clínicos se han organizado, bien en su conjunto, bien en sus diferentes áreas, de acuerdo con dos planteamientos distintos: tomando como base los procedimientos o las exploraciones funcionales. La automatización cada vez mayor de estos laboratorios ha llevado a organizarlos en áreas fundamentalmente instrumentales, de forma que los especímenes se repartan en el menor número posible de alícuotas para las determinaciones solicitadas.

Los laboratorios clínicos siguen dos diseños estructurales básicos: el modular y el abierto. Un laboratorio modular resalta los departamentos con salas separadas para cada uno de ellos. En cambio, en un diseño de laboratorio abierto, muchos de los departamentos están unidos, sin separaciones. Los avances tecnológicos han hecho que puedan realizarse, en un mismo sistema analítico, muchas determinaciones diferentes con técnicas distintas, o que puedan conectarse dos o más sistemas analíticos, de forma que compartan los tubos de los especímenes, creándose lo que se ha llamado islas de automatización o células de trabajo (*work cells*). Con estos diseños, se intenta concentrar aún más los sistemas automáticos.

Las últimas tendencias de los laboratorios clínicos son los laboratorios centrales o nucleares (*core*). Son laboratorios muy automatizados y mecanizados, en los que se realiza la mayoría de las pruebas analíticas habituales de mayor demanda. Junto a este laboratorio central se organizan pequeños laboratorios, más o menos independientes, para las pruebas de menor volumen o la atención de áreas específicas. Los laboratorios centrales permiten reducir el número

ro de tubos y simplificar su tráfico por los sistemas de análisis. Además, este tipo de laboratorios facilita la conexión al sistema informático e integra más fácilmente las fases preanalítica y postanalítica.

En los hospitales debe existir, además, un laboratorio que garantice la asistencia las 24 h del día. Este es el denominado laboratorio de urgencias o de continuidad. Los avances en las técnicas y la instrumentación han permitido que se realicen en estos laboratorios en el momento actual una amplia variedad de pruebas.

Un área fundamental en todos los laboratorios clínicos es el área administrativa. Esta debe estar situada a la entrada del laboratorio clínico para facilitar la comunicación con las personas ajenas al laboratorio clínico que consultan con él. Asimismo, debe estar cerca de las áreas de trabajo, aunque fuera de ellas. Es también importante que el área administrativa se encuentre cerca del área de recepción de muestra, ya que de aquí ha de recibir los impresos de petición de análisis.

SERVICIOS O ÁREAS DEL LABORATORIO CLÍNICO

Como se ha señalado, los laboratorios clínicos realizan determinaciones de bioquímica, hematología, microbiología e inmunología, de forma que estas son las cuatro áreas principales de un laboratorio clínico. Estas áreas pueden estar agrupadas bajo una dirección única o estar separadas en servicios independientes, cada uno de ellos dirigido por una persona distinta.

BIOQUÍMICA CLÍNICA

Las principales áreas o secciones instrumentales suelen ser las de bioquímica automatizada, inmunoanálisis automatizado, proteínas, orina, técnicas manuales y técnicas moleculares.

Área de bioquímica automatizada. En esta área se agrupan los analizadores automáticos para la bioquímica. En el mercado hay una gran variedad de aparatos, con una capacidad de procesado de especímenes muy grande. La dotación de analizadores automáticos para esta sección depende fundamentalmente del número de especímenes que se procese. Asimismo, la conexión entre los analizadores para formar las células de trabajo dependerá del número de estos sistemas.

Área de inmunoanálisis automatizado. Esta área agrupa los analizadores que emplean las técnicas de inmunoanálisis. La dotación instrumental para inmunoanálisis depende básicamente de la carga de trabajo. En la actualidad, se comercializan analizadores automáticos para inmunoanálisis con una gran capacidad de trabajo.

Las áreas de bioquímica automatizada e inmunoanálisis automatizados se encuentran unidas en los laboratorios de bioquímica clínica con grandes cargas de trabajo.

Área de proteínas. En ella se determinan las proteínas específicas, habitualmente mediante nefelómetros automáticos. Asimismo, aquí se realizan las

separaciones de proteínas mediante electroforesis y otras separaciones electroforéticas, como las de isoenzimas.

Área de orinas. En esta área se llevan a cabo los análisis sistemáticos que constan de dos partes: las determinaciones fisicoquímicas y el examen microscópico del sedimento urinario. Las primeras se realizan mediante la tecnología de la química seca. Pueden emplearse lectores o analizadores automáticos. El segundo suele hacerse de forma manual por observación microscópica, aunque ya se dispone de analizadores automáticos para efectuarlo.

Área de técnicas manuales. Concentra todas las técnicas sin automatizar, además de cromatógrafos líquidos, espectrómetros de absorción atómica, etc.

Área de técnicas moleculares. Aquí se encuentran los aparatos y analizadores necesarios para las pruebas moleculares.

HEMATOLOGÍA

Las principales áreas o secciones instrumentales referentes a la hematología son las de recuento/morfología, coagulación, citometría de flujo, citogenética, técnicas moleculares y técnicas especiales.

Área de recuento/morfología. En ella están los analizadores hematológicos mediante los que se efectúan los recuentos celulares sanguíneos de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, así como la fórmula leucocitaria. En esta área deben instalarse los sistemas de realización automática de extensiones y los microscopios para observar la morfología de las células sanguíneas. En la actualidad, en el mercado hay muchos analizadores hematológicos, desde los modelos sencillos hasta los más complejos que obtienen un número elevado de parámetros.

Área de coagulación. Realiza todas las pruebas de valoración de la hemostasia. Está dotada de analizadores automáticos de coagulación, cuyos números y capacidades dependen del número de especímenes que se procese diariamente.

Área de citometría de flujo. Esta técnica se ha convertido en los últimos años en una herramienta fundamental en los estudios de las alteraciones leucocitarias y de inmunofenotipado celular. El número y tipo de citómetros de flujo dependerá del volumen de trabajo del laboratorio.

Área de citogenética. Agrupa la instrumentación para las técnicas y métodos citogenéticos que estudian los cromosomas y tratan de detectar sus alteraciones y correlacionarlas con las enfermedades.

Área de técnicas moleculares. Como en el laboratorio de bioquímica clínica, en esta sección se agrupan los equipos para los estudios que empleen los métodos moleculares.

Área de técnicas especiales. En ella se llevan a cabo determinaciones relacionadas con las alteraciones eritrocitarias, como las pruebas de fragilidad osmótica, de autohemólisis y de deficiencias enzimáticas, y los estudios de hemoglobinas anormales. También los estudios con técnicas citoquímicas.

MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

Las áreas o secciones principales relativas a la microbiología son las de bacteriología, micobacterias, micología, parasitología, virología, serología y microbiología molecular.

Área de bacteriología. En ella se realiza la identificación de las bacterias empleando la observación directa, el cultivo y las pruebas bioquímicas. Esta área se encuentra cada vez más automatizada, existiendo en el mercado diversos modelos de analizadores automáticos para microbiología.

Área de micobacterias. Esta área se dedica principalmente a la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* que produce la tuberculosis humana. También identifica otras micobacterias no tuberculosas.

Área de micología. Dedicada al estudio e identificación de los hongos que causan enfermedades humanas.

Área de parasitología. Aquí se estudian los parásitos, principalmente los protozoos, helmintos y artrópodos que causan enfermedades al hombre.

Área de virología. En esta área se detectan y analizan los virus que producen enfermedades humanas. El diagnóstico de las enfermedades víricas es fundamental para aplicar el tratamiento óptimo del paciente lo más pronto posible.

Área de serología. Aquí se realizan las denominadas pruebas serológicas, que son aquellas determinaciones de antígenos o anticuerpos realizadas en suero, empleando técnicas inmunológicas.

Área de microbiología molecular. Esta área está dedicada a la aplicación de los métodos de la biología molecular para la detección e identificación de los microorganismos patógenos.

Los laboratorios de microbiología clínica deben disponer además de un área de toma de muestras, un área de limpieza de material y esterilización y un área de preparación de medios.

INMUNOLOGÍA CLÍNICA

En este caso, las áreas principales son las dedicadas a los HLA, la autoinmunidad y la inmunología celular.

Área de HLA. Esta área está dedicada al análisis y tipificación de los antígenos HLA, tanto para los trasplantes como para los estudios de asociación de estos antígenos con las enfermedades.

Área de autoinmunidad. Dedicada al análisis de autoanticuerpos para el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades autoinmunitarias. Utiliza fundamentalmente técnicas de inmunofluorescencia indirecta, inmunotransferencia e inmunoanálisis.

Área de inmunología celular. Área dedicada al estudio de las células del sistema inmunológico en relación con las enfermedades.

Como en los otros laboratorios, las pruebas que hay que realizar y la instrumentación dependen fundamentalmente del número de determinaciones que se soliciten. También en este sector es un objetivo importante automatizar al máximo las determinaciones.

PERSONAL

Un personal competente es esencial para el buen funcionamiento del laboratorio clínico y para proporcionar resultados de calidad. Todas las personas que

trabajan en el laboratorio deben estar cualificadas, tener experiencia y estar motivadas. El personal que trabaja en los laboratorios clínicos se divide en facultativo, técnico y administrativo. El número de personas de cada grupo, sus títulos y las descripciones de los trabajos varían de acuerdo con el tamaño del laboratorio y la amplitud de los servicios que proporcione. En todo caso, es de suma importancia que la plantilla esté equilibrada para que no haya tensiones laborales entre sus miembros.

PERSONAL FACULTATIVO

Está compuesto por titulados superiores (médicos, farmacéuticos, químicos, biólogos y bioquímicos), que participan en la actividad diaria de la atención al paciente proporcionando e interpretando la información del laboratorio para ayudar a resolver los problemas diagnósticos y el seguimiento de los tratamientos. El personal facultativo está jerarquizado; su estructura más común en los laboratorios clínicos es: jefe de servicio, jefe de sección y adjunto o facultativo especialista de área (FEA).

Jefe de servicio. Dirige el laboratorio y es el encargado de su organización. Asimismo, se comunica con la gerencia, la dirección médica y la dirección administrativa del hospital. La tarea principal del director del laboratorio es integrar, coordinar y gestionar sus recursos, como el personal, la instrumentación, el espacio y el presupuesto.

Jefes de sección. Se ocupan de organizar y dirigir cada una de las secciones en que esté estructurado el laboratorio. Los jefes de sección reciben del jefe de servicio las instrucciones básicas y los objetivos que se piden a su sección.

Facultativos especialistas. Se encargan de realizar el trabajo en cada sección. Dirigen el trabajo del personal técnico y se ocupan de adecuar las prestaciones analíticas de los métodos, de poner a punto nuevos métodos, de que los médicos entiendan la relevancia de los resultados de las pruebas y de que se use apropiadamente la información generada por el laboratorio.

PERSONAL TÉCNICO

Los profesionales encargados de la realización práctica de las pruebas de laboratorio son los técnicos especialistas de laboratorio (TEL). Están capacitados para recoger, procesar y almacenar la sangre y los especímenes de los pacientes, realizar las pruebas repetitivas del laboratorio clínico, reconocer un problema, identificar las causas directas (técnicas, instrumentales o fisiológicas), realizar las correcciones utilizando las estrategias prefijadas, utilizar y comprobar los procedimientos de control de la calidad y seguir las precauciones de seguridad adecuadas. El técnico conoce técnicas e instrumentos específicos y es capaz de reconocer los factores que afectan directamente a los procedimientos y los resultados. También analiza los programas de control de la calidad, dentro de parámetros predeterminados.

El personal técnico está a las órdenes de un supervisor, que controla el funcionamiento diario del laboratorio. Dicho supervisor se ocupa de gestionar el trabajo del personal. Para ello debe estipular el trabajo de cada uno, en función

de la carga, y asignar los tiempos. Asimismo, se encarga de gestionar los almacenes y la instrumentación.

PERSONAL ADMINISTRATIVO

Sus miembros atienden el manejo de los datos que genera el laboratorio clínico. En la actualidad, este trabajo se realiza a través del sistema informático de gestión del laboratorio. Los administrativos introducen las peticiones analíticas y los datos de los impresos de solicitud, elaboran las hojas de trabajo, editan los informes y se encargan, asimismo, de la estadística del laboratorio. Atienden también las consultas y reclamaciones que se realicen al laboratorio clínico.

ORGANIZACIÓN DE LAS OPERACIONES

Las operaciones de los laboratorios clínicos pueden dividirse en tres fases: preanalítica, analítica y postanalítica. La *fase preanalítica* abarca desde la solicitud de las pruebas hasta la realización del análisis. Incluye las fases de obtención de los especímenes, su transporte, procesamiento y distribución al lugar de análisis. La *fase analítica* comprende todas las etapas de la determinación analítica y finalmente la *fase postanalítica* incluye la validación clínica del resultado y la emisión del informe. En la figura 1-1 se muestra la ruta desde el paciente al laboratorio clínico y la comunicación de los resultados al médico.

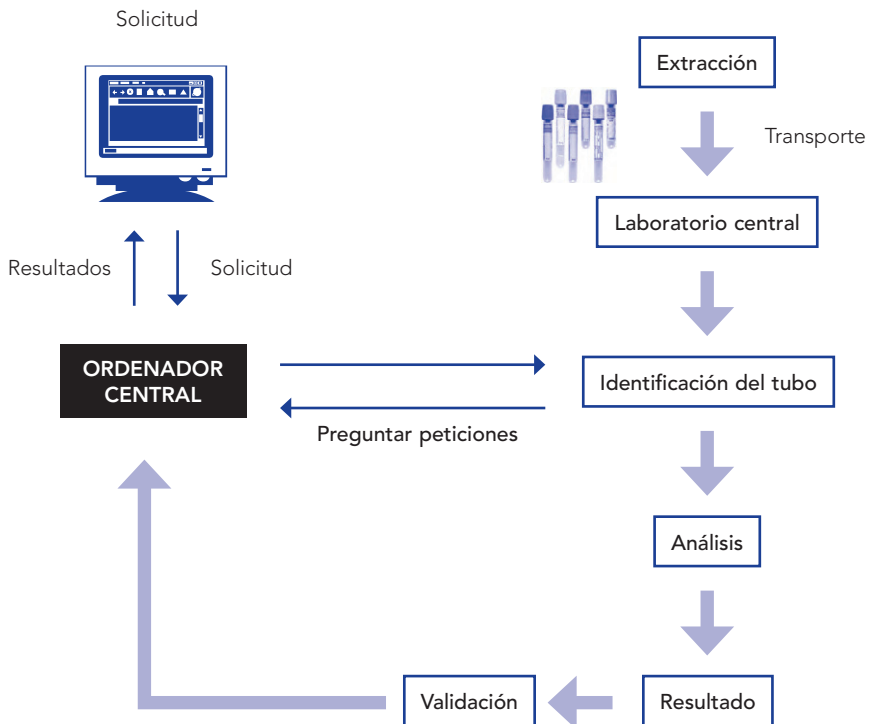


FIGURA 1-1 Conexiones entre las solicitudes, el análisis de las muestras y los resultados en la organización de los laboratorios clínicos.

ENVÍO DE LOS ESPECÍMENES

Los laboratorios clínicos hospitalarios procesan especímenes de dos procedencias básicas: pacientes hospitalizados y pacientes ambulatorios. En los pacientes hospitalizados, los especímenes extraídos se envían al laboratorio clínico por tubo neumático o en carritos de extracción. En los pacientes ambulatorios, los especímenes suelen extraerse en los centros periféricos, desde donde se envían al laboratorio hospitalario o al laboratorio externo en los contenedores adecuados. Cada laboratorio organiza el sistema de recogida de los centros periféricos, de acuerdo con el número de centros que atiende y la distancia a que estén. En cualquier caso, los traslados deben realizarse en las condiciones precisas para que no afecten de manera adversa a los especímenes y los movimientos se produzcan de la forma más fluida posible.

IDENTIFICACIÓN DE LOS ESPECÍMENES

La identificación de los especímenes es un proceso muy importante, una actividad humana que depende de la fiabilidad del personal que los obtiene o recoge. Como no es posible marcar el propio espécimen, el identificador o marca debe ir en su contenedor. Los procedimientos más utilizados para identificar los especímenes son las etiquetas marcadas de forma manual y las etiquetas con código de barras.

Método manual

Es un método de identificación que ya casi no se utiliza en los laboratorios clínicos. En los recipientes que contienen los especímenes se pega una etiqueta donde se escribe el nombre del paciente y una clave de acceso al laboratorio, que se incorpora al mismo tiempo al impreso de petición. La clave de acceso se usa en todos los procesos analíticos que se realicen con el espécimen, e identifica en todo momento al paciente. El método manual de identificación de los especímenes tiene muchos inconvenientes; entre los más importantes están los que se derivan de las transcripciones.

Etiquetas con código de barras

En la actualidad, el uso de estas etiquetas es el método mejor para identificar los especímenes. La etiqueta de código de barras la pueden leer el sistema informático del laboratorio y los analizadores automáticos, de modo que se conecta directamente el recipiente que contiene el espécimen con el sistema de procesado de datos y con los sistemas analíticos, y no hacen falta las transcripciones.

RECEPCIÓN, PROCESAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN DE LOS ESPECÍMENES

El área de recepción, procesamiento y distribución de los especímenes es de gran importancia en los laboratorios clínicos, por lo que su organización y funcionamiento deben realizarse de forma adecuada.

Recepción

La recepción debe estar situada cerca de la entrada del laboratorio y disponer de amplias mesetas para la recogida y manipulación de los especímenes. En la zona de recepción se depositan los contenedores donde se han transportado los especímenes y los correspondientes impresos de petición. Se sacan los especímenes que se colocan en gradillas, se comprueba que coinciden los especímenes con las peticiones y se señala cualquier incidencia. Los impresos de petición se llevan al área administrativa, donde se introducen las peticiones en el sistema informático del laboratorio.

Procesamiento

Los especímenes se trasladan desde la zona de recepción hasta las centrífugas para separar el suero o el plasma (en los especímenes de sangre) o los sobrenadantes de otros líquidos biológicos, y aquí se realiza el proceso de fraccionamiento en alícuotas, de acuerdo con las determinaciones solicitadas. Debe disponerse de centrífugas de gran capacidad y de centrífugas refrigeradas. El número de estas máquinas dependerá del número de especímenes que se procesen, pero hay que señalar que son instrumentos fundamentales para el funcionamiento de los laboratorios clínicos, por lo que debe haber la cantidad suficiente para garantizar en todo momento su función. Los tubos que contengan sangre u otros líquidos biológicos, potencialmente infecciosos, deben centrifugarse siempre tapados para impedir la formación de aerosoles, ya que estos conllevan el riesgo de transmitir enfermedades infecciosas.

Manipulación y distribución

El proceso de distribución de los especímenes debe estar muy bien organizado, pues de otra manera puede requerir mucho personal y ser origen de gran número de errores. Un aspecto importante del procesamiento de los especímenes es su manipulación, que incluye la separación de los tapones de los tubos y el alicuotado para las secciones del laboratorio. En todo momento, la manipulación de los tubos y los tapones ha de hacerse obligatoriamente con guantes de goma. Cuando el alicuotado y la distribución de los especímenes se realicen de forma manual, será fundamental hacerlo con gran cuidado, pues pueden cometerse errores e intercambiar especímenes o mezclarlos. Es muy importante identificar bien los contenedores secundarios y usar pipetas desechables, una por cada paciente o espécimen.

ASOCIACIONES

Asociación entre los especímenes extraídos a un paciente y su identificación

Generalmente, se lleva a cabo en el momento de la extracción, bien en la cabecera del enfermo si está hospitalizado, bien en la sala de extracciones si el paciente es ambulatorio. Por su parte, el proceso que asocia el espécimen y los resultados tiene lugar en el laboratorio. Las determinaciones que requieren

extraer el espécimen del tubo original, como el plasma o el suero, y llevarlo a otros contenedores producen identificaciones secundarias que deben llevar la misma información que la original. En la actualidad, la mayoría de los analizadores automáticos pueden aspirar el espécimen del tubo original de extracción (tubo primario), por lo que no hace falta sacar el espécimen del contenedor original ni generar identificaciones secundarias en otros recipientes. Los tubos de vacío para suero contienen un gel de silicona que, cuando se centrifuga, establece una barrera entre las células y el suero, de forma que no es necesario separar este. Para no manipular los tubos de extracción, se obtienen sendos tubos de contenido menor para los analizadores automáticos, y se les marca con su etiqueta de código de barras. También es posible utilizar un solo tubo para varios analizadores.

Asociación de los pacientes con los resultados

Esta asociación implica muchas posibilidades de error, sobre todo cuando se utilizan sistemas de identificación manual en los contenedores. Los errores más graves se producen cuando se coloca incorrectamente el espécimen respecto a la lista de trabajo, y cuando se alteran o trasponen números en los resultados o los especímenes. El uso del código de barras, que conecta directamente el espécimen con los resultados, evita estos errores.

ALMACENAMIENTO

Cuando no se vayan a procesar los especímenes inmediatamente, deben almacenarse en un refrigerador o un congelador, según el tiempo que hayan de conservarse y las determinaciones solicitadas. Es importante que el laboratorio disponga de un banco de especímenes congelados en el que almacenar una alícuota de los especímenes, de forma que puedan realizarse repeticiones o determinaciones de magnitudes adicionales. Cuando haya un banco de especímenes congelados, debe llevarse un catálogo en el que se señalen las determinaciones analíticas que pueden realizarse de acuerdo con la duración del almacenamiento.

HOJAS DE TRABAJO

Una vez trasladadas las peticiones que acompañan a los especímenes al área de procesamiento de datos del laboratorio clínico, se preparan las hojas de trabajo para distribuir los especímenes en las áreas o secciones. En ellas se señala la identificación del espécimen, su colocación en la secuencia de trabajo y las determinaciones solicitadas. El personal del área de distribución reparte los especímenes de acuerdo con las hojas de trabajo para cada sección. El uso de etiquetas con código de barras y la conexión directa del ordenador central del laboratorio con los analizadores automáticos han simplificado mucho la realización de las hojas de trabajo y en muchas ocasiones no es necesario elaborarlas. En estos casos, no hay que mantener una secuencia estricta entre los tubos y los especímenes, ya que cuando el analizador automático lee la etiqueta de código de barras pregunta al ordenador central las determinaciones que debe hacer y le comunica los resultados que se obtengan.

DISTRIBUCIÓN DE LOS ESPECÍMENES

Para cada área analítica del laboratorio, la distribución puede hacerse de diversas formas. En la actualidad, debido a la gran capacidad de procesamiento de los analizadores automáticos, suelen prepararse pocas alícuotas de los especímenes. Cada área instrumental recibe los tubos y las hojas de trabajo correspondientes. El personal del área, de acuerdo con estas hojas, distribuye los especímenes por los distintos analizadores.

Varios comités nacionales e internacionales están intentando definir estándares, tanto para los contenedores de los especímenes como para los tubos de extracción de vacío o sus transportadores. Se han establecido especificaciones para los contenedores que se utilizan para las aplicaciones del laboratorio automatizadas, bien como contenedores primarios de extracción o como contenedores secundarios preparados para los sistemas automáticos. Los tamaños aprobados son 13×75 , 13×100 , 16×75 y 16×100 mm. En dichos sistemas se utilizan transportadores capaces de llevar uno o varios contenedores. Estos transportadores deben poder trasladar los cuatro tubos de diferentes dimensiones de forma intercambiable, autocentrar el contenedor y permitir la lectura de los códigos de barras de los tubos. Se ha propuesto utilizar transportadores de cinco contenedores, en los que pueda leerse fácilmente los códigos de barras.

RELACIÓN CON LOS USUARIOS

Los principales medios de relacionarse con los usuarios del laboratorio son los impresos de solicitud de pruebas, los informes de resultados y las consultas al laboratorio clínico.

IMPRESOS DE PETICIÓN DE PRUEBAS

Los impresos de petición deben contener esta información:

- Datos de identificación del paciente (nombre y apellidos, número de la Seguridad Social, número de historia clínica, médico y servicio solicitante, y fecha de la petición).
- Características y datos clínicos del paciente (edad, sexo, diagnóstico de presunción y medicación).
- Pruebas solicitadas.

La estructura, la organización y el diseño de los impresos de petición de pruebas de laboratorio influyen mucho en las peticiones que realizan los médicos. En general, no se aprecia la importancia del impreso de solicitud como vehículo de comunicación entre el laboratorio y los médicos. Asimismo, un impreso bien diseñado puede influir mucho en la utilización de las pruebas y reducir su uso innecesario.

Los impresos de petición de pruebas de laboratorio que se emplean son muy variados, y cada laboratorio clínico establece el más adecuado a su organización laboral. De forma simple, los impresos de solicitud pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- *Impresos convencionales.* Su modelo más simple es un impreso en blanco donde el médico solicitante escribe las determinaciones que desea que se hagan al paciente. Otros modelos contienen impresas las pruebas más habituales, que suelen agruparse por perfiles diagnósticos o según la estructura instrumental o funcional del laboratorio. El principal inconveniente de estos métodos es que, cuando el laboratorio dispone de un sistema informático, deben teclearse las pruebas manualmente, con el consiguiente riesgo de errores.
- *Impresos de lectura por máquinas.* Los principales son los de código de barras. La ventaja más importante de estos modelos es que la introducción de las peticiones en el sistema informático del laboratorio es muy rápida y carece de errores. En algunos centros se realiza la petición de forma electrónica, en la que el médico solicita directamente las pruebas en la pantalla del ordenador en la consulta o en los controles de las salas de hospitalización, y con conexión en red con el sistema informático del laboratorio.

INFORMES DE RESULTADOS

Los resultados que proporcionan los laboratorios clínicos pueden ser numéricos o alfabéticos. Los informes de resultados deben ser informativos, claros, bien estructurados y de fácil manejo, y carecer de errores. Los primeros informes normalmente consistían sólo en resultados numéricos que se acompañaban de signos para mostrar los valores patológicos. En la actualidad, además de los valores numéricos contienen diversas ayudas interpretativas, como los valores de referencia, un texto libre o textos codificados. Los informes acumulados presentan los resultados de un paciente obtenidos en días distintos. Son muy útiles para seguir la evolución del mismo. También pueden producirse informes acumulados de diversos tipos, de acuerdo con las necesidades de los médicos solicitantes. Los informes suelen enviarse mediante métodos electrónicos a través de las redes de intranet, extranet o internet. Actualmente, se tiende a que los solicitantes de determinaciones analíticas tengan acceso al archivo histórico del laboratorio para poder consultarlo cuando sea necesario. Para ello, debe dotarse de claves de acceso, de forma que sólo pueda acceder a los resultados el personal autorizado.

CONSULTAS AL LABORATORIO CLÍNICO

Las consultas al laboratorio son la forma tradicional de resolver los problemas clínicos que van más allá de la competencia del médico solicitante. La mayoría de las consultas son comunicaciones informales, frecuentemente por teléfono, e iniciadas la mayor parte de las veces por el laboratorio. En cualquier caso, para comunicarse personalmente de modo eficaz con los médicos, el facultativo del laboratorio debe tener conocimientos de medicina (interna, pediatría, cardiología, nefrología, etc.).

En muchas áreas del laboratorio clínico, la comunicación entre los médicos solicitantes y los facultativos es fundamental para interpretar adecuadamente los resultados. Cabe citar, como ejemplos, las pruebas de autoanticuerpos en el estudio de las enfermedades autoinmunitarias, las de los HLA en los estudios

de su asociación con determinadas afecciones, las pruebas de marcadores genéticos en el cáncer, etc.

GESTIÓN ECONÓMICA

La gestión económica del laboratorio clínico es un tema fundamental, ya que la demanda de pruebas ha crecido de forma muy importante en los últimos años, con el consiguiente incremento de los costes en estos laboratorios. En nuestro país, la mayoría de los laboratorios clínicos son de gestión pública y las consideraciones económicas están sujetas a los presupuestos de los organismos gestores de las diferentes comunidades autónomas. Es difícil, pues, realizar una gestión económica análoga a la de una empresa privada. En cualquier caso, es importante conocer el análisis de costos aplicados a la gestión del laboratorio clínico.

CAPÍTULOS DE GASTO

Los distintos gastos de los laboratorios clínicos se dividen en capítulos; los más importantes son los siguientes:

- Capítulo 1: gastos de personal.
- Capítulo 2: gastos de bienes corrientes y servicios.
- Capítulo 3: gastos financieros.

CLASIFICACIÓN DE LOS COSTES

Los costes pueden clasificarse de acuerdo con el volumen de actividad o producción en: fijos y variables. Los *costes fijos* son los que se producen de forma independiente del volumen de pruebas y son constantes a lo largo del tiempo. El ejemplo más característico de este tipo de costes son los salarios. Los *costes variables*, generalmente, aumentan o disminuyen de forma lineal con la producción. El ejemplo más característico de este tipo de costes son los reactivos.

De acuerdo con los objetivos del coste y los criterios de imputación, los costes se dividen en: directos e indirectos. Los *costes directos* son los asociados directamente con la producción y derivan de la adquisición de los materiales y el trabajo necesario para medir una magnitud determinada. Los *costes indirectos* son los no asociados con la producción. En su mayor parte suelen ser costes fijos.

ANÁLISIS DE COSTES

El análisis de costes permite comparar la eficacia de los laboratorios y es una herramienta de gran importancia para mejorar la utilización de los laboratorios por los servicios clínicos. Los principales costes del laboratorio clínico proceden del personal, los reactivos y el mantenimiento de las instalaciones.

El análisis de costes hace posible la toma de decisiones entre otras cosas sobre la introducción de nuevas pruebas, la modificación de los métodos empleados para algunas de ellas, la eliminación de pruebas, el cambio de equipos analíticos y la utilización de laboratorios externos para algunas pruebas.

PROCEDIMIENTOS DE COMPRAS

En los laboratorios clínicos de centros públicos las compras de materiales están reguladas por la Ley 30/2007, de 30 de octubre, de Contratos del Sector Público (BOE 31 de octubre de 2007). Los laboratorios clínicos privados realizan sus compras directamente eligiendo las ofertas más adecuadas para ellos.

En el sector público, la adquisición del material de laboratorio puede realizarse mediante un procedimiento abierto, uno restringido o uno negociado. El *procedimiento abierto* suele realizarse como concurso público en el que cualquier empresa puede presentar una proposición u oferta. El *procedimiento restringido* es aquel en el que se seleccionan las empresas que pueden presentar las ofertas. Finalmente, en el *procedimiento negociado* se adjudica la compra a una empresa que se elige de forma justificada, bien porque sea la única que dispone del material que se desea o alguna otra circunstancia.

En los concursos públicos, el laboratorio clínico suele proponer los materiales que necesita, junto con un cálculo de los precios unitarios. Además, deben señalarse los principales criterios de valoración. El servicio de compras del centro se encarga de elaborar el pliego de condiciones técnicas y económicas y la tramitación del concurso.

El laboratorio debe evaluar las ofertas presentadas y emitir un informe de acuerdo con los criterios de valoración publicados previamente. El servicio de compras, con esta valoración y teniendo en cuenta la oferta económica, realiza la adjudicación a la mejor propuesta.

GESTIÓN DE ALMACENES

Los laboratorios clínicos emplean dos clases principales de materiales. Por un lado, los destinados a la extracción, que generalmente se encuentran en el almacén general del centro y que este distribuye a los usuarios en las plantas de hospitalización y los centros de salud donde se realizan extracciones. Por otro lado, se encuentran los materiales propios del laboratorio, que son fundamentalmente los reactivos para las determinaciones analíticas. Estos habitualmente se almacenan en el propio laboratorio.

El sistema informático de laboratorio debe disponer de un programa de gestión de almacenes. Los reactivos deben estar identificados mediante código de barras. Debe disponerse de un *stock* suficiente de forma que se establezca un programa de reposición de acuerdo con las entradas y salidas.

Las reposiciones pueden ser de tres tipos:

- *Reposición periódica.* Se fija un calendario de fechas y de cantidades para entregar. Es útil para productos de gran consumo y demanda regular; por ejemplo, el material de extracción de los laboratorios.
- *Reposición por pedido.* Se genera un pedido cuando las existencias alcanzan una cantidad determinada. Se emplea para consumos pequeños y de difícil previsión.
- *Reposición de productos de caducidad corta.* Se hace ajustando el plazo de entrega a las fechas de caducidad. Se emplea para reactivos de radioinmunoanálisis o medios de cultivo.

Material, reactivos y equipos básicos

INTRODUCCIÓN

Los laboratorios clínicos emplean muchos utensilios y dispositivos para almacenar las disoluciones y los reactivos, y para producir reacciones. El material de vidrio, muy utilizado en el pasado, se ha sustituido, en gran parte, por material de plástico desechable. El equipamiento básico de un laboratorio clínico incluye pipetas de pistón, dispensadores, diluidores, centrifugas, balanzas, baños y microscopios. En este capítulo se describen los materiales, reactivos y equipos básicos que utilizan los laboratorios clínicos.

MATERIAL DE VIDRIO

Debido a su fácil limpieza, su inercia química y su transparencia, el vidrio ha sido el material fundamental para fabricar contenedores y recipientes para la preparación de disoluciones para el laboratorio. Generalmente, el material de vidrio del laboratorio es de borosilicato, que soporta altas temperaturas, aunque también existe otro tipo de vidrio que, a causa de su fragilidad, no puede calentarse y se utiliza para recipientes de almacenaje de productos o disoluciones. Estos últimos vidrios son algo más gruesos y presentan un color verdoso a la transparencia.

El material de vidrio para bioquímica clínica debe lavarse con detergentes, aclararse con agua y pasarse luego por agua destilada. Para el lavado, hay lavadores automáticos programables, semejantes a los lavavajillas. Los recipientes deben colocarse con la boca hacia abajo, en las cubetas adecuadas, y el aclarado final ha de hacerse con agua desionizada. Terminado el lavado, el material se lleva a una estufa para secarlo. Cuando haya de usarse en determinadas técnicas, como la absorción atómica, el material requerirá tratamientos especiales. Asimismo, el material que se emplea en el laboratorio de hematología debe lavarse con sumo cuidado, extremándose la eliminación del detergente, que puede lisar los eritrocitos. También el material nuevo para el laboratorio de microbiología debe lavarse bien, y esterilizarse antes de utilizarlo. Conviene tratar el material de vidrio con lisol al 3%, y pasarlo por autoclave.

MATERIAL DE PLÁSTICO

Desde hace ya bastantes años, muchos de los utensilios utilizados en los laboratorios clínicos se construyen con este material. Los utensilios de plástico pueden ser de uso múltiple o de un solo uso. Hay muchos tipos de plástico, cada uno de ellos con sus características de resistencia química y propiedades físicas específicas. El polietileno y el polipropileno son plásticos que se emplean para la mayoría de los dispositivos desechables. El segundo tiene la ventaja de que resiste mayores temperaturas y puede esterilizarse. Por su parte, el primero es permeable al vapor de agua y aun en las botellas herméticamente cerradas

puede producirse evaporación, lo que hace que aumente la concentración de los reactivos y calibradores. El teflón es casi químicamente inerte y resiste un amplio margen de temperaturas; el policarbonato es muy claro, por lo que suele utilizarse para recipientes graduados; y el cloruro de polivinilo es blando y flexible, y se usa para tubos de conducción.

Cuando se empleen utensilios de plástico, debe tenerse en cuenta el tipo de plástico del que están contruidos para no estropearlos, ya que muchos plásticos son atacados por disolventes orgánicos y ácidos o bases fuertes. También conviene señalar que muchos plásticos no soportan temperaturas elevadas, principalmente el calor seco, sin deformarse o descomponerse. Los utensilios de polietileno, polipropileno, policarbonato y teflón pueden lavarse en lavavajillas. Hay que evitar los detergentes abrasivos y los oxidantes fuertes.

RECIPIENTES PARA PREPARAR DISOLUCIONES

Los principales recipientes que se utilizan en los laboratorios clínicos para preparar disoluciones son los vasos y los erlenmeyers.

VASOS

Son recipientes cilíndricos (fig. 2-1A) no calibrados, cuyos volúmenes más corrientes son 50, 100, 500, 1.000, 2.000 y 5.000 ml. Los vasos de laboratorio suelen fabricarse con vidrios que soporten altas temperaturas, por lo que, para calentar su contenido, pueden ponerse en contacto con llamas de mecheros o placas de calefacción. También hay en el mercado vasos de plástico, pero suelen utilizarse menos.

ERLENMEYERS

Son recipientes no calibrados de forma cónica para reducir la evaporación de las sustancias contenidas (fig. 2-1B). Los volúmenes más corrientes y el material de construcción son los mismos que los de los vasos.

UTENSILIOS PARA MEDIR EL VOLUMEN

Los principales utensilios para medir el volumen son los matraces aforados, las probetas, las buretas y las pipetas.

MATRACES AFORADOS

Son recipientes (fig. 2-1C) que, cuando están llenos hasta la marca indicadora, contienen a la temperatura indicada un volumen exacto. Se utilizan para preparar disoluciones de una concentración dada. Los volúmenes más frecuentes son 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1.000 ml, y se construyen con materiales análogos a los de los vasos y los erlenmeyers. Los matraces aforados han de llenarse hasta la señal, de modo que el menisco producido por el líquido tangente queda en la parte superior de la marca indicadora (fig. 2-2). Como se utilizan estos matraces para preparar disoluciones, una vez producido el enrase, deben invertirse varias veces para completar el proceso de mezclado.

PROBETAS

Las probetas (fig. 2-1D) son recipientes cilíndricos estrechos y graduados, que se emplean para medir volúmenes, generalmente superiores a los 25 ml. Las más utilizadas en los laboratorios tienen volúmenes que van desde 10 ml hasta varios litros. La graduación se realiza con subdivisiones de cien porciones del volumen total. Hay que señalar que, en las probetas, las apreciaciones del volumen no son muy exactas y han de leerse con el menisco que produce el líquido tangente por la parte superior de la marca del volumen deseado.

BURETAS

Las buretas (fig. 2-1E) son tubos largos, graduados y con una llave de paso en uno de los extremos, y se emplean para dispensar con exactitud volúmenes de líquido a un contenedor.

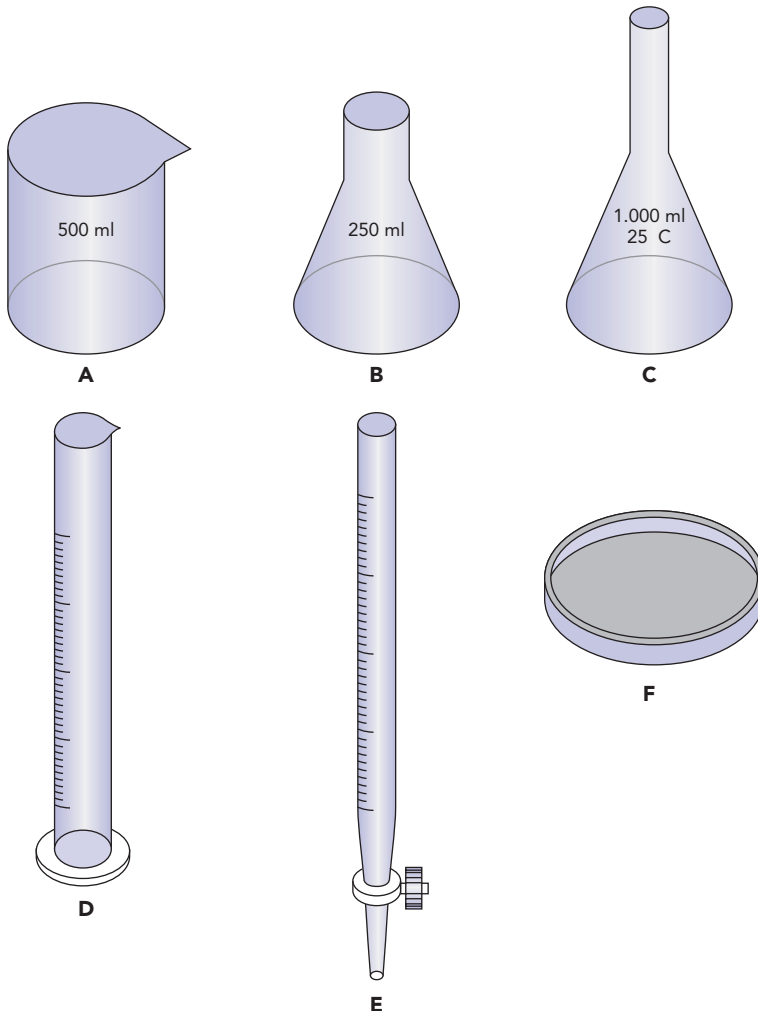


FIGURA 2-1 Recipientes que se utilizan en los laboratorios. **A.** Vaso. **B.** Erlenmeyer. **C.** Matraz aforado. **D.** Probeta. **E.** Bureta. **F.** Placa de Petri.

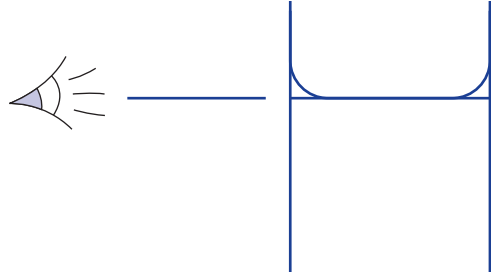


FIGURA 2-2

Forma de observar el menisco que producen los líquidos cuando se enrasan los matraces aforados, las pipetas y las probetas.

PIPETAS

Las pipetas (fig. 2-3) son instrumentos que se utilizan para suministrar pequeños volúmenes de líquido, inferiores a 20 ml, y exactos. Hay dos tipos de pipetas: las volumétricas y las graduadas. Las primeras suministran un volumen fijo de líquido, mientras que las graduadas pueden suministrar volúmenes variables.

Las pipetas que más se usan en los laboratorios son las de dispensación. Las pipetas de soplado deben vaciarse totalmente soplando por el extremo sobre su contenido. Existen también pipetas de doble enrase, en las que el volumen que quiere dispensarse queda contenido entre dos marcas en el vidrio. Cuando se utilizan las pipetas, la regla de oro es no aspirar nada a la boca. Las pipetas se sujetan con los dedos pulgar, medio y anular. Su llenado se realiza aspirando con la boca, hasta superar la marca del volumen que quiere dispensarse; entonces se tapa la abertura superior con el dedo índice, que se afloja para dejar que fluya el líquido hasta la marca. Alcanzada esta, se vuelve a apretar el dedo índice, se lleva la pipeta al recipiente y se separa el citado dedo de la abertura superior, dejando que caiga el líquido. Antes de utilizar una pipeta conviene lavarla con pequeñas porciones de la disolución que va a dispensarse para asegurar que se elimina cualquier residuo que quede en ella.

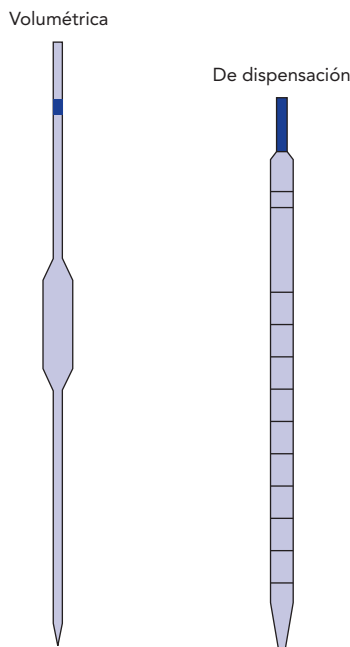
SUSTANCIAS QUÍMICAS, MATERIALES DE REFERENCIA Y EQUIPOS DE REACTIVOS

SUSTANCIAS QUÍMICAS

Las sustancias químicas que se emplean en los laboratorios clínicos pueden tener diferentes grados de pureza. Los solutos y disolventes que han de usarse para las técnicas de análisis deben ser de *grado reactivo*. Algunas técnicas analíticas, como la cromatografía de gases, la cromatografía líquida de alta resolución, la fluorimetría y la absorción atómica, requieren reactivos con un alto grado de pureza. Existe un amplio abanico de denominaciones para este tipo de reactivos y deben consultarse los catálogos de las casas suministradoras.

MATERIALES DE REFERENCIA

Los materiales de referencia son sustancias que poseen propiedades físicas y químicas establecidas para que puedan utilizarse como calibradores, para verificar un método de medición o para asignar valores.

**FIGURA 2-3** Pipetas.

Materiales de referencia primarios

Son sustancias químicas muy puras, que pueden pesarse o medirse directamente y proporcionar una disolución cuya concentración se conozca con exactitud. La International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ha propuesto un grado de pureza del 99,98% para los materiales de referencia primarios.

Materiales de referencia secundarios

Son aquellos cuyos valores se han asignado mediante un proceso formal de transferencia de valor a partir de un material de referencia primario. Se utilizan para asignar valores a los materiales de referencia terciarios.

Materiales de referencia certificados

Son aquellos cuyo valor se ha certificado mediante un procedimiento técnicamente válido.

EQUIPOS DE REACTIVOS

Un *kit* o equipo de reactivos es un conjunto de dos o más reactivos que se emplean para determinar una sustancia y se suministran juntos en un envase con las instrucciones del procedimiento. Los *kits* de reactivos pueden utilizarse para hacer determinaciones manuales o con un instrumento o analizador automático en particular. Inicialmente, los equipos de reactivos se fabricaban para

su uso general en el laboratorio y se adaptaban fácilmente a cualquier sistema analítico, tanto manual como automático. Sin embargo, en los últimos años, las empresas que fabrican reactivos para los laboratorios clínicos están sacando al mercado equipos de reactivos cada vez más cerrados, de forma que sólo puedan usarse con un sistema específico, por lo que modificar los equipos comerciales es cada vez más difícil. No obstante, estos equipos tienen ventajas, especialmente que las técnicas requieren una intervención cada vez menor de los operadores, lo que hace que disminuyan los errores. Entre sus inconvenientes está que estos equipos generalmente son más caros.

AGUA PARA EL LABORATORIO CLÍNICO

En los laboratorios, la sustancia química que más se usa es el agua. Esta se utiliza para preparar la mayoría de los reactivos y de las disoluciones que se emplean en los laboratorios clínicos. Es muy difícil obtener, y más difícil aún conservar, agua totalmente pura, ya que absorbe CO_2 e iones metálicos procedentes del aire y de los recipientes que la contienen. La forma más corriente de expresar la pureza del agua es indicar su resistividad específica, que es la resistencia que tiene cuando se coloca en un recipiente cúbico de 1 cm de lado, y se expresa en megaohmios ($\text{M}\Omega$) por centímetro. Cuanto menor sea la cantidad de sustancias ionizables, menor será la conductividad y, por tanto, mayor la resistividad. Se emplea el término agua de grado reactivo, seguido de la concreción del tipo (de I a III). De esta forma se definen las especificaciones del agua, con independencia del método de preparación. Los principales métodos para obtener agua de buena calidad son:

- *Destilación.* Es una técnica física para purificar el agua que la convierte en vapor que luego se condensa, a la vez que se retienen las sustancias no volátiles contenidas en el agua original —como las impurezas inorgánicas y orgánicas y los microorganismos— que, de esta forma, se eliminan. En cambio, la destilación no consigue el mismo resultado con las impurezas volátiles, como el CO_2 , el cloro, el amoníaco y algunos compuestos orgánicos.
- *Desionización.* Se logra al pasar agua a través de resinas de intercambio iónico. Los cambiadores pueden ser de aniones o de cationes, pero nunca de ambos simultáneamente. Al pasar el agua por la columna que contiene las resinas cambiadoras, las impurezas iónicas contaminantes se cambian por los iones H^+ y OH^- , localizados en la superficie de las resinas, que quedan retenidas en la columna. Las resinas cambiadoras pueden utilizarse en unidades separadas que cambien aniones o cationes, o en unidades mixtas que contengan una mezcla de resinas cambiadoras aniónicas y catiónicas. Con el uso, las resinas van perdiendo su capacidad de intercambio, pero pueden regenerarse tratándolas con ácidos o bases.
- *Ósmosis inversa.* Es un proceso por el que se fuerza el agua a pasar a través de una membrana semipermeable que actúa como un filtro molecular. La membrana elimina entre el 95 y el 99% de la materia orgánica, las bacterias y las demás materias particuladas, y entre el 90 y el 97% de todos los minerales ionizados o disueltos. Sin embargo,

elimina menos las impurezas gaseosas. Aunque el proceso no es adecuado para producir agua de grado reactivo para el laboratorio, puede emplearse como método preliminar de purificación.

- *Oxidación ultravioleta.* La radiación ultravioleta de 254 nm elimina muchas bacterias y rompe muchos compuestos orgánicos ionizantes que posteriormente pueden eliminarse por desionización.

En general, ningún proceso de purificación de agua proporciona por sí solo agua que cumpla las rígidas especificaciones del agua de grado reactivo de tipo I. Por esto, se emplean diversas combinaciones de los procesos de purificación. Los sistemas más utilizados en los laboratorios clínicos para obtener agua de calidad combinan la desionización y la destilación, de forma que se eliminen tanto los iones como las sustancias orgánicas no volátiles. El agua de tipo III (resistividad de 0,1 M Ω /cm) se emplea para lavar el material de vidrio y para algunos procesos cualitativos. El agua de tipo II (resistividad de 1 M Ω /cm) se usa para la mayoría de las pruebas de laboratorio; y el agua de tipo I (resistividad de 10 M Ω /cm), para métodos como la absorción atómica.

EQUIPAMIENTO BÁSICO

Los laboratorios clínicos deben disponer de una serie de equipos básicos que les permitan realizar su trabajo. El equipamiento básico debe comprender pipetas automáticas, dispensadores, diluidores, balanzas, baños, centrífugas y microscopios. En los apartados siguientes se describen cada uno de estos equipos.

PIPETAS SEMIAUTOMÁTICAS Y AUTOMÁTICAS

Las pipetas semiautomáticas se cargan y descargan merced a la acción del dedo pulgar sobre un pistón, en cuyo extremo opuesto se coloca una punta de plástico desechable o un capilar. Las automáticas son iguales, pero la carga y descarga se consigue con un motor incorporado a la pipeta. El volumen que puede aspirarse y dispensarse puede ser fijo o variable, dependiendo del tipo de pipeta. Los volúmenes de las pipetas están comprendidos entre 0,5 y 10 μ l. Con estas pipetas se evita la succión de los líquidos biológicos y el consiguiente riesgo de contagio de enfermedades, y de disolventes orgánicos u otros líquidos que produzcan vapores tóxicos o sean venenosos.

En la figura 2-4 se muestra una pipeta semiautomática de pistón y se presentan las tres posiciones que puede adoptar el émbolo: la normal de reposo, la intermedia de aspiración y la de presión a fondo de dispensación. Estas pipetas se cargan apretando el émbolo hasta la posición intermedia y luego se afloja la presión para llenar la punta. Para descargarlas, se aprieta el émbolo hasta el fondo. Algunas tienen acoplado un dispositivo para expulsar la punta de plástico una vez utilizada. Existen también pipetas multicanal que permiten dispensar simultáneamente diversas muestras.

DISPENSADORES

Son sistemas que proporcionan repetidamente un volumen seleccionado. Los dispensadores se usan sobre todo para añadir reactivos a lotes de especímenes

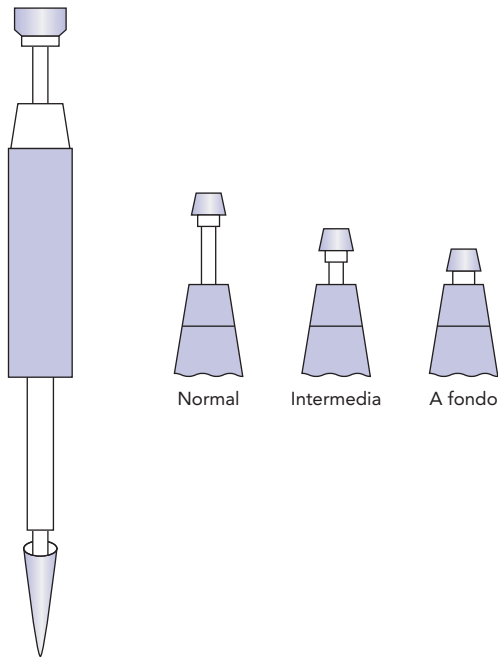


FIGURA 2-4 Pipeta de pistón y émbolo con sus tres posiciones: normal de reposo, intermedia y de presión a fondo.

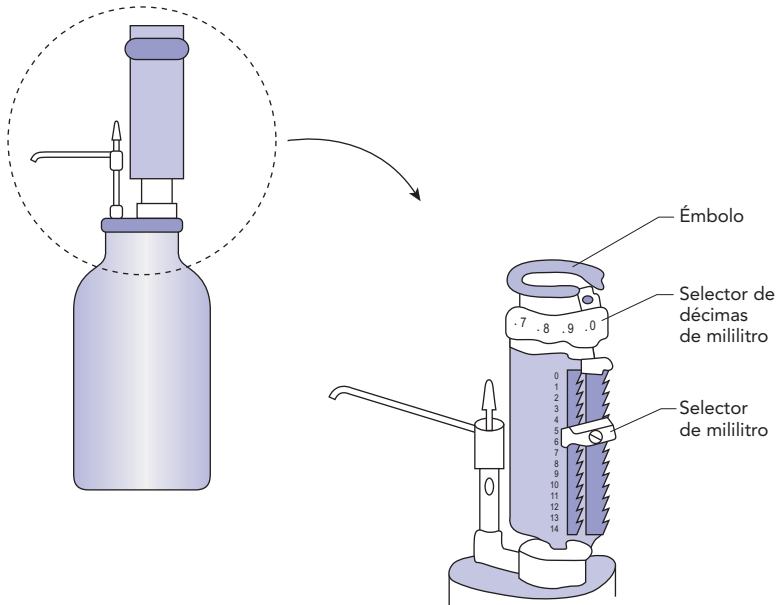


FIGURA 2-5 Dispensador y detalle de la cabeza con el émbolo, donde se muestran el selector de décimas de mililitro y el selector de mililitros.

reaccionantes. Hay en el mercado diferentes modelos con una amplia gama de volúmenes de uso. Los más empleados suelen dispensar entre 0,1 y 15 ml, con una precisión de alrededor del 1%. Algunos poseen cabezas que permiten acoplarlos a cualquier boca de contenedor. En la figura 2-5 se muestra de forma esquemática un dispensador y un detalle de la cabeza con el émbolo.

DILUIDORES

Son sistemas que producen diluciones de especímenes y de reactivos en las proporciones elegidas con un sistema de impulsión automático o manual. De forma general, los diluidores constan de dos sistemas de impulsión ajustables: en uno se selecciona el volumen del espécimen y en el otro el del diluyente. Los sistemas que hay a la venta poseen una gran precisión y son muy útiles en el laboratorio. En la figura 2-6 se muestra un diluidor automático.

BALANZAS

La masa es una propiedad invariable de la materia, y el peso es una función de la masa en que influye la fuerza de la gravedad, de forma que $\text{peso} = \text{masa} \times \text{gravedad}$. Las balanzas son sistemas de análisis que se usan para medir la masa, en los que se compara la masa desconocida con una masa conocida; a esta comparación se denomina pesada. En la práctica, los términos masa y peso se usan de forma sinónima. Existe una gran variedad de balanzas que pueden tener uno o dos platillos:

- *Balanzas de dos platillos.* Poseen un fiel con dos brazos de igual longitud. Para la pesada se van añadiendo pesas a uno de los platillos hasta compensar el peso del objeto colocado en el otro.

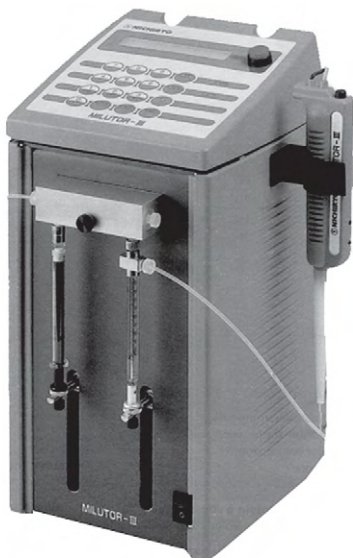


FIGURA 2-6 Diluidor automático.



FIGURA 2-7 Balanza de un platillo.

- *Balanzas de un platillo.* Tienen los dos brazos de diferente longitud. El objeto que hay que pesar se coloca en el platillo unido al brazo corto, y se van aplicando fuerzas al otro brazo, de forma mecánica o electrónica, hasta restablecer el fiel en su posición nula. En la figura 2-7 se muestra una balanza de este tipo.

Las balanzas que más se utilizan en los laboratorios son las electrónicas de un solo platillo. El espécimen que quiere pesarse se coloca en el platillo, que se desplaza hacia abajo con una fuerza igual al producto de la masa del espécimen por la aceleración de la gravedad. La balanza detecta este movimiento hacia abajo y genera una fuerza contraria que equilibra la anterior por medio de un sistema electromagnético. La corriente necesaria para producir esta fuerza es proporcional a la masa del espécimen.

Las balanzas analíticas características pesan hasta 200 g y tienen una sensibilidad de unos 10 μg . Algunas microbalanzas pueden pesar un máximo de 5 g, con una sensibilidad de 0,1 μg . Para pesos grandes se utilizan balanzas de un solo platillo, con tara automática, denominadas granatarios. Suelen pesar hasta 1 o 2 kg y tienen una sensibilidad de 0,1 mg.

Las balanzas deben colocarse en lugares protegidos de las corrientes de aire, el calor y los humos corrosivos. Es fundamental situarlas en soportes sólidos para evitar al máximo las vibraciones. Suelen ponerse sobre bloques que asientan en los cimientos del edificio. Disponen de un sistema de nivelación, generalmente de burbuja, que debe comprobarse siempre antes de realizar las pesadas. Asimismo, en las microbalanzas con compartimento de pesada cerrado, debe pesarse siempre con las puertas cerradas, y la adición del producto que se pese debe hacerse con la balanza en la posición de descanso.

BAÑOS

Los baños (fig. 2-8) son recipientes que contienen un líquido cuya temperatura puede ajustarse. Los más corrientes son los de agua y se utilizan para incubar a una temperatura ajustable menor de 100 °C. En los laboratorios clínicos, la temperatura de incubación más habitual es de 37 °C. Los baños suelen disponer de sistemas de agitación para mantener la temperatura uniforme en todo el recipiente. De acuerdo con la calidad de los baños, los niveles de variación de la temperatura de medida van desde ± 1 °C hasta $\pm 0,1$ °C. Hay baños especiales que llevan como líquido aceites pesados, que se usan para calentar a temperaturas altas. Asimismo, hay bloques metálicos termostatizados, con temperatura ajustable y orificios de diferentes tamaños, para colocar los tubos o recipientes que contengan las mezclas que se quieran incubar.

CENTRÍFUGAS

La centrifugación es una técnica de separación que se basa en el movimiento de las partículas impulsadas por una fuerza denominada centrífuga, que tiende a desplazarlas lejos del centro de rotación. Esta técnica separa las partículas de un espécimen, de acuerdo, fundamentalmente, con su masa y su forma. No obstante, la fuerza centrífuga que actúa sobre una partícula depende también de la velocidad y del radio de giro, que es la distancia desde el

centro de rotación hasta el extremo del recipiente donde está contenido el espécimen que se centrifuga. Con el fin de reproducir las condiciones de centrifugación, la aceleración centrífuga suele expresarse como una aceleración relativa, o sea, múltiplos de la aceleración de la gravedad g . De esta forma, en cualquier centrífuga pueden reproducirse con exactitud las condiciones de centrifugación.

Las centrífugas más sencillas consisten en un motor eléctrico que lleva unido un vástago que soporta el cabezal o rotor donde se colocan los recipientes con los especímenes. Hay dos tipos principales de rotores:

- *Rotores horizontales.* Bajo la acción de la fuerza centrífuga los tubos giran libremente y se colocan en posición horizontal, de forma que la separación se produce paralela al eje de rotación.
- *Rotores angulares.* Los tubos están fijos y la separación se produce con un componente doble: hacia la pared lateral y hacia el fondo del tubo.

En la figura 2-9 se muestra una centrífuga. Estos aparatos tienen un reóstato, por medio del cual se controla la velocidad de giro. Asimismo, la mayoría de las centrífugas disponen de sistemas de frenado que entran en funcionamiento cuando cesa la acción del motor que mueve el vástago con el cabezal. En algunos sistemas se invierte la polaridad de este motor para que genere una fuerza eléctrica de sentido opuesto al de giro y, de esta manera, se produzca el frenado.

Las centrífugas más completas poseen sistemas de control de la temperatura para ajustarla de acuerdo con lo que se centrifugue. Este tipo de centrífugas se denominan, de forma general, refrigeradas, ya que, normalmente, lo que se desea son temperaturas bajas para conservar en buenas condiciones el espécimen, pues el rozamiento de la centrifugación produce calor. Las centrífugas con velocidades de giro elevadas (ultracentrífugas) llevan sistemas de vacío del compartimento donde se aloja el rotor, a fin de evitar el rozamiento.



FIGURA 2-8 Baño de agua.



FIGURA 2-9 Centrífuga.

Los microscopios ópticos son sistemas de lentes que se utilizan para ampliar los objetos. En los laboratorios, estos microscopios se emplean para observar células, microorganismos y cristales en una gran variedad de medios biológicos.

COMPONENTES DE UN MICROSCOPIO

Todos los microscopios tienen una estructura con un brazo y una base (fig. 2-10). A esta estructura se unen las demás partes. La plataforma donde se coloca lo que quiere observarse se denomina platina y puede moverse mediante un botón. En la base de la mayoría de los microscopios hay una fuente de luz. Su lámpara posee un regulador de voltaje para variar la intensidad de la luz. Casi todos los microscopios disponen de algún sistema para reducir la intensidad.

Los botones de ajuste grueso y ajuste fino, situados de forma concéntrica a los lados del microscopio, se emplean para enfocar los objetos que se observan. En los microscopios binoculares pueden cambiarse la distancia entre los oculares y realizarse ajustes para las dioptrías de cada ojo. De esta forma pueden observarse imágenes nítidas con ambos ojos.

El sistema óptico de los microscopios consta de un objetivo, un ocular y un condensador (v. fig. 2-10).

Objetivo

Los objetivos son sistemas de lentes de aumento que se clasifican según su distancia focal, que es la que hay entre el frente de la lente y el objeto cuando la primera está enfocada. Los objetivos más corrientes son los indicados en la tabla 2-1. La apertura numérica de un objetivo determina su poder de resolución. La apertura numérica es igual a:

$$A = n \operatorname{sen} \alpha$$

donde n = índice de refracción del medio; α = la mitad del ángulo de apertura del objetivo.

De acuerdo con su empleo, los objetivos se clasifican en:

- *Secos*. Se utilizan directamente, de forma que lo único que se interpone entre el objetivo y el espécimen es el aire.
- *De inmersión*. Necesitan un líquido entre el objetivo y el espécimen. Se utilizan diversos aceites, de los que el más empleado es el aceite de cedro, que posee un índice de refracción igual al del cristal.
- *Acromáticos*. Utilizan lentes que eliminan la aberración cromática. Esta distorsión se debe a que la luz blanca es separada por las lentes en sus componentes, por lo que el contorno de las imágenes da unas franjas coloreadas.
- *Apocromáticos*. Usan lentes que eliminan la aberración esférica. Esta se produce por ser la refracción de la luz mayor en los bordes de la lente que en el centro, lo que distorsiona la imagen.

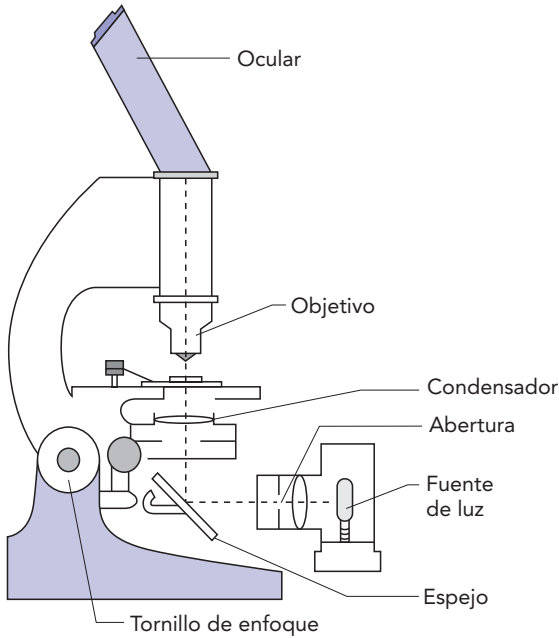


FIGURA 2-10
Esquema de un microscopio donde se señalan sus componentes principales.

Ocular

Los oculares son lentes que amplifican más la imagen formada por el objetivo. Su ampliación es constante, de modo que cuanto mayor sea la distancia entre el objetivo y el ocular (longitud óptica del tubo), mayor será la ampliación del objetivo:

- Los oculares más usados son los de Huygens, que constan de dos lentes simples (planoconvexas), la más baja de las cuales recoge la imagen y la enfoca débilmente sobre el plano del diafragma fijo. Este tipo de oculares no corrigen perfectamente los colores ni el aplanamiento del campo.
- Los oculares de Ramsden se componen de dos o tres lentes.
- Los oculares compensadores son oculares muy corregidos para reducir las aberraciones cromática y de esfericidad del objetivo.

TABLA 2-1 Principales objetivos de los microscopios ópticos que se utilizan en los laboratorios clínicos

| Ampliación | Abertura numérica | Distancia focal (mm) | Diámetro del campo (cm) |
|------------|-------------------|----------------------|-------------------------|
| 10 | 0,25 | 16 | 2 |
| 20 | 0,54 | 8 | 1 |
| 40 | 0,65 | 4 | 0,5 |
| 95* | 1,32 | 2 | 0,05 |

*Objetivo de inmersión.

Los primeros microscopios que se construyeron eran monoculares, pero en la actualidad la mayoría de los que usan los laboratorios son binoculares, lo que requiere un sistema de prismas que desdoblén los rayos luminosos.

Condensador

Los condensadores, que están debajo de la platina, concentran la luz sobre el objeto situado en la platina del microscopio. Suelen construirse con dos lentes (condensador de Abbe), que han de estar bien corregidas, como las de los objetivos, y deben poseer la misma apertura numérica que los objetivos con los que vayan a usarse. Los condensadores pueden moverse hacia arriba y hacia abajo mediante un botón situado debajo de la platina. Por lo general, llevan acoplado un diafragma, para controlar el cono de luz que pasa a través del objeto, y unos filtros.

RESOLUCIÓN

La capacidad de amplificación de un microscopio viene dada por su poder de resolución, que es la distancia entre dos puntos separados que pueden distinguirse como tales. El poder de resolución se relaciona con la longitud de onda de la luz empleada y la apertura numérica, mediante la expresión:

$$d = \frac{\lambda}{2A}$$

La resolución óptima de los mejores microscopios con objetivos de inmersión es de unos 0,2 μm . Para conseguir el máximo poder de resolución de un sistema de lentes deben tenerse en cuenta los factores siguientes:

- Hay que colocar un filtro azul sobre la fuente de luz, ya que las longitudes de onda cortas de la luz azul proporcionan la resolución máxima.
- El condensador debe situarse en la posición más alta, donde permite entrar la máxima cantidad de luz al objetivo.
- El diafragma no ha de centrarse demasiado pues, aunque el centrado mejore el contraste, reduce la apertura numérica.
- Debe utilizarse aceite de inmersión entre el soporte del espécimen y el objetivo de $\times 100$.

CONTRASTE

Por desgracia, la mayoría de los especímenes biológicos, las células y sus componentes son transparentes, de forma que no existe contraste o diferencia de intensidad con el medio y se observan mal con el microscopio. La solución más inmediata a este problema es teñir los especímenes que se vayan a observar, aplicando compuestos coloreados que se fijen o reaccionen con determinados componentes de las células. Se han utilizado también otros métodos para producir contraste y obtener una información cuantitativa de la observación microscópica. Entre ellos están la microscopia de campo oscuro, la de contraste de fase y la de fluorescencia.

Microscopia de campo oscuro

La microscopia de campo oscuro produce el contraste por la observación de los especímenes sobre un fondo oscuro. Los objetos se iluminan por medio de rayos de luz oblicuos que no atraviesan el objetivo. Esto se consigue colocando un diafragma de estrella en la ranura de filtros del condensador. Este dispositivo tiene un disco opaco en el centro que bloquea los rayos de luz centrales. Si se sustituye el disco opaco por discos de celuloide de color, se obtienen fondos de color azul, rojo, etc.

Con la iluminación de campo oscuro que use un disco opaco deben considerarse los puntos siguientes:

- La técnica ha de limitarse al estudio de estructuras grandes que puedan verse fácilmente con una ampliación baja, ya que con este método es difícil conseguir una buena resolución con los objetivos de mayor ampliación.
- Hay que abrir el diafragma y utilizar la mayor cantidad de luz posible.
- Debe centrarse el disco opaco de la forma más precisa.
- Se ha de mover el condensador hacia arriba y hacia abajo para conseguir los mejores efectos.

Microscopia de contraste de fase

La microscopia de contraste de fase se basa en la conversión de pequeñas diferencias del índice de refracción, que presenta el objeto que se observa, en diferencias de brillo. El microscopio de contraste de fase se distingue del microscopio óptico de campo brillante en que tiene otro tipo de diafragma y una placa de fase. El diafragma consta de un disco anular que sólo permite pasar un cono hueco de rayos de luz a través del condensador hacia el objeto. La placa de fase es un disco óptico especial situado en el plano focal posterior del objetivo. Posee un anillo de fase sobre ella que avanza o retarda los rayos de luz directos un cuarto de longitud de onda.

Microscopia de fluorescencia

La microscopia de fluorescencia aprovecha los fenómenos de fluorescencia para producir el contraste. Los componentes fundamentales de un microscopio de fluorescencia son: la fuente de luz, el filtro de calor, el filtro de excitación, el condensador y el filtro de barrera:

- La fuente de luz es una lámpara de arco de vapor de mercurio.
- Los rayos generados por esta lámpara producen una cantidad de calor considerable, y para eliminarlos se usa un filtro que absorbe calor (filtro de calor) y deja pasar los rayos ultravioleta y la mayoría del espectro visible.
- Una vez enfriada tras pasar por el filtro de calor, la luz atraviesa el filtro de excitación, que absorbe todas las longitudes de onda excepto las cortas, necesarias para excitar el fluorocromo situado en el objeto que

va a observarse. Este filtro es muy oscuro y está diseñado para dejar pasar sólo los rayos verde, azul, violeta y ultravioleta.

- Asimismo, se emplea un condensador de campo oscuro para conseguir el mejor contraste de un objeto fluorescente en el campo microscópico. Debe tenerse en cuenta que la fluorescencia débil de un objeto en un campo brillante sería difícil de ver. De este modo, el fondo oscuro producido por el condensador de campo oscuro proporciona el contraste deseado. Otra ventaja de este tipo de condensador es que desvía la mayoría de los rayos ultravioleta, lo que protege los ojos del observador. Para conseguirlo, la apertura numérica del objetivo será siempre 0,05 menor que la del condensador.
- El filtro de barrera se encuentra entre el objetivo y el ocular, y elimina el resto de la luz de excitación, de forma que sólo se observe la fluorescencia.

Magnitudes, unidades de medida y preparación de disoluciones

INTRODUCCIÓN

Las magnitudes son propiedades medibles de un sistema. En los laboratorios clínicos se determinan un número elevado de magnitudes bioquímicas, hematológicas, inmunológicas y microbiológicas. Las magnitudes se expresan en unidades de medida. Asimismo, los laboratorios clínicos preparan disoluciones para las determinaciones que realizan. En este capítulo se presentan los conceptos referentes a las magnitudes que miden los laboratorios clínicos, se relacionan las principales unidades de medida que utilizan y se describe la preparación de disoluciones.

MAGNITUDES

Las magnitudes son propiedades medibles en un sistema. Se caracterizan por el sistema, el componente y el tipo:

1. El *sistema* es el medio en que se encuentra el componente. Los principales sistemas que emplean los laboratorios clínicos son la sangre, el suero, el plasma, la orina y otros líquidos biológicos.
2. El *componente* es lo que se mide.
3. El *tipo* de magnitud es la propiedad que se mide.

La descripción sistemática de las magnitudes debe seguir el modelo:

Sistema–componente; tipo de magnitud

Las magnitudes más empleadas en los laboratorios clínicos son: concentración de sustancia, concentración de sustancia arbitraria, concentración de masa, concentración catalítica y concentración de número. En la tabla 3-1 se enumeran las principales magnitudes bioquímico-clínicas.

PROCESO DE MEDIDA

A continuación se describen los principales términos relacionados con el proceso de medida de una magnitud:

1. Un *análisis* es un proceso que proporciona información física o química sobre los constituyentes de un espécimen. Los análisis pueden ser cualitativos o cuantitativos. En los primeros se identifica la presencia de una sustancia en un espécimen. Los cuantitativos son aquellos en los que se determina la cantidad de una sustancia dada en un espécimen.
2. Una *medida* es la determinación experimental de las propiedades físicas o químicas de una sustancia.

TABLA 3-1 Principales magnitudes bioquímico-clínicas

| Magnitud en suero | Unidad |
|---|--------|
| Alanina aminotransferasa; <i>concentración catalítica</i> | μkat/l |
| Albúmina; <i>concentración de masa</i> | g/l |
| α-amilasa; <i>concentración catalítica</i> | μkat/l |
| Androstenediona; <i>concentración de sustancia</i> | nmol/l |
| Antígeno carcinoembrionario; <i>concentración de masa</i> | μg/l |
| α ₁ -antitripsina; <i>concentración de masa</i> | mg/l |
| Apolipoproteína A-I; <i>concentración de masa</i> | g/l |
| Apolipoproteína B; <i>concentración de masa</i> | g/l |
| Aspartato aminotransferasa; <i>concentración catalítica</i> | μkat/l |
| Bilirrubina; <i>concentración de sustancia</i> | μmol/l |
| Calcio; <i>concentración de sustancia</i> | mmol/l |
| Calcitonina; <i>concentración de sustancia</i> | ng/l |
| Cloruro; <i>concentración de sustancia</i> | mmol/l |
| Colesterol; <i>concentración de sustancia</i> | mmol/l |
| Colesterol de HDL; <i>concentración de sustancia</i> | mmol/l |
| Colinesterasa; <i>concentración catalítica</i> | μkat/l |
| Cortisol; <i>concentración de sustancia</i> | nmol/l |
| Cobre (II); <i>concentración de sustancia</i> | μmol/l |
| Creatina cinasa; <i>concentración catalítica</i> | μkat/l |
| Creatina cinasa 2; <i>concentración catalítica</i> | μkat/l |
| Creatinina; <i>concentración de sustancia</i> | μmol/l |
| Estradiol; <i>concentración de sustancia</i> | nmol/l |
| Factores reumatoides; <i>concentración de masa</i> | ua/l |
| Ferritina; <i>concentración de masa</i> | μg/l |
| α-fetoproteína; <i>concentración de masa</i> | μg/l |
| Folatos; <i>concentración de sustancia</i> | nmol/l |
| Folitropina; <i>concentración de sustancia arbitraria</i> | UI/l |
| Fosfato; <i>concentración de sustancia</i> | mmol/l |
| Fosfatasa ácida; <i>concentración catalítica</i> | μkat/l |
| Fosfatasa alcalina; <i>concentración catalítica</i> | μkat/l |
| Fructosamina; <i>concentración de sustancia</i> | mmol/l |
| Glucosa; <i>concentración de sustancia</i> | mmol/l |
| Gammaglutamil transferasa; <i>concentración catalítica</i> | μkat/l |
| Gonadotropina coriónica; <i>concentración de sustancia</i> | ng/l |
| Haptoglobina; <i>concentración de sustancia</i> | μmol/l |
| Hierro (II + III); <i>concentración de sustancia</i> | μmol/l |
| Inmunoglobulina A; <i>concentración de masa</i> | g/l |
| Inmunoglobulina G; <i>concentración de masa</i> | g/l |
| Inmunoglobulina M; <i>concentración de masa</i> | g/l |
| Insulina; <i>concentración de sustancia</i> | pmol/l |
| Ion potasio; <i>concentración de sustancia</i> | mmol/l |
| Ion sodio; <i>concentración de sustancia</i> | mmol/l |
| Lactato deshidrogenasa; <i>concentración catalítica</i> | μkat/l |
| Luteotropina; <i>concentración de sustancia</i> | UI/l |
| Magnesio; <i>concentración de sustancia</i> | mmol/l |

TABLA 3-1 Principales magnitudes bioquímico-clínicas (cont.)

| Magnitud en suero | Unidad |
|---|-------------------|
| β_2 -microglobulina; concentración de masa | $\mu\text{g/l}$ |
| Mioglobina; concentración de masa | $\mu\text{g/l}$ |
| Paratirina; concentración de sustancia | pmol/l |
| Péptido C; concentración de sustancia | nmol/l |
| Prealbúmina; concentración de masa | mg/l |
| Progesterona; concentración de sustancia | nmol/l |
| Prolactina; concentración de sustancia | $\mu\text{g/l}$ |
| Proteína; concentración de masa | g/l |
| Proteína C reactiva; concentración de masa | mg/l |
| Testosterona; concentración de sustancia | $\mu\text{mol/l}$ |
| Tirotropina; concentración de sustancia | UI/l |
| Tiroxina; concentración de sustancia | nmol/l |
| Transferrina; concentración de masa | g/l |
| Triglicérido; concentración de sustancia | mmol/l |
| Triyodotironina; concentración de sustancia | nmol/l |
| Urato; concentración de sustancia | $\mu\text{mol/l}$ |
| Urea; concentración de sustancia | mmol/l |
| Vitamina B ₁₂ ; concentración de sustancia | pmol/l |
| Magnitud en orina (día) | Unidad |
| Ácido (H ⁺); cantidad de sustancia | mmol |
| Albumina, masa | g |
| α -amilasa; concentración catalítica | $\mu\text{kat/l}$ |
| Creatinina; cantidad de sustancia | mmol |
| Fosfatos; concentración de sustancia | mmol |
| Glucosa; concentración de sustancia | mmol/l |
| Gonadotropina coriónica; concentración de sustancia | UI/l |
| 17-hidrocorticoide; cantidad de sustancia | μmol |
| 5-hidroxiindolacético; cantidad de sustancia | μmol |
| Hidroxiprolina; cantidad de sustancia | μmol |
| Ion potasio; cantidad de sustancia | mmol |
| Ion sodio; cantidad de sustancia | mmol |
| 17-oxoesteroide; cantidad de sustancia | μmol |
| Proteína; concentración de masa | g/l |
| HDL, lipoproteínas de alta densidad. | |

- Una *técnica* es cualquier principio físico o químico que puede utilizarse para estudiar una sustancia. Entre las que se usan en los laboratorios clínicos y que se exponen en este texto están las espectroscópicas, las electroquímicas, las cromatográficas, las electroforéticas y las microscópicas.
- Un *método* es la aplicación de una técnica para determinar una sustancia específica en una determinada matriz. Por ejemplo, la medición de

colesterol en suero puede realizarse mediante un método espectroscópico de punto final, y las catecolaminas en la orina pueden determinarse por otro de cromatografía líquida de alta eficacia.

5. Un *procedimiento* es un conjunto escrito de instrucciones que detalla la aplicación de un método. Este no conduce necesariamente a un único procedimiento, ya que puede realizarse de diversas maneras.
6. Finalmente, un *protocolo* es un conjunto de instrucciones escritas estrictas que concretan el procedimiento que debe seguirse.

UNIDADES DE MEDIDA

Los resultados de las mediciones se expresan con un número y una unidad. La unidad identifica la dimensión de la propiedad medida, mientras que el número indica las veces que contiene la propiedad. Las unidades del sistema métrico son las más utilizadas en los laboratorios clínicos. Inicialmente, tenían como referencia la longitud, la masa y el tiempo. El primer sistema absoluto se denominó CGS y tenía como unidades básicas el centímetro, el gramo y el segundo. Posteriormente, se empleó el sistema MKS, que se basaba en el metro, el kilogramo y el segundo. En 1960, el Comité Internacional de Pesas y Medidas aceptó el Sistema Internacional de Unidades (SI). Este sistema tiene dos clases de unidades: básicas y derivadas.

UNIDADES BÁSICAS

Corresponden a ocho magnitudes físicas fundamentales, de dimensiones independientes, que son la longitud, la masa, el tiempo, la temperatura, la cantidad de sustancia, la corriente eléctrica, la intensidad de luz y la actividad catalítica (tabla 3-2):

1. La unidad de longitud es el metro, que se define como la longitud igual a 1.650.763,73 veces la longitud de onda en el vacío de la radiación correspondiente a la transición entre los niveles $2p^{10}$ y $5d^5$ del átomo de kriptón 86.
2. La unidad de masa es el kilogramo, igual a la masa del prototipo internacional de la Oficina Internacional de Pesas y Medidas.

TABLA 3-2 Unidades básicas del Sistema Internacional (SI)

| Magnitud | Nombre | Símbolo |
|-----------------------|-----------|---------|
| Longitud | metro | m |
| Masa | kilogramo | kg |
| Tiempo | segundo | s |
| Temperatura | Kelvin | K |
| Cantidad de sustancia | mol | mol |
| Corriente eléctrica | amperio | A |
| Intensidad de luz | candela | cd |
| Actividad catalítica | katal | kat |

3. La unidad de tiempo es el segundo, que se define como la duración de 9.192.631,770 veces el período de la radiación correspondiente a la transición entre los niveles hiperfinos del estado basal del átomo de cesio 133.
4. La unidad de temperatura termodinámica es el Kelvin, que se define como la fracción $1/273,16$ del punto triple del agua. La unidad grado Celsius equivale exactamente al Kelvin.
5. La unidad de cantidad de sustancia es el mol, que se define como la cantidad de sustancia de un sistema que contiene tantas entidades elementales como átomos hay en 0,012 kg de carbono 12. Cuando se utiliza el mol deben especificarse las entidades elementales, que pueden ser átomos, moléculas, iones, electrones u otras partículas.
6. La unidad de intensidad de corriente eléctrica es el amperio, que se define como la corriente que, mantenida en dos conductores paralelos rectos, de longitud infinita y sección circular insignificante, y colocados con un metro de separación, producen entre ellos una fuerza igual a 2×10^{-7} N/m.
7. La unidad de intensidad de luz es la candela, que se define como la intensidad luminosa en dirección perpendicular de una superficie de $1/600.000$ m² de un cuerpo negro, a la temperatura del platino helado, bajo una presión de 101.325 N/m².
8. Como unidad de actividad catalítica se define el katal (mol/s), que es la cantidad catalítica de cualquier catalizador, incluidas las enzimas, que cataliza una velocidad de reacción de un mol por segundo. Existe una relación constante entre la Unidad Internacional (1 mol/min) y el katal (1 mol/s), de forma que, para transformar un valor de unidades internacionales a nmol/s, se multiplica por 16,67.

La aplicación de las unidades SI proporciona algunas veces valores muy grandes o muy pequeños cuyo uso es engorroso. Para evitarlo se utilizan múltiplos o submúltiplos; los principales que acepta el SI se presentan en la tabla 3-3.

TABLA 3-3 Múltiplos y submúltiplos del Sistema Internacional de Unidades

| Prefijo | Símbolo | Factor | Prefijo | Símbolo | Factor |
|---------|---------|-----------|---------|---------|------------|
| Yotta | Y | 10^{24} | deci | d | 10^{-1} |
| Zetta | Z | 10^{21} | centi | c | 10^{-2} |
| Exa | E | 10^{18} | mili | m | 10^{-3} |
| Peta | P | 10^{15} | micro | μ | 10^{-6} |
| Tera | T | 10^{12} | nano | n | 10^{-9} |
| Giga | G | 10^9 | pico | p | 10^{-12} |
| Mega | M | 10^6 | femto | f | 10^{-15} |
| Kilo | K | 10^3 | atto | a | 10^{-18} |
| Hecto | H | 10^2 | zepto | z | 10^{-21} |
| Deca | D | 10 | yocto | y | 10^{-24} |

UNIDADES DERIVADAS

Se forman con dos o más unidades básicas. La tabla 3-4 presenta ejemplos de unidades derivadas, algunas de las cuales reciben nombres especiales.

Hay también unidades no encuadradas en el SI que se utilizan con unidades de este sistema. La tabla 3-5 presenta las principales, que corresponden al tiempo (minuto, hora y día) y al volumen (litro y decilitro). Estas unidades se utilizan con profusión en los laboratorios clínicos. En España, la mayoría de estos todavía utiliza las unidades convencionales para expresar los resultados. Para transformar estos valores en unidades SI, basta multiplicar por un factor de conversión. En la tabla 3-6 se ofrecen los factores de conversión correspondientes a las magnitudes más habituales en los laboratorios clínicos.

PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

Una disolución es una mezcla homogénea de una o varias sustancias que se denominan solutos, dispersadas de forma molecular en una cantidad suficiente de un medio disolvente. Con frecuencia deben prepararse en el laboratorio

TABLA 3-4 *Unidades derivadas*

| Magnitud | Nombre | Símbolo SI | Expresión en unidades SI |
|----------------------------|----------------------------|--------------------|---|
| Volumen | metro cúbico | m ³ | m ³ |
| Densidad | kilogramo por metro cúbico | kg/m ³ | kg/m ³ |
| Velocidad | metro por segundo | m/s | m/s |
| Concentración de sustancia | mol por metro cúbico | mol/m ³ | mol/m ³ |
| Fuerza | Newton | N | m·kg/s ² |
| Presión | Pascal | Pa | kg/m·s ² |
| Energía, trabajo, calor | Julio | J | m ² ·kg/s ² |
| Potencia | watio | W | m ² ·kg/s ³ |
| Carga eléctrica | culombio | C | A·s |
| Potencial eléctrico | voltio | V | m ² ·kg/s ³ ·A |
| Resistencia | ohmio | V | m ² ·kg/s ³ ·A ² |
| Frecuencia | hertzio | Hz | s ⁻¹ |

TABLA 3-5 *Unidades que no son del SI y se emplean con unidades del SI*

| Magnitud | Unidad | Símbolo | Valor en unidades SI |
|----------|-----------|---------|--|
| Tiempo | minuto | min | 1 min = 60 s |
| | hora | h | 1 h = 3.600 s |
| | día | d | 1 d = 86.400 s |
| Volumen | litro | l | 1 l = 10 ⁻³ m ³ |
| | decilitro | dl | 1 dl = 10 ⁻⁴ m ³ |

TABLA 3-6 Factores de conversión más usuales en los laboratorios clínicos

| Magnitud | Unidad convencional | Factor | Unidad SI |
|------------------|---------------------|--------|-----------|
| Ácido úrico | mg/dl | 0,059 | mmol/l |
| Bilirrubina | mg/dl | 17,1 | μmol/l |
| Calcio | mg/dl | 0,25 | mmol/l |
| pCO ₂ | mmHg | 0,133 | kPa |
| Colesterol | mg/dl | 0,0259 | mmol/l |
| Creatinina | mg/dl | 88,4 | μmol/l |
| Glucosa | mg/dl | 0,0555 | mmol/l |
| Hierro | mg/dl | 0,179 | μmol/l |
| pO ₂ | mmHg | 0,133 | kPa |
| Fósforo | mg/dl | 0,323 | mmol/l |
| Potasio | mEq/l | 1 | mmol/l |
| Proteínas | g/dl | 10 | g/l |
| Sodio | mEq/l | 1 | mmol/l |
| Triglicéridos | mg/dl | 0,0113 | mmol/l |
| Urea | mg/dl | 0,357 | mmol/l |

clínico disoluciones y reactivos. Asimismo, en muchas ocasiones hay que diluir los especímenes o los reactivos. En los apartados siguientes se describe de forma práctica cómo se realizan las diluciones y cómo se preparan disoluciones, de concentración expresada en diferentes unidades físicas y químicas. También se describe la preparación de disoluciones amortiguadoras.

DILUCIONES

La dilución de especímenes y reactivos se realiza muy a menudo en los laboratorios. Expresa la relación de una disolución en un volumen total. Así, por ejemplo, una dilución 1:5 contiene un volumen de una disolución original en un volumen total de 5. La fórmula:

$$V \times c = V' \times c'$$

(donde V = volumen de la disolución concentrada; c = concentración de la disolución concentrada; V' = volumen de la disolución diluida; c' = concentración de la disolución diluida)

es la más utilizada para preparar diluciones. Por ejemplo, para diluir un espécimen de suero 1:10, se toma un volumen del espécimen (0,1 ml, 1 ml, etc.) y se añaden 9 volúmenes del diluyente (0,9 ml, 9 ml, etc.).

DISOLUCIONES DE CONCENTRACIÓN EXPRESADA EN UNIDADES FÍSICAS

Las unidades físicas que expresan la concentración de las disoluciones se basan en magnitudes físicas como la masa y el volumen. Son las unidades clásicas

para expresar la concentración, que se recomienda sustituir por las unidades químicas. A continuación se relacionan las más utilizadas.

PORCENTAJE EN PESO

El porcentaje en peso expresa la cantidad de soluto presente en 100 g de disolución. Para preparar las disoluciones cuya concentración se exprese así, se pesa el soluto y el disolvente en un equivalente a 100. Por ejemplo, se mezclan 5 g de sulfato de cobre y 95 g de agua y de este modo se obtiene una disolución de sulfato de cobre del 5% (peso/peso).

PORCENTAJE EN VOLUMEN

Indica la cantidad de soluto en 100 ml de una disolución y se utiliza cuando el soluto y el disolvente sean líquidos. Por ejemplo, una disolución alcohólica del 40% contiene 40 volúmenes de alcohol en 100 volúmenes de disolución. Para preparar un litro de esta disolución se toman 400 ml de etanol absoluto y se ponen en un matraz aforado de 1 l, que se enrasa con agua destilada.

PESO DE SOLUTO POR UNIDAD DE VOLUMEN DE DISOLUCIÓN

La expresión que se utiliza más frecuentemente son los gramos por litro (g/l). En los laboratorios clínicos se emplea con frecuencia la expresión miligramo por 100 ml o decilitro (mg/dl). Por ejemplo, una disolución de cloruro sódico de 9 g/l contiene 9 g de cloruro sódico en 1 l de disolución; para preparar 1 l de esta disolución se pesan 9 g de NaCl, se colocan en un matraz aforado de 1 l y se añade agua destilada hasta la marca de enrase.

PARTES POR MILLÓN (PPM)

Son cocientes de masa de gramos de soluto en un millón de gramos de espécimen. Por ejemplo, una disolución que contenga 320 ppm de Cr tendrá 320 $\mu\text{g/ml}$.

DISOLUCIONES DE CONCENTRACIÓN EXPRESADA EN UNIDADES QUÍMICAS

Las unidades químicas que expresan la concentración de las disoluciones se basan en las magnitudes químicas cantidad de sustancia y equivalente-gramo. El uso de estas magnitudes se fundamenta en que las sustancias reaccionan entre ellas mol a mol o equivalente a equivalente.

MOLARIDAD

Una disolución molar (M) es la que contiene un mol de soluto en un litro de disolución. Un mol de una sustancia es su peso molecular en gramos. Así, una disolución 1 M de NaCl (peso molecular de 58,5) contiene 58,5 g de NaCl en 1 l de disolución. Si se desea obtener 250 ml de una disolución 0,2 M de NaCl, deberán pesarse:

$$\frac{58,5 \times 0,2}{1.000/250} = 2,925 \text{ g de NaCl,}$$

deberán colocarse en un matraz aforado de 250 ml y añadir agua destilada hasta la marca de enrase.

Cuando se quiera preparar una disolución de concentración molar a partir de un líquido, habrá que tener en cuenta la densidad y la riqueza en peso del producto de partida. Por ejemplo, se va a preparar 500 ml de ácido sulfúrico 2 M a partir de ácido sulfúrico concentrado comercial de una densidad de 1,80 g/ml y una riqueza en peso del 98%. En primer lugar, debe calcularse la concentración molar del ácido sulfúrico concentrado. De acuerdo con la riqueza en peso, en cada 100 g de ácido sulfúrico concentrado hay 98 g puros; por otro lado, y de acuerdo con la densidad, 1 l (1.000 ml) pesa 1.800 g. Se tiene entonces $100/98 = 1.800/x$ y

$$x = \frac{98 \times 1.800}{100} = 1.764 \text{ g/l,}$$

y la disolución contiene 1.764 g/l. Como el peso molecular del ácido sulfúrico es 98, la molaridad del ácido sulfúrico concentrado es $1.764/98 = 18 \text{ M}$.

Para preparar los 500 ml de ácido sulfúrico 2 M a partir del concentrado (18 M), se aplica la fórmula de dilución:

$$V \times 18 = 500 \times 2, \quad \text{y} \quad V = \frac{500 \times 2}{18} = 27,8 \text{ ml}$$

Se toman 27,8 ml del ácido sulfúrico comercial concentrado (18 M) y se llevan a un matraz aforado de 500 ml, que se enrasa con agua hasta la marca. ¡Cuidado, al principio nunca debe añadirse agua sobre ácido sulfúrico concentrado, sino siempre ácido sulfúrico sobre agua! Así, en este caso se pondría agua destilada en el matraz aforado, por ejemplo unos 400 ml, y luego se añadiría el ácido sulfúrico concentrado. Una vez añadido todo el ácido, se enrasaría en 500 ml con agua destilada.

NORMALIDAD

Una disolución normal (N) es la que contiene un equivalente-gramo de un soluto en 1 l de disolución. El equivalente-gramo de una sustancia es igual a su peso molecular dividido por su valencia, expresado en gramos. Cuando la valencia de una sustancia sea 1, sus disoluciones poseerán la misma molaridad y normalidad. Por ejemplo, una disolución de ácido clorhídrico 1 M es también 1 N. Sin embargo, en el ácido sulfúrico, que tiene valencia 2, una disolución 1 M es 2 N. La molaridad y la normalidad están relacionadas por esta fórmula:

$$N = M \times v$$

donde v = valencia de la sustancia.

Una disolución que contenga 55 g/l de cloruro cálcico de peso molecular 111 y valencia 2 será 1 N. Si se quisiera preparar 500 ml de una disolución 0,3 N de dicho cloruro, habría de pesarse:

$$\frac{0,3 \times 55}{1.000/500} = 8,25 \text{ g}$$

de cloruro cálcico, llevarlos a un matraz aforado de 500 ml y añadir agua destilada hasta la marca de enrase.

Cuando se trata de líquidos, como ya se vio en el caso de la molaridad, debe considerarse la riqueza en peso y la densidad. Por ejemplo, para preparar 500 ml de ácido sulfúrico 0,25 N a partir de ácido sulfúrico comercial concentrado de densidad 1,8 g/ml y riqueza en peso del 98% —que, como ya se ha dicho, es 18 M—, se debe calcular primero la concentración normal, que será $18 \times 2 = 36 \text{ N}$. Aplicando la fórmula de la dilución: $500 \times 0,25 = V \times 36$, $V = 500 \times 0,25/36 = 3,47 \text{ ml}$. Se toman 3,47 ml de ácido sulfúrico concentrado (36 N), se colocan en un matraz aforado de 500 ml que contenga agua destilada hasta aproximadamente la mitad —recuérdese que al principio no debe añadirse agua sobre ácido sulfúrico concentrado, sino siempre el ácido sulfúrico concentrado sobre el agua— y se lleva hasta el enrase con más agua destilada.

DISOLUCIONES AMORTIGUADORAS

Las disoluciones amortiguadoras son sistemas que admiten pequeñas adiciones de ácidos o bases, sin que se altere el pH de la disolución. Los amortiguadores están formados por una disolución de un ácido o de una base débil y un exceso de su base o de su ácido conjugado, respectivamente. Consideremos una disolución de un ácido débil con una constante de equilibrio K_a :



$$K_a = [\text{A}^-] \times \frac{[\text{H}^+]}{[\text{AH}]}$$

Despejando $[\text{H}^+]$ tenemos:

$$[\text{H}^+] = K_a \frac{[\text{AH}]}{[\text{A}^-]}$$

Tomando logaritmos decimales:

$$\log [\text{H}^+] = \log K_a + \log \frac{[\text{AH}]}{[\text{A}^-]}$$

Y cambiando el signo:

$$-\log [H^+] = -\log K_a - \log \frac{[AH]}{[A^-]}$$

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

Es la ecuación de Henderson-Hasselbalch, que relaciona las concentraciones de las especies ácida y básica de un ácido o una base débil con el pH de la disolución.

Un amortiguador característico es el ácido acético/acetato. A continuación se explica la forma de preparar 1 l de un amortiguador de acetato sódico 0,1 M de pH 5. El pK_a del ácido acético es 4,75, su peso molecular 60 y el del acetato sódico 82. De acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = 4,75 + \log \frac{[\text{acetato}]}{[\text{acético}]}$$

$$\log \frac{[\text{acetato}]}{[\text{acético}]} = 5 - 4,75 = 0,25$$

$$\frac{[\text{acetato}]}{[\text{acético}]} = \text{antilog } 0,25$$

$$\frac{[\text{acetato}]}{[\text{acético}]} = 1,78$$

1,78 es la relación entre las concentraciones de acetato sódico y de ácido acético, de forma que las concentraciones que den esta relación producirán un amortiguador de pH 5. Como la concentración del amortiguador solicitada es 0,1 M, tenemos un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas:

$$[\text{acetato}] + [\text{acético}] = 0,1$$

$$\frac{[\text{acetato}]}{[\text{acético}]} = 1,78$$

$$[\text{acetato}] = 1,78 [\text{acético}]$$

$$1,78 [\text{acético}] + [\text{acetato}] = 0,1$$

$$2,78 [\text{acético}] = 0,1$$

$$[\text{acético}] = \frac{0,1}{2,78} = 0,036$$

$$[\text{acético}] = 0,036 \text{ mol/l} \times P_m = 0,036 \text{ mol/l} \times 60 \text{ g/mol} = 2,16 \text{ g/l}$$

$$[\text{acetato}] = 1,78 \times 0,036 \text{ mol/l} = 0,0641 \text{ mol/l} \times 82 \text{ g/mol} = 5,26 \text{ g/l}$$

Se pesan 2,16 g de ácido acético y 5,26 g de acetato sódico, y se llevan a un matraz aforado de 1 l, al que se añade agua destilada hasta enrasarlo.

Los amortiguadores que más se emplean en los laboratorios clínicos son los de acetato, carbonato/bicarbonato, fosfato, tris y veronal.

Seguridad en el laboratorio clínico

INTRODUCCIÓN

Los laboratorios clínicos son instalaciones en las que se trabaja con sustancias químicas y muestras biológicas de diversa peligrosidad. Además, se generan residuos peligrosos que deben eliminarse de forma adecuada para evitar contaminaciones ambientales. En este capítulo se presentan los conceptos principales sobre la seguridad en el laboratorio clínico.

CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE SEGURIDAD

La seguridad en los laboratorios clínicos es un tema de gran importancia que afecta a todas las personas que trabajan en ellos. Por este motivo, las medidas preventivas son esenciales para impedir los accidentes. Con frecuencia, la causa de algunos de ellos es la inexperiencia, aunque otros muchos se deben a la ignorancia, el cansancio, los descuidos o la dejadez.

El Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), dependiente del Ministerio de Trabajo e Inmigración, publica unas denominadas Notas Técnicas de Prevención (NTP), entre las que se incluyen diversas relacionadas con el trabajo en los laboratorios clínicos. Asimismo, en 1997 se publicó el Real Decreto 664/1997 sobre protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a diversos agentes durante el trabajo. En el contexto europeo se ha publicado la Directiva 2000/54/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de septiembre de 2000, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.

PROGRAMA DE SEGURIDAD

Todos los laboratorios clínicos deben disponer de un programa y un manual de seguridad, ya que todo su personal debe conocer los riesgos que conlleva su trabajo en dichos laboratorios. En ellos se deben señalar las medidas generales para la prevención de riesgos y las condiciones particulares para cada una de las áreas de trabajo y los diferentes riesgos específicos y las medidas a tomar cuando se produzca un accidente. El manual debe revisarse con frecuencia para poner al día todas las acciones relativas a la seguridad.

Aunque el responsable final de la seguridad del laboratorio es el director del mismo, debe existir una persona encargada de la seguridad. Una parte importante del programa de seguridad del laboratorio es la formación y motivación de todas las personas que trabajan en el laboratorio clínico sobre los temas de seguridad. Otro aspecto fundamental del programa de seguridad es garantizar que todo el laboratorio satisface los estándares de seguridad aceptados.

El diseño de los laboratorios clínicos debe tener en cuenta los posibles riesgos que puedan presentarse durante su funcionamiento. Para ello, los arquitectos deben colocar adecuadamente por las instalaciones del laboratorio todos los dispositivos adecuados que contribuyan a la seguridad. Asimismo, los laboratorios clínicos deben disponer de diversos equipos de seguridad adecuados. Entre ellos se encuentra el vestuario, que incluye batas y pijamas, guantes y protectores oculares que han de emplearse en las áreas donde sean necesarios. Asimismo, deben colocarse por el laboratorio lavabos para ojos y manos. También duchas de seguridad, situadas estratégicamente por el laboratorio. Se dispondrá de guantes para manipular el material de vidrio caliente y el hielo seco. También se dispondrá de protectores oculares de diversos tipos y tamaños para adaptarse adecuadamente a todas las personas que trabajan en el laboratorio. Las personas que usen lentes de contacto deben tener especial cuidado cuando manipulen sustancias irritantes. Los laboratorios clínicos tendrán una campana de extracción donde manipular los materiales tóxicos o las muestras que contengan agentes infecciosos.

Una cantidad importante de las bajas producidas en el personal que trabaja en los laboratorios clínicos se debe a trastornos del sistema musculoesquelético producidos por el trabajo rutinario frente a las pantallas de los analizadores o los ordenadores. Debe disponerse de las sillas y los taburetes adecuados para evitar en lo posible estas lesiones. Asimismo, hay que evitar los ruidos intensos que puedan producir lesiones.

MATERIALES Y RIESGOS QUÍMICOS

Los laboratorios clínicos emplean sustancias y reactivos sólidos, líquidos y gaseosos de diversa peligrosidad. Los avances tecnológicos y la automatización han conducido a que cada vez se empleen menos sustancias químicas peligrosas al ser sustituidas por reactivos ya preparados y listos para su uso, lo que ha hecho que disminuyan en gran medida los riesgos químicos.

Los productos químicos deben almacenarse y utilizarse de forma adecuada para evitar el riesgo de quemaduras, explosiones, fuegos, humos tóxicos, etc. Las salpicaduras de ácidos, materiales cáusticos y agentes oxidantes fuertes probablemente son el mayor peligro para la ropa y los ojos, y son un origen potencial de quemaduras químicas. Cuando se trabaje con soluciones ácidas o alcalinas habrá de llevarse gafas de seguridad. Los ácidos fuertes deben diluirse añadiéndolos lentamente al agua mientras se mezcla. No debe añadirse nunca agua sobre un ácido concentrado.

Por otra parte, todos los recipientes con reactivos estarán etiquetados adecuadamente. Conviene señalar, además del nombre del reactivo y su concentración, la fecha de preparación y, si caduca, la de caducidad.

Los ácidos fuertes, todas las sustancias cáusticas y los agentes oxidantes fuertes deben dispensarse mediante cualquiera de los dispositivos automáticos señalados en el capítulo 2. En ningún caso se pipeteará con la boca.

SUSTANCIAS VOLÁTILES

El uso de disolventes orgánicos en el laboratorio clínico supone un riesgo potencial de fuego, y riesgos para la salud por inhalación de vapores tóxicos o por contacto con la piel. Estos disolventes deben manipularse en una campana de humos. Es esencial que el extractor de la campana esté en perfectas condiciones de funcionamiento, ya que, si no lo estuviera, la campana representaría, más que una protección, un riesgo para los usuarios. La salida de la campana tiene que disponer de un filtro y, cuando haya varias campanas, debe tenerse cuidado de que no estén intercomunicadas.

GASES COMPRIMIDOS

Los principales gases que se emplean en los laboratorios clínicos son el oxígeno, el hidrógeno, el nitrógeno, el helio, el dióxido de carbono y, en menor medida, el acetileno y el propano. Estos gases se aplican sobre todo a los analizadores de pH y gases en sangre, las estufas de cultivo, los fotómetros de llama y los espectrómetros de absorción atómica.

Las bombonas de gases deben estar bien aseguradas a una pared mediante una cadena para evitar que se caigan, pues si no podrían ocasionar daños materiales o personales, ya que la bombona puede salir despedida como una bala. Ha de comprobarse periódicamente que no haya fugas. Las pequeñas pérdidas de oxígeno o nitrógeno no tienen consecuencias, pero las de hidrógeno, acetileno u otros gases inflamables no pueden tolerarse.

AGENTES Y RIESGOS BIOLÓGICOS

Los laboratorios clínicos procesan especímenes biológicos como sangre, suero, plasma, orina, líquidos de cavidades, etc. potencialmente infecciosos. Los agentes biológicos son aquellos microorganismos, cultivos celulares o endoparásitos humanos vivos, o los productos derivados de los mismos, capaces de producir enfermedades, alergias o toxicidad. De acuerdo con su riesgo, los agentes biológicos se clasifican en cuatro grupos:

Grupo 1. Aquellos que con poca probabilidad causan una enfermedad en el ser humano.

Grupo 2. Aquellos que pueden causar una enfermedad en el ser humano y pueden suponer un peligro para los trabajadores, pero que es poco probable que se propaguen a la colectividad y para los que existe profilaxis o tratamiento eficaz.

Grupo 3. Aquellos que pueden causar una enfermedad grave en el ser humano y representan un peligro serio para los trabajadores, con riesgo de que se propaguen a la colectividad y para los que existe profilaxis o tratamiento eficaz.

Grupo 4. Aquellos que causan una enfermedad grave en el ser humano y suponen un peligro serio para los trabajadores, con muchas probabilidades de que se propaguen a la colectividad y sin que exista profilaxis o tratamiento eficaz.

Todos los especímenes biológicos deben manipularse como si fueran infecciosos. Las precauciones tienen que extenderse a todos los especímenes de sangre, suero, plasma, productos sanguíneos, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, semen y secreciones vaginales. Además, cualquier espécimen que contenga trazas visibles de sangre debe manejarse cuidadosamente.

Las principales vías de penetración en el organismo son la respiratoria, la digestiva y la parenteral. La exposición a los agentes patógenos puede producirse mediante pinchazos accidentales con agujas hipodérmicas, la difusión de materiales infecciosos por una jeringa o la salpicadura de los mismos en poyatas o suelos, los accidentes de centrifugas y los cortes o arañazos con vidrios contaminados. Cualquier tejido sin fijar, incluidas las extensiones sanguíneas, debe considerarse un material potencialmente infeccioso.

Las precauciones al respecto contemplan el uso de barreras adecuadas como guantes, gorros, mascarillas y gafas que eviten el contacto de la piel y las mucosas con los especímenes. Hay que lavarse siempre las manos tras quitarse los guantes y siempre que hayan estado en contacto con sangre u otros líquidos biológicos. Nunca deben reutilizarse los guantes, antes bien, se desecharán en los recipientes adecuados una vez usados. En las áreas de trabajo ha de prohibirse comer, beber, fumar, maquillarse o realizar cualquier operación que pueda poner en contacto con potenciales agentes infecciosos.

En 2001, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) proporcionó las siguientes recomendaciones con relación a los riesgos biológicos:

- No pipetear con la boca y no soplar nunca pipetas que contengan material potencialmente infeccioso.
- No mezclar este tipo de material burbujeando aire a través del líquido.
- Hay que tener y emplear barreras de protección, como guantes, mascarillas, protectores oculares y batas, cuando se extraiga sangre de un paciente y cuando se manipulen todos los especímenes de los pacientes. Esto incluye la separación de los tapones de los tubos.
- Lavarse las manos siempre que se cambien los guantes.
- Deben utilizarse barreras de protección facial cuando exista la posibilidad de salpicaduras de sangre o de líquidos biológicos.
- Evitar el uso de jeringas siempre que se pueda y desechar las agujas en contenedores rígidos, sin manipularlos.
- Desechar de forma adecuada todo el material cortante.
- Utilizar ropa protectora que sirva de barrera eficaz frente a los materiales potencialmente infecciosos.
- Intentar evitar las lesiones accidentales.
- Fomentar el lavado frecuente de las manos en el laboratorio. Los trabajadores deben lavárselas siempre que vayan a salir del mismo.
- Fomentar el hábito de mantener las manos lejos de la boca, la nariz, los ojos y cualquier otra membrana mucosa. Esto reduce la posibilidad de autoinoculación.
- Minimizar los goteos y las salpicaduras.
- Descontaminar todas las superficies y los dispositivos reutilizables tras su uso con los desinfectantes adecuados.

- No deben utilizarse etiquetas de alarma en los especímenes de los pacientes.
- Siempre que sea adecuado, hay que utilizar procedimientos de seguridad biológica de nivel 2.
- Antes de centrifugar los tubos, compruébese que no estén rotos. También se ha de comprobar que el interior del recipiente del tubo no tenga signos de erosión o de materia adherida. Y que los amortiguadores de goma no tengan ningún trozo pequeño de vidrio.
- Utilizar técnicas de eliminación de residuos biológicos.
- No dejar nunca un tubo de desecho o material infectado sin atender o sin marcar.
- Periódicamente, limpiar los congeladores para eliminar tubos rotos con especímenes biológicos. Durante la limpieza, hay que emplear guantes de goma y protección respiratoria.

RIESGOS ELÉCTRICOS

Los cables eléctricos o las conexiones son una fuente potencial de descargas o de riesgo de incendios. Las descargas eléctricas pueden producir lesiones graves y la muerte. Todos los equipos deben estar conectados a tierra. Nunca deben manipularse los equipos eléctricos y las conexiones con las manos húmedas, ni debe emplearse un equipo eléctrico que haya sido salpicado por líquidos. La inspección regular de los equipos en lo referente a su integridad eléctrica ayuda a reducir daños potenciales, como los derivados de la presencia de interruptores sin tierra cerca de las tuberías del laboratorio.

RIESGOS DE INCENDIO

Cada laboratorio debe disponer del equipo necesario para apagar o cercar un fuego en el laboratorio, o para apagar el de la ropa de una persona. Es esencial que se acceda fácilmente a las duchas de seguridad. Hay varios tipos de extintores, adecuado cada uno para un tipo de fuego. Todos los trabajadores de los laboratorios han de saber usarlos.

TRATAMIENTO Y ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

La actividad de los laboratorios clínicos produce una gran cantidad de residuos. La gestión de residuos es un aspecto muy importante de la seguridad de los laboratorios clínicos. Muchos de los residuos que se generan contienen sustancias químicas tóxicas o peligrosas, así como microorganismos. Entre los residuos que generan los laboratorios clínicos se encuentran los residuos generales que no contienen ningún tipo de contaminación específica y que no representan riesgo de infección, los residuos asimilables a los urbanos, los residuos potencialmente infecciosos, los residuos químicos peligrosos y los residuos radiactivos. Cada tipo de residuo debe recogerse en su propio contenedor, sin mezclar residuos de diferente tipo. Asimismo, su eliminación debe realizarse de acuerdo con la legislación sobre esta materia, lo que queda fuera del alcance de este texto.

Obtención, transporte y procesamiento de especímenes

INTRODUCCIÓN

Los laboratorios clínicos analizan fundamentalmente especímenes líquidos; los principales: sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido ascítico, líquido sinovial, líquido amniótico y otros. Cada líquido y cada determinación requieren unas condiciones precisas de obtención, por lo que es fundamental establecer unos protocolos detallados. Con frecuencia, los especímenes se obtienen en lugares lejos del laboratorio clínico, por lo que es muy importante establecer un sistema de transporte rápido y en unas condiciones que preserven en todo momento la integridad del espécimen. Llegados al laboratorio, los especímenes se procesan para obtener la muestra adecuada para los análisis. En este capítulo se exponen los métodos de obtención, transporte y procesamiento de los especímenes que analizan los laboratorios clínicos.

ACCIONES INICIALES

El primer paso antes de realizar la extracción del espécimen es confirmar la identidad del paciente. Las etiquetas de los impresos de petición deben coincidir con los datos que nos proporciona el paciente. Normalmente, el lugar de extracción dispone de etiquetas impresas con una numeración correlativa, con código de barras, con el número correspondiente en forma decimal. En el momento de la extracción se pega una etiqueta a cada recipiente del espécimen y otra al impreso de petición. También puede conectarse con el sistema informático de laboratorio para generar las etiquetas necesarias previamente a la extracción.

ESPECÍMENES DE SANGRE

La sangre puede recogerse de las venas, las arterias y los capilares. Para la mayoría de las determinaciones que se realizan en los laboratorios clínicos, no hay diferencias entre la sangre arterial y la venosa, por lo que suele utilizarse esta debido a que es más fácil obtenerla. Para algunas determinaciones donde hay diferencias entre ambos tipos de sangre, como las de los gases en sangre, el espécimen más adecuado es la arterial.

Los especímenes de sangre se obtienen para realizar en ellos una gran variedad de pruebas, entre las que están los cultivos microbiológicos (hemocultivos), los recuentos celulares, las determinaciones de sustancias químicas (sustratos, enzimas, hormonas y proteínas), la caracterización de subpoblaciones celulares, los estudios de coagulación y las pruebas inmunológicas.

Las extracciones sanguíneas son un factor muy importante para valorar la calidad de un laboratorio clínico. Al ser la única actividad de este en la que existe un contacto directo entre el personal del laboratorio y el paciente, las malas extracciones afectarán negativamente la valoración que haga el paciente de la calidad del laboratorio. Por el contrario, una extracción sanguínea cuidada

dosa y bien hecha da gran confianza al paciente respecto a la calidad de los resultados de las pruebas analíticas.

ANTICOAGULANTES

Una vez fuera de las venas y las arterias, la sangre coagula en unos minutos por lo que, cuando el espécimen requerido para los análisis sea sangre total o plasma sanguíneo, deberá añadirse al espécimen el anticoagulante adecuado durante el proceso de obtención. El anticoagulante se elige según las determinaciones que vayan a realizarse, asegurándose de que su presencia no afecte las medidas. Los anticoagulantes más empleados en los laboratorios clínicos son la heparina, el etilendiaminotetraacetato (EDTA) y el citrato.

Heparina

Es un polisacárido presente en la mayoría de los tejidos, en concentraciones menores a las necesarias para impedir la coagulación de la sangre. Actúa como anticoagulante, evitando la transformación de la protrombina en trombina y, como consecuencia, la formación de fibrina a partir de fibrinógeno. La heparina puede emplearse como sal sódica, potásica, amónica o de litio, y su concentración debe ser de unas 20 U/ml de sangre extraída; puede usarse como solución o secarse sobre las paredes de los tubos donde se recoja la sangre. La heparina es el anticoagulante que menos interfiere en las determinaciones de la bioquímica clínica.

EDTA

El etilendiaminotetraacetato (EDTA) ejerce su acción uniendo con fuerza el calcio iónico del plasma, lo que bloquea de forma eficaz la coagulación y la agregación de las plaquetas. Sus cuatro hidrógenos simétricos pueden sustituirse por potasio, sodio o litio para formar sales más solubles. El EDTA se usa como anticoagulante en forma de sal disódica, dipotásica o tripotásica. La cantidad de EDTA necesaria para la quelación completa del calcio debe valorarse de modo que produzca el menor daño celular. Los organismos internacionales de estandarización han recomendado concentraciones de 1 a 2 mg/ml de sangre. Estas concentraciones de EDTA parecen no afectar de forma adversa ninguno de los parámetros eritrocitarios o leucocitarios. Cuando por algún motivo el volumen de sangre de la extracción sea menor de lo que conviene, puede producirse un aumento de la anticoagulación con cambios significativos de la morfología y del tamaño celular. En la actualidad, el EDTA es el anticoagulante estándar en hematología.

Citrato

Es otro anticoagulante que actúa formando complejos con el calcio del plasma. Suele emplearse el citrato sódico, con una concentración de alrededor de 30 mg/ml de sangre. Se utiliza para procedimientos de coagulación, incluidos los tiempos de protrombina y tromboplastina. El citrato ayuda a evitar el rápido deterioro de los factores lábiles de la coagulación, como los factores V y VII.

JERINGAS Y AGUJAS PARA LAS TOMAS DE ESPECÍMENES

Las jeringas y agujas (fig. 5-1) son el método más antiguo de obtención de sangre por punción venosa:

Jeringas. Inicialmente, las jeringas empleadas eran de vidrio y se esterilizaban para volver a usarse. Desde hace ya muchos años se usan jeringas de plástico desechables de un solo uso. Sus tamaños más habituales son 3, 5, 10 y 15 ml, y pueden ser de dos o tres piezas. Las de tres se deslizan mejor, pues su émbolo está revestido de goma. Hay jeringas con un adaptador de la aguja excéntrico, que permiten una punción con ángulos menores de 15° .

Agujas. Las agujas que se adaptan a las jeringas son de diferentes tamaños; las más utilizadas tienen entre 19 y 25 mm de longitud, y el color de su cono suele indicar su calibre. Este señala el grosor de la aguja, de forma que cuanto mayor sea el calibre menor será el grosor. Las agujas más usadas son las de un calibre comprendido entre 19 y 23 (de 0,9 a 1,1 mm). Debe comprobarse siempre que el extremo de la aguja esté abierto y que no tenga aristas o extremos romos, que puedan producir dolor a los pacientes. Las agujas deben estar siempre estériles; en cambio, no es necesario que las jeringas lo estén, aunque, como se ha señalado, nunca deben reutilizarse.

SISTEMA DE VACÍO PARA LA RECOGIDA

El sistema de tubos de vacío para recoger especímenes de sangre venosa permite obtener esta directamente en los contenedores definitivos y sin limitación de volumen, con molestias mínimas. En la figura 5-2 se representan los componentes de este sistema. Son tres: el dispositivo de sujeción de los tubos, la aguja y los tubos:

Dispositivo de sujeción de los tubos. Tiene por finalidad actuar de soporte físico para mantener fijos los tubos en el momento de la extracción y en él se enrosca también la aguja.

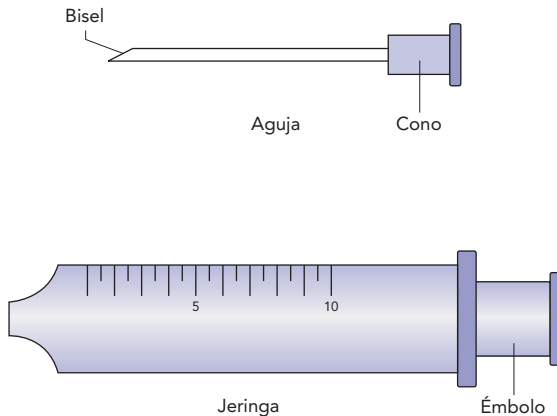


FIGURA 5-1 Jeringa y aguja para la punción venosa.

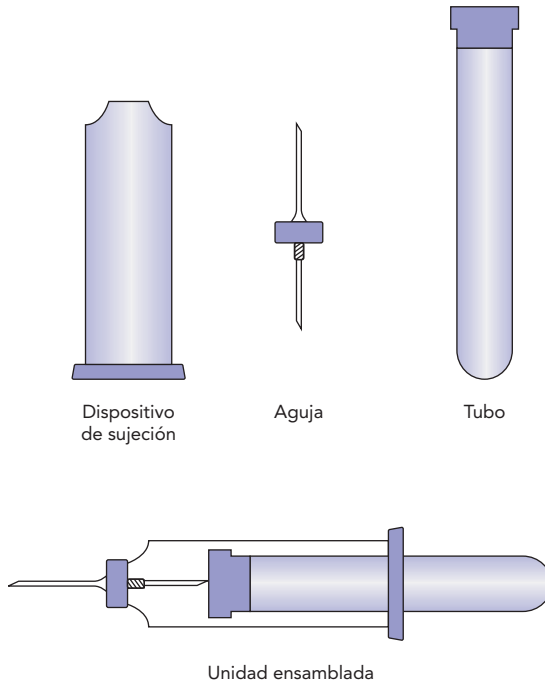


FIGURA 5-2 Sistema de recogida de especímenes de sangre con tubos de vacío.

Aguja. La aguja para los sistemas de vacío tiene los dos extremos punzantes; uno se introduce en la vena y el otro se dirige al interior del dispositivo de sujeción. Este último extremo lleva una camisa de goma como dispositivo de seguridad, que se cierra para evitar salpicaduras de sangre cuando se cambia de un tubo a otro.

Tubos de vacío. En la tabla 5-1 se presentan los diferentes tubos de vacío; en ellos, el color del tapón de goma indica el tipo de anticoagulante o conservante que llevan. La diferencia de tamaño entre los tubos permite obtener entre 3 y 15 ml de sangre. En la tabla 5-2 se muestran sus dimensiones y su carga máxima.

Los tubos de vacío están recubiertos interiormente de silicona para reducir la adhesión de los coágulos a las paredes y disminuir el riesgo de hemólisis. La silicona puede descomponerse con el tiempo, lo que después de la centrifugación daría lugar a especímenes con menos células. Por este motivo, se recomienda respetar la fecha de caducidad. Así pues, hay que evitar un almacenamiento demasiado prolongado de los tubos. Hay distintos tipos de tubos:

Tubos con separador. Estos tubos contienen polímeros semisólidos en su fondo. Una vez centrifugada la sangre, el polímero se interpone entre el suero o el plasma y las células, por ser su densidad intermedia entre la de ambos, lo que establece entre ellos una barrera que aísla el suero o el plasma del coágulo.

Tubos con un sistema de cerrado especial. Los tubos de vacío más empleados son los que llevan un sistema de cerrado especial. Se trata de tapones con

TABLA 5-1 Tubos de vacío para recoger los especímenes de sangre

| Color del tapón | Aditivo | Utilización |
|-----------------|-------------------------------|---|
| Rojo | Ninguno | Bioquímica en suero Serología Banco de sangre |
| Rojo/gris | Gel separador inerte | Bioquímica en suero |
| Verde | Heparina | Bioquímica en plasma |
| Violeta | EDTA | Recuentos hematológicos |
| Azul claro | Citrato | Estudios de coagulación |
| Gris | Fluoruro/oxalato | Medida de glucosa |
| Amarillo | Polianetol sulfonato de sodio | Hemocultivos |
| Naranja | Trombina | Bioquímica de urgencia |
| Negro | Citrato | Velocidad de sedimentación globular |

EDTA, etilendiaminotetraacetato.

TABLA 5-2 Dimensiones y carga máxima de los tubos

| Tamaño (mm) | Carga máxima (ml) | Tamaño (mm) | Carga máxima (ml) |
|-------------|-------------------|-------------|-------------------|
| 10 × 65 | 3 | 16 × 75 | 7 |
| 13 × 75 | 5 | 16 × 100 | 10 |
| 13 × 100 | 7 | 16 × 127 | 15 |

un faldón de plástico externo que minimiza el riesgo de dispersión de gotas de sangre al extraer el tapón. Asimismo, el sistema incluye una cavidad de seguridad en la parte superior del tapón, y el orificio de su capuchón tiene un diámetro reducido, lo que disminuye el riesgo de contacto con la gota de sangre que puede quedar en la superficie del tapón, una vez completada la extracción. El diseño ergonómico de este faldón de plástico, que recubre los 2 cm superiores del tubo, proporciona una sujeción que permite controlar mejor la extracción del tapón. Asimismo, la base plana del componente de caucho hace mínimas las adherencias de sangre y la pared inferior del faldón retiene la posibles salpicaduras aisladas.

A la vez que ofrece una gran superficie de sujeción, el faldón de plástico, aísla el tapón de goma, a modo de armadura. Así, este no entra en contacto directo ni con las manos ni con el espacio ambiente. Además, protege de los riesgos de contacto con los bordes superiores del tubo, sobre los que pueden quedar restos de sangre, cuando se reinserte el tapón. Una vez abierto el tubo, la reinsertión es segura y fácil. La estanquidad del tubo se restablece perfectamente, de forma que prácticamente se eliminan los riesgos de contaminación en pasos sucesivos (agitación, reapertura y desechado).

En los últimos años se han comercializado tubos de plástico con un separador para muestras de suero. Las ventajas de los tubos de plástico con relación

a los de vidrio son que no se rompen cuando caen sobre superficies duras, no producen aristas que puedan clavarse con el consiguiente riesgo de contagio, pueden incinerarse con masas resultantes muy pequeñas y pesan un 30% menos que sus equivalentes de vidrio.

Dispositivos de mariposa. Con venas difíciles y en los niños pueden utilizarse dispositivos de mariposa adaptados a los tubos de vacío (fig. 5-3). Consisten en agujas unidas a mariposas y conectadas con la aguja que se enrosca en el dispositivo de sujeción mediante un tubo de plástico. Con este sistema, la extracción de sangre venosa es fácil y cómoda para el paciente.

PREPARACIÓN Y APROXIMACIÓN AL PACIENTE

La preparación adecuada de los pacientes es un factor fundamental para interpretar correctamente los resultados de las determinaciones solicitadas. Es bien sabido que muchos componentes sanguíneos se alteran al ingerir alimentos durante el período anterior a la extracción del espécimen de sangre. Las alteraciones dependen, en gran medida, del tipo y la cantidad de los alimentos ingeridos, así como del tiempo transcurrido entre la ingestión y la toma del espécimen. Muchas pruebas no requieren ayuno, aunque siempre es preferible que los pacientes no ingieran alimento al menos entre 4 y 6 h antes de la extracción, pues esto reduce la posibilidad de una lipemia por quilomicrones que puede interferir en muchos métodos. En general, suele recomendarse un ayuno de unas 12 h.

Más importante que la interferencia de la alimentación es la producida por la medicación. Cuando sea posible, se ha de dejar de tomar si se sabe que interfiere o puede interferir, al menos 48 h antes de la toma.

La realización adecuada de la extracción de sangre no sólo implica conocimientos técnicos: también es fundamental mostrar interés por el paciente, ya

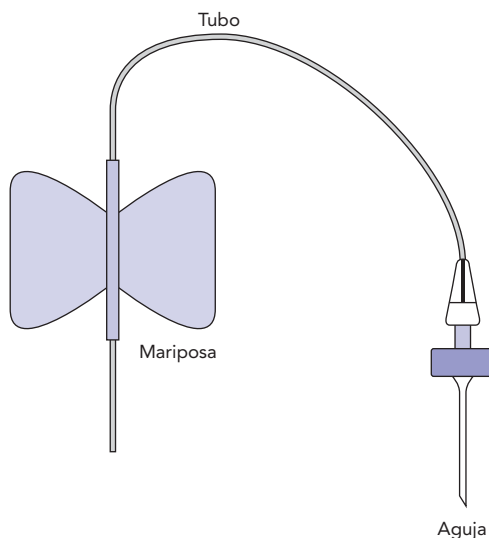


FIGURA 5-3 Dispositivo de mariposa para tubos de vacío.

que la obtención de los especímenes de sangre implica un contacto directo. Por ello es esencial que las personas que realicen este cometido tengan siempre en cuenta el servicio que están prestando. Todo el personal encargado de hacer las extracciones de los especímenes debe recibir descripciones muy detalladas e instructivas de los procedimientos.

Es preciso indicar al paciente que se siente de forma cómoda. El brazo tiene que descansar firmemente en el apoyabrazos y no ha de doblarse por el codo. En todo momento hay que ser franco con él, y explicarle qué se va a hacer. Hay que decir al paciente que, aunque la punción venosa duele, dura poco. No se le debe decir que el pinchazo no le dolerá, y se le ha de avisar cuando la aguja vaya a penetrar en la piel para evitar que se asuste. El personal de extracciones debe ser especialmente cuidadoso con los pacientes hospitalizados. Asimismo, con los niños es básico ganarse su confianza.

PUNCIÓN VENOSA

La mayoría de los especímenes de sangre venosa se obtienen de las venas del antebrazo; las principales son la cefálica, la mediana cubital y la basilica (fig. 5-4). Generalmente, la punción suele realizarse en la mediana cubital por su grosor y superficialidad. Si hubiera problemas con esta vena puede emplearse la basilica. El brazo debe extenderse en línea recta desde el hombro hasta la muñeca. Para localizar la vena se ha de palpar y trazar su camino varias veces con el dedo índice. Cuando las venas superficiales no sean fácilmente detectables, puede forzarse la afluencia de sangre a la vena dando masajes al brazo desde la muñeca hasta el codo. Asimismo, puede golpearse la vena repetidamente con los dedos índice y segundo para producir su dilatación. También es posible aplicar un paño caliente (a unos 40 °C) en el lugar durante 5 min.

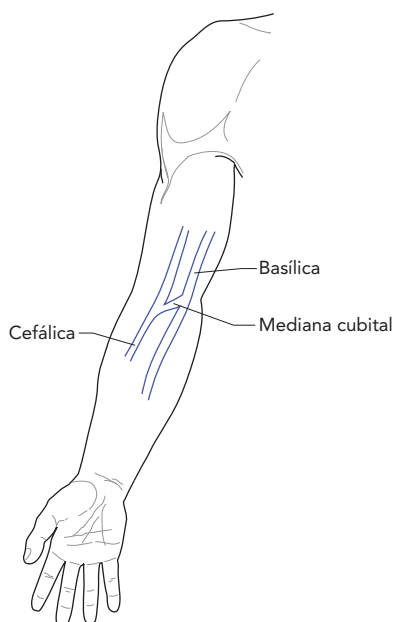


FIGURA 5-4

Localización de las venas del antebrazo que se utilizan para la punción venosa.

Extracción con tubos de vacío

Antes de realizar una extracción mediante punción venosa con tubos de vacío, deben escogerse los tubos que van a emplearse de acuerdo con las determinaciones solicitadas. Este tipo de extracción se realiza de la siguiente forma (fig. 5-5). Las tomas de sangre deben hacerse siempre con guantes de látex. Hay que insistir en las medidas de seguridad de la extracción para evitar contagios. Localizada la vena como se ha expuesto anteriormente, se desinfecta la zona que circunda el punto de punción con un algodón empapado en alcohol, dejando que la piel se seque al aire. Cuando la piel esté seca se aplicará un compresor de goma, entre 10 y 15 cm por encima del lugar de punción, para obstruir el retorno de la sangre venosa al corazón y distender las venas. Cuando vaya a realizarse la punción, el paciente deberá cerrar el puño para hacer más visibles las venas. A continuación, se enrosca la aguja en el dispositivo de sujeción y se introduce en la

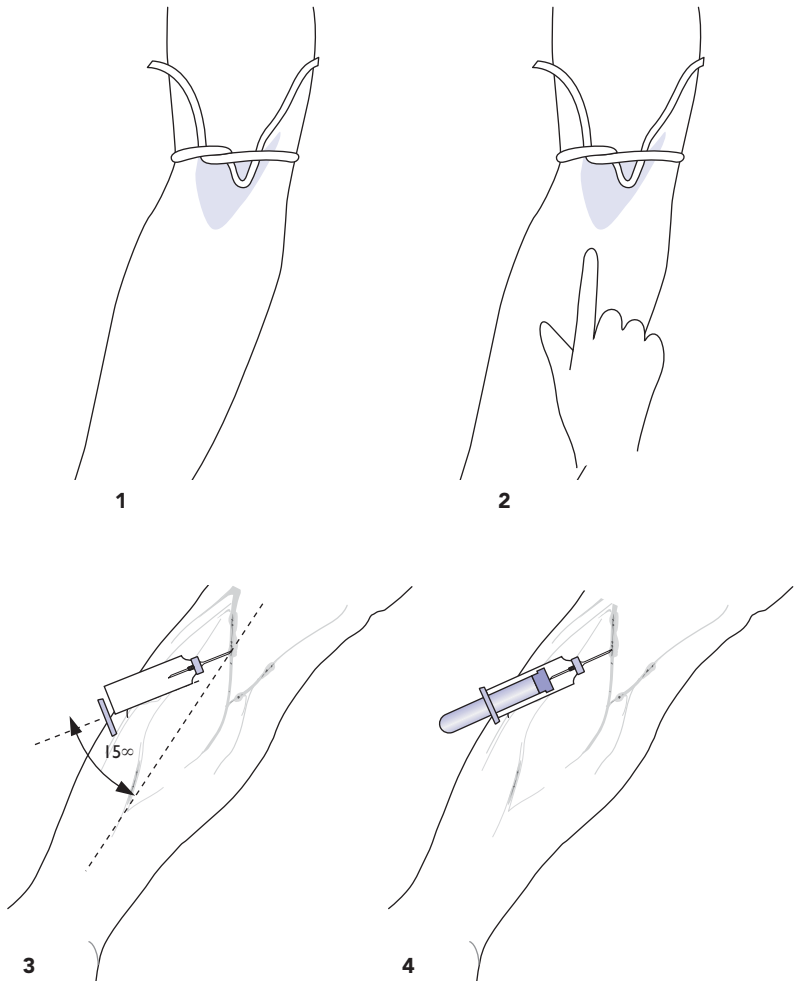


FIGURA 5-5 Extracción de sangre venosa con tubos de vacío: (1) colocación del compresor; (2) palpación de la vena; (3) introducción de la aguja en la vena; (4) introducción del tubo de vacío en la parte de la aguja situada dentro del dispositivo de sujeción.

vena con un ángulo de unos 15°, con el bisel de la aguja hacia arriba para evitar que resbale sobre la epidermis. Salvada la resistencia inicial de la pared de la vena, se canaliza la aguja, apoyando el bisel en su parte inferior. Después se presiona el tubo de vacío sobre el extremo de la aguja situado dentro del dispositivo de sujeción, hasta pinchar el tapón y liberar el vacío. Cuando la sangre comience a fluir al tubo, se suelta el compresor sin mover la aguja, y el tubo se llena hasta que se agota el vacío. Mientras se esté llenando el tubo no hay que cambiar su posición. Asimismo, durante el procedimiento de llenado debe evitarse que el contenido del tubo entre en contacto con el tapón. Se mantendrá una ligera presión constante sobre el fondo del tubo en dirección a la aguja para impedir que se suelte la camisa de cierre y se detenga el flujo de sangre.

Una vez llenado el tubo, se saca del dispositivo de sujeción y se coloca otro. De esta manera, pueden utilizarse los tubos que sean necesarios. Los tubos con anticoagulante deben llenarse hasta agotar el vacío y que cese el flujo de sangre, pues esto asegura una relación adecuada entre la sangre y el anticoagulante. Sin embargo, es normal que el tubo no se llene totalmente. Hay que mezclar bien el contenido de los tubos con anticoagulante, mediante una inversión suave. Para evitar una posible contaminación cruzada de los anticoagulantes, los tubos de vacío de recogida deben utilizarse en un orden determinado (tabla 5-3). Se ha señalado que puede producirse contaminación de un tubo a otro cuando hay problemas en la salida de la sangre. En general, se ha de empezar por los tubos estériles para cultivos y seguir, sucesivamente, por los tubos sin anticoagulante, los tubos para estudios de coagulación con citrato, los tubos con gel separador y los que contengan heparina y, finalmente, los tubos con otros anticoagulantes, como el EDTA.

Terminada la toma de sangre, el paciente debe sujetar con fuerza un algodón sobre el lugar de punción, con el brazo extendido y la mano abierta para impedir la salida de la sangre. El algodón puede sujetarse con un esparadrapo que, transcurridos unos minutos, podrá quitarse. Cuando el paciente continúe sangrando, hay que presionar el lugar del pinchazo con un algodón hasta que cese de sangrar.

Cuando se usan los tubos de vacío deben tenerse en cuenta estas consideraciones:

- Si un tubo empieza a llenarse y luego se para, cámbiese la posición de la aguja, dirigiéndola primero hacia delante y luego ligeramente hacia atrás. Aflójese el compresor.

TABLA 5-3 Orden de recogida de los especímenes con tubos de vacío

1. Recipientes estériles para cultivos
2. Tubos sin anticoagulante (suero para determinaciones químicas)
3. Tubos con citrato (plasma para estudios de coagulación)
4. Tubos con heparina (plasma para determinaciones químicas)
5. Tubos con EDTA (plasma para recuentos hematológicos)
6. Tubos con fluoruro/oxalato (plasma para la determinación de glucosa)

EDTA, etilendiaminotetraacetato.

- Cuando un tubo no se llene de sangre, aunque la aguja esté en la vena, habrá que cambiar el tubo, pues, a veces, algunos tubos pueden haber perdido el vacío. También es posible que se haya producido un colapso venoso. Si ocurriera esto, sáquese la aguja y hágase la punción en otro lugar.
- Cuando sea necesario otro pinchazo, se hará en el otro brazo. Si se hiciera en el mismo, pínchese en un lugar por debajo de la primera punción.
- No se recomienda intentar una punción venosa más de dos veces. Cuando no se haya conseguido tras dos intentos, búsquese a otra persona para que extraiga el espécimen o notifíquese al médico.

Una vez utilizadas las agujas, deben introducirse en los contenedores de desechos adecuados (fig. 5-6) lo más pronto posible para evitar pinchazos accidentales. En cualquier caso, hay que insistir, de nuevo, en el cuidado con el que se han de manipular las agujas en las tomas de especímenes de sangre.

Extracción con jeringas

En la actualidad, el empleo de jeringas para obtener especímenes de sangre venosa suele producirse cuando no pueden utilizarse los tubos de vacío, por ejemplo, a causa de venas difíciles. Con la jeringa y la aguja, el pinchazo se realiza de forma semejante a lo expuesto para el sistema de vacío. Una vez que haya penetrado la aguja en el interior de la vena, se suelta el compresor con suavidad y se aspira la sangre deseada tirando lentamente del émbolo, con cuidado para no colapsar la vena. Si hiciera falta más sangre que la que cabe en la jeringa usada, se quitaría la llena, manteniendo la aguja en la vena y comprimiendo antes por encima del bisel, y se colocaría una nueva jeringa.

Terminada la toma de sangre, se retira la aguja con la jeringa y se transfiere la sangre de esta lo antes posible a los tubos adecuados, con una presión suave sobre el émbolo y dejando resbalar la sangre por las paredes del tubo. Los que contengan anticoagulante deberán taparse y mezclarse con una inversión suave. Si se utilizase un tubo de vacío para recoger la sangre, habría que empujar la aguja a través del tapón y dejar que la sangre pase al tubo utilizando su vacío. Para evitar pinchazos accidentales, manténgase el tubo de vacío en una gradilla y no se coja con la mano. Como en el caso del método de obtención de sangre con el sistema de tubos de vacío, una vez empleadas las jeringas y agujas, deberán introducirse en el contenedor de desechos.

RECOGIDA DE ESPECÍMENES PARA CULTIVOS

Cuando se obtiene sangre para cultivos deben tomarse precauciones adicionales con relación a la limpieza de la piel para evitar contaminaciones. Se limpia bien la piel con alcohol al 70%, o con una mezcla de éter-alcohol, y se extraen de 5 a 10 ml de sangre con una jeringa estéril. Se punciona con la aguja el tapón de goma del recipiente que contiene el medio de transporte y se descarga la jeringa mezclando bien la sangre con dicho medio. Hay también recipientes de vacío que contienen medios para hemocultivos. La extracción con estos sistemas se hace como se indicó para los tubos de vacío.



FIGURA 5-6 Contenedor de agujas y desechables de las tomas de especímenes.

PUNCIÓN ARTERIAL

Las extracciones de sangre arterial suelen realizarse en la arteria radial del brazo o en la femoral. Las punciones arteriales son técnicamente más difíciles que las venosas. La mayor presión en las arterias hace más complejo detener la hemorragia y aparecen hematomas con más facilidad. Así pues, las extracciones de sangre arterial deben llevarse a cabo con mucho cuidado, debido a la fragilidad de las arterias. Asimismo, puede producirse un espasmo arterial, que es una constricción refleja que restringe el flujo sanguíneo y puede afectar la circulación.

Las extracciones de sangre arterial se efectúan con jeringas de vidrio heparinizadas. La heparina de litio es el anticoagulante más adecuado para los especímenes de sangre arterial. Cuando se use heparina de forma líquida, esta debe colocarse en el espacio muerto de la jeringa y en la aguja, ya que una cantidad excesiva de heparina puede acidificar el espécimen. Este problema se ha resuelto en las jeringas de un solo uso para especímenes de sangre arterial, que contienen la heparina liofilizada. Para estas extracciones no hay que usar jeringas de plástico normales, pues el émbolo no sube sólo con la presión arterial; tampoco tubos de vacío para punciones venosas.

La arteria se localiza por su latido, se pincha con la aguja y se deja que la sangre fluya por la propia presión arterial. La aguja debe penetrar en la piel con un ángulo de entre unos 45 a 60°, y se aproxima a la arteria lentamente. Las pulsaciones de la sangre en la jeringa confirman que se ha obtenido sangre arterial. Tras la punción arterial, ha de aplicarse una compresión sobre el lugar de punción. Cuando se separe la aguja de la arteria, podrá doblarse para evitar que entre aire, o quitarse la aguja y tapar su cono de sujeción.

En el mercado hay jeringas de vidrio o de plástico de un solo uso, especialmente diseñadas para las tomas de sangre arterial. Las jeringas fabricadas con vidrio de borosilicato tienen un pistón de goma sin influencia atmosférica sobre el espécimen de sangre. El pistón tiene un diseño especial que permite una retracción suave mediante la simple presión arterial para facilitar la extracción. Asimismo, la jeringa lleva unas protuberancias en su cuerpo y en el émbolo que impiden que este se salga del cuerpo de la jeringa y no haya peligro de derra-

mamiento. Estas jeringas contienen heparina de litio liofilizada, lo que evita el problema de la dilución y la acidificación del espécimen. El protector de la aguja lleva silicona, de forma que la aguja se sella completamente al taparse con el protector, después de haber realizado la extracción y expulsado el aire.

PUNCIÓN CUTÁNEA

Los especímenes de sangre obtenidos por punción cutánea son especialmente importantes en pediatría y también son útiles cuando hay grandes quemados, pacientes muy obesos o con tendencias trombóticas, ancianos cuyas venas superficiales no sean fácilmente accesibles o sean muy frágiles, y pacientes diabéticos que deben autocontrolar la glucemia.

Las punciones cutáneas pueden realizarse en el talón o en la superficie del dedo pulgar. En los niños se emplea fundamentalmente el talón, mientras que en los adultos, el dedo pulgar. No se recomienda la punción en el lóbulo de la oreja. La punción en el talón ha de hacerse en las áreas señaladas en la figura 5-7, pues en la mayoría de los niños el hueso del talón no se encuentra bajo ellas. No debe realizarse sobre un lugar de punción previa, que puede estar infectado, ni en la curvatura del talón. Las punciones cutáneas no se efectuarán en el área central del pie de un niño (área del arco), pues podrían causar daño a los nervios y tendones y al cartílago, y no ofrecen ventajas respecto a la punción en el talón.

Con relación a los dedos, no hay que realizar punciones cutáneas en los de los niños pequeños. La distancia desde la piel al hueso en la parte más gruesa del último segmento de todos los dedos de los recién nacidos va de 1,2 a 2,2 mm, y con las lancetas disponibles puede dañarse seriamente el hueso. En el recién nacido, la infección local y la gangrena son las complicaciones potenciales más importantes de las punciones en los dedos. Cuando se lleve a cabo este tipo de punción, la profundidad de la incisión deberá ser menor de 2,5 mm para evitar el contacto con el hueso. El dedo habrá de mantenerse de forma que la gravedad ayude a recoger la sangre de la punta. Hay que evitar masajear el dedo para estimular el flujo sanguíneo, ya que provoca la salida de residuos y de líquido tisular, que no tienen la misma composición que el plasma sanguíneo. Debe desecharse la primera gota de sangre.

El calentamiento de la piel en el sitio de la punción puede aumentar el flujo sanguíneo en el mismo hasta siete veces. Principalmente, aumenta el flujo arterial, por lo que los especímenes de los lugares que se han calentado se denominan sangre de punción cutánea arterializada. El paso del calentamiento es

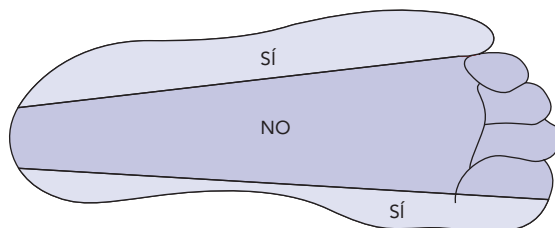


FIGURA 5-7 Lugares de punción en el talón.

esencial cuando se recogen especímenes para analizar el pH y gases en sangre. Para calentar, puede utilizarse una toalla húmeda caliente a una temperatura no superior a 42 °C que cubra el lugar durante, al menos, 3 min. Si se recogen especímenes para análisis de pH y gases en sangre, se recomiendan períodos de calentamiento mayores. Esta técnica aumenta el flujo sanguíneo, no quema la piel y no produce un cambio significativo de los valores de ningún constituyente químico de los que se miden habitualmente en los laboratorios clínicos.

Los especímenes por punción cutánea pueden recogerse por acción capilar en un tubo capilar, o a través del tapón de recogida de un dispositivo de microrrecogida. No se aconseja recoger la sangre gota a gota en tubos de ensayo pequeños, debido a que el traumatismo mecánico de presionar el tubo sobre la piel puede aumentar la hemólisis. Se dispone de capilares y tubos con distintos anticoagulantes. El llenado debe realizarse lo más rápidamente posible para impedir la coagulación. También debe evitarse la introducción de burbujas de aire.

RECOGIDA DE SANGRE DE CATÉTERES INTRAVENOSOS O ARTERIALES

Cuando se recoge sangre de un catéter venoso central o una conducción arterial, debe garantizarse que la composición del espécimen no esté afectada por el líquido que se infunde. Para ello se interrumpe el líquido utilizando la llave del catéter. Se aspiran 10 ml de sangre a través de la llave de paso y se desechan antes de extraer el espécimen para el análisis.

Se puede obtener sangre de las venas de un brazo por debajo de un conducto intravenoso sin interferencia del líquido que se infunde, debido a que en las venas no se produce un flujo sanguíneo retrógrado y el líquido que se infunde debe circular por el corazón y volver al tejido antes de alcanzar el lugar de la toma.

ESPECÍMENES DE ORINA

La orina ha de recogerse de acuerdo con los análisis solicitados. La recogida de la orina condiciona la interpretación de los resultados que se obtengan.

CONTENEDORES

Los contenedores para los especímenes de orina deben estar limpios y secos, y fabricados con materiales desechables claros. Se considera que los contenedores desechables fabricados por empresas reconocidas están limpios, no contaminados e inertes con relación a los constituyentes urinarios. No hay que reutilizar contenedores desechables.

Los contenedores para los análisis sistemáticos de orina deben tener una capacidad de 50 a 100 ml y bocas redondas de, al menos, 5 cm de diámetro y tapa de rosca. Han de cerrar bien para evitar que salga el contenido, sea cual sea la posición del contenedor. Deben ser de material transparente para ver fácilmente el contenido. En los estudios microbiológicos hacen falta contenedores estériles.

Para la recogida de orina de 24 h han de utilizarse contenedores de plástico grandes (de 2 a 5 l), con bocas amplias y tapas de rosca. Para determinar sustancias que se alteren con la luz, como las porfirinas, las catecolaminas, el ácido

vanilmandélico, el ácido homovanílico, el ácido δ -aminolevulínico, el ácido 5-hidroxiindolacético, la dopamina y las metanefrinas, se utilizan recipientes opacos. Para pediatría, se usan bolsas de poliestireno que se fijan a los genitales.

CONSERVANTES

De forma ideal, la orina debe analizarse en los 30 min siguientes a su recogida, pues pasado este tiempo comienza a alterarse su composición, por ser la orina un medio de cultivo muy bueno para las bacterias. Cuando no sea posible analizar de inmediato la orina, deberá conservarse de alguna forma. El método más sencillo y utilizado es la refrigeración, que permite conservar la orina sin grandes cambios entre 6 y 8 h.

En general, para las recogidas de orina de 24 h no suelen usarse conservantes químicos, pues pueden interferir en alguno de los parámetros de los análisis sistemáticos. Los conservantes ejercen diferentes acciones, pero normalmente se añaden para reducir la acción bacteriana o la descomposición, o solubilizar constituyentes que de otra forma pueden precipitar. La descomposición de la orina implica principalmente el crecimiento de bacterias, que da al espécimen un aspecto turbio. A consecuencia de la rotura de la urea por las bacterias, el pH de la orina se vuelve alcalino y se forma amonio, los eritrocitos, leucocitos y cilindros se desintegran, la glucosa va desapareciendo, se evapora la acetona, el ácido acetoacético se convierte en acetona, la bilirrubina se oxida a biliverdina y el urobilinógeno, a urobilina.

Como conservante químico puede utilizarse tolueno, un disolvente orgánico que impide el crecimiento de las bacterias. Se añade una capa fina de tolueno, justo para cubrir la superficie de la orina, que posteriormente se elimina, a no ser que se tome la orina de debajo. El tolueno no interfiere en los análisis sistemáticos de orina. Otros conservantes empleados son el formol, el timol y el ácido bórico. Estos dos impiden el crecimiento bacteriano, mientras que el formol fija los elementos formes del sedimento urinario.

En ocasiones, es necesario mantener el pH de la orina por debajo de 3, para lo cual puede utilizarse ácido acético glacial o ácido clorhídrico. Se emplea ácido clorhídrico para acidificar la orina en las recogidas para la determinación de catecolaminas, metanefrinas y el ácido vanilmandélico, y se usa el ácido acético glacial en las recogidas para determinar el ácido 5-hidroxiindolacético y el ácido δ -aminolevulínico.

Para el transporte de especímenes de orina se han comercializado sistemas de vacío. Constan de un tubo de vacío con una fórmula liofilizada de mantenimiento y un dispositivo de transferencia. Mediante este dispositivo, la orina del recipiente de recogida se transfiere al tubo que contiene el conservante liofilizado. Como el medio de mantenimiento impide la rápida multiplicación de bacterias en la orina, la población bacteriana se mantiene en el espécimen durante un período de 24 h a temperatura ambiente, a niveles comparables a los de especímenes sin aditivos, mantenidos refrigerados el mismo tiempo.

TIPOS DE ESPECÍMENES DE ORINA

De acuerdo con las determinaciones que hay que realizar pueden considerarse cuatro tipos de especímenes de orina: orina de una micción, orina primera de

la mañana, orina de un tiempo determinado y orina para cultivos microbiológicos.

Orina de una micción

Es la orina recogida a cualquier hora del día y se utiliza para los análisis cualitativos poco influidos por las variaciones periódicas en la eliminación de las sustancias que se valoran, como los análisis sistemáticos.

Orina de la primera hora de la mañana

La orina de la primera micción de la mañana está indicada para determinar la proteinuria y como forma de recogida para pacientes ambulatorios que acudan a consultas de revisión o de control.

Orina de un tiempo determinado

La recogida de orina de un tiempo determinado se utiliza fundamentalmente para las determinaciones cuantitativas metabólicas, como los aclaramientos y, en general, para medir todas las sustancias que muestran variaciones en su eliminación. El tiempo de recogida más utilizado son 24 h y el protocolo más común es este:

- Orinar al levantarse, desechar esta orina y anotar la hora.
- Recoger toda la orina de las 24 h siguientes.
- Al cumplirse las 24 h, orinar y adicionar esta orina a la ya obtenida.

Una vez recogida toda la orina, debe llevarse lo más rápido posible al laboratorio, donde se mide el volumen, se mezcla bien y se separan alícuotas para las determinaciones que se vayan a realizar, y el resto se tira. Durante todo el período de recogida debe conservarse la orina en un frigorífico (a 4 °C), excepto para algunos casos en que se mantiene a temperatura ambiente. El laboratorio debe comunicar previamente todas estas condiciones de recogida.

Orina para cultivos microbiológicos

Para estos cultivos es deseable un espécimen de orina limpia de mitad de micción. Es importante limpiar con una gasa o un algodón el glande del pene en los varones y el orificio uretral en las mujeres. Además, en estas, debe limpiarse primero cada lado del orificio urinario y luego lavarse dos veces con una gasa estéril o una torunda de algodón humedecidas en agua. Durante el proceso de emisión de la orina, la mujer ha de separar los labios mayores para que no se produzca contaminación.

INSTRUCCIONES PARA LA RECOGIDA DE ORINA

Para recoger especímenes de orina, deben comunicarse las instrucciones que siguen a los pacientes. Las instrucciones pueden darse de forma oral, aunque es más conveniente de forma escrita y a ser posible con ilustraciones:

- En los varones no circuncidados, hay que retirar la piel para exponer el meato uretral. Se comienza a orinar, se deja pasar la primera porción de orina al sanitario, se recoge la intermedia en el recipiente adecuado y se desecha el resto en el sanitario.
- En las mujeres, se separan manualmente los labios menores con una mano y se mantienen así durante la salida de la primera porción de orina, que se elimina. Se recoge la porción intermedia en un recipiente adecuado, procurando un espécimen sin contaminación, y se desecha el resto en el sanitario.

RECOGIDA DE ESPECÍMENES EN LOS NIÑOS

Para los niños pequeños, se utilizan bolsas de poliestireno estériles que se adhieren a la piel. Para ello se separan las piernas del niño y se comprueba que las zonas púbica y perineal estén secas y limpias. Se adhiere la bolsa de plástico a la piel de forma que quede firmemente sujeta. En los varones se ajusta la bolsa sobre el pene y se adhieren los salientes al perineo. En las niñas, se separa el perineo para quitar los pliegues de la piel y se aprieta firmemente el adhesivo a la piel que rodea la vagina. Debe comprobarse la bolsa cada 15 min. Cuando haya orina, se retirará a un recipiente de almacenamiento.

ESPECÍMENES DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

El líquido cefalorraquídeo (LCR) se obtiene normalmente por punción percutánea entre los interespacios lumbares —de donde deriva el término punción lumbar—, que realiza siempre un médico. El paciente se tiende en posición lateral (posición fetal). La punción se efectúa entre la tercera y la cuarta vértebras lumbares, o entre la cuarta y la quinta. El interespacio L3-L4 se identifica por el plano que conecta la parte superior de ambas crestas ilíacas y que cruza la columna vertebral.

Con una técnica estéril, se introduce en la línea media, a través del ligamento amarillo y la duramadre, en el espacio subaracnoideo, una aguja fina (de 0,8 mm de grosor) con una punta de 10 cm, con el bisel paralelo al eje vertebral. Para optimizar el flujo libre la aguja se gira 90°. La presión de salida se mide colocando un manómetro y una válvula de tres vías en el eje de la aguja. En los adultos, la presión de salida normal comprende entre 145 y 150 mm. La exactitud de la presión de salida depende de la posición del paciente y de su relajación. Se deja que fluya el líquido, que se recoge en tres recipientes estériles. En los adultos suele obtenerse un volumen de 7 a 15 ml de líquido, y en cada tubo se recogen de 1 a 3 ml. Es fundamental observar todos los tubos recogidos. En caso de punción hemorrágica, el primer recipiente es el más hemático, pero si ya existiera hemorragia, los tres recipientes serán igual de hemorrágicos.

ESPECÍMENES DE EFUSIONES SEROSAS

Las efusiones serosas son acumulaciones patológicas de líquido en cualquier espacio del cuerpo, incluidos el saco pericárdico, el espacio pleural, el espacio peritoneal y los espacios articulares. En condiciones normales, el volumen de los líquidos que llenan estos espacios es muy escaso, pero en condiciones pato-

lógicas pueden acumularse grandes cantidades. La palabra serosa deriva de suero e intenta expresar la procedencia del líquido.

Las efusiones serosas se denominan exudados o trasudados, según la concentración de proteínas del líquido. Estos dos tipos de efusiones se han diferenciado fundamentalmente desde una base fisiopatológica y su distinción es importante, ya que los trasudados son líquidos no inflamatorios que se producen al aumentar la presión osmótica del plasma sanguíneo o la presión hidrostática capilar, y los exudados son líquidos inflamatorios, resultado de un estado patológico que produce inflamación, con el consiguiente aumento de la permeabilidad capilar.

LÍQUIDO PLEURAL

El líquido pleural se obtiene por *toracentesis*, o punción aséptica del tórax con una aguja, realizada siempre por un médico. Se deja que fluya el líquido y se llenan varios recipientes. Uno de ellos debe contener un anticoagulante, preferentemente heparina, para los recuentos celulares, los cultivos y la observación de cristales.

LÍQUIDO ASCÍTICO

Más comúnmente, el líquido peritoneal recibe el nombre de líquido ascítico —ascitis procede de una palabra griega que significa bolsa— para indicar el abdomen abultado de los pacientes con una gran acumulación. El líquido ascítico se obtiene por *laparocentesis*, que siempre debe realizar un médico. Para ello se desinfecta la piel del abdomen y se pincha con una aguja de tamaño adecuado. Se aspira el líquido con una jeringa hasta obtener la cantidad requerida, y se va dispensando el líquido en varios recipientes, uno de los cuales ha de contener un anticoagulante —con preferencia heparina— para los recuentos celulares, los cultivos y la observación de cristales.

LÍQUIDO SINOVIAL

Es el líquido que llena las cavidades de las articulaciones, y sus funciones principales son lubricar las superficies de rozamiento y aportar nutrientes al cartílago articular. El líquido sinovial se obtiene por *artrocentesis*. La técnica varía ligeramente dependiendo de la localización y el tamaño de la articulación. En todos los casos, debe desinfectarse la piel que cubre esta y anestesiarse localmente con cloruro de etilo. Se introduce una aguja de tamaño adecuado y se aspira la cantidad de líquido requerido en la jeringa. El espécimen debe recogerse en dos tubos. Uno debe contener un anticoagulante, preferiblemente heparina, para los cultivos microbiológicos, el recuento celular, la observación de cristales y la preparación de extensiones.

ESPECÍMENES DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

El líquido amniótico es el fluido en el que está inmerso el feto en el útero materno. Este líquido se obtiene por punción abdominal, mediante una técnica denominada *amniocentesis*, con ayuda de un ecógrafo para localizar la placenta

y determinar la colocación del feto. El mejor lugar para obtener el espécimen está detrás del cuello fetal, debajo de la cabeza, aunque también son buenas otras áreas libres de la cavidad amniótica. Para realizar la amniocentesis, se pincha con una aguja larga y se aspiran unos 10 ml de líquido con una jeringa. Luego se transfiere el líquido desde la jeringa a un contenedor de plástico, que se tapa y se lleva al laboratorio para el análisis.

ESPECÍMENES DE SEMEN

Para la recogida de los especímenes de semen debe guardarse abstinencia sexual, al menos 48 h y no más de 7 días. El espécimen se obtiene por masturbación y se recoge en un recipiente limpio de plástico, de boca ancha, que debe haberse comprobado que no tenga efectos tóxicos sobre los espermatozoides. Cuando se vaya a realizar un análisis bacteriano, el paciente habrá de orinar y luego lavarse y enjuagarse las manos y el pene, antes de recoger la muestra en un recipiente estéril.

No deben utilizarse preservativos para recoger semen, ya que suelen contener espermicidas. Cuando por circunstancias especiales deba obtenerse el semen con un preservativo, existen en el mercado modelos específicos para este fin. El *coitus interruptus* no es un método aceptable para la recogida de semen, puesto que puede perderse la primera porción del eyaculado, que suele contener la mayor concentración de espermatozoides. Además, puede haber una contaminación celular y bacteriológica del espécimen y el pH ácido del líquido vaginal ejercerá una influencia adversa sobre la motilidad de los espermatozoides.

No hay que analizar especímenes incompletos, en particular si se pierde la primera porción del eyaculado. Durante el traslado al laboratorio debe protegerse el espécimen de las temperaturas extremas.

TRANSPORTE DE LOS ESPECÍMENES

En los hospitales, generalmente el tiempo que transcurre entre la obtención de los especímenes y su llegada al laboratorio suele ser corto, por lo que, para la mayoría de las determinaciones, no son necesarias condiciones especiales de transporte. Sin embargo, algunas requieren que se refrigere el espécimen desde el momento de la extracción.

SISTEMAS DE TUBOS NEUMÁTICOS

En muchos hospitales funcionan sistemas de tubos neumáticos para el transporte de los tubos de extracción, principalmente de los que tienen como destino el laboratorio de urgencias. Con estos hay que tener especial cuidado, y fijarlos bien dentro de los contenedores que viajan por el tubo neumático para evitar su movimiento, pues este puede producir hemólisis en los especímenes de sangre.

REGLAS DE MANIPULACIÓN

El transporte de los especímenes desde los centros periféricos de extracción debe hacerse de forma adecuada, a fin de que no se deterioren sus compo-

nentes. Se pueden señalar las siguientes reglas para manipular los especímenes:

- El personal, tanto el del laboratorio como el de los centros de extracción periféricos, debe estar instruido en las técnicas de recogida de cada tipo de espécimen. Se aconseja disponer de un manual que exponga las instrucciones generales para obtener y manipular adecuadamente los especímenes.
- Enviar los especímenes tan pronto como sea posible.
- Disponer de los contenedores adecuados para los envíos.
- Evitar las temperaturas superiores 35 °C, ya que el deterioro de los componentes a menudo se acelera a temperaturas altas.
- Evitar la exposición a la luz, especialmente a la luz solar, que puede producir el deterioro rápido de algunos componentes químicos, como la bilirrubina.
- No exponer la sangre total a temperaturas inferiores a 0 °C, pues la congelación hemoliza los especímenes.
- Procesar los especímenes en cuanto lleguen al laboratorio. Cuando sea preciso separar el suero o el plasma de las células, habrá que hacerlo antes de que pasen 2 h desde la obtención del espécimen.

Como regla general, no debe obtenerse un espécimen cuando no se tenga la certeza de que va a llegar al laboratorio en condiciones adecuadas. Este tiene que establecer los procedimientos administrativos que aseguren el manejo adecuado de los especímenes que se van a transportar. Con cada espécimen debe incluirse el nombre del paciente, un número de referencia adecuado, las pruebas que se solicitan y el nombre y la dirección del solicitante.

CONDICIONES DE TRANSPORTE

Como se ha apuntado, el envío de especímenes de un laboratorio a otro ha de hacerse en condiciones adecuadas. Los recipientes donde vayan los especímenes (tubos o frascos) deben ser de material plástico (polietileno o polipropileno). Dichos recipientes se introducen en los contenedores de transporte (sobres especiales o cajas) y, en todo momento, los tubos o los contenedores de los especímenes tienen que estar perfectamente protegidos para evitar su rotura o que se vierta el contenido durante el transporte. Los especímenes que necesiten congelación deberán enviarse en recipientes de poliestireno expandido con hielo seco o bolsas congeladoras.

ESPECÍMENES DE ORINA

En cuanto a los *especímenes de orina*, es preciso llevarlos rápidamente al laboratorio para su examen. Cuando el espécimen no pueda transportarse inmediatamente, deben tomarse precauciones para asegurar su almacenamiento adecuado. Si no se solicita un examen microbiológico, el espécimen puede mantenerse a temperatura ambiente y protegido de la luz fuerte durante 2 h. Cuando se solicite ese examen y el espécimen no pueda transportarse de inmediato al laboratorio, habrá que refrigerarlo a una temperatura entre 4 y 6 °C

para evitar la multiplicación de bacterias. Los especímenes pueden refrigerarse hasta 24 h y proporcionar aún información válida. De forma alternativa, la flora bacteriana puede estabilizarse introduciendo una alícuota de orina en un tubo de transporte que contenga una solución estabilizante.

OTROS LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

Los líquidos biológicos diferentes a la sangre y a la orina deben llevarse lo antes posible al laboratorio para su procesado, procurando en todo momento evitar las temperaturas extremas.

PROCESADO DE LOS ESPECÍMENES

SANGRE

Determinaciones bioquímicas

Generalmente, las determinaciones bioquímicas se realizan en suero o en plasma sanguíneos. Cuando no se ha añadido anticoagulante a la sangre extraída, hay que dejar que se complete la coagulación y se retraiga el coágulo antes de centrifugar ya que, si no, la formación de fibrina puede causar luego problemas de obstrucción en las pipetas y en las puntas de aspiración de los especímenes de los analizadores. La sangre coagula normalmente entre 20 y 40 min. La separación entre la fracción líquida de la misma y sus componentes celulares se efectúa por centrifugación a $1.000-1.500 \times g$ durante 10 min.

Cuando algún análisis no pueda realizarse en el mismo día de la extracción del espécimen de sangre, habrá que almacenar el suero o el plasma en las condiciones adecuadas. Para las determinaciones bioquímicas, debe taparse el tubo y guardarse en un refrigerador a 4 °C, o congelarse a -20 °C, hasta su análisis.

Determinaciones de pH y gases

Los especímenes para las determinaciones de pH y gases han de colocarse en un baño de hielo tras su obtención, llevarse con prontitud al laboratorio y analizarse lo antes posible.

Recuentos hematológicos

Los recuentos hematológicos se realizan en sangre total anticoagulada con EDTA y no requieren tratamiento previo. Los especímenes pueden almacenarse hasta 24 h a 4 °C. La sangre obtenida para medir la velocidad de sedimentación globular puede mantenerse 4 o 5 h a temperatura ambiente sin alteraciones significativas.

Una vez obtenido el espécimen adecuado, debe repartirse por las secciones del laboratorio, de acuerdo con las peticiones y la estructura del mismo. Esta operación se realiza, comúnmente, de forma manual. Para evitar trasvases que pueden dar lugar a errores, muchos analizadores automáticos y otros equipos del laboratorio clínico pueden utilizar los mismos tubos de extracción como recipientes para la toma de suero o de plasma.

ORINA

Los especímenes de orina para los análisis sistemáticos no requieren procesado. Una vez recibidos en el laboratorio, se trasvasa una parte de la orina a tubos de volumen más reducido y fáciles de manejar. Los tubos más utilizados son de material transparente, de 10-12 ml de capacidad, con fondo cónico, fácilmente rotulables y con tapón. En estos tubos se introducen las tiras de orina directamente.

Sedimento urinario

La realización del sedimento urinario exige centrifugar la orina, proceso que debe hacerse de la forma más sistemática posible. Las principales fuentes de variación al observar el sedimento proceden de la diferencia entre los volúmenes de orina, entre las fuerzas centrífugas (que crean cantidades variables de sedimento), las cantidades de sedimento recogido y suspendido bajo el cubreobjetos, y de variaciones de la técnica entre las personas que realizan el procedimiento.

Orinas de 24 h

Con relación a las orinas de 24 h, cuando se haya completado la recogida debe llevarse sin demora toda la orina al laboratorio, donde se mide el volumen y se realiza el fraccionamiento en alícuotas, de acuerdo con las determinaciones que se vayan a realizar. Antes de transferir el espécimen a los contenedores más pequeños, debe mezclarse bien para asegurar su homogeneidad.

OTROS LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

Líquido cefalorraquídeo

Como se ha señalado, el LCR suele recogerse en tres recipientes. El contenido del primer o del tercer recipiente se utiliza, en parte, para el recuento de células; el resto se centrifuga y se hace una extensión del sedimento, que se tiñe con giemsa para determinar la fórmula leucocitaria, y con gram para observar la presencia de microorganismos. El sobrenadante se emplea para las determinaciones bioquímicas. En cuanto al líquido del segundo recipiente, se usa para los cultivos microbiológicos. El LCR debe cultivarse lo antes posible; cuando no pueda hacerse, tendrá que mantenerse a temperatura ambiente, hasta que pueda realizarse el cultivo.

Líquidos pericárdico, pleural, peritoneal y sinovial

Estos líquidos se recogen en varios recipientes estériles, uno de los cuales debe llevar un anticoagulante para el recuento celular total y la fórmula leucocitaria. En el laboratorio, los líquidos se centrifugan para separar las células, y se utilizan los sobrenadantes para las determinaciones bioquímicas. Cuando no pueda analizarse algún constituyente el mismo día de la obtención del líquido, se habrá de congelar este y almacenarlo a -20°C hasta su análisis.

Líquido amniótico

Tras llegar al laboratorio, el líquido amniótico se centrifuga a baja velocidad ($500 \times g$ durante 5 min). El sobrenadante se emplea para los estudios de medida de surfactante pulmonar. Cuando no puedan realizarse inmediatamente las determinaciones, el espécimen se almacenará a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Especímenes de semen

Los especímenes de semen deben procesarse de forma semejante a los de sangre en cuanto a las precauciones para evitar el contagio de los virus de la hepatitis B y del sida. Cuando llegan al laboratorio, se observa su aspecto y se anota cualquier alteración. Se mide el volumen con un tubo graduado o una jeringa y se evalúa la consistencia y el pH. A continuación, se mide también la motilidad por observación microscópica, y se determina la concentración espermática mediante la cámara de Makler. La vitalidad de los espermatozoides se mide tiñéndolos con eosina o una mezcla de eosina y nigrosina. Finalmente, se hace una extensión del semen, que se fija con una mezcla a partes iguales de etanol (95% [v/v]) y éter, para analizar las características morfológicas de los espermatozoides.

INTRODUCCIÓN

La estadística es la ciencia que recoge, presenta, analiza e interpreta los datos. En los laboratorios clínicos se genera una enorme cantidad de datos, a los que deben darse tratamientos estadísticos para su correcta utilización. La *estadística descriptiva* se emplea para describir las características principales de un conjunto de datos. Por otro lado, la *inferencia estadística* se utiliza para comparar las características de dos o más conjuntos de datos. En este capítulo se presentan los conceptos estadísticos básicos y su aplicación al tratamiento de los datos generados en los laboratorios clínicos.

VARIABLES

Una *variable* es una característica que puede medirse y que puede tomar un valor cualquiera de un conjunto especificado de valores. De acuerdo con la escala de medida, las variables pueden ser cuantitativas o cualitativas. Las *variables cuantitativas* son aquellas que se expresan mediante cantidades numéricas. Estas pueden ser *discretas* cuando sólo pueden asumir determinados valores numéricos fijos y no son posibles valores intermedios. Por ejemplo, si contamos el número de leucocitos en un espécimen de líquido cefalorraquídeo, puede haber 20 o 21/ μl , pero nunca 20,4/ μl . Las variables cuantitativas son *continuas* cuando pueden adquirir cualquier valor dentro de un intervalo especificado. Si medimos la concentración de glucosa en suero, son posibles valores diferentes de los números enteros, como 84,9 o 90,5 mg/dl. Potencialmente son posibles todos los decimales que queramos, aunque, en realidad, hay límites debido a la precisión del aparato de medida.

Las *variables cualitativas* son las que expresan distintas cualidades, características o modos. Pueden ser nominales u ordinales. Las *nominales* no poseen un intervalo numérico, aunque pueden codificarse numéricamente por conveniencia. Los colores son un ejemplo de variables nominales. Las *ordinales* poseen algún ordenamiento natural. Las relaciones «mayor que» o «menor que» son ordinales, ya que especifican el orden de tamaño, cantidad o magnitud de lo que se mide.

Las variables también pueden clasificarse por la influencia que asignemos a unas sobre otras. Las *variables independientes* son las características o propiedades que se supone que son la causa de los fenómenos que se estudian. Las *variables dependientes* son las propiedades o factores que se miden para determinar el efecto de las variables independientes.

POBLACIÓN Y MUESTRA

En estadística, la *población* es el conjunto de elementos de referencia sobre el que se realizan las observaciones. En epidemiología, la población es el conjunto de individuos con determinadas características demográficas del que quieren obtenerse unas conclusiones tras la realización de determinadas medidas.

En estadística, la *muestra* es un subconjunto de casos o individuos de una población. Al ser muy difícil estudiar la población, se utiliza la muestra para inferir propiedades de toda la población, para lo cual debe ser representativa de la misma. El número de observaciones o de individuos de la muestra recibe el nombre de *tamaño* y se representa con la letra n .

DISTRIBUCIONES, MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL, MEDIDAS DE DISPERSIÓN, MEDIDAS DE POSICIÓN Y MEDIDAS DE FORMA

DISTRIBUCIONES

Cuando se realiza una medida repetidas veces con un mismo espécimen, o cuando se mide un parámetro en un grupo de personas, se observa que los resultados se distribuyen alrededor de uno o varios valores: es lo que se conoce como distribución de la población. En su forma más simple, una distribución es un listado de las medidas individuales que se hacen de una variable.

Una *distribución de frecuencias* es una representación de los datos obtenidos según su frecuencia. Por ejemplo, si analizamos la concentración de glucosa en sangre de 100 personas sanas, se obtienen valores que pueden representarse frente a su frecuencia de presentación. Se genera un histograma como el de la figura 6-1. Para comprender mejor el significado de los datos, debe describirse la distribución de forma concisa. Con este fin, se utilizan las medidas de tendencia central de la distribución, las medidas de dispersión de los datos, las medidas de posición y las de forma de la distribución.

DISTRIBUCIÓN NORMAL O DE GAUSS

Es la distribución teórica que con más frecuencia aparece en fenómenos reales. En ella coinciden la media aritmética, la mediana y la moda (fig. 6-2). Las distribuciones gaussianas se denominan paramétricas y se caracterizan por dos valores: su localización y su extensión. La primera es especificada por la desviación estándar. Las curvas gaussianas con desviaciones estándar pequeñas son altas y estrechas y su pico desciende rápidamente, mientras que las que tienen desviaciones estándar grandes son bajas y amplias y el pico cae lentamente.

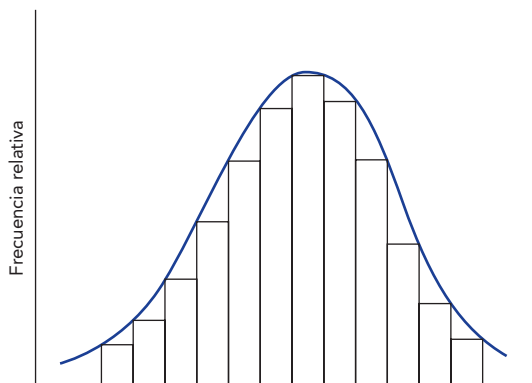


FIGURA 6-1 Histograma que representa la distribución de las frecuencias de un parámetro.

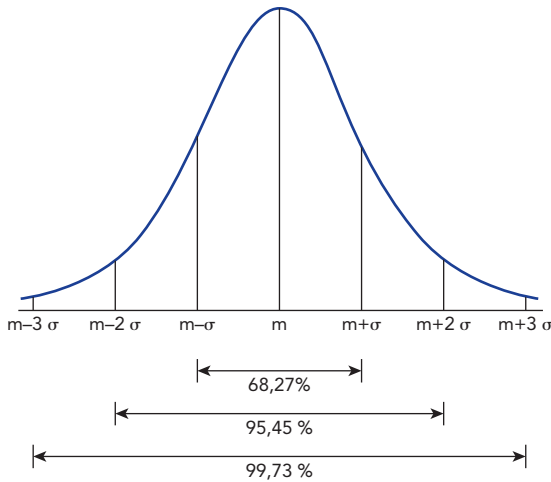


FIGURA 6-2 Distribución de Gauss.

MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL

Para describir los grupos de observaciones, generalmente se emplea un valor alrededor del cual se centra la distribución de los datos. Entre las medidas de tendencia central están la media aritmética, la mediana y la moda.

La *media aritmética* es el promedio de todas las medidas individuales y se obtiene sumando todos los valores y dividiendo el total por el número de medidas. Se calcula con la expresión:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

La media aritmética resume en un valor las características de una variable teniendo en cuenta todos los casos. Sólo puede utilizarse con variables cuantitativas y sólo es representativa de la tendencia central de la población o muestra cuando la distribución es simétrica. La *mediana* es el valor de la distribución que deja la mitad de los datos por encima y la otra mitad por debajo. La *moda* es el dato más repetido, el valor de la variable con mayor frecuencia absoluta.

La media aritmética, la mediana y la moda tienen las mismas unidades que los datos. Mientras que sólo hay una media y una mediana en cada población, puede haber más de una moda (distribuciones bimodales o polimodales). La mediana y la moda son útiles para las distribuciones sesgadas. La figura 6-3 muestra tres tipos de distribuciones de población en las que se indica la media, la mediana y la moda.

MEDIDAS DE DISPERSIÓN

Una distribución no queda totalmente definida con las medidas de tendencia central; debe conocerse también la dispersión de los datos alrededor del cen-

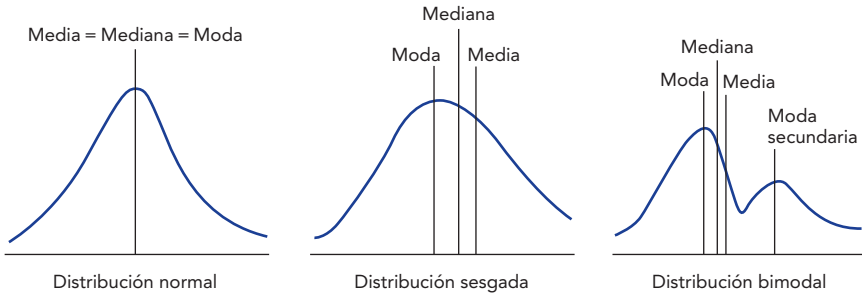


FIGURA 6-3 Tres distribuciones de población en las que se indica la media, la mediana y la moda.

tro. Las principales medidas de la variación o dispersión de unos datos son el intervalo, la variancia, la desviación estándar y el coeficiente de variación:

Intervalo. También se conoce como rango o recorrido. Es la diferencia entre el valor más alto y el más bajo. Proporciona una idea global de la dispersión de los datos y su valor es relativo, ya que no señala nada sobre la forma de la distribución.

Variancia (s^2). Se denomina así al valor que se obtiene cuando se suma la diferencia al cuadrado de todos los datos con su media y se divide por el número de individuos. No viene expresada en las mismas unidades que la variable.

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Desviación estándar (s). Es la raíz cuadrada de la variancia:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

La desviación estándar es el mejor índice de dispersión de una distribución. Viene expresada en las mismas unidades que la variable. Describe adecuadamente el grado de variación entre las observaciones individuales. Si todas estas tienen el mismo valor, la desviación estándar es cero; cuanto más apartados estén unos valores de otros y de su media, mayor será la desviación estándar. En la tabla 6-1 se exponen los símbolos utilizados para poblaciones y muestras.

Coficiente de variación. Con objeto de poder comparar la dispersión de dos variables se utiliza el coeficiente de variación (CV), que es el tanto por ciento que representa la desviación estándar con respecto a la media; se calcula con la fórmula:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

TABLA 6-1 Símbolos utilizados para los parámetros estadísticos en poblaciones y muestras

| Término | Población | Muestra |
|---------------------|------------|-----------|
| Tamaño | N | n |
| Media | μ | \bar{x} |
| Variancia | σ^2 | s^2 |
| Desviación estándar | σ | s |

MEDIDAS DE POSICIÓN

Las medidas de posición sirven para clasificar a un individuo o elemento dentro de una determinada población o muestra. Dividen la distribución en partes iguales. Dentro de las medidas de posición tenemos los cuartiles, los deciles y los percentiles.

Los *cuartiles* (Q_k) son los tres valores que dividen la muestra en cuatro grupos porcentualmente iguales. El cuartil de orden k es el valor que deja a la izquierda las $k/4$ partes de las observaciones. Los *deciles* (D_k) son los valores que dividen a la muestra en 10 grupos porcentualmente iguales. Se define el k -ésimo decil como el que deja a la izquierda las $k/10$ partes de las observaciones. Por último, los *percentiles* (P_k) son los valores que dividen a la muestra en 100 grupos porcentualmente iguales, es decir, el percentil k es el valor que deja a la izquierda el k por ciento de las observaciones. Por lo tanto tenemos 99 percentiles. Por ejemplo, el percentil de orden 33 deja por debajo al 33% de las observaciones y al 85% por encima.

MEDIDAS DE FORMA

Además de las medidas de tendencia central, de dispersión y de posición, hay otras características que permiten describir una distribución de frecuencias. Tienen que ver con la forma de la distribución y se trata de la asimetría y la curtosis. Como indica su nombre, los coeficientes de asimetría como el coeficiente de asimetría de Pearson 1, el coeficiente de asimetría de Pearson 2, o el de Fisher, entre otros, miden la asimetría de la distribución, de forma que un valor de cero indica que la distribución es simétrica; un valor positivo indica que la distribución es asimétrica positiva o hacia la derecha, y un valor negativo señala que es asimétrica negativa o hacia la izquierda. La curtosis mide el aplanamiento de la distribución. El coeficiente de curtosis más conocido es el coeficiente de aplastamiento de Fisher, definido como:

$$K = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^4}{nS^4} - 3$$

Es un coeficiente adimensional; el patrón de referencia es la distribución normal o gaussiana para la que se tiene que $K = 0$. De este modo, podemos clasificar las distribuciones de frecuencias de la siguiente forma: si K es cero, la curva es como la de una distribución normal; si K es mayor de cero, señala

que la curva es picuda en el centro y que las colas son relativamente largas; mientras que si el valor de K es menor de cero, indica que la curva es aplanada y que las colas son cortas.

INFERENCIA ESTADÍSTICA

El propósito de un estudio estadístico suele ser dar información de la población a partir de la información obtenida de la muestra; esto recibe el nombre de inferencia estadística. La inferencia estadística puede ser paramétrica o no paramétrica. En la inferencia paramétrica se conoce la forma de la distribución (habitualmente la normal o gaussiana), pero se desconocen sus parámetros y se realizan inferencias sobre los parámetros desconocidos de la distribución conocida. En la inferencia no paramétrica, tanto la forma de la distribución como los parámetros son desconocidos. Se realizan inferencias sobre características que no tienen por qué ser parámetros de una distribución conocida (mediana, estadísticos de posición, etc.).

Para saber si una población se encuentra distribuida normalmente, puede usarse la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Otra forma de medir si los datos se ajustan a una distribución normal es calcular los coeficientes de asimetría y curtosis. Para los datos que se ajustan a una distribución gaussiana, los coeficientes de asimetría y curtosis se encuentran entre 1 y -1 .

Cuando se observe una distribución no simétrica o no gaussiana, una posibilidad es transformarla en una distribución normal mediante la transformación de los valores tomando logaritmos o inversos.

La inferencia estadística puede clasificarse en dos grupos: estimación (estimación puntual y por intervalos) y contrastes de hipótesis. Con la estimación puntual se utiliza la información de la muestra para determinar un único valor que sea un buen indicador de valor del parámetro de la población. Muchas veces, en vez de hacer una estimación puntual se prefiere obtener un intervalo estimador o un intervalo de confianza. Cuando calculamos un intervalo de confianza, con un nivel de confianza del 95%, por ejemplo, significa que el 95% de las veces que repitiéramos el experimento, el intervalo de confianza calculado contendría el verdadero valor del parámetro y en el 5% restante el intervalo no contendría el verdadero valor.

Un contraste de hipótesis es un procedimiento estadístico mediante el cual se investiga la aceptación o el rechazo de una afirmación acerca de unas características de una población partiendo de una muestra. Dos son las hipótesis que generalmente se contrastan, la hipótesis nula (H_0), que es la hipótesis en la que se basa el procedimiento de contraste, y la hipótesis alternativa (H_a), que es la hipótesis que se acepta cuando se rechaza la nula o viceversa. Se rechazará la hipótesis nula en los casos en que aparezcan diferencias significativas entre los valores muestrales y los teóricos. La medida de esas diferencias se efectúa con un estadístico de contraste, que es una variable aleatoria que tiene una determinada distribución. Denominamos región crítica al conjunto de valores del estadístico de contraste que nos lleva a la decisión de rechazar la hipótesis nula. Los contrastes de hipótesis pueden ser unilaterales (una cola) o bilaterales (dos colas) según la región crítica esté formada por un solo conjunto de puntos o por dos conjuntos de puntos disjuntos.

Obviamente, puede haber casos en los que se acepte la hipótesis nula siendo falsa o viceversa. Al error que se comete cuando se rechaza la hipótesis nula siendo verdadera se le conoce con el nombre de error tipo I y al error que se comete cuando se acepta la hipótesis nula siendo falsa se le denomina error tipo II. A la probabilidad de cometer un error tipo I se la denomina nivel de significación (α), mientras que a $1 - \alpha$ se le denomina nivel de confianza.

Los procedimientos de contraste pueden diseñarse también utilizando alguna media de la discrepancia o de la similitud entre el valor teórico de la hipótesis nula y el valor estimado a partir de la muestra. La hipótesis se rechaza cuando la discrepancia es muy grande. Este tipo de medida se denomina p-valor y se puede definir como la probabilidad de obtener un valor muestral más extremo que el obtenido en nuestro caso particular (cuando H_0 es cierta). Su utilización en la investigación aplicada se debe a que es la forma de presentación de los resultados de un contraste que emplean la mayor parte de los programas de ordenador.

PRUEBA DE LA T DE STUDENT

Es la prueba más utilizada para comparar las medias de dos poblaciones que tienen una distribución normal. Determina la superposición de las distribuciones de probabilidad. Si la superposición es pequeña, las dos muestras son diferentes y, si es grande, no puede asegurarse que haya diferencias. El valor de la *t* de Student se obtiene con la ecuación:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

El valor de *t* se compara con el de *t* para la probabilidad deseada y con unos grados de libertad que en el caso de que las variancias poblacionales sean iguales son $(n_1 + n_2 - 2)$ de una tabla. Si el valor de *t* calculado es mayor que el de *t* de la tabla, la diferencia es estadísticamente significativa. Por ejemplo, se ha medido la concentración en suero de la enzima convertora de angiotensina (ECA) en un grupo de niños menores de 18 años ($n = 70$) y en un grupo de adultos ($n = 75$). Los valores medios \pm la desviación estándar respectivos han sido 140 ± 30 y 100 ± 35 U/l. ¿Son las medias estadísticamente diferentes? El valor de *t* es:

$$t = \frac{140 - 100}{\sqrt{\frac{30^2}{70} + \frac{35^2}{75}}} = 7,407$$

y los grados de libertad $70 + 75 - 2 = 143$. El valor de *t* de la tabla, para $\alpha = 0,001$ y 143 grados de libertad, es de 3,36. El valor de *t* calculado es mayor que el de *t* de la tabla, por lo que la probabilidad de que exista una diferencia entre los valores de ECA en niños y adultos es del 99%.

COMPARACIÓN DE MEDIAS EN MUESTRAS PAREADAS

Cuando el número de muestras sea igual en ambos grupos, por ejemplo, cuando se analiza una variable por dos métodos diferentes empleando las mismas muestras, la ecuación que se utiliza para calcular la t es:

$$t = \frac{y}{\sqrt{\frac{S_y^2}{n}}}$$

donde y es la media de las diferencias $x_1 - x_2$, s_y^2 la desviación estándar de la diferencia entre las poblaciones y n el número de muestras.

Por ejemplo, sean dos métodos diferentes para determinar la glucosa. La medida de esta en 60 especímenes diferentes de suero por ambos métodos ha dado los valores de la tabla 6-2. ¿Proporcionan dichos métodos valores estadísticamente diferentes? El valor de t es:

$$t = \frac{0,1333}{\sqrt{\frac{2,0479}{60}}} = 0,7212$$

y los grados de libertad: $60 - 1 = 59$. El valor de t en la tabla para $\alpha = 0,05$ y 59 grados de libertad es de 2,0010. El valor calculado es menor que el valor de la tabla, por lo que no existe diferencia significativa entre los valores obtenidos por ambos métodos. Todas estas pruebas se realizan mediante programas estadísticos informáticos.

CONTRASTES NO PARAMÉTRICOS

Con frecuencia, los datos obtenidos no se distribuyen de forma gaussiana. En tal caso debe utilizarse una estadística no paramétrica o de distribución libre. Las ventajas principales de esta estadística es que puede emplearse cuando no se conozca la distribución de la población y puede aplicarse para datos cuantitativos, semicuantitativos y ordenables. Por el contrario, sus desventajas principales son que es más compleja en cuanto a los cálculos y sus pruebas son menos poderosas que las paramétricas correspondientes.

La prueba no paramétrica de comparación de dos muestras más sencilla es la de los signos, que se aplica, mejor o peor, cuando los datos se expresan en forma de aumento o de descenso. Una prueba más precisa es la de Wilcoxon o de los intervalos con signo, que considera los valores de las diferencias y el intervalo de las mismas. La prueba de los signos y la de Wilcoxon son pruebas para datos pareados. Para muestras independientes o diferentes se usa la prueba de Mann-Whitney. Y cuando se comparan varias muestras, la prueba a aplicar es la de Friedman. En la actualidad, todas estas pruebas estadísticas se realizan con ordenador.

TABLA 6-2 Valores de glucosa en suero medidos por dos métodos diferentes, A y B, y diferencia entre los valores (y)

| Método A | Método B | Diferencia (y) | Método A | Método B | Diferencia (y) |
|----------|----------|----------------|----------|----------|----------------|
| 98 | 100 | -2 | 100 | 101 | -1 |
| 75 | 76 | -1 | 87 | 89 | -2 |
| 101 | 97 | 4 | 85 | 84 | 1 |
| 95 | 95 | 0 | 93 | 92 | 1 |
| 96 | 98 | -2 | 104 | 105 | -1 |
| 100 | 101 | -1 | 97 | 99 | -2 |
| 99 | 97 | 2 | 85 | 85 | 0 |
| 102 | 101 | 1 | 90 | 91 | -1 |
| 100 | 100 | 0 | 92 | 90 | 2 |
| 103 | 99 | 4 | 102 | 103 | -1 |
| 95 | 94 | 1 | 88 | 89 | -1 |
| 98 | 97 | 1 | 101 | 100 | 1 |
| 93 | 92 | 1 | 98 | 99 | -1 |
| 95 | 95 | 0 | 85 | 84 | 1 |
| 89 | 90 | -1 | 81 | 80 | 1 |
| 79 | 81 | -2 | 104 | 103 | 1 |
| 92 | 93 | -1 | 100 | 98 | 2 |
| 89 | 89 | 0 | 104 | 102 | 2 |
| 94 | 93 | 1 | 87 | 85 | 2 |
| 102 | 101 | 1 | 97 | 96 | 1 |
| 102 | 101 | 1 | 100 | 101 | -1 |
| 98 | 99 | -1 | 98 | 97 | 1 |
| 97 | 99 | -2 | 85 | 84 | 1 |
| 100 | 100 | 0 | 84 | 84 | 0 |
| 103 | 102 | 1 | 97 | 97 | 0 |
| 98 | 97 | 1 | 80 | 79 | 1 |
| 99 | 99 | 0 | 100 | 99 | 1 |
| 89 | 91 | -2 | 75 | 77 | -2 |
| 87 | 89 | -2 | 81 | 81 | 0 |
| 98 | 99 | -1 | 104 | 103 | 1 |

ANÁLISIS DE LA VARIANCIA

La forma más habitual de comparar conjuntos de medias de dos grupos es similar a la de la t de Student. Cuando se quieren comparar varios grupos, el análisis de la variancia entre grupos (ANOVA) señala si existen diferencias entre las medias de dichos grupos, pero no indica cuáles son las que difieren. Las diferencias entre cada grupo se obtienen merced a diversas pruebas, entre las que está la de Newman-Keuls. Las pruebas de ANOVA se realizan con programas estadísticos en ordenador.

CONCORDANCIA ENTRE PRUEBAS CUALITATIVAS

Cuando se comparan dos pruebas que proporcionan resultados cualitativos (positivo o negativo) se construye una tabla de contingencia de 2×2 . Una

medida obvia de concordancia es el porcentaje de resultados que tienen el mismo resultado en ambas pruebas. Pero al hacer este cálculo no se tiene en cuenta la concordancia que resulta del azar. El índice de concordancia más empleado es kappa (κ):

$$\kappa = \frac{I_o - I_e}{1 - I_e}$$

donde I_o es la proporción de concordancia observada (en tanto por 1) y I_e es la proporción de concordancia esperada por puro azar. Cuando hay una concordancia perfecta $\kappa = 1$, si la concordancia observada es mayor o igual a la concordancia por azar, κ es mayor o igual a cero y si la concordancia observada es peor que la que se obtendría por azar, se obtiene un valor de κ negativo.

Los valores de κ mayores de 0,75 indican una concordancia excelente, los valores entre 0,4 y 0,75 una concordancia buena y los valores menores de 0,4 una concordancia mala.

REGRESIÓN LINEAL Y CORRELACIÓN

Cuando se quiere estudiar el grado de asociación entre dos variables, se utilizan los estudios de regresión lineal y correlación; por ejemplo, si se desea estudiar los valores de una magnitud proporcionados por dos métodos diferentes o la relación que existe entre dos parámetros, como la proteína C reactiva y la velocidad de sedimentación globular. El modelo de regresión lineal supone que la relación entre la x y la y puede resumirse como una línea recta, esto es, para un cambio unitario de x , y cambia una cantidad constante en el intervalo de las observaciones.

En los estudios de correlación se representan los valores en un eje de coordenadas y se obtiene la ecuación de la recta que más se ajusta a los datos por medio de mínimos cuadrados:

$$y = ax + b$$

donde b = ordenada en el origen; a = pendiente.

De esta forma, la línea queda definida de forma matemática por estos dos números.

Además de la ordenada en el origen y la pendiente, con la ecuación de regresión se asocia también la variabilidad de los puntos obtenidos alrededor de la línea de regresión. Su número proporciona una medida de cuánto se acercan los valores de x y y . Suele expresarse como la desviación estándar de la estimación (s_{xy}). De forma ideal, la pendiente es 1, la ordenada en el origen es 0 y s_{xy} es también 0. Las desviaciones de estos valores ideales las producen los diferentes tipos de errores analíticos: los errores proporcionales producen cambios de la pendiente; los constantes, cambios de la intersección con y ; y los aleatorios, aumentos de s_{xy} .

El grado de correlación entre las variables x e y se expresa por medio del coeficiente de correlación, r , que mide el grado de relación lineal entre las dos. Su valor depende de las unidades en que se expresan x y y . La pendiente y el

coeficiente de correlación no son medidas equivalentes de asociación, ya que existe una asimetría básica de la ecuación de regresión, de forma que x e y no son intercambiables. El coeficiente de correlación puede calcularse directamente a partir de los datos, sin obtener la citada ecuación. El coeficiente de correlación puede tener valores desde -1 hasta $+1$, donde el signo indica la dirección de la relación entre las dos variables. Un r positivo indica que ambas variables aumentan o disminuyen juntas, mientras que un r negativo indica que cuando una variable aumenta la otra disminuye. Un valor de r de 0 indica que no existe relación lineal.

PROGRAMAS ESTADÍSTICOS

En el momento actual, los análisis estadísticos se llevan a cabo utilizando hojas de cálculo o programas estadísticos. Los principales programas que se emplean son SPSS, SAS, StatView. Los programas generales suelen carecer de procedimientos útiles para los laboratorios clínicos. En estos casos pueden utilizarse algunos programas más o menos especializados para los laboratorios clínicos.

Evaluación de métodos y objetivos de calidad analítica

INTRODUCCIÓN

Los métodos de análisis que van a emplearse en los laboratorios clínicos han de evaluarse para conocer sus características de funcionamiento. La evaluación de los métodos analíticos debe comprender tanto los requerimientos prácticos como las características analíticas. Asimismo, los laboratorios clínicos deben fijar objetivos de calidad analítica. Estos objetivos pueden fijarse en función de diversos criterios. En este capítulo se exponen las principales técnicas para la evaluación de los métodos analíticos y la determinación de los objetivos de calidad analítica.

REQUERIMIENTOS PRÁCTICOS DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Los requerimientos prácticos de un método analítico comprenden sus características de realización que determinan si puede funcionar adecuadamente en el laboratorio clínico. Los factores principales que determinan que un método pueda realizarse en él son el tamaño del espécimen, la rapidez, la dificultad técnica, el grado de dependencia, la frecuencia de calibración, el coste por prueba y la peligrosidad de los reactivos y su seguridad.

Tamaño de espécimen

La cantidad de espécimen que necesita un método es un factor clave en los métodos analíticos que se emplean en los laboratorios, ya que en ocasiones no se dispone de una gran cantidad de espécimen.

Rapidez

La evaluación de la rapidez de un método debe analizar dos variables descriptivas relacionadas con el tiempo: la velocidad a la que pueden procesarse los especímenes, y el intervalo que transcurre entre la recepción del espécimen y la disponibilidad del resultado. En el primero se analiza el tiempo que tarda en procesarse el espécimen con ese método y, en el segundo, cada cuánto tiempo se realiza.

Dificultad técnica

Es también importante estudiar la dificultad de los diferentes pasos del método. Algunos métodos son muy fáciles, porque requieren pocos pasos de procesado, mientras que otros son complejos, porque tienen muchos pasos.

Grado de dependencia

Asimismo, debe valorarse el grado de dependencia de los instrumentos utilizados para realizar el método.

Frecuencia de calibración

Es fundamental conocer la frecuencia de calibración para proporcionar unos resultados fiables. Debe conocerse la estabilidad de la calibración y cada cuánto tiempo hay que realizarla.

Coste por prueba

El coste de un método incluye no sólo el gasto en los reactivos y los materiales necesarios para preparar los especímenes y hacer el análisis, sino también los costes de amortización y de operación, los de trabajo —que dependen de los conocimientos técnicos que debe tener la persona que lo realice— y los costes correspondientes de los gastos generales del laboratorio.

Peligrosidad de los reactivos y seguridad

Finalmente, hay que analizar la seguridad del método, en términos de riesgos químicos, como explosiones y reactivos venenosos o cancerígenos, y de posibles riesgos microbiológicos. También deben ponderarse los riesgos derivados de accidentes, como las salpicaduras de los reactivos.

CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Toda medida cuantitativa es afectada por factores que la apartan del valor verdadero. Las causas principales de variabilidad analítica se deben a errores sistemáticos y errores aleatorios.

Los *errores sistemáticos* pueden dividirse en cuatro categorías: errores de muestreo, errores del método, errores de la medida y errores personales. Los errores de muestreo son los que se introducen durante la obtención del espécimen. Los del método se deben a las limitaciones del método de análisis. Los de la medida son fruto de las limitaciones del equipo y de los instrumentos utilizados para realizarla. Finalmente, los errores personales son obra del analista que efectúa la medida. Los errores sistemáticos cambian la posición de la media, con un sesgo que puede ser positivo o negativo. Sin embargo, afectan poco a la variabilidad de los resultados.

Los *errores aleatorios* se deben a lecturas incorrectas de los instrumentos, cálculos equivocados, el cambio de especímenes y el uso de reactivos o de estándares preparados de forma incorrecta. Estos errores aumentan la variabilidad de los resultados, y afectan poco a la media.

Los principales parámetros de eficacia analítica de un método son: precisión, exactitud, sensibilidad analítica, especificidad analítica, interferencias e intervalo de linealidad. En los apartados siguientes se detallan cada uno de estos parámetros.

PRECISIÓN ANALÍTICA

La *precisión analítica* de un método da cuenta de la concordancia entre las medidas repetidas con un mismo espécimen. La precisión es un término conceptual que no posee valor numérico. El término cuantitativo es la *imprecisión*, que se

define como la desviación estándar o el coeficiente de variación de los resultados de un conjunto de medidas repetidas. La imprecisión informa del error aleatorio.

Las principales causas que contribuyen a la imprecisión de los resultados de un método son emplear diferentes reactivos, personal, estándares de calibración y series analíticas. Durante la evaluación de un método deben mantenerse constantes tantos factores como se pueda, por ejemplo, usar el mismo lote de reactivos, los mismos estándares y el mismo personal de laboratorio, aunque debe estudiarse también el efecto de la variación de estos factores.

En los estudios de precisión hay que obtener la imprecisión intraserial y la interserial:

- La *imprecisión intraserial* se obtiene analizando especímenes, generalmente de tres concentraciones diferentes (baja, normal y alta) del intervalo analítico, de forma repetida (de 10 a 20 veces) en la misma serie de análisis. A partir de los datos, se obtienen los coeficientes de variación para cada concentración. La imprecisión intraserial proporciona un valor optimista, ya que se producen menos oportunidades de variación dentro de una serie que entre series.
- La *imprecisión interserial* se obtiene con los mismos especímenes. Se preparan 20 alícuotas de cada uno de los especímenes que se congelan, descongelando cada día uno para su análisis, durante 20 días consecutivos de trabajo. A partir de los resultados, se calcula el coeficiente de variación para cada concentración. La imprecisión interserial es el valor más real de la precisión de un método y el que observa el médico solicitante cuando usa esa determinación, ya que incluye todas las causas que contribuyen a la imprecisión.

Para analizar el efecto de la concentración sobre la imprecisión se representan los coeficientes de variación frente a la concentración de la sustancia. Si la imprecisión es constante en el intervalo analítico, los coeficientes de variación proporcionarán una línea recta, mientras que si la imprecisión es proporcional a la concentración de la sustancia, el coeficiente aumentará al crecer la concentración.

EXACTITUD ANALÍTICA

La *exactitud analítica* es una medida de la concordancia entre el valor obtenido para una determinación y su valor real. La exactitud es un término conceptual que no posee un correlato numérico. Como término cuantitativo se usa la *inexactitud*, que se define como la diferencia numérica entre el valor medio de una serie de determinaciones y su valor verdadero. La diferencia, positiva o negativa, puede expresarse en las mismas unidades en que se mida la magnitud, o como un porcentaje del valor verdadero. La inexactitud puede evaluarse utilizando materiales de control o por medio de la comparación de métodos.

USO DE MATERIALES DE CONTROL

Una forma de evaluar la inexactitud analítica de un método es utilizar materiales de control con valores asignados, obtenidos mediante métodos definiti-

vos o de referencia. Estos materiales suelen ser caros y difíciles de conseguir, por lo que pueden emplearse controles comerciales valorados. Es importante constatar que su matriz sea lo más semejante posible a la de los especímenes.

Deben escogerse tres materiales de control con tres valores de concentración: bajo, medio y elevado. Se analiza cada material por triplicado y, a ser posible, en diferentes series analíticas (cinco por lo menos). Con los resultados obtenidos se calcula el valor medio y se compara con el valor asignado. Se obtiene así el error relativo respecto al valor teórico, con signo positivo o negativo.

COMPARACIÓN DE MÉTODOS

Otro modo de evaluar la inexactitud analítica es mediante la comparación de métodos, para lo cual se analizan especímenes clínicos por el método que se evalúa y por otro método de referencia o de inexactitud conocida. El estudio debe realizarse, al menos, en 40 especímenes distribuidos uniformemente por el intervalo analítico, con determinaciones por duplicado. Así, se comprueba la presencia de valores aberrantes y se comparan las imprecisiones de ambos métodos. Los especímenes de los pacientes se dividen en dos alícuotas, que se analizan por duplicado con cada método. Los resultados se representan de forma gráfica, colocando en el eje de abscisas los valores obtenidos con el método de referencia o comparativo y en el eje de ordenadas los valores que se obtengan con el método nuevo. En la figura 7-1 se presenta un ejemplo de comparación de métodos. La inspección visual informa del intervalo analítico cubierto, de si los puntos se distribuyen de forma homogénea a lo largo del mismo, de la posible existencia de valores aberrantes, etc.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Se realiza por medio de un análisis de regresión lineal y se valora la ecuación de la recta ($y = ax + b$), el coeficiente de correlación (r) y el valor estadístico t :

Ecuación de la recta de regresión

En esta ecuación, los términos de la ecuación, pendiente (a) y ordenada en el origen (b), muestran los errores sistemáticos. La pendiente de la recta da cuenta del error proporcional, que es positivo cuando $b > 1$ y negativo cuando $b < 1$; y la ordenada en el origen señala el error constante, que es positivo cuando $a > 0$ y negativo cuando $a < 0$. En una situación perfecta, los resultados del método nuevo deben coincidir con los del método de referencia, de manera que se obtenga una recta $y = x$, es decir de pendiente 1 y que pase por el origen. Por tanto, si los intervalos de confianza de la pendiente y de la ordenada en el origen no incluyen los valores teóricos respectivos de 1 para la pendiente y 0 para la ordenada en el origen, hay un error sistemático constante y/o proporcional.

Coefficiente de correlación

El coeficiente de correlación (r) indica el grado de asociación lineal entre el método nuevo y el de referencia o comparativo. Cuanto más cerca de 1 se encuentre r , mayor será el grado de asociación. Sin embargo, este grado puede

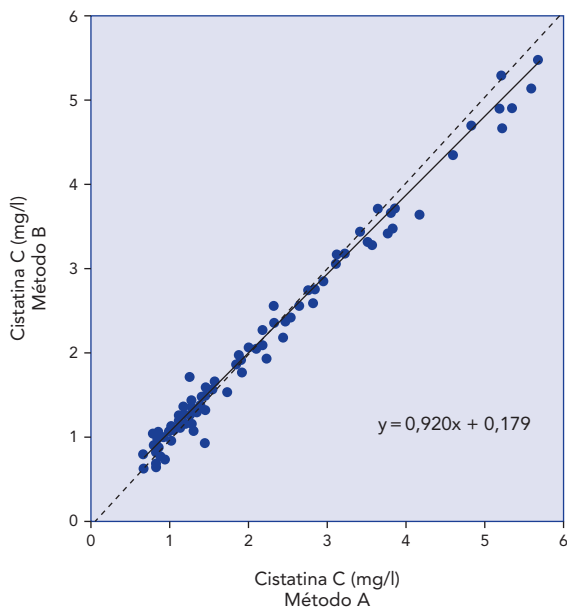


FIGURA 7-1 Ejemplo de comparación de dos métodos.

ser alto y estar todos los puntos fuera de la recta de regresión. La desviación estándar de los residuales $s_{y/x}$ que señala las diferencias entre el valor observado con el método nuevo y el obtenido mediante la recta de regresión, informa del grado de dispersión de los puntos alrededor de la recta de regresión.

Estadístico t

Valora de un modo conjunto los resultados que proporcionan el método nuevo y el de referencia o comparativo. El valor de t lleva asociada la probabilidad de que las medias de los resultados con el método nuevo y el comparativo sean iguales.

En la figura 7-2 se muestran las diferencias entre precisión y exactitud. Un método puede ser preciso y exacto, como en A; impreciso, pero exacto, como en B; o preciso, pero inexacto, como en C.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA Y LÍMITE DE DETECCIÓN

La *sensibilidad analítica* es una medida de la capacidad de un método para detectar variaciones pequeñas de la sustancia que se analiza. Suele expresarse por la pendiente de la curva de calibración, aunque también depende de la variación aleatoria de la función de calibración, que es la relación entre la señal y la concentración de la sustancia. Cuanto menor sea la variación aleatoria de la respuesta del aparato y más inclinada la pendiente mayor será la capacidad de determinar pequeñas diferencias de la concentración de la sustancia.

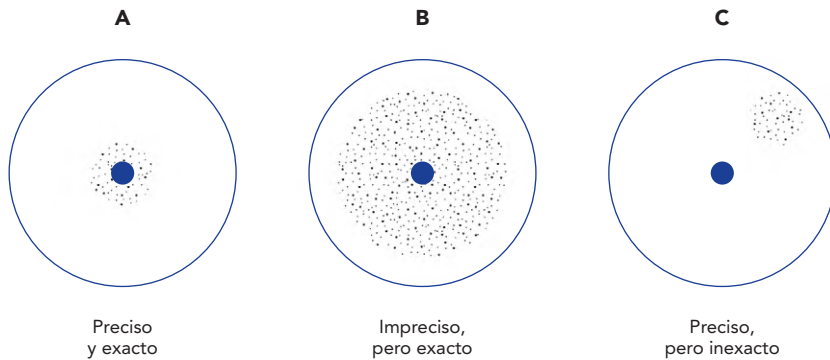


FIGURA 7-2 Diferencias entre la precisión y la exactitud de tres métodos.

El *límite de detección* se define como el resultado más pequeño que puede diferenciarse de un blanco adecuado, con una probabilidad del 95%. Este límite marca el punto a partir del cual puede realizarse el análisis. Una definición cuantitativa del límite de detección es que es igual a tres veces la desviación estándar del blanco de espécimen. La determinación del límite se realiza de la forma siguiente:

- Se selecciona el blanco adecuado. Idealmente, debe diferir de los especímenes en no contener el componente que se mide. Otra solución es evitar el uso de un componente esencial en la reacción (enzimas, reactivo de inicio, incubación, etc.).
- Se efectúan 20 determinaciones del blanco.
- Se establece la media y la desviación estándar de los resultados aparentes del blanco.
- Se obtiene el valor equivalente a tres veces la desviación estándar.

Hay que señalar que la imprecisión a estas concentraciones tan bajas puede divergir de la obtenida con el método, por lo que la desviación estándar que se usa es la total, que reúne la de los blancos y la de los especímenes. Para conocer si la de los blancos es semejante a la de estos, se puede realizar una comparación, mediante la F de Snedecor, de las variancias de los blancos y las de cinco especímenes de muy baja concentración, de modo que se determinan si son o no significativamente diferentes.

INTERVALO DE LINEALIDAD E INTERVALO ANALÍTICO

El *intervalo de linealidad* determina el analítico, que se define como el intervalo de concentración, o de la magnitud que se mida, en el que hay una relación lineal entre el valor real y el obtenido con el método, de forma que este puede aplicarse sin modificación. El intervalo de linealidad del método debe ser suficientemente amplio para incluir la mayoría de los valores que se obtienen en los especímenes de rutina. En los métodos que emplean calibraciones a uno o dos puntos, se asume la linealidad del método, al menos entre el origen y el

punto superior de calibración, y se extrapola generalmente esta linealidad a un valor de concentración especificado por el fabricante del reactivo.

El procedimiento consiste en emplear un espécimen con una concentración alta de la sustancia y efectuar dos series de diluciones, una con un diluyente adecuado (agua o suero fisiológico) y otra con un espécimen de nula o muy baja concentración de la sustancia. Los análisis se realizan por duplicado y se representan las medias de los duplicados en el eje x , frente a los valores teóricos (o frente al volumen de espécimen utilizado) en el eje y . Entonces se comprueban visualmente los valores de concentración para los que se mantiene la relación lineal y si las dos series de diluciones tienen la misma pendiente, ya que, en caso contrario, habrá un efecto de matriz causado por el diluyente.

ESPECIFICIDAD ANALÍTICA E INTERFERENCIAS

La *especificidad analítica* de un método representa su capacidad para medir únicamente el componente o los componentes que pretendan medirse. Las *interferencias* se refieren a las influencias que ejercen determinadas sustancias, que por sí mismas no producen lecturas, sobre la exactitud de un método para determinar otra sustancia. La interferencia puede dar lugar a valores más bajos o más altos de la sustancia que se analice. La magnitud del efecto sobre la medida depende de la concentración o de la cantidad de la sustancia que interfiere, aunque no necesariamente de forma proporcional. Al menos, deben investigarse siempre los efectos de la ictericia, la lipemia y la hemólisis. Los estudios se realizan de la forma siguiente. Se seleccionan especímenes icterícos, lipémicos y hemolizados, y se determina la sustancia que interesa por el método que se evalúa y por otro de referencia, libre de la interferencia que se estudie. Luego se compara la diferencia obtenida entre ambos valores con el error permitido.

Normalmente, se analizan las interferencias de una en una. Sin embargo, a menudo hay presentes de forma simultánea más de una sustancia interferente. La evaluación cuantitativa de las interferencias complejas es complicada y requiere un diseño factorial en el que se analicen todas las combinaciones posibles de las diversas concentraciones de cada sustancia interferente.

Cuando no se disponga de un método comparativo que con seguridad esté libre de interferencias, se añadirán cantidades diferentes de la sustancia interferente a una combinación de sueros y se analizarán los especímenes por duplicado, comparando el valor obtenido y el esperado, y se expresará el efecto sobre la sustancia en las mismas unidades que esta y por unidad de la sustancia interferente (p. ej., 3 mg/dl de glucosa por cada mg/dl de bilirrubina).

OBJETIVOS DE CALIDAD ANALÍTICA

Se denominan objetivos de calidad analítica a los requerimientos de funcionamiento necesarios para proporcionar un cuidado óptimo a los pacientes. Para tomar decisiones, los médicos utilizan todos los datos de que disponen, y muy raras veces actúan de acuerdo con los resultados de una sola prueba de laboratorio. En caso de duda, suelen solicitar que se repita la prueba y, si el resultado coincide con el anterior, puede considerarse exacto. La falta de concordancia puede deberse a la variación biológica que, con frecuencia, no

se tiene en cuenta aunque puede, correcta o equivocadamente, tenerse también por un error del laboratorio o ser resultado de un cambio clínico significativo.

Se ha señalado que los objetivos de calidad analítica dependen del uso médico de los resultados y, por tanto, son variables, en función del problema clínico del momento y de la determinación de que se trate. Para el diagnóstico son importantes tanto la precisión como la exactitud, mientras que para el seguimiento lo más importante es la precisión. En un servicio de urgencias, es fundamental la comunicación rápida del resultado, de forma que para conseguirlo puede aceptarse una precisión y una exactitud de los resultados menores que las del laboratorio general. Deben, pues, establecerse para cada laboratorio clínico objetivos de calidad analítica en lo referente a la imprecisión y la inexactitud de los resultados que proporciona.

OBJETIVOS ANALÍTICOS PARA LA IMPRECISIÓN

Las variaciones de los resultados de un paciente se deben a la imprecisión analítica y a la variación intraindividual, así como al deterioro o la mejora de su estado. Se han utilizado varias estrategias para definir los objetivos de calidad analítica respecto a la imprecisión que han de presentar los métodos empleados en los laboratorios clínicos. Los principales criterios utilizan los valores de referencia, la opinión de los médicos y la variabilidad biológica.

El criterio que se recomienda en la actualidad para establecer los objetivos de imprecisión analítica señala que deben depender de la variabilidad biológica del compuesto que se mida. Aunque muchas sustancias no varían particularmente a corto plazo, fluctúan de forma aleatoria alrededor de un valor o punto homeostático. Esta variación se denomina variación biológica intraindividual. Las diferencias entre los puntos homeostáticos de las personas se denominan variación biológica interindividual.

En 1970, se propuso por vez primera basar los valores de los errores analíticos permisibles en la variación biológica. Se sugirió que debían utilizarse los componentes de variación biológica (CV) intraindividual e interindividual para calcular un CV analítico óptimo (CV_a), de acuerdo con la fórmula:

$$CV_a = 1/2 [(CV_{\text{intraindividual}})^2 + (CV_{\text{interindividual}})^2]^{1/2}$$

El cálculo de los componentes de variación biológica puede realizarse de la siguiente forma. Se selecciona un grupo de personas de las que se recogen varios especímenes durante un período de tiempo, en condiciones que minimicen las fuentes de variación preanalíticas. Se guardan todos los especímenes en condiciones que aseguren su estabilidad. Cuando se completa la recogida de estos, se analizan todos juntos. Los análisis deben realizarse en las denominadas condiciones de variancia óptimas, que significa que se hace mínima la variación analítica usando un solo lote de reactivos y consumibles, un solo instrumento y un único operador.

La variancia total está compuesta por la variancia analítica, la variancia biológica intraindividual y la biológica interindividual. Para derivar la variancia analítica, se llevan a cabo análisis de todos los especímenes de las personas en duplicados aleatorios. Dicha variancia viene dada por esta fórmula:

$$\text{variancia} = s^2 = \frac{\sum (\text{diferencia entre duplicados})^2}{2 \times \text{número de pares}}$$

donde s es la imprecisión.

De la variancia total, calculada a partir de los datos obtenidos en todas las personas, puede extraerse la variancia biológica interindividual por sustracción de la suma de las variancias analítica e intraindividual.

Cuando se usan las pruebas de laboratorio para diagnosticar o seguir una enfermedad, son importantes tanto la variación analítica como la biológica intraindividual. Así, para la imprecisión entre lotes dentro del laboratorio:

$$s^2_{\text{analítica}} < 1/4 s^2_{\text{intraindividual}}$$

Debe tenerse en cuenta que esta fracción es empírica y los objetivos no son definitivos, ya que pueden modificarse como consecuencia de otras teorías o planteamientos más adecuados.

El objetivo analítico para la imprecisión de las pruebas utilizadas en una situación de una sola prueba y para los análisis de especímenes seriados es:

$$CV_{\text{analítico}} < 1/2 CV_{\text{intraindividual}}$$

Cuando los resultados de las pruebas de laboratorio se empleen para detectar una enfermedad en personas aparentemente sanas (detección sistemática), son importantes tanto la variación analítica como la biológica intraindividual y la biológica interindividual. Así, el objetivo analítico para la imprecisión entre lotes intralaboratorio en las determinaciones de detección sistemática sería, de manera análoga a lo descrito antes:

$$s^2_{\text{analítica}} < 1/4 (s^2_{\text{intraindividual}} + s^2_{\text{interindividual}})$$

que puede transformarse en la fórmula ya presentada:

$$CV_{\text{analítico}} < 1/2 [(CV_{\text{intraindividual}})^2 + (CV_{\text{interindividual}})^2]^{1/2}$$

En cualquier caso, en términos matemáticos puede escribirse:

$$CV_{\text{analítico}} < 1/2 CV_{\text{biológico}}$$

Si se consigue este objetivo, el error analítico aleatorio añadirá alrededor del 12% a la variabilidad total, ya que:

$$CV_{\text{total}} = CV_a^2 + CV_b^2$$

Donde a = analítico; b = biológico.

Sin embargo,

$$CV_a = 1/2 CV_b$$

por lo que:

$$CV_{\text{total}}^2 = 1/4 CV_b^2 + CV_b^2 = 5/4 CV_b^2$$

$$CV_{\text{total}} = 1,118 CV_b$$

Existen muchos datos sobre la variación biológica intraindividual para un gran número de componentes de la sangre. La variación intraindividual parece ser siempre la misma, independientemente del número de personas estudiadas, del tiempo que abarque el estudio, de la metodología o de la instrumentación utilizada y del país en que se realice. Aún más, la variación intraindividual en poblaciones ancianas sanas no es diferente de la obtenida en los jóvenes. Además, en estados estables de enfermedad, como la insuficiencia renal crónica, la hipertensión esencial, la diabetes mellitus y la disfunción hepática crónica, y durante el embarazo, los puntos de ajuste homeostático pueden cambiar, pero no lo hacen las variaciones alrededor suyo.

En la tabla 7-1 se presentan los objetivos de calidad analítica para la precisión, obtenidos a partir de la variabilidad biológica de diversos componentes de la sangre, y expresados en forma de porcentaje del coeficiente de variación.

OBJETIVOS ANALÍTICOS PARA LA INEXACTITUD

No se han definido con aceptación general los criterios sobre las necesidades médicas a este respecto, y hay pocos objetivos de calidad analítica sobre la inexactitud de las pruebas de los laboratorios clínicos. Pero aunque los límites aceptables de inexactitud sean difíciles de establecer, en sentido amplio puede considerarse admisible la ausencia de inexactitud. El *College of American Pathologists* ha combinado la valoración de la inexactitud y la imprecisión en un solo término denominado «error total», que es la suma de la desviación y la imprecisión del método. Este planteamiento tiene la ventaja de proporcionar a los médicos un único término para el error analítico total, más fácil de entender.

ESTRATEGIAS DE FUNCIONAMIENTO

Fijar los objetivos para la calidad analítica es muy útil para los programas de control de la calidad y para ajustar la adecuación de las técnicas de control a las aplicaciones a las que se dirigen. Dichos objetivos deben expresarse en forma de errores analíticos permisibles: desviación estándar permitida para los errores aleatorios y desviación permitida para los sistemáticos. Alternativamente, como ya se ha señalado, puede definirse un error total analítico permisible (límite de error del 95%) como objetivo de calidad para los errores aleatorios y sistemáticos juntos.

Cuando se hayan especificado los objetivos para la calidad analítica podrá calcularse el tamaño de los errores que deben detectarse para conseguir una calidad determinada. Los errores aleatorios (EA_c) y los sistemáticos (ES_c) médicamente importantes o críticos vienen dados por las ecuaciones:

$$ES_c = [(ET_a - \text{desviación})/s_{\text{obs}}] - 1,65$$

$$EA_c = [ET_a - \text{desviación}]/1,96 s_{\text{obs}}$$

donde ET_a = calidad requerida en forma de error total permisible; desviación = inexactitud del método; s_{obs} = imprecisión del método.

El error sistemático crítico (ES_c) es la desviación sistemática de la distribución que permite que un 5% de los resultados tengan errores médicamente importantes. Esta definición asume que un proceso analítico deberá detenerse si un 5% de los resultados son defectuosos.

Se ha propuesto utilizar dos factores para obtener el error total analítico permisible que detecte cambios significativos de los resultados de las pruebas de laboratorio: la variación biológica y el error analítico permisible aceptado por los médicos. Según esta proposición, como la valoración por los médicos del error analítico permisible incorpora tanto la variación biológica como la analítica, el componente analítico real del error total analítico permisible puede obtenerse a partir de la diferencia estadística de la variación biológica y el error analítico que permiten los médicos.

TRANSFERIBILIDAD DE LOS MÉTODOS

Cuando se introduce un método nuevo o se cambia uno antiguo debe realizarse un estudio comparativo, utilizando especímenes de pacientes, con otro método definitivo o de referencia para comprobar que los resultados sean equivalentes y que pueden transferirse. Sin embargo, no siempre se dispone de estos métodos ideales —con imprecisión e inexactitud escasas y un amplio intervalo analítico—, y en la mayoría de los casos la comparación se realiza con el método que se empleaba habitualmente en el laboratorio, cuyas prestaciones analíticas se conocen. En el apartado «Exactitud analítica» de este capítulo se ha descrito la comparación de métodos.

TABLA 7-1 *Objetivos de calidad analítica para la precisión*

| Magnitud en suero | 0,5 CV _{intra} individual (%) | Magnitud en suero | 0,5 CV _{intra} individual (%) |
|----------------------------|--|---------------------------|--|
| Alanina aminotransferasa | 12,4 | Fosfato | 4,8 |
| α-amilasa | 3,9 | Gammaglutamil transferasa | 5,8 |
| Aspartato aminotransferasa | 5,4 | Glucosa | 6 |
| Bilirrubina | 8,9 | Hierro (II + III) | 9 |
| Calcio | 1,1 | Ion potasio | 2,3 |
| Cloruro | 0,7 | Ion sodio | 0,3 |
| Colesterol | 2,9 | Proteína | 1,3 |
| Creatincinasa | 10,1 | Triglicérido | 10,1 |
| Creatinina | 2,6 | Urato | 3,8 |
| Fosfatasa alcalina | 3,4 | Urea | 5 |

Cuando los resultados obtenidos en un laboratorio por dos procedimientos —o los resultados para un mismo espécimen que analizan dos laboratorios— son equivalentes, se dice que son transferibles o conmutables. La equivalencia clínica de dos métodos analíticos significa que pueden intercambiarse. En términos prácticos, esta equivalencia significa dos cosas: que los resultados de ambos métodos tienen un alto grado de concordancia y que los intervalos de referencia para la sustancia medida que se han determinado utilizando dichos métodos son esencialmente idénticos. Por tanto, el concepto de transferibilidad encuentra su principal aplicación en la obtención de resultados comparables entre sí para un paciente que acuda a un laboratorio varias veces a lo largo del tiempo, y también para el que acude a diferentes laboratorios.

El concepto de transferibilidad o conmutabilidad es fundamental cuando un laboratorio utiliza procedimientos analíticos diferentes para un mismo constituyente; un centro dispone de varios laboratorios que pueden atender al mismo paciente (general y de urgencias); varios laboratorios quieren compartir los valores de referencia; y se utilizan valores discriminantes fijos para tomar decisiones médicas.

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS

Todos los métodos de determinación que se aplican en los laboratorios clínicos tienen que estar perfectamente documentados. El manual de procedimientos recoge esta documentación. Para cada método debe realizarse una presentación que resuma la utilidad clínica de esa determinación y la justificación analítica de la elección del método. Además, hay que señalar el tipo de espécimen para el que puede emplearse el método. En la descripción de este debe explicarse la obtención y la manipulación del espécimen, los reactivos y el equipo, la preparación y realización del método, el cálculo de los resultados y el control de la calidad:

Obtención del espécimen. Hay que indicar si es necesario algún tipo de preparación especial del paciente y la clase de contenedor preciso.

Manipulación del espécimen. Debe especificarse si son necesarias condiciones anaeróbicas, la temperatura y el tiempo que puede transcurrir desde la recogida hasta el análisis, así como el procedimiento y las condiciones de almacenamiento del espécimen.

Reactivos y disoluciones. La lista de reactivos señala la identidad y el origen de cada reactivo y proporciona instrucciones sobre su almacenamiento, manipulación y utilización. Es preciso describir la preparación de las disoluciones de almacenamiento y de trabajo y su caducidad.

Equipo. Se describirán los aparatos y el equipo auxiliar necesarios con referencia a los manuales de los fabricantes.

Preparación y desarrollo del método. Se describirá también cada paso del método.

Cálculo de los resultados. Finalmente, se indicará el modo de obtener las fórmulas adecuadas para calcular los resultados de los especímenes.

Control de la calidad. Se indicará la forma y los controles adecuados para evaluar la calidad del método.

Valores de referencia y utilidad clínica de las pruebas de laboratorio

INTRODUCCIÓN

Valores de referencia es el término que se emplea en la actualidad para indicar los valores que se obtienen en las poblaciones de referencia y ha sustituido al de valores normales para designar a las personas supuestamente sanas. Clásicamente, la exactitud de una prueba diagnóstica se ha dado en función de su sensibilidad y especificidad. En este capítulo se presenta la teoría de los valores de referencia y los principales métodos para determinar la utilidad clínica de las pruebas que se realizan en los laboratorios clínicos.

TEORÍA DE LOS VALORES DE REFERENCIA

Durante mucho tiempo se ha empleado el término valores normales para designar a los valores de las personas supuestamente sanas; pero este término tiene, según el contexto en el que se emplee, diferentes significados, por lo que se recomienda usar el de valores de referencia y términos relacionados, como persona de referencia, límite de referencia, intervalo de referencia y valores observados. Valores de referencia es un término genérico al que se asocian calificativos. Así, se habla de valores de referencia en personas sanas —que vienen a ser lo que antes se denominaba valores normales—, valores de referencia en diabéticos, en hipertensos, en embarazadas, etc.

Los valores de referencia pueden dividirse en individuales o poblacionales. Los individuales son los valores previos de una persona, obtenidos cuando esta tenía determinado estado de salud. Los valores de referencia poblacionales se alcanzan a partir de un grupo de personas de referencia bien definido. Este último tipo de valores es el que se sobreentiende cuando no se añade ningún calificativo al término valores de referencia.

TÉRMINOS UTILIZADOS

Los términos que se utilizan y sus definiciones respectivas cuando se habla de valores de referencia son estos:

Persona de referencia. Es la que se selecciona con criterios definidos específicamente; por ejemplo, si es sana o bien tiene alguna enfermedad, la edad, el sexo y las condiciones en que se realiza la obtención del espécimen.

Población de referencia. Población que contiene a todas las personas posibles de referencia.

Grupo de muestra de referencia. Grupo constituido por un número adecuado de personas de referencia, seleccionadas para que representen a la población de referencia.

Valor de referencia. Valor que se obtiene por la observación o medida de una magnitud determinada en una persona de referencia.

Distribución de referencia. Distribución de los valores de referencia.

Límite de referencia. Límite que se obtiene a partir de la distribución de referencia para su utilización con fines descriptivos.

Intervalo de referencia. Intervalo definido entre los límites de referencia.

Valor observado. Valor de una magnitud analítica determinada que se obtiene por observación o medida con el fin de realizar un proceso de decisión médica. Puede compararse con los valores de referencia, la distribución de referencia, los límites de referencia o los intervalos de referencia. De modo más sencillo, y en el ámbito del laboratorio clínico, puede definirse como el resultado obtenido mediante el análisis del espécimen extraído a una persona dentro de un estudio clínico.

DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE REFERENCIA

Para determinar los valores de referencia se siguen los siguientes pasos: selección de las personas de referencia, obtención de los especímenes, realización de los procedimientos analíticos y análisis estadístico.

SELECCIÓN DE LAS PERSONAS DE REFERENCIA

Las personas de referencia se seleccionan aplicando unos criterios determinados, que se habrán definido previamente. De forma ideal, el grupo de personas de referencia debe ser una muestra aleatoria de todas las personas de la población que cumplan los criterios de inclusión. Es de una importancia fundamental establecer satisfactoriamente estos criterios para una población de personas con una enfermedad determinada. Los criterios de inclusión, que son la base para diagnosticar la enfermedad, deben basarse en un método aceptado de forma universal para identificarla. Cuando se determinen los criterios de referencia habrá que considerar la gravedad de la enfermedad. Los criterios de inclusión y de exclusión, aplicados a poblaciones sin una enfermedad determinada, condicionan los criterios clínicos en los que serán útiles los valores de referencia. Los criterios deben definir personas semejantes a aquellas sobre las que se realizará el estudio de laboratorio en la práctica. Por ejemplo, si el estudio va a utilizarse para detectar sistemáticamente una enfermedad en la población general, deberá usarse una muestra de dicha población. Por otro lado, si el estudio se empleara exclusivamente para identificar la enfermedad en un subconjunto seleccionado de pacientes, la muestra debería constar de miembros de este subconjunto.

OBTENCIÓN DE LOS ESPECÍMENES

Una vez que se dispone del grupo de muestra de referencia, el paso siguiente es obtener los especímenes. Es muy importante estandarizar los factores preanalíticos de preparación de las personas de referencia, así como el proceso de obtención de los especímenes y su manipulación previa al análisis, con objeto de reducir los factores que pueden enmascarar los cambios que indiquen la aparición de una enfermedad, la respuesta a un tratamiento, etc.

La postura es un factor que modifica las sustancias no difusibles, como las proteínas.

REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Cuando se han obtenido los especímenes, se realiza el proceso analítico de medición. Se deben indicar claramente las especificaciones analíticas, como el método, el equipo, los reactivos, los calibradores y la forma de cálculo, de manera que el estudio pueda reproducirse y puedan compararse los valores de referencia obtenidos con los producidos en otros lugares.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos debe comprender la observación de la distribución, la identificación de los valores aberrantes, la determinación de los límites de referencia y el fraccionamiento de los valores de referencia en los grupos adecuados.

Observación de la distribución

Es fundamental representar de forma gráfica la distribución de los valores obtenidos. Al observar la distribución, deben mirarse las características siguientes:

- Presencia de valores aberrantes.
- Si la distribución es bimodal o polimodal, esto es, si tiene dos o más picos, lo cual señala que hay dos o más poblaciones. Deben revisarse los criterios de selección de las personas de referencia o fraccionar los valores de acuerdo con la edad, el sexo u otro factor.
- Forma de la distribución. Muchas de las distribuciones de magnitudes biológicas no son gaussianas, pueden ser asimétricas o más o menos picudas que la distribución de Gauss.
- Situación aproximada de los límites de referencia.

Observación de los valores aberrantes

Siempre hay que comprobar la posible presencia de valores aberrantes, que son aquellos con desviaciones significativas respecto al resto de la distribución. Cuando estos valores se deben a errores analíticos pueden quedar ocultos dentro de la distribución de referencia. En este caso, sólo un control de la calidad escrupuloso podrá detectarlos. En general, se aprecian visualmente, si bien debe evitarse siempre confundir los valores extremos de distribuciones asimétricas con valores aberrantes.

Determinación de los límites de referencia

La Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) ha propuesto tres clases de intervalos de referencia: intervalo de tolerancia, intervalo de predicción e intervalo interpercentil. Este último es fácil de calcular y es el que recomien-

da la Federación. Se define como el intervalo limitado por dos percentiles de la distribución de referencia. La IFCC sugiere que se calcule el intervalo no paramétrico interfractílico del 95% central, limitado por los percentiles 2,5 y 97,5%. Cuando las personas de referencia han sido seleccionadas de forma aleatoria, es posible determinar el intervalo de confianza del percentil, esto es, los límites dentro de los cuales se encuentra el percentil verdadero con un determinado grado de confianza. El tamaño teórico mínimo de la muestra que se requiere para calcular los percentiles 2,5 y 97,5 es 40, pero se requieren al menos 120 para obtener unos cálculos fiables.

El intervalo interpercentil puede obtenerse mediante métodos estadísticos paramétricos o no paramétricos:

- El método paramétrico asume una distribución gaussiana y los límites de referencia se determinan como los valores que están por encima y por debajo de dos desviaciones estándar de la media. Cuando la distribución tenga otra forma podrá emplearse alguna transformación matemática de los datos que le hagan aproximadamente gaussiana.
- El método no paramétrico no asume ningún tipo de distribución y determina los percentiles cortando en cada cola.

Fraccionamiento de los valores de referencia

El conjunto de personas de referencia analizado y los valores de referencia correspondientes pueden fraccionarse de acuerdo con el sexo, la edad o cualquier característica que interese. El fraccionamiento se denomina también estratificación o categorización. En general, los valores de referencia pueden fraccionarse cuando las diferencias entre los grupos sean estadísticamente significativas.

USO DE LOS VALORES DE REFERENCIA

En la práctica clínica, el valor que se obtiene de una prueba analítica en un paciente suele interpretarse por comparación con los valores de referencia, que suelen estar acotados por los límites de referencia. En cierto modo, esta comparación es una prueba de hipótesis donde se supone que la persona pertenece a la población de referencia (hipótesis nula), aunque el clínico no suele hacer una comparación estadística en sentido estricto.

La presentación de los resultados es importante para que el clínico realice una interpretación adecuada. La forma más generalizada de presentar los resultados es dar el valor medido junto con los correspondientes intervalos de referencia. Cuando se dispone de distintos valores de referencia para diferentes grupos de personas, como hombres, mujeres y niños, hay que asegurarse de que los valores de referencia reflejados son los adecuados. Esta presentación se suele acompañar de asteriscos que indican señales de alerta, que muestran normalmente que el valor se encuentra fuera de los valores de referencia.

La IFCC ha propuesto presentar el resultado junto con su fractil, es decir, junto con la fracción numérica de las personas de referencia con valores inferiores al valor observado. De esta forma, se expresa la infrecuencia de este

valor, y la probabilidad es un índice de lo atípico que es el mismo. Por ejemplo, una creatinina = 0,6 mg/dl ($p = 0,023$) indica que sólo un 2,3% de las personas de referencia tiene concentraciones de creatinina inferiores a 0,6 mg/dl.

VALORES DE REFERENCIA POBLACIONALES MULTIVARIANTES

Hasta ahora se han considerado los valores de referencia poblacionales univariantes. Sin embargo, habitualmente se solicitan varias pruebas de laboratorio que deben interpretarse globalmente. La interpretación puede hacerse de dos maneras. Cada valor obtenido puede compararse con sus correspondientes valores de referencia, realizando varias comparaciones univariantes, o puede considerarse el conjunto de resultados como una única observación multivariante y efectuar una comparación multivariante.

COMPARACIÓN UNIVARIANTE

La región de referencia univariante de un resultado es definida por los dos límites de referencia sobre el eje de resultados. Los intervalos de referencia univariantes para dos resultados describen un cuadrado en el plano definido por los dos ejes. Para tres o más resultados, definen poliedros o hiperpoliedros en el espacio o en el hiperespacio (más de tres dimensiones). La interpretación mediante una región de referencia univariante múltiple consiste en averiguar si un punto queda dentro o fuera del cuadrado, poliedro o hiperpoliedro que definen los intervalos de referencia univariantes. Pero aunque este método es el más utilizado, presenta deficiencias importantes.

COMPARACIÓN MULTIVARIANTE

En la comparación multivariante se define una región de referencia multivariante basada en la conjunción de los valores de referencia de dos o más pruebas de laboratorio, que no está limitada por superficies o cuerpos con ángulos rectos. Como muestra la figura 8-1, la región multivariante de referencia para dos, tres o más determinaciones, en vez de ser un cuadrado, un poliedro o un hiperpoliedro, es una elipse en el plano, un elipsoide en el espacio tridimensional o un hiper cuerpo en el espacio multidimensional.

TRANSFERIBILIDAD DE LOS VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia son propios de cada laboratorio. Incluso en la misma población, con el mismo instrumento y con metodologías con un control de la calidad adecuado, es difícil que dos laboratorios produzcan los mismos valores de referencia. Sin embargo, a veces es muy difícil para algunos laboratorios obtener sus valores de referencia, por lo que se recurre a la literatura científica y se adoptan los generados por otros laboratorios. Para saber si son semejantes a los valores propios y se pueden asumir, el laboratorio que acepte los valores de referencia obtenidos en otro lugar deberá conocer la forma en que se han obtenido respecto a las características de la población de origen de las personas estudiadas y sus criterios de inclusión o de exclusión, el modo de obtener el

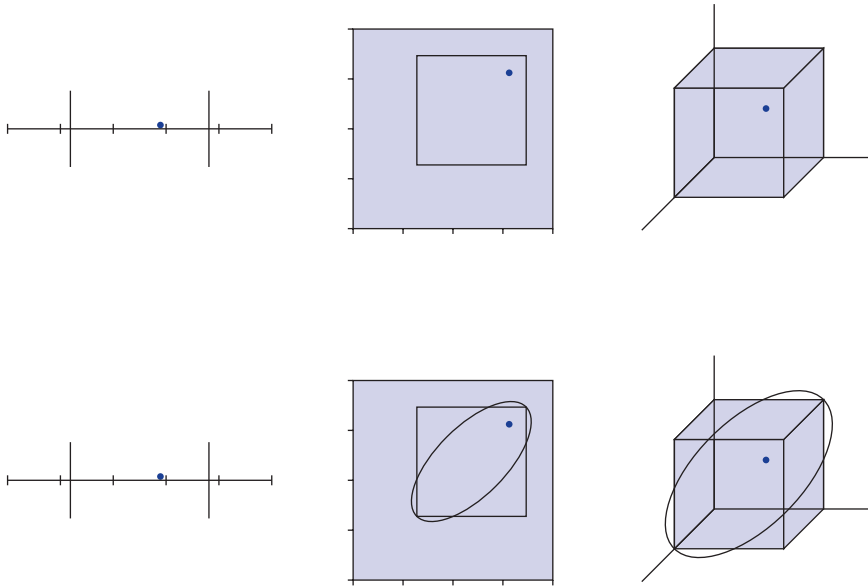


FIGURA 8-1 Región multivariante de referencia.

material biológico, el procesado de los especímenes, la metodología analítica utilizada y el tratamiento de los resultados.

UTILIDAD CLÍNICA DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS: ÍNDICES DE PRECISIÓN

La principal cualidad clínica de una prueba diagnóstica es su exactitud, que se define como la capacidad para distinguir entre dos estados de salud: sano y enfermo. Clásicamente, la exactitud de una prueba diagnóstica se ha evaluado en función de dos características: sensibilidad y especificidad. Siempre que una disyuntiva diagnóstica y el resultado de una prueba puedan plantearse en términos de dicotomía (positivo o negativo, sano o enfermo), se podrá definir la exactitud diagnóstica en términos de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, estas dos características diagnósticas varían según el criterio elegido como punto de corte de la prueba para separar entre la población sana y la enferma.

Una forma más global de conocer la calidad de una prueba diagnóstica en el espectro completo de puntos de corte es utilizar las curvas ROC (*receiver operating characteristics*: características operativas del receptor), que son una herramienta fundamental y unificadora en el proceso de evaluación y uso de las pruebas diagnósticas.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICAS

La *sensibilidad diagnóstica* de una prueba es la probabilidad de obtener un valor positivo de ella en un enfermo. Mide, por tanto, la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad cuando está presente. Por su parte, la *especificidad diag-*

nóstica de una prueba es la probabilidad de obtener un valor negativo de ella en una persona sana. Mide la capacidad de la prueba para descartar la enfermedad cuando no está presente.

La sensibilidad y la especificidad diagnósticas de una prueba se obtienen realizándola en dos grupos de personas: sanos y enfermos. Estos dos grupos se establecen utilizando un procedimiento diagnóstico de referencia preciso e independiente. Como la sensibilidad se alcanza en el grupo de enfermos y la especificidad en el de sanos, ambos valores son independientes de la prevalencia de la enfermedad en la muestra estudiada. La prevalencia de la misma en una población de estudio es el número de enfermos en la población total.

Cuando se comparan los resultados de la prueba y el diagnóstico, existen cuatro posibilidades que se resumen en una tabla de contingencia de 2×2 (tabla 8-1). Los verdaderos positivos (VP) son los enfermos clasificados correctamente por la prueba; los falsos positivos (FP), los sanos mal clasificados por ella; los falsos negativos (FN), los enfermos clasificados erróneamente por la prueba; y los verdaderos negativos (VN), los sanos clasificados correctamente por ella:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Enfermos positivos}}{\text{Total de enfermos}} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Sanos positivos}}{\text{Total de sanos}} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}}$$

La sensibilidad y la especificidad diagnósticas son dos características que se usan de forma separada, la primera para excluir la presencia de una enfermedad y la segunda para confirmarla. Para excluirla interesan pruebas con una sensibilidad elevada (pocos falsos negativos), mientras que para confirmarla interesan pruebas con gran especificidad (pocos falsos positivos). Una prueba diagnóstica ideal es la que tiene una sensibilidad y una especificidad del 100%. Sin embargo, ambos valores van en direcciones opuestas, de forma que, moviendo el punto de corte, cuando uno aumenta el otro disminuye, y a la inversa.

TABLA 8-1 *Tabla de contingencia de 2×2*

| | | Estado de salud | |
|------------------------|----------|-------------------------|-------------------------|
| | | Enfermo | Sano |
| Resultado de la prueba | Positivo | Verdadero positivo (VP) | Falso positivo (FP) |
| | Negativo | Falso negativo (FN) | Verdadero negativo (VN) |

EFICACIA DIAGNÓSTICA

Otra medida de la utilidad de una prueba diagnóstica es la eficacia, que se define como la frecuencia global de clasificaciones diagnósticas correctas cuando se aplica el estudio en un marco clínico:

$$\text{Eficacia} = \frac{\text{VP} + \text{VN}}{\text{VP} + \text{FP} + \text{VN} + \text{FN}}$$

La eficacia depende de la prevalencia de la enfermedad, esto es, de la proporción de personas de la población que tengan la enfermedad. También puede calcularse así:

$$\text{Eficacia} = \text{prevalencia} \times \text{sensibilidad} + (1 - \text{prevalencia}) \times \text{especificidad}$$

A partir de esta fórmula, se comprueba la validez de varias deducciones intuitivas con relación al comportamiento de la eficacia diagnóstica. En primer lugar, la eficacia de una prueba es determinada en gran medida por su especificidad y, en segundo lugar, cuando la prevalencia de la prueba es alta, depende principalmente de su sensibilidad.

VALOR PREDICTIVO

El valor predictivo de una prueba, llamado también probabilidad *a posteriori*, es un indicador de su seguridad en la detección de las personas sanas o enfermas. El valor predictivo señala la probabilidad de una persona de presentar o no la enfermedad dado el resultado de una prueba. Cada prueba tiene un valor predictivo positivo y otro negativo. A partir de la tabla de contingencia, el valor predictivo del resultado positivo (VPP) se define como la proporción de resultados válidos entre los resultados positivos de la prueba:

$$\text{VPP} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}} = \frac{\text{prevalencia} \times \text{sensibilidad}}{\text{prev} \times \text{sen} + (1 - \text{prev}) \times (1 - \text{esp})}$$

donde prev = prevalencia; sen = sensibilidad; esp = especificidad.

VPP señala la probabilidad de que el paciente tenga la enfermedad cuando se obtenga un resultado positivo. El valor predictivo del resultado negativo (VPN) es la proporción de resultados válidos entre los resultados negativos:

$$\text{VPN} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FN}} = \frac{(1 - \text{prevalencia}) \times \text{especificidad}}{(1 - \text{prev}) \times \text{esp} + \text{prev} \times (1 - \text{sen})}$$

VPN indica la probabilidad de que el paciente no tenga la enfermedad cuando se obtenga un resultado negativo.

El valor predictivo positivo informa de la posibilidad de confirmar la enfermedad, mientras que el negativo lo hace de la posibilidad de excluirla. A dife-

rencia de la sensibilidad y la especificidad, los valores predictivos de una prueba varían en función de la prevalencia de la enfermedad. Si se estudia una enfermedad cuya prevalencia es baja, incluso una prueba muy específica dará lugar a muchos falsos positivos, debido al gran número de personas sanas de la colectividad. En cambio, si la prevalencia es alta se puede esperar un número mayor de resultados falsos negativos. Así pues, cuanto menor es la prevalencia menor es el valor predictivo positivo y mayor el negativo; y al contrario cuando la prevalencia es elevada.

CURVAS ROC

Como se ha señalado antes, la sensibilidad y la especificidad de una prueba diagnóstica varían en función del punto de corte que se elija para dar la prueba como positiva o negativa. Las curvas ROC (*receiver operating characteristics*) son gráficos en los que se observan todos los pares sensibilidad/especificidad resultantes de la variación continua de los puntos de corte en todo el intervalo de los resultados observados. En el eje *y* de coordenadas se representa la sensibilidad o fracción de resultados verdaderos positivos; y en el eje *x*, 1 – especificidad o fracción de resultados falsos positivos (fig. 8-2).

Cada punto de una curva ROC representa un par:

$$\frac{s}{1 - e}$$

donde *s* es la sensibilidad y *e* la especificidad, correspondiente a un nivel de decisión determinado. Una prueba con discriminación perfecta, sin solapamiento de resultados en las dos poblaciones, tendrá una curva ROC que pasará por la esquina superior izquierda, donde *s* y *e* toman los valores máximos de 1. En cambio, una prueba que no discrimine, con una distribución igual de

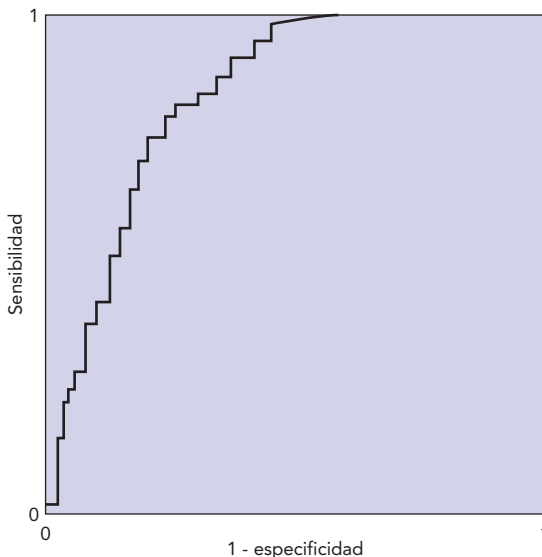


FIGURA 8-2 Curva ROC.

resultados entre sanos y enfermos, dará lugar a una diagonal que irá desde la esquina inferior izquierda hasta la superior derecha. La mayoría de las curvas ROC se encuentran entre estos dos extremos.

La observación de este tipo de curvas permite realizar una valoración cualitativa de la prueba. La mejor combinación de sensibilidad/especificidad corresponde al punto más cercano a la esquina superior izquierda. Cuando se comparan varias pruebas ROC correspondientes a sendas pruebas diagnósticas, aquella que esté situada más hacia arriba y hacia la izquierda será la de la prueba con mayor exactitud diagnóstica.

El área bajo la curva ROC (ABC ROC) es una medida global de la exactitud de una prueba diagnóstica. Los valores entre 0,5 y 0,7 indican una exactitud baja, entre 0,7 y 0,9 son útiles para algunos fines, y los mayores de 0,9 indican una exactitud elevada. Como es una medida global, el ABC ROC implica una pérdida de información, por lo que no debe considerarse de forma aislada sin observar la curva. A veces, curvas ROC de trazados muy distintos (fig. 8-3) tienen áreas semejantes. Por otro lado, una curva con un área mayor que otra puede no ser la mejor para el fin que interese.

Considerando únicamente los valores de sensibilidad y especificidad no es posible seleccionar el punto de corte idóneo para la aplicación concreta de la prueba diagnóstica. Independientemente del cálculo de decisión exacto y habida cuenta de la afección estudiada y las condiciones reales de aplicación, la elección práctica de una prueba diagnóstica debe contemplar las recomendaciones siguientes:

- Se elige la mayor sensibilidad posible cuando:
 - La enfermedad sea grave y no pueda pasar inadvertida.
 - La enfermedad sea tratable.
 - Los resultados falsos positivos no supongan un grave problema psicológico o económico para las personas examinadas.

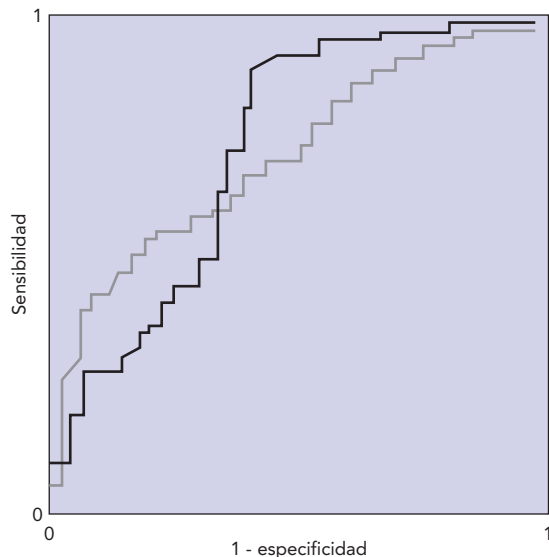


FIGURA 8-3

Curvas ROC de dos pruebas diagnósticas hipotéticas, con igual área bajo la curva pero trazados muy diferentes.

- Se elige la mayor especificidad posible cuando:
 - La enfermedad sea importante, pero difícil de curar o incurable.
 - Saber que no se padece la enfermedad tenga importancia sanitaria y psicológica.
- Debe utilizarse una prueba de gran valor predictivo positivo alto cuando el tratamiento de los falsos positivos pueda tener consecuencias graves.
- Se desea un valor global elevado cuando:
 - La enfermedad sea importante, pero curable.
 - Tanto los falsos positivos como los falsos negativos supongan un grave problema e impliquen consecuencias graves.

INTERPRETACIÓN DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO

La interpretación de las pruebas de laboratorio, como las pruebas diagnósticas, se realiza de forma más adecuada utilizando los cocientes de verosimilitud (*likelihood ratios*, LR). El cociente de verosimilitud es un cociente de dos probabilidades. El LR+ es el cociente de la probabilidad de un resultado positivo en los pacientes con la enfermedad (verdadero positivo) dividido por la probabilidad de un resultado positivo en una persona sin la enfermedad (falso positivo). El LR- es el cociente de la probabilidad de un resultado negativo en los pacientes con la enfermedad (falso negativo) dividido por la probabilidad de un resultado negativo en los pacientes sin la enfermedad (verdadero negativo):

$$LR+ = \frac{\text{sensibilidad}}{1 - \text{especificidad}} \quad LR- = \frac{1 - \text{sensibilidad}}{\text{especificidad}}$$

Los cocientes de verosimilitud son independientes de la prevalencia. Una prueba es muy útil en una determinada situación cuando tiene un LR+ mayor de 5 o un LR- menor de 0,2; es útil cuando LR+ está entre 2 y 5 o LR- entre 0,2 y 0,5; y carece de utilidad cuando LR+ es menor de 2 o LR- mayor de 0,5. Otro parámetro que señala el valor de una prueba es el cociente de verosimilitud diagnóstico (CVD):

$$CVD = \frac{LR+}{LR-} = \frac{s \times e}{(1 - e)(1 - s)}$$

Las pruebas útiles tienen valores de CVD mayores de 20.

INTRODUCCIÓN

La gestión de la calidad en los laboratorios clínicos abarca todas las acciones dirigidas a proporcionar los resultados con la máxima fiabilidad. La gestión de la calidad tiene dos componentes principales: garantía de la calidad y control de la calidad. En este capítulo se presentan los conceptos y las acciones dirigidas a gestionar la calidad de los resultados de los laboratorios clínicos.

OBJETIVOS

La calidad de un producto o servicio es la capacidad para satisfacer las necesidades de los usuarios. En los laboratorios clínicos, el producto final son los resultados de los análisis que realiza, y los usuarios son, en última instancia, los pacientes, aunque también deben considerarse como usuarios los médicos y, en general, todas las personas que reciben los resultados que proporcionan. De esta forma, la calidad en los laboratorios clínicos se aplicaría a la satisfacción de los usuarios (médicos y pacientes) con los resultados.

Como se ha señalado, la gestión de la calidad tiene dos componentes principales: su garantía y su control. La garantía de la calidad se define como todas las acciones planificadas o sistemáticas necesarias para asegurar que un producto o servicio satisface unos requerimientos dados. Así pues, el término garantía de la calidad tiene un significado amplio y comprende todas las acciones que han de realizarse para asegurar que se obtiene la calidad deseada. Los programas de garantía de la calidad tienen como objetivo inmediato asegurar que el producto final del laboratorio, esto es, los resultados de las pruebas solicitadas, sea lo más exacto posible, de modo que cumpla el fin para el que se ha pedido. Un objetivo más amplio es conseguir que todos los laboratorios produzcan resultados semejantes, con unas características de exactitud aceptables. En cualquier caso, la calidad es una obligación de los laboratorios clínicos con sus usuarios y son muchas las recompensas de un buen programa de garantía de la calidad. Su mejora conduce a una mayor productividad, pues se eliminan las repeticiones y, por ende, los costes son menores. Además, una calidad garantizada, con resultados analíticos exactos y fiables, da al laboratorio una buena reputación.

El control de la calidad son los procedimientos que valoran el funcionamiento correcto. Comprende las técnicas estadísticas cuantitativas que detectan las fuentes de error, calculan la magnitud de los errores y alertan cuando se producen indicaciones de que se ha deteriorado la calidad. Es decir, el control de la calidad es el estudio de los errores del laboratorio y los procedimientos para detectarlos y reducir su número.

ELEMENTOS ESENCIALES DE UN PROGRAMA DE GARANTÍA DE LA CALIDAD

En los laboratorios clínicos, los programas de garantía de la calidad implican virtualmente todo y a todos sus miembros. No obstante, hay algunos elemen-

tos esenciales: recursos, competencia técnica y procedimientos. A continuación se analiza cada uno de ellos.

RECURSOS

El laboratorio debe disponer de los recursos suficientes, tanto presupuestarios como materiales y de personal, para garantizar la calidad. Los laboratorios deben tener espacio, luz y una ventilación adecuados para que el personal realice su actividad de manera óptima. El trabajo en lugares con poco espacio, mal iluminados o con poca ventilación difícilmente puede hacerse con una gran calidad.

Para proporcionar calidad, es fundamental que el tamaño de la plantilla sea el adecuado, ya que se ha observado una correlación inversa significativa entre la calidad analítica y la carga de trabajo. Por otro lado, también se ha comprobado que una carga de trabajo baja conduce a una calidad analítica baja, ya que el personal dispone de mucho tiempo muerto y pierde concentración en el trabajo.

Para efectuar un buen trabajo es esencial la calidad de la instrumentación y de los reactivos. Es prácticamente imposible proporcionar buenos resultados con malos instrumentos o reactivos, pero también debe señalarse que los buenos instrumentos o reactivos no garantizan la calidad, si no se usan adecuadamente.

COMPETENCIA TÉCNICA

Es muy importante disponer de un personal competente para conseguir resultados de calidad. Todas las personas que trabajan en el laboratorio clínico deben estar cualificadas. Con la automatización y la mecanización actual de los laboratorios clínicos, los fallos humanos son los responsables de la mayoría de los errores que se producen en ellos, por lo que es muy importante la competencia técnica del personal y de su dirección.

PROCEDIMIENTOS

El laboratorio clínico debe controlar tanto las variables analíticas como las anteriores (preanalíticas) y las posteriores (postanalíticas). El control de las variables preanalíticas incluye factores ajenos a la determinación analítica, pero aunque muchos de ellos queden fuera de los límites del laboratorio, este debe conocer todos los pasos desde la obtención del espécimen hasta que llegue, e identificar los pasos donde puedan producirse errores o variaciones. El control de las variables analíticas incluye la metodología analítica, los procedimientos de calibración y la instrumentación analítica. Este control de la calidad puede realizarse utilizando materiales de control o los resultados de los pacientes. Ambas formas no se excluyen y pueden emplearse de forma combinada.

CONTROL DE LAS VARIABLES PREANALÍTICAS

Se denomina variables preanalíticas a las posibles fuentes de error localizadas antes de la medida analítica. Es muy difícil controlar estas variables porque

muchas se producen fuera del laboratorio. En este sentido, debe señalarse que, en los últimos años, se han implantado de forma generalizada las extracciones descentralizadas de los especímenes para las determinaciones analíticas. Los especímenes se obtienen en las plantas de hospitalización y los centros periféricos de extracción, fuera del laboratorio, y desde ellos se envían a este para su procesado. En estas circunstancias, es fundamental que el laboratorio controle las causas preanalíticas de variación, ya que se multiplican los lugares donde pueden producirse alteraciones que afecten a la calidad de los resultados. Los principales factores preanalíticos que deben controlarse son la identificación de los especímenes, la preparación de los pacientes, la obtención de los especímenes, el transporte de estos al laboratorio, la preparación y distribución de los especímenes en el mismo y su almacenamiento.

IDENTIFICACIÓN DE LOS ESPECÍMENES

Uno de los errores que se produce con cierta frecuencia es identificar incorrectamente al paciente de quien se obtiene el espécimen. Por este motivo, siempre debe comprobarse cuidadosamente que concuerden la identificación del paciente en el impreso de petición, su identidad en el momento de la extracción y la identificación de los recipientes de recogida. El uso de etiquetas impresas mediante ordenador, que evitan la transcripción a mano, ha reducido mucho los errores. Asimismo, los analizadores automáticos tienen sistemas de lectura de código de barras que impiden el trasvase de los especímenes desde los tubos de extracción y disminuyen los errores de identificación.

PREPARACIÓN DE LOS PACIENTES

Para que tengan sentido los resultados obtenidos es esencial preparar bien a los pacientes. Los factores inmediatos más importantes que afectan a la composición de la sangre y, en consecuencia, a las pruebas de laboratorio son la postura, el alimento, el ejercicio, la presión del compresor, los fármacos, el ayuno prolongado y el tabaco.

Postura

La postura afecta a la concentración de algunos componentes sanguíneos. Así, en posición ortostática (de pie o sentado) son más elevados que en la supina (tumbado) los valores del hematocrito, la hemoglobina, los leucocitos y las proteínas y las sustancias unidas a estas, como el calcio, los triglicéridos, el colesterol y la bilirrubina. Esto es importante cuando se comparan los resultados obtenidos del paciente ambulatorio con los obtenidos cuando está en la cama del hospital.

Alimento y ayuno

La concentración de muchos componentes sanguíneos se altera por la ingestión de alimentos durante el período anterior a la extracción del espécimen de sangre. Las alteraciones dependen, en gran medida, del tipo y la cantidad de alimentos ingeridos, así como del tiempo transcurrido entre la ingestión y la toma. Muchas pruebas no requieren ayuno, aunque siempre es preferible

que los pacientes no ingieran alimento, al menos entre 4 y 6 h antes de las extracciones, pues así se reduce la posibilidad de lipemia por quilomicrones, que puede interferir en algunos métodos de análisis. Así pues, se recomienda hacer siempre en ayunas las extracciones de sangre. El ayuno adecuado suele ser de unas 12 h; un período de tiempo más largo puede producir alteraciones en la concentración de algunas sustancias sanguíneas, como la glucosa. También se ha comprobado que un ayuno prolongado se asocia con el aumento de la concentración sérica de la bilirrubina.

Ejercicio y presión del compresor

El ejercicio produce la alteración de varios componentes de la sangre. Los más afectados son algunas enzimas, como la aspartato aminotransferasa (AST), la lactato deshidrogenasa (LDH) y la creatina cinasa (CK). La presión del compresor afecta también la concentración de muchos constituyentes sanguíneos, especialmente de las enzimas, las proteínas y las sustancias ligadas a estas, como el colesterol, los triglicéridos, el hierro y el calcio.

Fármacos

Los efectos de los fármacos son de dos tipos: *in vivo* modifican la concentración de determinadas sustancias e *in vitro* pueden interferir en la técnica de determinación. La respuesta *in vivo* a un fármaco depende del paciente, de la dosis que se utilice y de que otras medicaciones se administren de forma concurrente. En cualquier caso, los médicos que soliciten las pruebas deberán conocer la influencia de los fármacos que tome el paciente sobre las determinaciones que pidan. En cuanto a los efectos *in vitro*, el laboratorio deberá informar de las interferencias conocidas en las técnicas analíticas de medida.

Tabaco

Finalmente, el tabaco produce alteraciones inmediatas sobre algunos componentes sanguíneos. Mientras que el recuento de leucocitos no suele alterarse, los linfocitos y los neutrófilos aumentan y los eosinófilos descienden. Por este motivo, debe recomendarse a los pacientes que se abstengan de fumar antes de realizar las extracciones.

OBTENCIÓN DE LOS ESPECÍMENES

Para conseguir buenos resultados se requiere obtener adecuadamente los especímenes. El laboratorio sólo debe aceptar los que se hayan identificado perfectamente y obtenido en los tubos apropiados. Con frecuencia, la obtención incorrecta del espécimen puede producir errores que superan, con mucho, la variabilidad analítica de las determinaciones.

El anticoagulante o conservante debe elegirse bien, de forma que no se alteren los componentes de la sangre, tanto los formes como las sustancias químicas disueltas en el plasma. El anticoagulante o conservante puede alterar los constituyentes celulares; por ejemplo, no puede utilizarse oxalato para los estudios de morfología celular, pues altera las células sanguíneas.

La recogida de los especímenes durante un período prolongado de tiempo, como la orina de 24 h, ha de hacerse con sumo cuidado, procurando recoger todo el líquido emitido y mantenerlo en las condiciones adecuadas. Cuando se utilicen conservantes debe procurarse que no afecten a las medidas que interesan.

TRANSPORTE DE LOS ESPECÍMENES

En los hospitales, el tiempo que transcurre entre la obtención de los especímenes y su llegada al laboratorio suele ser corto, por lo que para la mayoría de las determinaciones no hacen falta condiciones especiales de transporte. Sin embargo, algunas requieren la refrigeración del espécimen desde el momento de la extracción. El envío de los especímenes desde los centros periféricos debe hacerse de forma adecuada, para que no se deterioren sus componentes.

La manipulación correcta de los especímenes es fundamental cuando se envían para su análisis a un laboratorio alejado del lugar de extracción o a otros laboratorios de referencia. Como norma general, hay que rechazar los especímenes que lleguen al laboratorio en condiciones inadecuadas, pues pueden provocar el deterioro de la calidad de los resultados. El laboratorio debe tener unos criterios de aceptación de especímenes. Por lo común, han de considerarse inaceptables los que tengan algunas de estas características: identificación inadecuada, volumen inadecuado de sangre recogido en una jeringa o un tubo con aditivo, uso de un tubo de recogida incorrecto, hemólisis, transporte incorrecto y presencia de sustancias interferentes.

PREPARACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS ESPECÍMENES

El proceso de preparación y distribución de los especímenes se realiza en el laboratorio. El personal dedicado a estas tareas debe ser especialmente cuidadoso. Los especímenes de sangre para bioquímica clínica deben centrifugarse inmediatamente tras la formación del coágulo. En la práctica, se acepta un intervalo máximo de unas 2 h entre la toma de los especímenes de sangre y la centrifugación. Los tubos deben centrifugarse tapados, para reducir la evaporación que se produce al generarse calor durante el proceso de centrifugación para obtener el suero o el plasma sanguíneo. Al mismo tiempo, los tapones impedirán que se formen aerosoles de partículas infecciosas. Una vez centrifugados los especímenes de suero o de plasma sanguíneo, hay que evitar mantenerlos sin tapar a temperatura ambiente, pues puede producirse una evaporación importante que afecte a los resultados. Asimismo, debe evitarse la exposición directa a la luz, ya que pueden descomponerse algunos constituyentes, como la bilirrubina.

ALMACENAMIENTO DE LOS ESPECÍMENES

Cuando no se vayan a analizar los especímenes inmediatamente después de su separación, deberán guardarse en un refrigerador, tapados, a 4 °C. Si la determinación no se realizase en un plazo de tiempo breve, convendría congelar el espécimen a -20 °C. Sin embargo, hay que tener en cuenta que algunos

constituyentes, como las isoenzimas de LDH, se alteran con el proceso de congelación. En estos casos, es preferible mantener el espécimen, siempre que se pueda, a 4 °C.

CONTROL DE LAS VARIABLES ANALÍTICAS

Las variables analíticas son las relacionadas con los métodos analíticos y su funcionamiento. Los métodos analíticos suelen implantarse tras un proceso cuidadoso de selección y evaluación (v. el capítulo 7). La evaluación del funcionamiento adecuado de los métodos analíticos debe realizarse periódicamente por medio de los métodos de control de la calidad. Hay dos formas diferentes y complementarias de control de la calidad analítica; la más habitual es la utilización de materiales de control y gráficas de control. La otra forma es el empleo de los resultados de los pacientes. En los apartados siguientes se describen estas formas del control de la calidad analítica.

CONTROL DE LA CALIDAD ANALÍTICA CON MATERIALES DE CONTROL Y GRÁFICAS DE CONTROL

Normalmente, el control de la calidad analítica se realiza con materiales de control, que se analizan diariamente. La mayoría de los laboratorios clínicos emplean materiales de control comerciales. La IFCC define el material de control como el espécimen o la solución que se analiza únicamente para controlar la calidad y no se usa para calibrar. Los materiales de control deben ser semejantes a los especímenes de los pacientes. Cuando el material utilizado para el control de la calidad se desvía física o químicamente de estos especímenes, y/o cuando haya alguna diferencia en la manipulación de los mismos y los materiales de control, existe la posibilidad de errores en el control de la calidad. Los errores falsos positivos se producen cuando los especímenes de los pacientes no tienen alguna característica física o química del material de control. Ejemplos típicos son los materiales de control desestabilizados durante el envío o que derivan del valor asignado antes de la fecha de caducidad. En cuanto a los errores falsos negativos, ocurren típicamente cuando los especímenes de los pacientes se manipulan de forma diferente a los materiales de control y la manipulación introduce alteraciones. Un ejemplo frecuente es la resuspensión inadecuada de un espécimen de hematología antes de ser aspirado por un contador.

GRÁFICAS DE CONTROL

Las gráficas de control son el instrumento principal que se utiliza para evaluar y estudiar la variabilidad analítica. En dichas gráficas se representa la magnitud medida frente al tiempo. La gráfica de control más usada es la gráfica de la media. Para construirla se analiza el material de control durante 20 días y se calcula la media y la desviación estándar. Se representa la media y se señalan las desviaciones estándar (una, dos o tres). En la figura 9-1 se muestran los resultados de un control de la calidad. La interpretación de los datos de control se hace utilizando determinados criterios de decisión o reglas de control, que definen cuándo una serie analítica es aceptable o rechazable.

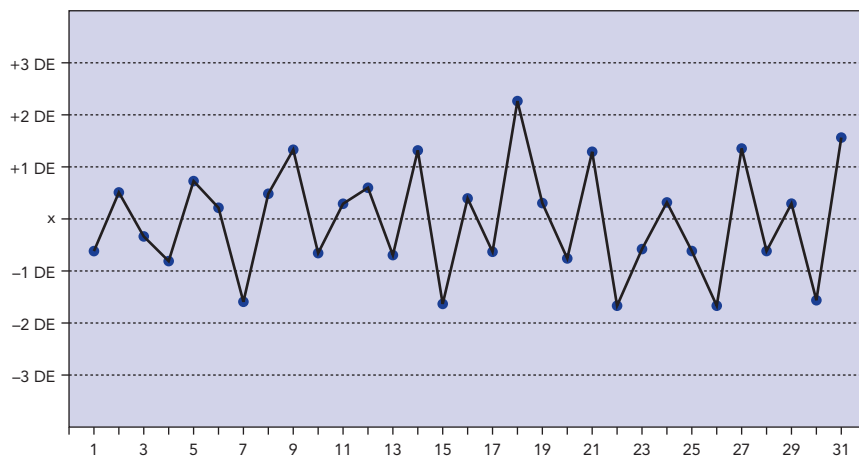


FIGURA 9-1 Resultados de un control de la calidad.

REGLAS DE CONTROL

Se usa el término regla de control para señalar un criterio que juzgue si las medidas del control representan un funcionamiento estable o bien inestable del método analítico. La regla que se utilizó primero fue la $2s$, de forma que si los resultados del control superaban por encima o por debajo de la media dos desviaciones estándar se rechazaba la serie analítica de especímenes. Sin embargo, aplicar una sola regla de control lleva a muchos falsos negativos y sólo es sensible a los errores aleatorios. Usar simultáneamente varias reglas de control permite mejorar la eficacia de un método de control. Cada regla individual posee una capacidad distinta para detectar los diferentes tipos de errores analíticos. Deben escogerse, al menos, dos reglas de control: una que detecte el error analítico aleatorio y otra que detecte el error analítico sistemático. La violación de la regla proporciona alguna indicación sobre el tipo de error que, a su vez, proporciona una pista sobre la fuente del mismo. El procedimiento más utilizado es el de las multirreglas de Westgard. Este método utiliza las siguientes reglas en el orden que se indica:

- 1_{2s} Una observación del control supera la media $\pm 2s$.
Regla de alarma que conduce a analizar los datos de control con las otras reglas, para juzgar si la serie analítica debe aceptarse o rechazarse.
- 1_{3s} Una observación del control supera la media $\pm 3s$.
Regla de rechazo de la serie analítica sensible al error aleatorio.
- 2_{2s} Dos observaciones seguidas del control superan la media $+2s$ o la media $-2s$.
Regla de rechazo de la serie analítica sensible al error sistemático. Inicialmente, la regla se aplica a dos observaciones en una serie, correspondientes a cada control diferente, pero también puede aplicarse a dos observaciones seguidas del mismo control, correspondiente a dos series analíticas.

- R_{4s} Una observación excede la media $+2s$, y otra la media $-2s$.
Regla de rechazo de la serie analítica sensible al error aleatorio.
- 4_{1s} Cuatro observaciones seguidas exceden la media $+1s$ o la media $-1s$.
Regla de rechazo de la serie analítica sensible al error sistemático.
- 10_x Diez observaciones seguidas caen a un lado de la media, por encima o por debajo, sin otro requerimiento sobre el tamaño de las desviaciones.
Regla de rechazo de la serie analítica sensible al error sistemático.

En la figura 9-2 se muestra un diagrama lógico de aplicación de las multirreglas de Westgard.

CONTROL DE LA CALIDAD ANALÍTICA UTILIZANDO LOS RESULTADOS DE LOS PACIENTES

Como los resultados son el producto final de la mayoría de los procedimientos del laboratorio clínico, valorar aquellos es la forma más directa de controlar la calidad. Sin embargo, los procedimientos para evaluar la calidad utilizando los resultados no son muy sensibles y tienen pocas probabilidades de detectar el error.

Los métodos de control de la calidad basados en los resultados de los pacientes deben reunir dos condiciones. En primer lugar, el método debe ser sensible a los errores sistemáticos que afecten a las medidas y, en segundo lugar, no ha de ser sensible a los valores aberrantes. De modo ideal, el control interno de la calidad con materiales de control debe proporcionar resultados comparables a los de los métodos basados en los resultados de los pacientes. Las discrepancias tienen que alertar al laboratorio de la presencia de errores preanalíticos.

Los procedimientos para controlar la calidad analítica que usan los resultados de los pacientes no deben sustituir a los métodos de control de la calidad que utilizan materiales de control, sino que deben emplearse como complemento, ya que, como se ha señalado antes, pueden detectar errores que escapan a otros métodos de control de la calidad.

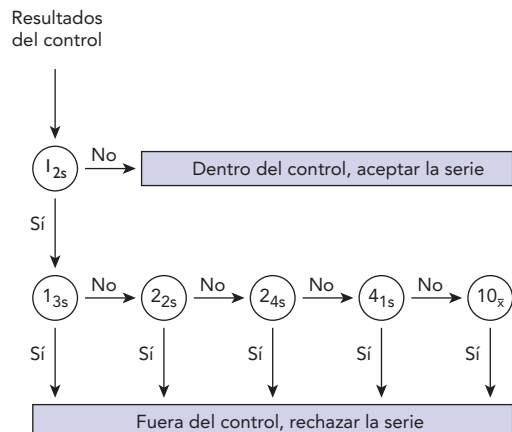


FIGURA 9-2
Diagrama lógico de aplicación de las multirreglas de Westgard.

Los procedimientos para controlar la calidad que utilizan los resultados de los pacientes pueden emplear los resultados individuales de los pacientes o los resultados de un gran número de pacientes.

RESULTADOS INDIVIDUALES DE LOS PACIENTES

Los principales métodos son las relaciones entre diversas pruebas de laboratorio, la verificación delta con pruebas previas, la verificación de límites y el uso de duplicados de los especímenes

Correlación entre las pruebas

Una forma de controlar la calidad que utiliza los resultados de los pacientes es la correlación de las diferentes pruebas de laboratorio solicitadas, de forma que sean congruentes entre sí; por ejemplo, los valores de la laguna aniónica y los electrolitos, los valores de tiroxina (T_4) y hormona tiroestimulante (TSH), los de urea y creatinina, etc. La discrepancia puede ser real, aunque también puede obedecer a errores de la determinación de algún parámetro.

Verificación delta

Hace años, cuando las cargas de trabajo de los laboratorios clínicos no eran muy grandes, era frecuente registrar los resultados de los pacientes en fichas individuales. Cuando se transcribía un nuevo resultado, solían consultarse los anteriores, lo que permitía descubrir errores como la confusión de especímenes. Este método se ha adaptado a los sistemas informáticos de laboratorio (SIL) con el nombre de verificación delta (*delta check*). En este método de control de la calidad, el ordenador resta el último resultado del primero y el valor obtenido se divide por el primer resultado. El valor delta, en forma de porcentaje, se compara con los valores permitidos. La variabilidad esperada de los resultados de las pruebas depende tanto de la determinación como del intervalo de tiempo transcurrido entre las determinaciones.

Verificación de límites

En estos métodos se revisan los resultados de las pruebas para comprobar que estén dentro de los intervalos fisiológicos compatibles con la vida. Esta comprobación de los límites ayuda a detectar errores de transcripción, como los dígitos cambiados o comas decimales mal colocadas. Esta verificación puede combinarse con límites de alarma para detectar resultados posibles pero poco frecuentes. Estos límites dependerán de la metodología de la prueba y las características de la población analizada.

Duplicados de los especímenes

En el método que utiliza duplicados, los especímenes se dividen en dos alícuotas y se analizan de forma separada. Es un procedimiento sencillo de control que no requiere materiales de control y puede usarse cuando no se disponga

de ellos o como procedimiento suplementario. Con él pueden obtenerse las precisiones intraserial e interserial.

RESULTADOS DE UN GRAN NÚMERO DE PACIENTES

El principal método es el análisis de la distribución global de los resultados. Para muchas pruebas, la distribución global de los resultados de los pacientes obtenida cada día en un laboratorio es muy constante y, en algunas circunstancias, su valor medio puede utilizarse para controlar la calidad. Las alteraciones de este valor de un día a otro pueden deberse a errores sistemáticos o a alteraciones de la población analizada. El número necesario de especímenes para cada lote de control dependerá de la cantidad y la composición de los pacientes, el tipo de distribución de los resultados, la técnica estadística usada y el tamaño de error que se quiera detectar. Normalmente, en cada lote deben utilizarse entre 50 y 100 pacientes.

PROGRAMAS EXTERNOS DE EVALUACIÓN DE LA CALIDAD

Los procedimientos expuestos se aplican fundamentalmente para el control de la calidad en un laboratorio y constituyen lo que se denomina *control interno de la calidad*. Los procedimientos que tienen como finalidad la comparación entre diferentes laboratorios reciben el nombre de *evaluación externa de la calidad*. Los dos son complementarios, ya que el control interno es necesario para el seguimiento diario de la precisión y exactitud de los métodos analíticos, y la evaluación externa para el mantenimiento a largo plazo de la exactitud de los métodos analíticos.

Los programas de evaluación externa de la calidad suelen estar promovidos por sociedades científicas y organismos gubernamentales o por fabricantes de materiales de control. En muchos países, el trabajo de los laboratorios clínicos está controlado por ley, de forma que es obligatorio participar en programas externos de evaluación de la calidad. De acuerdo con los preceptos legales, antes de conceder los certificados o licencias de funcionamiento se valora la calidad.

El control interno de la calidad y la evaluación externa de la misma pueden relacionarse con un sistema mixto que utilice el mismo material internamente y envíe los datos periódicamente para su procesamiento central con los resultados de los demás laboratorios que empleen los mismos métodos. Varios laboratorios comerciales utilizan este sistema. Con todo, no existe un programa de control de la calidad que sea el mejor de todos. Cada laboratorio clínico debe determinar cuál se adapta mejor a sus necesidades y ponerlo en práctica.

Los programas de evaluación externa de la calidad envían el mismo material de control a todos los laboratorios participantes que lo analizan, bien diariamente como parte de su control interno de la calidad o cada cierto tiempo. Los resultados se envían al organizador del programa, que los recoge y analiza y manda el informe de los datos a cada laboratorio. Todo este proceso se ha agilizado mucho con las transmisiones a través de Internet, de forma que se está alcanzando un posible control de la calidad externo a tiempo real.

Los informes incluyen los datos individuales, de grupo y representaciones como la de Levey-Jennings. Se emplea la media de todos los resultados o de

los resultados de los laboratorios que utilizan métodos semejantes para compararla con los resultados del laboratorio. Puede emplearse la prueba de la t de Student para observar diferencias. Cuando se encuentren diferencias significativas se alerta al laboratorio.

Informática del laboratorio clínico

10

INTRODUCCIÓN

En el mundo actual, los ordenadores son parte fundamental del trabajo. Los laboratorios clínicos no son una excepción, y los ordenadores ocupan un lugar muy importante en la organización y ejecución del trabajo en estos lugares. Las aplicaciones en el campo de los laboratorios clínicos son muchas: las principales son el control del funcionamiento de los instrumentos analíticos, la calidad y los sistemas informáticos de laboratorio. En este capítulo se considera esta última aplicación; antes se darán unas nociones generales sobre los ordenadores y su funcionamiento.

COMPONENTES BÁSICOS DE LOS ORDENADORES

Los ordenadores poseen dos componentes conceptuales principales: la máquina física, o *hardware*, y las instrucciones y datos que se utilizan para la operación de la máquina, o *software*. Estos dos componentes son análogos a la división del trabajo analítico en instrumentación y métodos. El *hardware* consta de tres elementos fundamentales: la CPU (unidad central de procesamiento), los lugares de almacenamiento de datos (memorias) y los sistemas de entrada/salida de datos (periféricos). Estas partes están interconectadas mediante *buses*.

UNIDAD CENTRAL DE PROCESAMIENTO

La CPU es la pieza maestra del ordenador, donde se procesa la información bajo el control del programa. En la actualidad las CPU están construidas en un único circuito integrado denominado *microprocesador*.

MEMORIAS

Las memorias son los lugares donde se almacenan los programas y donde se registran y conservan los datos intermedios. Hay dos clases de memorias: las ROM (*Read Only Memory*: memoria sólo de lectura) y las RAM (*Random Access Memory*: memoria de acceso aleatorio). La memoria ROM está incorporada al sistema y almacena los datos permanentemente, de forma que no puede borrarse y se mantiene cuando se interrumpe la corriente eléctrica. Se utiliza fundamentalmente para almacenar los sistemas operativos. Las memorias RAM pueden grabarse y borrarse cuantas veces se desee. Se utilizan para almacenar momentáneamente los datos que se procesan y se borran cuando se interrumpe la corriente eléctrica. En un ordenador personal, la ROM contiene un programa especializado denominado BIOS, que dirige la carga del sistema operativo del ordenador desde el disco duro a la RAM siempre que se enciende el ordenador.

La unidad de almacenamiento es el *byte*, que es una secuencia de ocho bits. Un bit es un dígito binario (0 o 1). Un *kilobyte* es 2^{10} bytes (1.024 bytes), un *mega-byte* (Mb) equivale a 1.048.576 bytes y un *gigabyte* (Gb) son 1.073.741.824 bytes.

DISPOSITIVOS DE ENTRADA/SALIDA DE DATOS

Los dos dispositivos principales de entrada de datos son el teclado y el ratón y los dos dispositivos principales de salida de datos son el monitor y la impresora. Otros dispositivos de entrada y salida de datos son los discos duros, los discos ópticos y las memorias USB.

SISTEMA OPERATIVO

El sistema operativo es el conjunto de programas que dirigen constantemente el trabajo del ordenador y sin los que este no puede funcionar. El sistema operativo puede estar incluido en la memoria central en forma de memoria ROM o puede introducirse en un disco. Este sistema contiene los programas que permiten acceder a los periféricos, transferir datos entre los dispositivos del ordenador y controlar los tiempos de acceso de estos al procesador. Asimismo, en los sistemas de tiempo compartido, regula el acceso de cada usuario al sistema. En la actualidad el sistema operativo más empleado es Windows, en sus diversos formatos (7, Vista, XP, 2000), que permite la multitarea, esto es, realizar varias tareas independientes al mismo tiempo.

REDES LOCALES

Una red de área local, red local o LAN (del inglés *Local Area Network*) es un dispositivo de interconexión de varios ordenadores y periféricos. Su principal objetivo es compartir recursos e intercambiar datos y aplicaciones. Los sistemas de redes locales más utilizados son los llamados cliente/servidor. Este término describe una interacción específica entre dos ordenadores en red. El servidor tiene la base de datos a partir de la cual el cliente obtiene y procesa los datos para su uso. Un programa servidor puede atender a muchos clientes. Cuando uno de estos actualice los datos, generalmente lo hará también con los del servidor. La estructura cliente/servidor es la más utilizada en los sistemas informáticos de laboratorio.

INTERNET, INTRANET Y EXTRANET

Internet es un conjunto descentralizado de redes de comunicación interconectadas que utilizan la familia de protocolos TCP/IP. Internet proporciona un gran número de servicios, como la *World Wide Web* (www), el correo electrónico, la transmisión de archivos y las transmisiones de imagen y sonido en línea.

La Web es un conjunto de protocolos que permiten de forma sencilla la consulta remota de archivos de hipertexto. Como utilidad de la Web se encuentran los buscadores, que son sistemas que presentan los archivos almacenados en servidores web sobre un tema que se ha solicitado, lo cual permite el acceso a la información de una forma simple.

El correo electrónico es otro servicio fundamental de Internet. Permite enviar y recibir mensajes utilizando los medios electrónicos de comunicación. Asimismo, permite adjuntar ficheros con información a estos mensajes electrónicos.

Una intranet es una red privada de ordenadores que utilizan la tecnología y los protocolos de Internet para compartir información o programas. Suele emplearse por empresas u organismos para el trabajo corporativo. Una extranet es parte de la intranet de una organización que se extiende a usuarios fuera de ella. Las extranet suelen tener un acceso restringido. Es un medio muy utilizado por las empresas para comunicarse con sus proveedores, socios, clientes, etc.

SISTEMAS INFORMÁTICOS DE LABORATORIO

Los sistemas informáticos de laboratorio (SIL) son aplicaciones o conjuntos de programas diseñados para tratar los datos producidos en los laboratorios clínicos. En el mercado se dispone de diversos SIL distribuidos principalmente por las casas comerciales de equipos y reactivos. Cada uno de ellos tiene sus propias características. En lo que sigue utilizaremos el Programa Omega 3000 (Roche Diagnostics) para señalar las principales características de estos programas.

Los SIL suelen tener diversos módulos interconectados que gestionan desde el control del flujo de las muestras hasta la conexión con otras redes de información sanitaria. Los principales módulos de Omega 3000 son:

- PSM.
- General.
- Urgencias.
- Microbiología.
- Dosis.
- Weblab.
- Omnium.
- TQM.
- e-DAI

A continuación se describen las principales características de estos módulos.

PSM

Es la unidad de gestión de las muestras, del control de la calidad y de la validación técnica. Permite la entrada continua de las muestras y pueden programarse diversos parámetros como el tipo de muestra, el destino, la realización de alícuotas, las repeticiones y el archivo de las muestras.

El módulo gestiona también el control de la calidad empleando el sistema de multirreglas de Westgard (v. el capítulo 9). Los valores de los controles se obtienen por medio de las conexiones con los diferentes analizadores. El sistema muestra en diversas pantallas informativas el estado general del control de la calidad y los detalles de cada uno de los valores, las reglas incumplidas y los gráficos de evolución.

El PSM tiene también un sistema de validación técnica de los resultados con criterios de visualización que personaliza cada usuario.

MÓDULO GENERAL

Este módulo gestiona los laboratorios de bioquímica y hematología. Las principales características de este módulo son la gestión de procesos y la capacidad de parametrización. Con relación a los procesos, estos comprenden:

- Entrada de peticiones.
- Fase analítica.
- Resultados.
- Validación diagnóstica.
- Consultas.
- Impresión.
- Estadísticas.
- Trazabilidad.

Entrada de peticiones

La entrada de peticiones puede hacerse de diferentes formas, bien mediante la incorporación de los datos desde los peticionarios de atención especializada y atención primaria o bien manualmente en el laboratorio o por medio de lectores automáticos de tarjetas de marcas ópticas o escáneres de digitalización.

Fase analítica

La fase analítica se gestiona mediante el módulo PSM con sus funcionalidades asociadas a la gestión de los flujos de muestras, las conexiones en línea y la validación técnica.

Resultados

Una vez realizadas las determinaciones deben asentarse los resultados de las pruebas, cuya introducción puede ser automática o manual. La comunicación de resultados desde los aparatos conectados con el sistema informático de laboratorio se hace de manera automática. La introducción a través de la pantalla puede hacerse por parámetro, lo que permite introducir los datos por columnas, y por paciente, lo que permite introducirlos por filas.

Se dispone de diversos formatos para la presentación de los resultados; entre otros, numéricos, alfanuméricos, textos codificados, textos libres y diversas combinaciones de ellos.

Validación diagnóstica

Una vez asentados los resultados, hay que proceder a su validación. Cuando la petición tiene todos los resultados y estos están dentro de los márgenes de validación programados, la petición queda validada automáticamente. Cuando algún resultado está fuera de los márgenes de validación, la petición apa-

rece en pantalla para solicitar la validación manual del personal facultativo. Para ello hay múltiples accesos a diversos niveles y filtros personalizables para el acceso a las peticiones a validar. Asimismo, la presentación de los resultados puede programarse de forma que aparezcan alarmas, valores de referencia, últimos resultados históricos, etc.

Consultas

Puede accederse a la información de los pacientes mediante búsquedas simples por nombre, raíz, número de historia, etc.

Impresión

Después de validar los resultados, se pasa a editar los informes. Puede configurarse y seleccionarse la impresión. Asimismo, pueden integrarse los informes en los diversos sistemas de información de la red asistencial distribuyendo la información en diferentes formatos y localizaciones. Puede realizarse la impresión automática sin necesidad de órdenes, la impresión remota en impresoras de red hospitalaria, combinar la impresión automática y remota y la preparación del informe en formato fichero que puede enviarse por correo electrónico.

Estadísticas

El programa dispone de utilidades estadísticas de actividad del laboratorio, lo que permite llevar una contabilidad analítica y presupuestaria. Con la primera puede obtenerse no sólo el coste real por parámetro, sino también la distribución del gasto sobre las unidades de demanda. Por otro lado, la contabilidad presupuestaria puede controlar la repercusión diaria del gasto real realizado en el presupuesto asignado, lo que permitirá modular el primero para alcanzar los objetivos planteados en el segundo.

Asimismo, el SIL tiene que realizar una estadística asistencial y epidemiológica que haga posible evaluar día a día y parámetro a parámetro la demanda analítica y la distribución de los valores obtenidos. Finalmente, debe efectuar un control de los peticionarios que permita conocer exactamente la distribución por unidades de demanda del trabajo realizado, el coste de producción de este y las determinaciones normales y patológicas y, en consecuencia, actuar conteniendo o estimulando y, en todo caso, demostrando un completo control y conocimiento de la finalidad del trabajo.

Trazabilidad

El sistema permite la trazabilidad de las acciones realizadas en los diferentes procesos del laboratorio clínico. Puede obtenerse la hora de registro de la petición y la persona que la ha registrado, la hora de validación de cada parámetro y la persona que lo ha validado, la hora de edición y reedición de informes, la impresora de edición, la hora de recepción de la muestra, la hora de entrada y de salida en analizadores y posición y la hora de archivo y posición.

MÓDULO DE URGENCIAS

El núcleo fundamental de este módulo es una pantalla que presenta en tiempo real las peticiones activas. Tiene automatizados procesos que en los programas de los laboratorios generales suelen hacerse de forma manual, como la impresión automática y remota, el cierre automático al final del día, la validación automática y un tratamiento específico de los gases.

MÓDULO DE MICROBIOLOGÍA

El laboratorio de microbiología presenta unas características especiales, por lo que los SIL suelen tener un módulo específico. Mediante este programa específico son posibles las acciones siguientes:

- Identificar el soporte estudiado.
- Siembras que deben realizarse.
- Aislados identificados.
- Pruebas de identificación.
- Resiembras.
- Antibigramas.
- Introducción de resultados a todos los niveles.
- Visualización completa de la trazabilidad de las acciones realizadas.

El sistema se ha diseñado para que aparezca en una pantalla la mayor información posible. Tras escanear el código de barras del paciente aparecen muestras, localización, pruebas, medios, aislados, pruebas identificativas, información histórica del paciente, antibigramas solicitados y resistencias de antibióticos. La información aparece en cuatro zonas diferenciadas: demográfica, áreas de trabajo, información histórica y antibigramas.

MÓDULO DE DOSIS

Permite la gestión de los pacientes en tratamiento con anticoagulantes orales. Dispone de utilidades completas en:

- Gestión de peticiones.
- Fichas de pacientes.
- Validación y filtros de acceso.
- Asignación y distribución de dosis.
- Citaciones.
- Informes con diseños gráficos.
- Envío automatizado vía fax.

MÓDULO WEBLAB

Módulo que permite el acceso remoto mediante la Web a la base de datos Omega con funcionalidades de consulta e impresión de informes. Hay filtros de acceso para los usuarios.

MÓDULO OMNIUM

Módulo para la explotación estadística de la información.

MÓDULO TQM

Módulo que permite la implantación de un modelo de calidad global con inclusión de gestión documental, incidencias, auditorías e indicadores de calidad.

MÓDULO E-DAI

Se trata de un integrador de área de varios sistemas Omega. Permite conectar varios laboratorios y varios centros para el intercambio de la información.

SISTEMAS EXPERTOS

Las investigaciones sobre el diagnóstico médico asistido por ordenador comenzaron en los años sesenta con gran esperanza de poder reducir los problemas clínicos a formalismos matemáticos. La mayor parte del trabajo inicial se centró en aplicar cartas de flujo, álgebra de Boole, emparejamiento de patrones y análisis de decisión del problema diagnóstico. Sin embargo, estas técnicas tuvieron poco éxito, por lo que en la década de 1970 el interés derivó hacia la inteligencia artificial, y especialmente las aplicaciones del ordenador que implican el procesamiento de información simbólica. Los programas informáticos que intentan ayudar a tomar una decisión reciben el nombre de sistemas expertos.

Estos sistemas son programas de ordenador que tratan de emular el razonamiento de un experto en un determinado campo del conocimiento. No dependen de suposiciones estadísticas o de datos sobre grandes poblaciones y pueden modificar su base de conocimientos para mejorar su funcionamiento. En lugar de conocer las reglas de un ámbito determinado del saber e ir probándolas todas, los sistemas expertos caminan hacia la solución del problema siguiendo una andadura lógica que imita la forma de actuar del ser humano.

Dichos sistemas constan de una base de conocimientos que contiene información de tipo general y un sistema inferente (deductivo) que recibe los datos del usuario y aplica la base de conocimientos para proporcionar las respuestas. La base de conocimientos está formada por hechos, como los que pueden verse en los libros de texto, y opiniones y conocimientos heurísticos, derivados de la experiencia adquirida durante años de trabajo en un campo concreto del saber. Como para el experto es difícil hacer explícita esta información, le ayuda a ello un ingeniero del conocimiento que sabe representarlo en un ordenador y construir un programa que razona de acuerdo con la base de conocimientos proporcionada por aquel. Ahora bien, no hay que confundir una base de conocimientos con una base de datos. La primera contiene información de tipo general, mientras que la segunda se compone de datos concretos.

EXPERTOS BASADOS EN REGLAS

Estos sistemas se fundamentan en que el conocimiento del experto consiste en un gran número de reglas independientes, específicas de cada situación. Los

ordenadores pueden imitar el razonamiento del experto hilando estas reglas en cadenas de deducción. En estos sistemas la base de conocimientos está formada por un conjunto de sentencias condicionales o reglas.

EXPERTOS CON REDES SEMÁNTICAS

Estos sistemas comparan los datos introducidos inicialmente con patrones almacenados en su base de conocimientos y establecen una hipótesis. Con ella, interrogan sobre el caso, y con la información obtenida pueden rechazarla y establecer otra, o sugerir un diagnóstico. Los patrones, denominados nodos o marcos, están interconectados por ligazones que representan relaciones y dependencias. Estas redes de nodos y marcos son excelentes para representar estructuras jerárquicas de conocimientos.

DÓNDE COLOCAR LOS SISTEMAS EXPERTOS

La mayoría de los sistemas expertos actuales funcionan aislados, de forma que los usuarios han de introducir los datos. Sin embargo, en un laboratorio clínico tiene poco sentido un sistema experto si no se integra, de alguna manera, en el sistema informático del laboratorio. Es absurdo introducir los datos de forma manual en el sistema experto cuando se encuentran almacenados en el sistema informático del laboratorio. Sin embargo, no es fácil integrar aquel sistema en este. Se han propuesto unos estándares internacionales para transferir los datos que se espera que se introduzcan en los sistemas expertos que se comercialicen en el futuro.

SISTEMAS DE VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS

Una de las tareas que consume más tiempo en los laboratorios de bioquímica clínica es validar los resultados y firmar los informes correspondientes. Se entiende por validación el proceso mediante el que el responsable de la sección o servicio revisa los resultados y los traslada al fichero de pacientes para luego editar el informe. Se han sugerido sistemas de validación automática y de firma electrónica. Uno de ellos, VALAB, se basa en los cambios de las determinaciones repetidas, comparar componentes relacionados fisiológicamente, y la ubicación hospitalaria, la edad y el sexo del enfermo.

Técnicas espectroscópicas. Métodos de cuantificación

INTRODUCCIÓN

Las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético se emplean para el análisis cualitativo y cuantitativo de un gran número de sustancias en los medios biológicos. Las técnicas espectroscópicas utilizan la medida de los efectos que produce la interacción de las radiaciones electromagnéticas con la materia. Así, puede medirse la radiación absorbida, emitida, transmitida, dispersada o reflejada de acuerdo con los diferentes métodos. En este capítulo se describen las principales técnicas espectroscópicas y su aplicación en los laboratorios clínicos para la determinación cuantitativa de muchas sustancias en los medios biológicos, como sustratos, enzimas y metales.

RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA

La radiación electromagnética está compuesta de campos eléctricos y magnéticos oscilantes que se propagan por el espacio linealmente y con una velocidad constante. Asimismo, las radiaciones electromagnéticas son un conjunto de corpúsculos, los *fotones*, que llevan asociada una onda. La *longitud de onda* es la distancia entre los picos de onda y se expresa en nanómetros (nm; 1 nm = 10^{-9} m). La frecuencia de la onda es proporcional a la energía de la partícula. Se llama espectro electromagnético al conjunto de las radiaciones electromagnéticas, que se haya dividido en varias regiones de acuerdo con la longitud de onda.

La relación entre la energía de la radiación y su frecuencia viene dada por la ecuación:

$$E = h\nu$$

donde E = energía; h = constante de Planck, y ν = frecuencia.

Por su parte, la frecuencia de la radiación está relacionada con la longitud de onda (λ), de acuerdo con la ecuación:

$$\nu = c/\lambda$$

y si se sustituye este valor en la ecuación de la energía se obtiene:

$$E = h \times c/\lambda$$

lo que demuestra que la energía de una radiación electromagnética es inversamente proporcional a la longitud de onda, de forma que las radiaciones electromagnéticas de menor longitud de onda son las de mayor contenido energético. En la figura 11-1 se presenta la relación entre la longitud de onda, la energía y las diferentes regiones del espectro electromagnético.

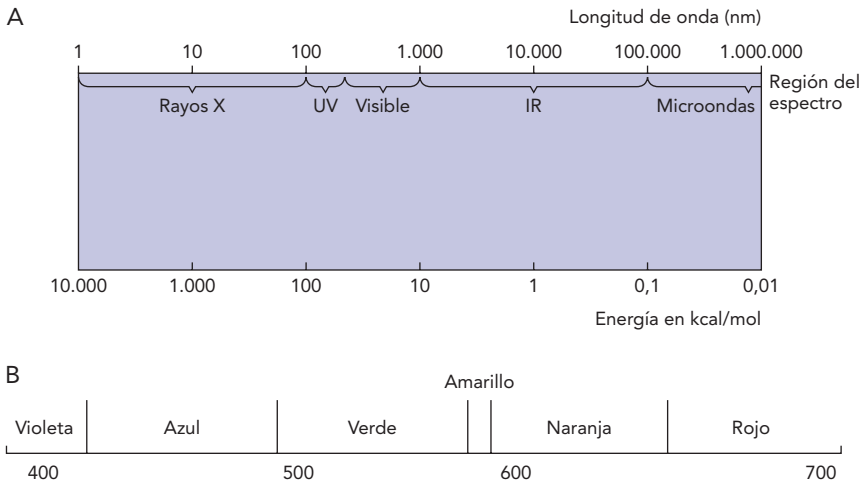


FIGURA 11-1 A. Relación entre la longitud de onda, la energía y la región del espectro electromagnético. B. Zonas de la región visible del espectro.

TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

Las principales técnicas espectroscópicas que se utilizan en los laboratorios clínicos son la espectroscopia de absorción molecular para la determinación de sustratos y enzimas, la espectroscopia atómica para la medida de la concentración de metales, la espectroscopia de fluorescencia y la espectroscopia de luminiscencia para la medida de diversos compuestos químicos y actividades enzimáticas, y la espectroscopia de dispersión para determinar fundamentalmente proteínas específicas. En los apartados siguientes se detallan cada una de estas técnicas.

ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN MOLECULAR

Las regiones del espectro electromagnético más utilizadas en el trabajo analítico de rutina en los laboratorios clínicos son la ultravioleta y la visible. El término *luz* se aplica a la región radiante con longitudes de onda visibles para el ojo humano y las longitudes de onda que la rodean. La absorción de luz por las moléculas biológicas depende de la estructura electrónica de los átomos de carbono que las componen.

LEY DE LAMBERT-BEER

La ley de Lambert-Beer establece que para disoluciones diluidas la cantidad de luz absorbida es directamente proporcional a la concentración de la sustancia. Puede escribirse:

$$A = acl$$

donde A es la absorbancia; a es la constante de proporcionalidad denominada *absortividad*; l el paso de la luz, y c la concentración del compuesto que absorbe.

Cuando la concentración se expresa en mol/l, a se escribe con el símbolo ϵ , sus unidades son $l/mol \times cm$ y se llama *coeficiente de absorción molar*. La ley de Lambert-Beer queda entonces así:

$$A = \epsilon cl$$

ESPECTROFOTÓMETROS

Los espectrofotómetros son los instrumentos que se utilizan para medir la absorción de luz por las disoluciones. Los principales componentes de un espectrofotómetro de un solo haz son (fig. 11-2) la fuente de luz, el sistema de selección de la longitud de onda, la cubeta para el espécimen, el detector de luz y el dispositivo de lectura. Los espectrofotómetros de doble haz (fig. 11-3) dividen el rayo luminoso en dos haces, uno que pasa por la cubeta de referencia (blanco) y otro que pasa por la del espécimen. La señal que incide sobre el detector es la diferencia (espécimen-referencia). El rayo luminoso se divide por medio de un espejo giratorio que hace incidir el mismo haz, alternativamente, por la cubeta con la referencia y por la cubeta con el espécimen. A continuación se describen las principales características de los elementos de los espectrofotómetros.

Fuente de luz

Las lámparas incandescentes y los láseres son los tipos de fuentes de luz que se emplean en los espectrofotómetros. La fuente de luz que más se ha utilizado para las medidas en la región visible del espectro (360-950 nm) ha sido la lámpara de wolframio. En la actualidad, se usan lámparas de halógenos que proporcionan energía radiante más intensa y son más duraderas. Para las medidas en la región ultravioleta (220-360 nm), se utilizan las lámparas de descarga de hidrógeno o de deuterio. Algunos de los espectrofotómetros más modernos emplean láseres.

Sistema de selección de la longitud de onda

La luz de la radiación emitida por las lámparas de los espectrofotómetros cubre el intervalo completo de longitudes de onda que es capaz de producir la

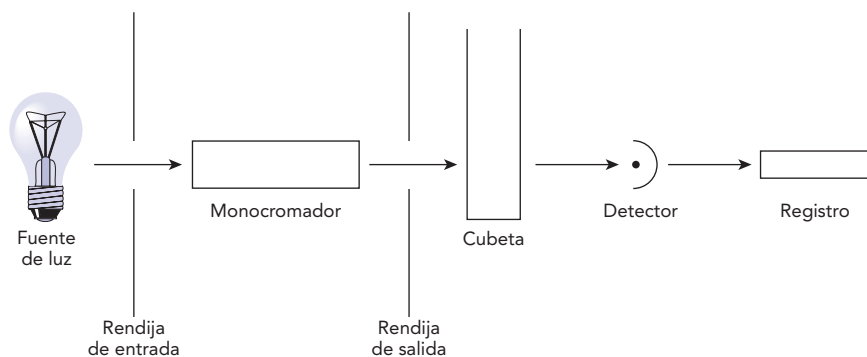


FIGURA 11-2 Principales componentes de un espectrofotómetro.

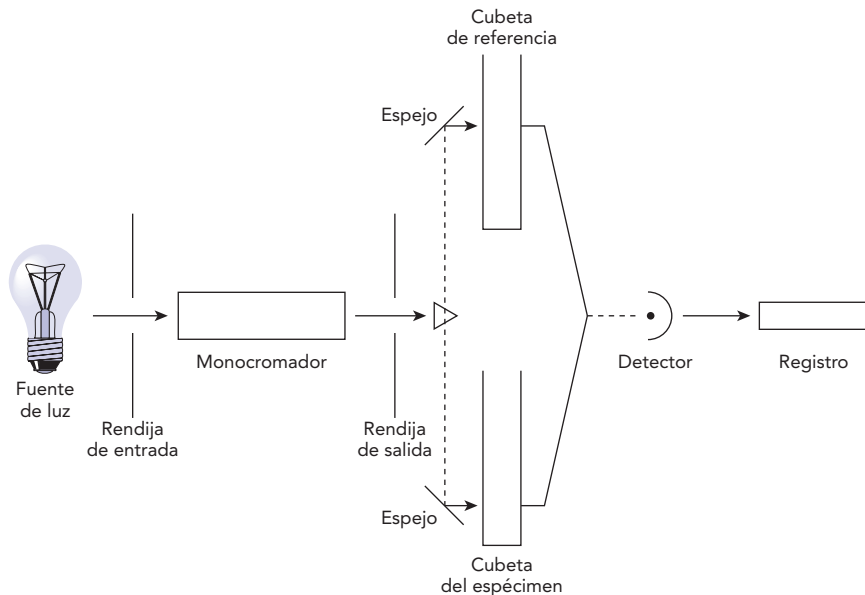


FIGURA 11-3 Esquema de un espectrofotómetro de doble haz.

lámpara. Sin embargo, la ley de Lambert-Beer se cumple para la luz monocromática. Inicialmente para aislar la longitud de onda adecuada se emplearon filtros. En la actualidad se utilizan monomadores; los principales son los prismas y las rejillas de difracción.

En los prismas y las rejillas, la radiación procedente de la lámpara se dispersa en un espectro, a partir del cual se aísla la longitud de onda deseada por medio de una rendija. Los prismas separan por refracción la radiación emitida por las fuentes de luz en un espectro continuo. La refracción tiene lugar debido a que la radiación de diferentes longitudes de onda viaja por diferentes rutas en el medio más denso del material del prisma. En cuanto a las rejillas de difracción, consisten en una placa metálica con un gran número de surcos equidistantes; las mejores rejillas de difracción contienen entre 1.000 y 2.000 surcos por milímetro. Cuando se ilumina la rejilla, cada surco da lugar a un pequeño espectro. Se forman, así, frentes de ondas que refuerzan las longitudes de onda en fase y eliminan las que no están en fase. El resultado neto es un espectro continuo lineal uniforme. Como se ha señalado antes, tanto en el caso de los prismas como en el de las rejillas de difracción, la selección de la longitud de onda deseada se hace con un colimador o rendija ajustable.

Los sistemas de selección de longitud de onda se catalogan por su amplitud de banda o paso de banda, que es la anchura en nanómetros de la curva de transmitancia en el punto medio del pico (fig. 11-4). Los prismas permiten aislar una radiación de amplitud de banda de 0,5 a 1,5 nm. Las rejillas de difracción permiten aislar una energía radiante cuya amplitud de banda está, en el caso de las peores, entre 20 y 35 nm, y es en el de las mejores de 0,5 nm o menos. Generalmente, las buenas rejillas seleccionan mejor que los prismas la longitud de onda.

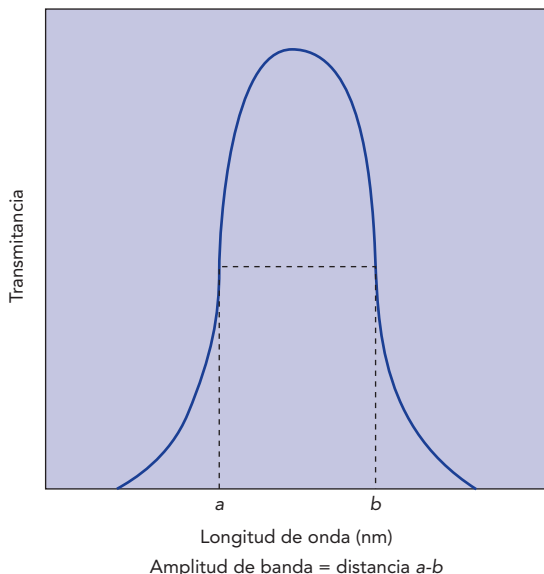


FIGURA 11-4
Amplitud de banda.

Longitud de onda (nm)
Amplitud de banda = distancia a-b

Cubeta

La cubeta es el recipiente donde se coloca la disolución para medir la absorbancia. Puede ser cuadrada, redonda o rectangular; se construye de vidrio, plástico o cuarzo, y suele tener un paso de 1 cm. Las cubetas de vidrio son útiles para las medidas entre 340 y 1.000 nm, y las cubetas de plástico, para las que están entre 310 y 1.000 nm. Para lecturas por debajo de 310 nm se precisan cubetas de cuarzo, ya que, por debajo de esa longitud de onda, el vidrio y el plástico absorben.

Detector de luz

El detector de luz de los espectrofotómetros convierte la que le llega en energía eléctrica. Los detectores más utilizados para medir la intensidad de la luz en las regiones ultravioleta y visible son los tubos fotomultiplicadores y los dispositivos de estado sólido.

Los *tubos fotomultiplicadores* son tubos electrónicos que, además de detectar la señal luminosa, la amplifican. Estos sistemas se construyen usando como cátodos metales sensibles a la luz, capaces de emitir electrones en proporción directa a la energía luminosa que les llegue. Los electrones producidos son dirigidos a una segunda superficie del mismo metal que produce más electrones, estos a otra y así sucesivamente. Cada electrón que llega al cátodo produce cascadas en el tubo fotomultiplicador. De esto resulta una corriente de electrones que puede ser hasta un millón de veces superior a la inicial. Los tubos fotomultiplicadores tienen de 10 a 15 superficies de amplificación o dinodos.

Los principales *dispositivos de estado sólido* son los fotodiodos y los detectores de carga acoplada. Los fotodiodos están fabricados con materiales semicon-

ductores fotosensibles como silicio, galio o arsénico. Estos materiales absorben luz con un intervalo de longitudes de onda característico. Se denomina matriz de fotodiodos (photodiode array) a un conjunto bidimensional de diodos, donde cada uno de ellos responde a una longitud de onda específica. Los *detectores de carga acoplada* están contruidos con silicio y transforman de manera espontánea la luz recibida en una corriente eléctrica.

Dispositivo de lectura

La energía eléctrica procedente del detector se presenta mediante diversos dispositivos de lectura. En la actualidad, la mayoría de los espectrofotómetros son controlados por ordenador, con programas que permiten procesar las señales, realizar curvas de calibrado, almacenarlas y transformar los datos.

INTERFERENCIAS EN LAS DETERMINACIONES ESPECTROSCÓPICAS

Las interferencias en las medidas espectroscópicas son de dos tipos: estáticas y cinéticas. Las *interferencias estáticas* las producen sustancias presentes en el espécimen que no experimentan variación durante la reacción analítica. Los ejemplos más típicos de estas interferencias en los laboratorios clínicos son la ictericia, la lipemia y la hemólisis. Su corrección se realiza usando un blanco con el espécimen al que no se añade ninguna de las sustancias necesarias para la reacción. Otra forma de corregirlas utiliza la lectura a varias longitudes de onda.

Las *interferencias cinéticas* se deben a sustancias presentes en el espécimen que reaccionan con algún componente de la mezcla de reacción. La importancia relativa de la contribución de esas sustancias depende del tiempo de reacción y de la concentración de las mismas. Cuando la sustancia reacciona más rápido que la que se analiza, su presencia puede corregirse con un análisis cinético; y si lo que interfiere reacciona a la misma velocidad que lo que se analiza, la corrección se hace realizando la determinación con la sustancia que hay que analizar y sin ella, y es una sustracción simple.

LECTURAS A VARIAS LONGITUDES DE ONDA

Como se ha señalado en el apartado anterior, las interferencias estáticas que se producen en algunas determinaciones pueden eliminarse leyendo a dos o más longitudes de onda. Cuando se emplean dos, se escoge la que más absorba la sustancia que se mide y otra que corresponda a un mínimo de absorbancia.

MEDIDA DE SUSTRATOS POR MÉTODOS DE ABSORCIÓN MOLECULAR

Como se ha señalado antes, la absorbancia de una disolución está relacionada con la concentración de las sustancias de acuerdo con la ley de Lambert-Beer:

$$A = acl$$

Para determinar la concentración de un compuesto en disolución se mide su absorbancia; si el compuesto absorbe, se transforma en otro que absorba por medio de su reacción con los reactivos adecuados o se hace que forme parte de una reacción en la que otra sustancia experimente un cambio de sus propiedades de absorción de luz. A veces es necesario ligar varias reacciones para obtener un compuesto que absorba. La reacción en la que se transforma la sustancia que quiere medirse se denomina *reacción auxiliar*, mientras que la reacción utilizada para la medida se denomina *reacción indicadora*. Ambas reacciones pueden ser simples reacciones químicas o reacciones catalizadas por enzimas.

La medida de la concentración de sustancias en disolución por técnicas espectroscópicas de absorción molecular se realiza con dos tipos fundamentales de métodos: los de punto final y los de medida de la velocidad de reacción.

MÉTODOS DE PUNTO FINAL

En los métodos de punto final, se incubaba la disolución reaccionante con el espécimen y con el patrón de concentración conocida, el tiempo necesario para que se complete la reacción o se alcance el equilibrio. El nombre de punto final no debe conducir a equívoco; es más correcto el de método de equilibrio, ya que muchas veces la reacción se produce de forma que puede hacerse la medida antes de alcanzar el punto final.

Cuando se usan enzimas como reactivos para medir sustancias en los métodos de punto final, el sistema debe contener todos los componentes necesarios en exceso. La cantidad de enzimas que se añada debe ser suficiente para que la reacción se complete en un tiempo corto. Si el equilibrio de la reacción no fuera favorable, habría que utilizar unas condiciones que lo invirtiese o añadir a la mezcla de reacción otros reactivos o sistemas enzimáticos que fueren la reacción en la dirección deseada.

La concentración del espécimen en estos métodos viene dada por el producto del cociente entre las absorbancias del espécimen y del patrón por la concentración de este de acuerdo con la fórmula:

$$c_e = K (A_e - A_b)$$

donde $K = c_{\text{pat}}/A_{\text{pat}} - A_b$, o sea el factor de calibración; c_e = concentración del espécimen; c_{pat} = concentración del patrón; A_b = absorbancia del blanco de reactivos; A_{pat} = absorbancia del patrón; A_e = absorbancia del espécimen.

En los métodos de punto final, en lugar de utilizar un único estándar de concentración conocida puede obtenerse una curva patrón con varios estándares y luego extrapolar en esta los valores de absorbancia de las muestras problemas. Hay que tener en cuenta que nunca debe extrapolarse más allá de la región que se haya calibrado. Cuando el valor de la absorbancia supere la del mayor calibrador, se diluirá el espécimen y se medirá de nuevo.

Es importante señalar que cuando se representan las curvas de calibración, a pesar de que la ley de Lambert-Beer implique que la absorbancia de la concentración cero es cero, no debe forzarse que la línea atraviese el cero. Hay que trazar la línea que mejor se ajuste a los puntos, bien visualmente o con métodos de regresión.

MÉTODOS CINÉTICOS

En los métodos cinéticos o de medida de la velocidad de reacción, se determina la variación de la absorbancia con el tiempo, que se relaciona con la concentración. Cuando se empleen métodos que utilicen enzimas hay que tener en cuenta que se requieren enzimas con constante de Michaelis (K_m) elevadas. En los casos en los que la K_m sea demasiado baja, su valor aparente puede aumentarse añadiendo un inhibidor competitivo.

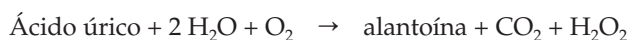
Las reacciones enzimáticas son muy sensibles a las condiciones de la reacción, como el pH y la temperatura, por lo que los métodos cinéticos para determinar la concentración de sustancias deben mantener las condiciones constantes. Esto se consigue con facilidad en los analizadores automáticos, que son sistemas muy adecuados para los análisis cinéticos. Los métodos cinéticos son mucho más rápidos y menos sensibles a las interferencias externas, como la turbidez y el color del espécimen, que los métodos de punto final.

PRINCIPALES MÉTODOS

A continuación se relacionan los métodos principales para medir sustratos que se utilizan en los laboratorios de bioquímica clínica. Se indican las reacciones, los componentes principales de los reactivos —sin señalar su concentración—, el tipo de técnica (de punto final o cinética), la longitud de onda de medida, los valores de referencia y las enfermedades principales en las que estos están alterados.

Ácido úrico: método de la uricasa

URICASA



PEROXIDASA



Reactivos: uricasa, peroxidasa y cromógeno.

Técnica: punto final.

Longitud de onda de medida: 570 nm.

Valores de referencia en suero: varones, 3,5-7,2 mg/dl [208-428 $\mu\text{mol/l}$]; mujeres, 2,6-6 mg/dl [155-357 $\mu\text{mol/l}$].

Alteraciones: se producen aumentos del ácido úrico en suero en la gota, la insuficiencia renal, la leucemia, el mieloma y otras neoplasias diseminadas. También en asociación con la hiperlipemia, la obesidad, la hipertensión, la diabetes, el consumo de alcohol y las enfermedades hepáticas. La alimentación con abundantes purinas aumenta la concentración de ácido úrico en suero.

Bilirrubina: método de diazotación

La bilirrubina se copula con una sal de diazonio para dar azobilirrubina.

Reactivo: sal de diazonio.

Técnica: punto final.

Longitud de onda de medida: 546 nm.

Valores de referencia en suero: 0,3-1,2 mg/dl (5-21 $\mu\text{mol/l}$).

Alteraciones: la bilirrubina aumenta en suero en el daño hepatocelular, las obstrucciones hepáticas, las enfermedades hemolíticas, la ictericia fisiológica neonatal y en otras enfermedades hereditarias hiperbilirrubinémicas.

Calcio

Método de la ortocresolftaleína complexona

En un medio alcalino, el calcio forma un complejo violeta junto con la ortocresolftaleína complexona.

Reactivo: ortocresolftaleína complexona.

Técnica: punto final.

Longitud de onda de medida: 575 nm.

Valores de referencia: 8,6-10 mg/dl (2,15-2,50 mmol/l).

Alteraciones: el calcio se eleva en suero en las enfermedades cancerosas con implicación ósea, el hiperparatiroidismo, la enfermedad de Paget, la sarcoidosis y el síndrome de leche y alcalinos. En cambio, la concentración de calcio en suero disminuye, entre otros procesos, en el hipoparatiroidismo, la insuficiencia renal crónica, la pancreatitis aguda y la hiperfosfatemia.

Método del azul de metiltimol

En un medio alcalino, el calcio forma un complejo azul con el azul de metiltimol.

Reactivo: azul de metiltimol.

Técnica: punto final.

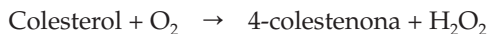
Longitud de onda de medida: 620 nm.

Colesterol: método enzimático

COLESTEROL ESTERASA



COLESTEROL OXIDASA



PEROXIDASA



Reactivos: colesterol esterasa, colesterol oxidasa, peroxidasa y cromógeno.

Técnica: punto final.

Longitud de onda de medida: 546 nm.

Valores de referencia: <200 mg/dl (<5,18 mmol/l).

Alteraciones: el colesterol aumenta en suero en las hipercolesterolemias hereditarias, las hiperlipemias secundarias a las enfermedades hepáticas, las glomerulonefritis, el síndrome nefrótico, el hipotiroidismo, la gota, la isquemia coronaria, el embarazo, la diabetes y el alcoholismo.

Creatinina

Método de Jaffé sin desproteinizar

En un medio alcalino, la creatinina forma con el picrato un complejo coloreado.

Reactivos: picrato sódico e hidróxido sódico.

Técnica: cinética.

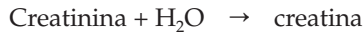
Longitud de onda de medida: 505 nm.

Valores de referencia: varones, 0,9-1,3 mg/dl (80-115 $\mu\text{mol/l}$); mujeres, 0,6-1,1 mg/dl (53-97 $\mu\text{mol/l}$).

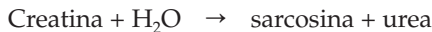
Alteraciones: la creatinina se eleva en suero en el daño de la función renal, tanto si es agudo como crónico, el hipertiroidismo y tras las comidas con carne abundante.

Método enzimático

CREATININASA



CREATINASA



SARCOSINA OXIDASA



PEROXIDASA



Técnica: punto final.

Reactivos: creatininas, creatinasa, sarcosina oxidasa, peroxidasa y cromógeno.

Longitud de onda de medida: 505 nm.

Fosfato inorgánico: método del ácido molibdico

En una disolución ácida, el fosfato inorgánico forma un complejo fosfomolibdico.

Reactivo: molibdato amónico.

Técnica: punto final.

Longitud de onda de medida: 340 nm.

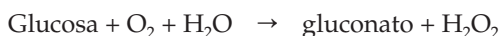
Valores de referencia: 2,7-4,5 mg/dl (0,87-1,45 mmol/l).

Alteraciones: el fosfato sérico aumenta en las metástasis osteolíticas de los tumores óseos, la leucemia mielocítica, la sarcoidosis, el síndrome de leche y alcalinos, la insuficiencia renal, la intoxicación con vitamina D y el hipoparatiroidismo. En cambio, la concentración de fosfato en suero disminuye en la osteomalacia, la acidosis tubular renal, el alcoholismo agudo, la deficiencia de vitamina D, la malnutrición grave, los vómitos y la diarrea grave.

Glucosa

Método de la glucosa oxidasa

GLUCOSA OXIDASA



PEROXIDASA



Reactivos: glucosa oxidasa, peroxidasa y cromógeno.

Técnica: cinética.

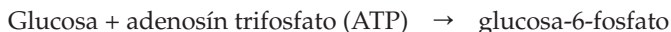
Longitud de onda de medida: 546 nm.

Valores de referencia: 74-106 mg/dl (4,1-5,9 mmol/l).

Alteraciones: la glucosa en suero aumenta en la diabetes mellitus y disminuye en los tumores pancreáticos.

Método de la hexocinasa

HEXOCINASA



GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA



donde NADP^+ = fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina, estado oxidado; NADPH = fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina, estado reducido.

Reactivos: hexocinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y NADP^+ .

Técnica: punto final.

Longitud de onda de medida: 340 nm.

Magnesio: método de la calmagita

El magnesio reacciona con la calmagita para formar un complejo rosa.

Reactivo: calmagita.

Técnica: punto final.

Longitud de onda de medida: 532 nm.

Valores de referencia: 1,26-2,1 mEq/l (0,63-1,05 mmol/l).

Alteraciones: el magnesio se eleva en suero en la deshidratación, la insuficiencia renal, la enfermedad de Addison y el hipotiroidismo. La concentración de magnesio en suero disminuye en la pancreatitis aguda, el hipoparatiroidismo, el alcoholismo crónico y la ingestión o absorción inadecuada.

Proteínas totales: método del biuret

En disolución alcalina, las proteínas forman un complejo coloreado con los iones de cobre.

Reactivo: sulfato de cobre.

Técnica: punto final.

Longitud de onda de medida: 546 nm.

Valores de referencia: 6,4-8,3 g/dl (64-83 g/l).

Alteraciones: las proteínas totales en suero aumentan en las hiperinmunoglobulinemias, las gammopatías policlonales o monoclonales y la deshidratación grave. Las proteínas totales del suero disminuyen en las gastroenteropatías con pérdida de proteínas, el síndrome nefrótico, las quemaduras graves, los síndromes de malabsorción y la malnutrición.

Triglicéridos: método enzimático

LIPASA



GLICEROL CINASA



GLICEROL-FOSFATO OXIDASA



PEROXIDASA



Reactivos: lipasa, glicerol cinasa, glicerol-fosfato (glicerol-P) oxidasa, peroxidasa y cromógeno.

Técnica: cinética.

Longitud de onda de medida: 546 nm.

Valores de referencia: <200 mg/dl (<2,30 mmol/l).

Alteraciones: los triglicéridos se elevan en suero en las hipertrigliceridemias hereditarias, la obesidad, la tolerancia a la glucosa dañada, el alcoholismo,

las pancreatitis, el síndrome nefrótico, la diabetes y la gota. En cambio, la concentración de triglicéridos en suero disminuye en el hipertiroidismo, la malnutrición y el síndrome de malabsorción.

Urea: método enzimático

UREASA



GLUTAMATO DESHIDROGENASA



donde NADH = dinucleótido de adenina y nicotinamida, estado reducido; NAD⁺ = dinucleótido de adenina y nicotinamida, estado oxidado.

Reactivos: ureasa, glutamato deshidrogenasa y α -cetoglutarato.

Técnica: cinética.

Longitud de onda de medida: 340 nm.

Valores de referencia: 10-45 mg/dl (1,66-7,47 mmol/l).

Alteraciones: la urea en suero se eleva en los procesos en que está dañada la función renal. Por el contrario, la concentración sérica de urea disminuye en la alimentación con pocas proteínas y en la alteración hepática grave.

MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS POR MÉTODOS DE ABSORCIÓN MOLECULAR

Las enzimas pueden determinarse en los medios biológicos mediante métodos espectroscópicos de absorción molecular. La cantidad de una enzima en un medio biológico puede determinarse en términos de masa o en términos de actividad. En general, la cantidad de las enzimas en los líquidos biológicos es muy pequeña. Con fines comparativos, se aprovecha su propiedad esencial de catalizar reacciones químicas para medir la actividad y relacionarla con la cantidad.

La medida de la cantidad de sustrato que desaparece o del producto que se forma durante un intervalo de tiempo proporciona una medición de la actividad de la enzima que cataliza la transformación. De este modo, la actividad catalítica puede utilizarse con fines comparativos como una medida de la concentración de la enzima. La medición de la actividad de una enzima siempre implica medidas de la velocidad de reacción.

Las reacciones enzimáticas son muy sensibles a las condiciones de la reacción, por lo que las medidas de las actividades enzimáticas deben realizarse en condiciones bien definidas, para que los resultados puedan ser comparativos. Estas condiciones han de optimizarse en lo que se refiere al tipo de amortiguador y de concentración, el pH, los cofactores, los activadores, la(s) concentración(es) de sustrato(s) y la fracción volumétrica del espécimen en la mezcla de análisis.

La medida de la actividad enzimática puede realizarse mediante dos tipos de métodos fundamentales: los de tiempo fijo y los de velocidad de reacción.

MÉTODOS DE TIEMPO FIJO

En estos métodos se incubaba la muestra que contiene la enzima con el sustrato durante un tiempo determinado y se mide la variación de la absorbancia. La cantidad de sustrato desaparecido o de producto formado es proporcional a la actividad enzimática.

MÉTODOS DE SEGUIMIENTO CONTINUOS O CINÉTICOS

Se mide la variación de la absorbancia continuamente. Estos métodos son mejores que los de tiempo fijo, ya que puede comprobarse mejor la linealidad de la reacción. La causa más habitual de desviación de la linealidad se produce cuando la cantidad de enzima es tan elevada que el sustrato se agota pronto tras comenzar la reacción. Se produce un descenso brusco de la velocidad de reacción.

ACOPLAMIENTO DE REACCIONES

Cuando ninguno de los sustratos o productos dé lugar a un cambio de absorbancia que pueda medirse, es posible ligar la reacción catalizada por la enzima a otra u otras que den lugar a un producto que absorba. Como en el caso de los sustratos, esta reacción recibe el nombre de auxiliar.

UNIDADES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad de las enzimas se expresa en unidades presentes en un volumen determinado. En enzimología clínica, la actividad enzimática suele darse en términos de una unidad de volumen adecuada como dl o l. Inicialmente, la Unión Internacional de Bioquímica (UIB) propuso la Unidad Internacional (U) que es la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto ($\mu\text{mol}/\text{min}$). La concentración catalítica en los líquidos biológicos se expresa habitualmente en U/l. Posteriormente, la UIB ha recomendado que la actividad enzimática se exprese en moles por segundo (mol/s), que es unidad derivada del SI. Esta unidad ha recibido el nombre de *katal* y la concentración enzimática se expresa en términos de katal por litro (kat/l). Las dos unidades de concentración enzimática pueden interconvertirse de forma que $1 \text{ nkat}/\text{l} = 0,06 \text{ U}/\text{l}$. En la actualidad, la mayoría de los laboratorios clínicos siguen empleando la Unidad Internacional (U) en lugar del katal.

PRINCIPALES MÉTODOS

A continuación se presentan los principales métodos espectroscópicos para medir la actividad de las enzimas con interés clínico. Se indican las reacciones, los componentes principales de los reactivos —sin señalar la concentración—,

el fundamento de la medición, el pH, la longitud de onda de medida, los valores de referencia y las principales alteraciones.

Alanina aminotransferasa (ALT): método de la IFCC con piridoxal-fosfato

ALT



LACTATO DESHIDROGENASA



Reactivos: alanina, α -cetoglutarato, lactato deshidrogenasa, NADH y piridoxal-fosfato.

Fundamento de la medición: medida de la desaparición de NADH.

pH: 7,4.

Longitud de onda de medida: 340 nm.

Valores de referencia (a 37 °C): 10-40 U/l (0,17-0,68 $\mu\text{kat/l}$).

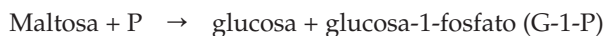
Alteraciones: la ALT aumenta en la necrosis de las células hepáticas de cualquier causa, la insuficiencia cardíaca, la anoxia aguda, el traumatismo extenso, la cirrosis, el infarto de miocardio y la distrofia muscular.

Amilasa: método Beckman DS

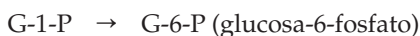
α -AMILASA



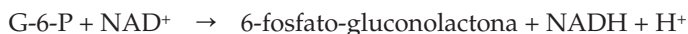
MALTOSA FOSFORILASA



β -FOSFOGLUCOMUTASA



G-6-P DESHIDROGENASA



Reactivos: Maltotetraosa, maltosa fosforilasa, β -fosfoglucomutasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y NAD⁺.

Fundamento de la medición: medida de la formación de NADH.

pH: 7,4.

Longitud de onda de medida: 340 nm.

Valores de referencia (a 37 °C): 27-131 U/l (0,46-2,23 $\mu\text{kat/l}$)

Alteraciones: la amilasa aumenta, fundamentalmente, en las pancreatitis agudas.

Aspartato aminotransferasa (AST): método de la IFCC con piridoxal-fosfato

AST

Ácido aspártico + ácido α -cetoglutarico \rightarrow ácido glutámico + ácido oxalacético

MALATO DESHIDROGENASA

Ácido oxalacético + NADH + H⁺ \rightarrow ácido málico + NAD⁺

Reactivos: aspartato, α -cetoglutarato, NADH, malato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa y piridoxal-fosfato.

Fundamento de la medición: medida de la desaparición del NADH.

pH: 7,4.

Longitud de onda de medida: 340 nm.

Valores de referencia (a 37 °C): 15-40 U/l (0,26-0,68 μ kat/l).

Alteraciones: la AST aumenta en la hepatitis vírica, la hepatitis crónica y con el ejercicio intenso.

Colinesterasa (CHE): método colorimétrico con butiriltiocolina

CHE

Butiriltiocolina + H₂O \rightarrow tiocolina + butirato

Tiocolina + ditiobisnitrobenzoato \rightarrow 2-nitro-5-mercapto-benzoato

Reactivos: butiriltiocolina y ditiobisnitrobenzoato.

Fundamento de la medición: medida de la formación de 2-nitro-5-mercapto-benzoato.

pH: 7,7.

Longitud de onda de medida: 480 nm.

Valores de referencia (a 37 °C): 5.300-12.900 U/l (88-215 μ kat/l).

Alteraciones: la colinesterasa aumenta en la diabetes mellitus, el hipertiroidismo, la exposición a los insecticidas organofosforados y el síndrome nefrótico.

Creatina cinasa (CK): método de la IFCC con N-acetilcisteína

CK

Fosfato de creatina + ADP \rightarrow creatina + ATP

HEXOCINASA

ATP + glucosa \rightarrow glucosa-6-fosfato + ADP

GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA

Glucosa-6-fosfato + NADP \rightarrow 6-fosfogluconato + NADPH + H⁺

Reactivos: hexocinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, NADP⁺ y N-acetilcisteína.

Fundamento de la medición: medida de la formación de NADH.

pH: 6,8.

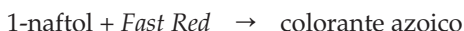
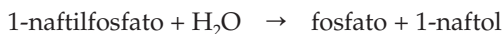
Longitud de onda de medida: 340 nm.

Valores de referencia (a 37 °C): 25-170 U/l (0,42-2,86 μkat/l)

Alteraciones: la creatina cinasa aumenta en el infarto agudo de miocardio, las miopatías y el hipotiroidismo.

Fosfatasa ácida (ACP): método colorimétrico

ACP



Reactivos: 1-naftilfosfato y *Fast Red* (rojo rápido).

Fundamento de la medición: medida de la formación de colorante azoico.

pH: 5,4.

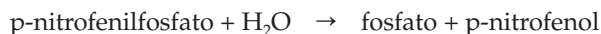
Longitud de onda de medida: 405 nm.

Valores de referencia (a 37 °C): <6,6 U/l (<0,110 μkat/l).

Alteraciones: la fosfatasa ácida aumenta en el cáncer de próstata, las fracturas óseas, los tumores con metástasis óseas, las hepatitis, el hiperparatiroidismo y el mieloma múltiple.

Fosfatasa alcalina (ALP): método colorimétrico

ALP



Reactivo: p-nitrofenilfosfato.

Fundamento de la medición: medida de la formación de p-nitrofenol.

pH: 9,8.

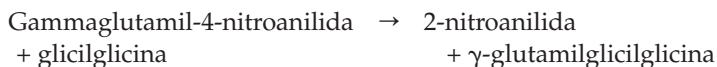
Longitud de onda de medida: 405 nm.

Valores de referencia (a 37 °C): 70-270 U/l (1,2-4,5 μkat/l).

Alteraciones: la fosfatasa alcalina aumenta en las enfermedades óseas con formación de hueso y en las obstrucciones hepáticas.

Gammaglutamil transferasa (GGT): método colorimétrico

GGT



Reactivos: gammaglutamil-4-nitroanilida y glicilglicina.

Fundamentos de la medición: medida de la formación de 2-nitroanilida.

pH: 7,6.

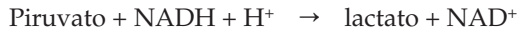
Longitud de onda de medida: 405 nm.

Valores de referencia (a 37 °C): varones 11-49 U/l (0,18-0,82 μ kat/l); mujeres 7-32 U/l (0,12-0,53 μ kat/l).

Alteraciones: la gammaglutamil transferasa aumenta en las enfermedades hepáticas obstructivas y el alcoholismo.

Lactato deshidrogenasa (LDH): método estandarizado

LDH



Reactivos: piruvato y NADH.

Fundamentos de la medición: medida de la desaparición de NADH.

pH: 7,4.

Longitud de onda de medida: 340 nm.

Valores de referencia (a 37 °C): 240-280 U/l (4-8 μ kat/l).

Alteraciones: la lactato deshidrogenasa aumenta en las hepatitis víricas, las anemias megaloblástica y perniciosa, el *shock*, la hipoxia y las enfermedades neoplásicas.

ESPECTROSCOPIA ATÓMICA

En contraste con las moléculas que producen espectros de bandas, los átomos producen espectros de líneas definidos con claridad. En general, y a diferencia de la espectroscopia molecular, las concentraciones de átomos no se miden directamente en la disolución, sino que hay que volatilizarlos, lo cual puede hacerse con una llama o electrotérmicamente en un horno. En este estado, los elementos emiten o absorben fácilmente radiación monocromática a la longitud de onda adecuada. La luz emitida o absorbida es proporcional al número de átomos. La emisión de luz se mide por espectroscopia de emisión atómica, y la absorción de luz, por espectroscopia de absorción atómica.

ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN ATÓMICA

La espectroscopia de emisión atómica mide la luz emitida por los átomos cuando reciben energía calorífica. Hay dos tipos de técnicas de espectroscopia de emisión atómica: la emisión por llama y la emisión por plasma.

Espectroscopia de emisión atómica por llama

La espectroscopia de emisión atómica por llama se denomina también *fotometría de llama*. Se basa en la emisión de luz característica por los átomos de muchos elementos metálicos cuando se les suministra energía con una llama. El sodio produce luz amarilla (589 nm); el calcio rojo amarillento (622 nm); el litio rojo (760 nm); y el potasio violeta (766 nm). En condiciones controladas, la intensidad de la luz de la longitud de onda característica producida por cada

uno de los átomos es directamente proporcional al número de átomos de la muestra. Esta técnica se ha utilizado en los laboratorios clínicos durante mucho tiempo para la medida de sodio y potasio en los líquidos biológicos, pero en la actualidad ya no se emplea.

Espectroscopia de emisión atómica por plasma

Un plasma consta de un gas caliente, parcialmente ionizado, con una concentración abundante de cationes y electrones que lo hacen conductor. Los plasmas que se emplean en la emisión atómica se forman por la ionización de una corriente de argón, que produce iones de argón y electrones. Las altas temperaturas del plasma se deben al calentamiento resistivo que tiene lugar por obra del movimiento de los electrones y de los iones de argón. Como los plasmas operan a temperaturas mucho mayores que las llamas, proporcionan una atomización mejor y estados de excitación más intensamente poblados. Además de los átomos neutros, las temperaturas elevadas del plasma producen también iones de la sustancia.

La espectroscopia de emisión atómica por plasma es muy adecuada para el análisis multielemental, ya que todos los átomos de un espécimen se excitan a la vez. Puede programarse un monocromador de barrido para que se mueva rápidamente a la longitud de onda de un átomo, se detenga y registre la intensidad de su emisión, luego vaya a la longitud de onda de otro y así sucesivamente. De esta forma, pueden analizarse tres o cuatro elementos por minuto. Otra posibilidad es utilizar un aparato con varios canales que permita medir simultáneamente muchos elementos. En la tabla 11-1 se presentan los límites de detección de algunos elementos de utilidad clínica medidos por emisión atómica (emisiones de llama y de plasma).

TABLA 11-1 *Límites de detección en partes por billón (ppb) de algunos elementos de utilidad clínica medidos por emisión atómica*

| Elemento | Emisión de llama | Emisión de plasma |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|
| Al | 3 | 0,2 |
| As | 2.000 | 2 |
| Ba | 1 | 0,01 |
| Ca | 0,1 | 0,00001 |
| Cd | 300 | 0,07 |
| Cr | 1 | 0,08 |
| Fe | 10 | 0,09 |
| K | 0,01 | 30 |
| Li | 0,001 | 0,02 |
| Mg | 1 | 0,003 |
| Na | 0,01 | 0,1 |
| Ni | 10 | 0,2 |
| Pb | 0,2 | 1 |
| Se | | 1 |
| Zn | 1.000 | 0,1 |

ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Principios generales

La espectroscopia de absorción atómica mide la luz de una determinada longitud de onda absorbida por los átomos de un elemento. En su estado fundamental, los átomos en forma de vapor absorben luz de longitudes de onda muy estrechas y pasan entonces a estados de excitación. El elemento que quiere medirse se vaporiza por medio de una llama o un método electrotrémico (horno de grafito). La fuente de energía radiante son las lámparas de cátodo hueco, construidas con el mismo elemento que quiere medirse. Cuando se excitan los átomos de la lámpara producen un vapor que emite un rayo de luz monocromática de la misma longitud de onda que la que absorben los átomos de ese elemento. Cuando la luz procedente de la lámpara de cátodo hueco atraviesa la llama, parte de aquella es absorbida por los átomos vaporizados en su estado fundamental, lo que ocasiona un descenso de la intensidad del rayo de la lámpara.

Componentes de un espectrómetro de absorción atómica

Los componentes de un espectrómetro de absorción atómica son: lámpara de cátodo hueco, nebulizador, monocromador y detector (fig. 11-5). La lámpara de cátodo hueco está construida con el metal del elemento que quiere medirse y es distinta para el análisis de cada metal. Las lámparas de cátodo hueco tienen dos propiedades fundamentales: una anchura de línea estrecha y una intensidad elevada a la longitud de onda correcta. Los espectrómetros de absorción atómica llevan también una lámpara suplementaria para corregir las interferencias de fondo. A diferencia de la espectroscopia de emisión atómica, la de absorción es un método para determinar un solo elemento. A lo sumo, los aparatos están diseñados para determinar unos pocos elementos sin cambiar las fuentes.

Los quemadores electrotrémicos se emplean en la llamada absorción atómica sin llama. El más utilizado es el horno de grafito, que consiste en una cavidad de este mineral con dos electrodos que proporcionan la corriente eléctrica para el calentamiento. Por el interior de la cámara circula agua para enfriarla rápidamente después de la atomización. El espécimen se coloca en la cámara e, inicialmente, se produce un calentamiento de unos 1.500 °C para

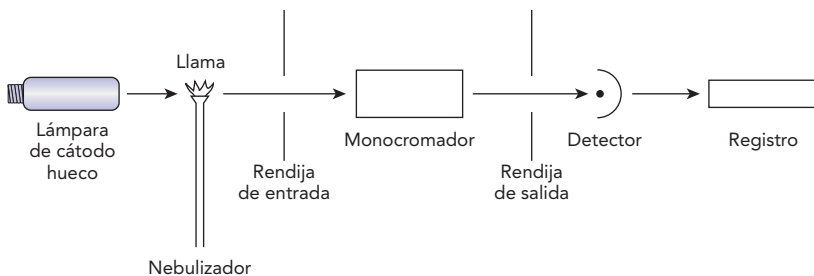


FIGURA 11-5 Componentes de un espectrómetro de absorción atómica.

eliminar el disolvente y destruir la matriz (calcinación). Posteriormente, se eleva la temperatura hasta alcanzar unos 3.000 °C para producir la atomización.

Elección del método de atomización

La elección del método para atomizar está determinada, principalmente, por la concentración del elemento en el espécimen que se analice. Dada la mayor sensibilidad de la atomización electrotrémica, para la mayoría de los elementos sus límites de detección son significativamente menores. En la tabla 11-2 se presentan los límites de detección de la absorción atómica con atomización de llama y con atomización electrotrémica. La mayor precisión del primer tipo de atomización la hace la más adecuada cuando la concentración del elemento es significativamente mayor que el límite de detección de la técnica para ese elemento. Además, la atomización con llama tiene menos interferencias y es más fácil de aplicar. En cambio, la atomización electrotrémica es más adecuada para los elementos cuya concentración esté por debajo del límite de detección de la atomización con llama. También es útil cuando el volumen del espécimen es limitado.

La atomización por llama y la electrotrémica requieren que el espécimen esté en forma líquida o en disolución. Los especímenes sólidos (tejidos, pelos, uñas, etc.) deben prepararse disolviéndolos en los disolventes adecuados. Cuando el espécimen no sea soluble deberá digerirse utilizando HNO_3 , H_2SO_4 o HClO_4 . Los especímenes líquidos pueden analizarse directamente o bien diluirse o extraerse si la matriz es incompatible con el método de atomización. Para el suero se utiliza la extracción con un disolvente orgánico que contenga un agente quelante para concentrar el espécimen.

TABLA 11-2 Límites de detección en partes por billón (ppb) de algunos elementos de utilidad clínica medidos por espectroscopia de absorción atómica

| Elemento | Atomización por llama | Atomización electrotrémica |
|----------|-----------------------|----------------------------|
| Al | 20 | 0,01 |
| As | 20 | 0,01 |
| Ba | 8 | 0,04 |
| Ca | 0,5 | 0,01 |
| Cd | 0,5 | 0,0002 |
| Cr | 2 | 0,04 |
| Fe | 3 | 0,01 |
| K | 1 | 0,004 |
| Li | 0,3 | 0,01 |
| Mg | 0,1 | 0,0002 |
| Na | 0,2 | 0,004 |
| Ni | 2 | 0,05 |
| Pb | 10 | 0,007 |
| Se | 100 | 0,05 |
| Zn | 0,8 | 0,0006 |

Corrección de Zeeman

Una forma de corrección de fondo en la espectroscopia de absorción atómica sin llama es la denominada de Zeeman. En ella, se aplica un campo magnético intenso que desdobra los niveles de energía atómica en dos componentes polarizados de forma paralela y perpendicular a dicho campo. El componente paralelo está en la línea de resonancia de la fuente, mientras que los dos componentes perpendiculares están desviados a diferentes longitudes de onda. Ambos componentes interactúan de forma diferente con la luz polarizada. Se pone un polarizador entre la fuente y el atomizador y se hacen dos medidas de absorción a distintos ajustes del polarizador. Con un ajuste se mide las absorciones del elemento y de fondo, mientras que con otro sólo se mide la absorción de fondo. La diferencia entre las dos medidas de la absorción es la absorbancia corregida. La ventaja principal del método de corrección de Zeeman es que se emplea la misma fuente luminosa para medir la absorción total y la de fondo. Su desventaja principal es que el sistema es caro.

Interferencias

Las principales interferencias en las medidas de absorción atómica son tres: químicas, de ionización y de matriz. Las primeras las producen las sustancias que impiden que la llama disocie los átomos, por lo que estos no están libres y no se produce absorción. Las interferencias de ionización se originan cuando los átomos de la llama, además de disociarse, se excitan y emiten energía de la misma longitud de onda que se mide. Finalmente, las de matriz se refieren a los aumentos de la absorción de radiación que producen los disolventes orgánicos, a la formación de sólidos al evaporarse el disolvente en la llama y la formación de óxidos de metales.

Aplicaciones

La espectroscopia de absorción atómica se emplea para medir la concentración de metales en los líquidos biológicos. Los principales metales que se miden son: aluminio, arsénico, bario, cadmio, calcio, cobre, cromo, hierro, litio, magnesio, manganeso, mercurio, níquel, plata, platino, plomo, selenio y cinc.

La puesta a punto de un método cuantitativo de absorción atómica requiere algunas consideraciones, entre ellas, elegir los métodos de atomización y de estándar, seleccionar la longitud de onda y la amplitud de la rendija, y preparar el espécimen para el análisis.

La absorción atómica sigue la ley de Lambert-Beer, por lo que cabe esperar curvas de calibración lineales. Sin embargo, en la práctica, la mayoría de las curvas no son lineales o sólo lo son en un intervalo limitado de concentraciones. Cuando se pueda, deberán realizarse los análisis cuantitativos utilizando estándares externos. No obstante, como a menudo se producen interferencias de la matriz, sobre todo con la atomización electrotérmica, se suele emplear el método de adiciones de estándar.

En la tabla 11-3 se indican los principales oligoelementos que se determinan en los laboratorios clínicos por espectroscopia de absorción atómica, y se indican la longitud de onda de la línea de absorción y los valores de referencia.

TABLA 11-3 Oligoelementos de interés clínico, con la longitud de onda de la línea de absorción y los valores de referencia en suero

| Oligoelemento | Longitud de onda (nm) | Valores de referencia en suero |
|---------------|-----------------------|--|
| Cobalto | 240,7 | 0,11-0,45 $\mu\text{g/l}$ (1,9-7,6 nmol/l) |
| Cobre | 324,8 | 70-155 $\mu\text{g/dl}$ (11-24,3 $\mu\text{mol/l}$) |
| Cromo | 357,9 | 0,05-0,5 $\mu\text{g/l}$ (1-10 nmol/l) |
| Hierro | 248,3 | 50-170 $\mu\text{g/dl}$ (9-31 $\mu\text{mol/l}$) |
| Magnesio | 285,2 | 1,6-2,6 mg/dl (0,7-1,1 mmol/l) |
| Manganeso | 279,5 | 0,4-1,1 ng/ml (7-20 nmol/l) |
| Níquel | 232 | 0,14-1 $\mu\text{g/l}$ (2,4-17 nmol/l) |
| Selenio | 196 | 46-143 $\mu\text{g/dl}$ (0,58-1,82 $\mu\text{mol/l}$) |
| Cinc | 213,9 | 70-120 $\mu\text{g/dl}$ (10,7-18,4 $\mu\text{mol/l}$) |

Varios metales son tóxicos cuando el ser humano se expone a grandes concentraciones de ellos. Entre estos metales están el aluminio, el arsénico, el cadmio, el cromo, el cobalto, el cobre, el hierro, el manganeso, el mercurio, el níquel, el plata, el platino, el plomo, el selenio, el silicio y el talio. Algunos de ellos son oligoelementos, pero en grandes cantidades producen toxicidad.

Las principales técnicas para medir los metales tóxicos son la espectroscopia de absorción atómica (de llama o de atomización electrotermica), la espectroscopia de emisión de plasma acoplado por inducción y la espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción. Describir estos métodos queda fuera del alcance de este texto.

ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La absorción por algunas moléculas de luz ultravioleta o visible hace que un electrón de valencia pase de su estado basal a otro excitado. La emisión de luz al volver el electrón del estado excitado al basal se denomina *fluorescencia*. La energía de la luz emitida es menor que la de la absorbida y, por tanto, su longitud de onda, mayor. La diferencia entre estas dos longitudes de onda se denomina desviación de Stokes y, de forma general, los mejores resultados de las medidas de fluorescencia se obtienen con compuestos que tengan grandes diferencias entre la longitud de onda de excitación y de emisión. El tiempo que transcurre entre la absorción de la radiación electromagnética y la emisión de la fluorescencia es muy pequeño, de unos 10^{-8} s.

Son muchos los compuestos que presentan el fenómeno de la fluorescencia. La mayoría de ellos son sustancias que tienen enlaces múltiples conjugados con electrones π deslocalizados. La fluorescencia se emite en todas las direcciones, puede cuantificarse y su medición es mucho más sensible que la de la absorción de la radiación.

FLUORÍMETROS

Las medidas de la fluorescencia se realizan con aparatos denominados fluorímetros (fig. 11-6), que constan de los siguientes componentes: fuente de luz de

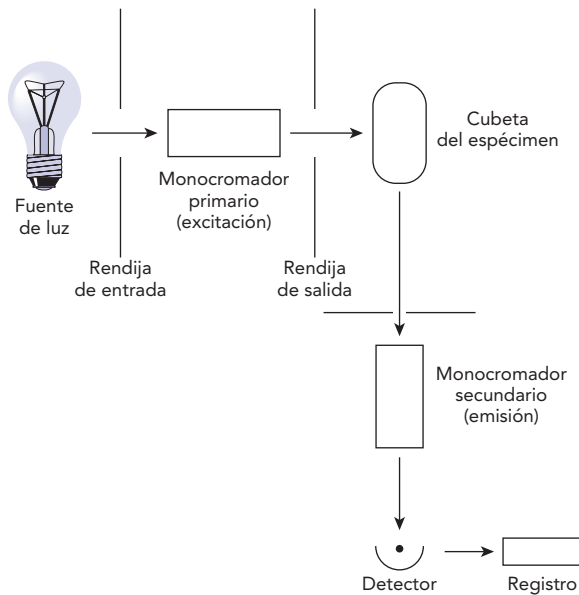


FIGURA 11-6
Componentes de un fluorímetro.

excitación, filtro o monocromador primario, cubeta para el espécimen, filtro o monocromador secundario, detector de luz y dispositivo de lectura.

La luz que procede de la lámpara de excitación se hace pasar por el filtro o monocromador primario, que selecciona la longitud de onda adecuada que incidirá sobre la cubeta con el espécimen. Parte de la luz se absorbe y, por obra del proceso de fluorescencia, se emite luz de mayor longitud de onda. A su vez, esta luz se hace pasar por el filtro o monocromador secundario, colocado perpendicularmente al primero para evitar que interfiera la luz de excitación. Finalmente, la luz llega al detector, donde se transforma en energía eléctrica. El retardo entre la absorción de la radiación electromagnética y la emisión de la fluorescencia se emplea en unos fluorímetros llamados de resolución de tiempo, que eliminan las interferencias y son, por tanto, más sensibles.

Generalmente, la fuente de energía radiante de los fluorímetros (lámpara de excitación) es una lámpara de descarga de mercurio o de xenón, capaz de producir la suficiente energía para excitar los compuestos fluorescentes. Proporciona un espectro de energía radiante muy intenso (entre 250 y 800 nm).

Los filtros o monocromadores utilizados para seleccionar las longitudes de onda primaria y secundaria son análogos a los de los espectrofotómetros. En cuanto a las cubetas, pueden tener forma cilíndrica o rectangular, caso este último en que las cuatro caras serán translúcidas. Los detectores son similares a los de los espectrofotómetros.

APLICACIONES

La espectroscopia de fluorescencia se aplica en los laboratorios clínicos para determinar diversos compuestos químicos y actividades enzimáticas en los medios biológicos.

ESPECTROSCOPIA DE LUMINISCENCIA

La luminiscencia es la emisión de luz fruto de una reacción química. Puede ser quimioluminiscencia, cuando los electrones pasan a un estado excitado como consecuencia de una reacción química y vuelven a su estado basal emitiendo luz, o bioluminiscencia, cuando la emisión de luz surge debido a una reacción catalizada por una enzima.

La luminometría es la técnica que mide la luminiscencia. Para medirla se requieren aparatos sencillos, llamados luminómetros, que constan de estos componentes: cámara de mezcla/cubeta, fotomultiplicador, amplificador y lector/registro.

La cámara de mezcla/cubeta debe mantenerse a temperatura constante, ya que las reacciones que tienen lugar son muy sensibles a la temperatura, especialmente las catalizadas por enzimas. En los laboratorios clínicos, la luminometría se aplica, principalmente, en los sistemas de detección de los inmunoanálisis con reactivos marcados, por ejemplo, los enzimoimmunoanálisis que utilizan fosfatasa alcalina como enzima marcadora en la detección por quimioluminiscencia.

ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN

DISPERSIÓN DE LA LUZ

Cuando un rayo de luz choca con una partícula en suspensión, una parte de la luz se absorbe, otra se refleja y otra se dispersa. La dispersión de la luz por una partícula depende de su tamaño, su índice de refracción respecto al del líquido que la rodea y la longitud de onda de la luz. Cuando la longitud de onda es mucho mayor que el tamaño de la partícula ($\lambda > 10 d$), la luz se dispersa de forma simétrica alrededor de esta, de modo que la intensidad de la dispersión es mínima a 90° del rayo incidente. En cambio, cuando la longitud de onda de la luz incidente sea aproximadamente igual al tamaño de la partícula ($\lambda = d$), se dispersará más luz hacia delante que hacia atrás. Finalmente, cuando la longitud de onda sea mucho menor que el tamaño de la partícula ($\lambda < 0,1 d$), la mayoría de la luz se dispersará hacia delante.

TURBIDIMETRÍA Y NEFELOMETRÍA

La turbidimetría y la nefelometría son dos técnicas relacionadas entre sí que se emplean para medir la luz dispersada por una suspensión de partículas coloidales. En la turbidimetría, el detector se coloca en línea con la fuente de radiación y se mide el descenso de la luz transmitida a través de la disolución particulada a consecuencia de su dispersión por las partículas. La nefelometría, por su parte, mide la luz dispersada a diversos ángulos de la fuente de luz.

El principal problema para aplicar estas dos técnicas a los sistemas biológicos es la presencia de moléculas endógenas que dispersan la luz. Además, los reactivos deben estar libres de polvo, ya que las partículas grandes de este dispersan mucho la luz y el fondo o dispersión blanco que resulta limita la sensibilidad de ambas técnicas. Estos problemas se han solucionado diseñando instrumentos muy sensibles y mejorando la calidad de los anticuerpos.

INSTRUMENTACIÓN PARA LAS MEDIDAS TURBIDIMÉTRICAS Y NEFELOMÉTRICAS

Medición turbidimétrica

Las medidas turbidimétricas pueden realizarse con un espectrofotómetro. En consecuencia, la sensibilidad de la turbidimetría está limitada principalmente por la exactitud y la sensibilidad del aparato, ya que este método mide el descenso de una señal grande de luz. Para medir la turbidez puede utilizarse cualquier longitud de onda; las más empleadas son, para la inmunoprecipitación con concentraciones pequeñas de la sustancia que se mide, la de 340 nm; para las pruebas que emplean partículas, las de 500-700 nm, y para los análisis con grandes concentraciones de la sustancia que se mide, la de 800 nm.

En la turbidimetría, la transmitancia medida (T) es el cociente entre la intensidad transmitida de la fuente de radiación (I_T) y la intensidad transmitida por un blanco (I_0):

$$T = I_T/I_0$$

La relación entre la transmitancia y la concentración de las partículas dispersadoras es semejante a la que da la ley de Beer:

$$-\log T = kbc$$

donde c = concentración de las partículas dispersadoras en masa por unidad de volumen; b = longitud de paso; k = constante que depende de varios factores, entre ellos el tamaño y la forma de las partículas dispersadoras y la longitud de onda de la fuente de radiación.

La relación exacta se establece con una curva de calibración utilizando varios estándares de concentración conocida.

Nefelómetros

Los nefelómetros son semejantes a los fluorímetros y se diferencian de ellos, principalmente, en que la longitud de onda de la emisión y la de la detección son la misma. Estos instrumentos están formados por los componentes que siguen: una fuente de luz, un filtro de selección de la longitud de onda de emisión, una cubeta para el espécimen, un filtro de selección de la longitud de onda de detección, un detector y un registro.

Los componentes ópticos de los nefelómetros son similares a los de los espectrofotómetros. En algunos nefelómetros los detectores están situados a 90° , y en otros, a ángulos comprendidos entre 10° y 90° .

Los aparatos que miden la dispersión de la luz para cuantificar las reacciones antígeno-anticuerpo deben detectar el exceso de antígeno. Las tres fases de la cinética de la formación de complejos inmunitarios por turbidimetría o nefelometría —exceso de anticuerpo, equivalencia y exceso de antígeno— se diferencian lo bastante para que el uso de algoritmos matemáticos con un ordenador permita detectar automáticamente el exceso de antígeno.

En la nefelometría, la relación entre la intensidad de la radiación dispersada (I_S), y la concentración de las partículas dispersadoras es:

$$I_S = k_S I_0 c$$

donde k_S = constante empírica del sistema; I_0 = intensidad de la fuente de radiación incidente.

El valor de k_S se obtiene a partir de una curva de calibración usando diversos estándares de concentración conocida.

ELECCIÓN ENTRE TURBIDIMETRÍA Y NEFELOMETRÍA

La elección entre estas dos técnicas depende de a qué se apliquen y de la instrumentación de que se disponga. En general, la turbidimetría suele utilizarse para grandes concentraciones de partículas que dispersan la luz y producen grandes descensos de la luz transmitida. En cambio, la nefelometría suele emplearse para pequeñas concentraciones de partículas dispersadoras de luz, que dan poca turbidez. Otro factor fundamental para elegir entre ambas técnicas es el tamaño de las partículas dispersadoras. La nefelometría es más adecuada para partículas pequeñas, mientras que en la turbidimetría el tamaño de las partículas importa menos.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS

La principal aplicación actual de la turbidimetría y la nefelometría en los laboratorios clínicos es la determinación de proteínas específicas con métodos

TABLA 11-4 Sustancias que habitualmente se miden mediante nefelometría o turbidimetría, con sus valores de referencia

| Magnitud | Unidades convencionales | Unidades SI |
|--------------------------|---|--------------------------------|
| α_1 -antitripsina | 78-200 mg/dl | 0,78-2 g/l |
| Albumina | 3,5-5,2 g/dl | 35-52 g/l |
| Apolipoproteína A-I | Varones: 94-178 mg/dl Mujeres: 101-199 mg/dl | 0,94-1,78 g/l 1,01-1,99 g/l |
| Apolipoproteína B | Varones: 63-133 mg/dl Mujeres: 60-126 mg/dl | 0,63-1,33 g/l 0,60-1,26 g/l |
| Ceruloplasmina | 18-45 mg/dl | 0,18-0,45 g/l |
| Complemento C3 | 85-180 mg/dl | 0,85-1,8 g/l |
| Complemento C4 | 29-68 mg/dl | 0,29-0,68 g/l |
| Proteína C reactiva | 6,8-820 μ g/dl | 68-8.200 μ g/l |
| Haptoglobina | 26-185 mg/dl | 0,26-1,85 g/l |
| Inmunoglobulina A (IgA) | 40-350 mg/dl | 0,4-3,5 g/l |
| Inmunoglobulina G (IgG) | 650-1.600 mg/dl | 6,5-16 g/l |
| Inmunoglobulina M (IgM) | 50-300 mg/dl | 0,5-3 g/l |
| Transferrina | 215-380 mg/dl | 2,15-3,75 g/l |
| Factor reumatoide (FR) | <30 U/ml | <30 kU/l |

inmunológicos. El tamaño de la mayoría de las proteínas solubles es de entre 1 y 20 nm, y el de los complejos antígeno-anticuerpo, de entre 50 y 100 nm. Los agregados que se forman tras la reacción antígeno-anticuerpo tienen tamaños de entre 300 y 1.000 nm. Como se ha señalado antes, la cantidad de luz dispersada depende del tamaño, de la cantidad y del índice de refracción de las especies dispersantes, por lo que un aumento de cualquiera de estas magnitudes aumenta la detectabilidad. Para lograr esto, se unen a los antígenos o los anticuerpos partículas de látex con un tamaño de entre 100 y 300 nm, de manera que los agregados que se formen tendrán tamaños mayores. Este tipo de métodos se llaman inmunoanálisis potenciados. En la tabla 11-4 se relacionan las sustancias que suelen medirse mediante nefelometría o turbidimetría con sus valores de referencia.

Automatización en el laboratorio de bioquímica clínica

INTRODUCCIÓN

El término *automatización* describe los aparatos y dispositivos que se utilizan en los laboratorios de bioquímica clínica para mecanizar los procesos de preparación de los especímenes y de determinación de sustancias químicas con una reducida intervención de los operadores. La automatización ha permitido hacer frente al enorme incremento del número de especímenes y de la carga de trabajo que se ha producido en los últimos años. Al mismo tiempo, se han reducido la variabilidad de los resultados y los errores inherentes al trabajo manual humano repetitivo. La automatización puede ir desde unos pocos pasos del proceso analítico hasta todo el trabajo del laboratorio. En este capítulo se presentan los componentes fundamentales de los sistemas de preparación de los especímenes y de los analizadores automáticos para bioquímica clínica.

AUTOMATIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN DE LOS ESPECÍMENES

La preparación de los especímenes antes de realizar las determinaciones analíticas, lo cual se conoce como *fase preanalítica*, es uno de los componentes operativos más importantes a los que se enfrentan los laboratorios clínicos. Los componentes principales de los sistemas mecanizados para manipular los especímenes antes de la realización de las determinaciones analíticas son:

- Unidad de entrada de especímenes.
- Centrifugas automáticas.
- Destaponador de tubos.
- Alicuotador.
- Taponador o sellador de tubos.
- Etiquetador.
- Clasificador.

A continuación se describen, de forma breve, las características más importantes de cada uno de estos componentes. En la tabla 12-1 se dan las características básicas de los sistemas comerciales.

UNIDAD DE ENTRADA DE ESPECÍMENES

Según llegan los tubos al laboratorio se colocan en la unidad de entrada. Aquí se clasifican y se distribuyen de acuerdo con las determinaciones solicitadas y las condiciones del tubo. Los tubos pueden transportarse de uno en uno o utilizando dispositivos que permiten acomodar varios de ellos, normalmente cinco. Los

TABLA 12-1 *Sistemas de automatización de la preparación de especímenes*

| Característica | Abbott | Beckman | Olympus | Ortho | Roche | Siemens | Siemens |
|-----------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------|--------------------------|
| Cadena | Accelerator APS | Power Processor | TAC Automation | EnGen | Modular Preanalytics | LabCell | Stream Lab |
| Diseño | Circular | Circular | Circular | Circular | Lineal | Circular | Circular |
| Año | 2005 | 1998 | 2009 | 2001 | 2000 | 1998 | 2002 |
| Transporte tubo | 1 tubo | 1 tubo | 1 tubo | 1 tubo | 5 tubos | 1 tubo | 1 tubo |
| Centrífugas | 2 | Sin límite | 2 | 4 | 2 | 2 | 1 |
| Destaponador | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí |
| Retaponador | Sí | Sí | Sí | No | Sí | No | No |
| Alicuotador | No | Sí | Sí | Sí | Sí | No | No |
| Conexión analizadores | Puntual | Puntual y brazo robot | Puntual y brazo robot | Puntual y brazo robot | Puntual | Puntual | Puntual y brazo robot |

sistemas difieren en cuanto al tamaño y tipo de tubos que aceptan. Algunos sistemas tienen transportadores de tubos que pueden aceptar cualquier tamaño de tubo, pero alguno de los otros componentes del sistema, como la centrífuga, el destaponador, el alicuotador y el taponador pueden no ser tan versátiles.

CENTRÍFUGAS AUTOMÁTICAS

Si hay que centrifugar el tubo para obtener el suero o el plasma, aquel se dirige hacia la centrífuga automática que va cargando mediante un brazo robotizado los tubos en el rotor y, cuando este se llena, se autoequilibra. La capacidad y funcionalidad de cada centrífuga difieren dependiendo del sistema. La capacidad, el tamaño de los tubos y el rendimiento del proceso varían de unos equipos a otros. Algunos rotores pueden acomodar todo tipo de tubos, mientras que otros no lo hacen. El mecanismo de equilibrado también difiere de unos sistemas a otros. Debe considerarse el número de centrífugas que pueden conectarse, especialmente en aquellos laboratorios con un volumen elevado de especímenes.

DESTAPONADOR

Una vez centrifugados los tubos, se extraen de la centrífuga y se llevan al destaponador, donde se quita el tapón.

ALICUOTADOR

Si está programado el fraccionamiento en alícuotas, se trasladan los tubos al alicuotador, en el que se realiza la operación y se etiqueta el tubo. La mayoría de los alicuotadores pueden realizar la detección del coágulo y detectar el nivel. Algunos sistemas registran de forma óptica el volumen que queda en el tubo y avisan al operador si hay volumen suficiente para el alicuotado.

TAPONADOR O SELLADOR DE TUBOS

El taponamiento de los tubos puede realizarse con tapones de plástico o con una lámina metálica de sellado por calor.

ETIQUETADOR

Sistema que hace etiquetas para los tubos secundarios generados.

CLASIFICADOR

Módulo del sistema automático de la fase preanalítica mediante el cual se clasifican los tubos para su envío a las secciones adecuadas.

ANALIZADORES AUTOMÁTICOS PARA BIOQUÍMICA CLÍNICA

En la actualidad, los analizadores automáticos para bioquímica clínica son del tipo denominado *discreto*, en donde la mezcla de reacción se produce en una cubeta individual. Los principales componentes de estos analizadores son:

- Dispositivo de carga de los especímenes
- Sistema de identificación de los especímenes
- Dispositivo de toma y dispensación de los especímenes
- Sistema de dispensación de los reactivos
- Baño de incubación
- Sistema de medida de la reacción

DISPOSITIVO DE CARGA DE LOS ESPECÍMENES

La mayoría de los analizadores de bioquímica clínica puede utilizar tubos primarios, esto es, los mismos tubos de extracción después de centrifugados, ya que las pipetas de toma de muestra disponen de sensores de nivel que detienen su acción cuando alcanzan el líquido. La zona de carga del analizador es la parte donde se mantienen los especímenes en el instrumento antes de que se analicen. Esta zona puede tener la forma de una bandeja circular, una grilla o una cadena transportadora con capacidades variables, que generalmente dependen de la velocidad de trabajo del analizador. Respecto a los contenedores secundarios (tubos o copas), cada analizador los utiliza de forma diferente, y están diseñados de manera que el volumen muerto sea mínimo y se produzca poca evaporación cuando no estén tapados. La evaporación de los especímenes puede causar errores analíticos destacables cuando deban permanecer mucho tiempo en la zona de carga de los especímenes. La mayoría de los analizadores automáticos poseen tapas para el dispositivo de carga de los especímenes, que suelen ser opacas para impedir que la luz degrade algunos componentes.

La carga de los especímenes en los dispositivos correspondientes puede ser discontinua o continua. En el primer modo, se cargan los especímenes en un dispositivo que se cambia cuando se han tomado todos los especímenes del primero, y en el segundo modo se van cambiando continuamente los contenedores de los especímenes a medida que se van aspirando del dispositivo de carga situado en el analizador.

SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN DE LOS ESPECÍMENES

La identificación de los especímenes puede introducirse mediante el ordenador del analizador. Sin embargo, en la actualidad, los analizadores automáticos de bioquímica clínica suelen estar conectados al sistema informático del laboratorio, que les pasa directamente los datos.

Los analizadores para bioquímica clínica tienen lectores de códigos de barras para la identificación positiva de los especímenes. El uso de estos códigos presenta un gran número de ventajas; entre ellas, que se eliminan las listas de trabajo del analizador y se evitan posibles mezclas de los especímenes durante su colocación en el mismo, sobre todo cuando se emplean contenedores secundarios.

DISPOSITIVO DE TOMA Y DISPENSACIÓN DE LOS ESPECÍMENES

El dispositivo de toma y dispensación de los especímenes tiene por función trasladar un volumen definido del espécimen desde su contenedor hasta la

cubeta de reacción. Las pipetas de toma y dispensación de los especímenes disponen de sensores de nivel para detectar el líquido, que pueden ser de tres tipos: de capacitancia, de conductimetría y de ultrasonidos. Algunos analizadores automáticos tienen también pipetas de toma de especímenes capaces de detectar pequeños coágulos en el espécimen, en cuyo caso detienen la aspiración para no obstruirse.

Para dispensar los especímenes, los analizadores automáticos actuales utilizan jeringas de desplazamiento líquido positivo. La pipeta se mueve hasta el contenedor del espécimen, lo aspira, y luego mueve el brazo de toma hasta la cubeta de reacción y dispensa un volumen fijo del espécimen en la cubeta, bien solo o mezclado con diluyente o reactivo. Una vez lavada la punta de aspiración interna y externamente, la pipeta vuelve a la posición de toma para aspirar el espécimen siguiente.

La transferencia del espécimen desde su contenedor hasta el lugar de reacción es un proceso crítico, ya que las técnicas actuales de los analizadores automáticos utilizan volúmenes muy pequeños, inferiores en muchos casos a 5 μl . Para estos volúmenes tan pequeños, la inexactitud y la imprecisión de los dispositivos de toma y dispensación de especímenes no deben superar el 1%.

SISTEMA DE DISPENSACIÓN DE LOS REACTIVOS

En la mayoría de los analizadores automáticos, los reactivos están en forma líquida, dentro de contenedores de vidrio o de plástico cuyo tamaño dependerá de la estabilidad y de la tasa de trabajo del analizador. Normalmente, cada prueba utiliza uno o dos reactivos, aunque algunos analizadores permiten usar tres o más. Los compartimentos para los reactivos suelen estar refrigerados y mantener la temperatura entre 4 y 8 °C. Por otra parte, como los contenedores de los reactivos se identifican mediante un código de barras, el contenedor puede colocarse en cualquier posición del compartimento de reactivos, pues el analizador detecta automáticamente su situación.

Los reactivos se dispensan por medio de pipetas conectadas a jeringas de desplazamiento líquido positivo. Generalmente, se utilizan las mismas pipetas para dispensar todos los reactivos, por lo que deben lavarse por dentro y por fuera cada vez que tomen un reactivo distinto.

Con relación a los reactivos, los analizadores pueden ser abiertos o cerrados. En el primer caso, pueden modificarse la mayoría de las magnitudes del análisis, de forma que es posible utilizar reactivos de diferentes suministradores. En cambio, en los sistemas cerrados no pueden realizarse modificaciones, por lo que deben utilizarse los reactivos que proporcione el suministrador del analizador en los contenedores y formatos adecuados.

CUBETAS DE REACCIÓN

Las cubetas de reacción pueden ser desechables o reutilizables. En la mayoría de los sistemas, la cubeta de reacción sirve también como cubeta de lectura fotométrica, mientras que en otros se aspira la solución de las cubetas de reacción y se lleva a otra de medida.

Las cubetas de plástico de la mayoría de los sistemas tienen una vida de entre uno y dos meses. En cambio, las cubetas de vidrio no se reemplazan, a

no ser que se dañen. Una vez hecha la lectura, el ciclo de lavado implica aspirar la mezcla de reacción. Se añade una solución de lavado varias veces y se aspira de la cubeta. Luego se añade agua desionizada y, tras aspirarla, se seca la cubeta mediante vacío o con aire a presión. De esta manera, la cubeta queda lista para utilizarse de nuevo.

BAÑO DE INCUBACIÓN

Las cubetas de reacción van introducidas en baños de agua o en cámaras de aire termostatazadas a la temperatura de incubación.

SISTEMAS DE MEDIDA

La mayoría de las determinaciones de los analizadores automáticos de bioquímica clínica se realizan por medidas espectroscópicas de absorbancia. Algunos analizadores pueden realizar también medidas de fluorescencia, turbidimétricas, nefelométricas y electroquímicas.

Medidas espectroscópicas de absorbancia

Las medidas espectroscópicas de absorbancia requieren tres componentes básicos (v. capítulo 11): una fuente de luz, un dispositivo de selección de la longitud de onda de medida y un detector.

Las *principales fuentes de luz* que se utilizan en los analizadores automáticos de bioquímica clínica son las lámparas de halógenos, las de deuterio, las de mercurio y las de xenón. Los espectros producidos por estas lámparas están comprendidos entre 300 y 700 nm de longitud de onda.

Los *dispositivos selectores de la longitud de onda de medida* en los analizadores automáticos más sencillos son los filtros de interferencia, cuya amplitud de banda oscila entre 5 y 10 nm. En los analizadores capaces de realizar varias pruebas diferentes y en los que todas las medidas tienen lugar en el mismo sitio, con una única fuente de energía radiante, los filtros suelen colocarse en una rueda que, dirigida por un microprocesador, dispone el filtro adecuado para cada medida. Para seleccionar la longitud de onda de medida, los mejores analizadores utilizan rejillas de difracción, que proporcionan un espectro continuo de longitudes de onda. Por otro lado, la mayoría de los analizadores para bioquímica clínica emplean un sistema de lectura de absorbancia a dos o más longitudes de onda (bicromatismo o policromatismo).

En los analizadores automáticos para bioquímica clínica, el *detector*, que convierte la energía luminosa que le llega en energía eléctrica, suele ser un tubo fotomultiplicador. Los sistemas de medida de la absorbancia de los analizadores automáticos tienen, en general, intervalos de medida de 0 a 2 unidades de absorbancia y una sensibilidad de unas 0,001 unidades de absorbancia, a un valor de esta de una unidad.

Medidas de fluorescencia

En los analizadores automáticos para bioquímica clínica, las medidas de fluorescencia se usan, fundamentalmente, para los inmunoanálisis. La sensibilidad

de estas medidas es unas 1.000 veces mayor que la de las medidas espectroscópicas de absorbancia. Para las de fluorescencia hace falta un sistema de selección de longitud de onda adicional, dispuesto en ángulo recto con el de excitación.

Medidas turbidimétricas y nefelométricas

Las medidas turbidimétricas y nefelométricas se emplean para detectar agregados particulados en las reacciones antígeno-anticuerpo. Mientras que la turbidez se puede medir del mismo modo que la absorbancia, las medidas nefelométricas miden la luz dispersada por las partículas a diferentes ángulos de la luz incidente.

Los componentes ópticos para las medidas fluorimétricas, turbidimétricas y nefelométricas se parecen a los de la espectroscopia de absorbancia. Como fuentes de luz utilizan lámparas de halógenos, xenón o láser. Los sistemas que seleccionan la longitud de onda son filtros de interferencia o rejillas de difracción, y los detectores, tubos fotomultiplicadores.

Medidas electroquímicas

Los dispositivos electroquímicos más usados en los analizadores de bioquímica clínica para medir electrólitos son los electrodos selectivos construidos, generalmente, con vidrios especiales de borosilicato, y permeables a los iones que se desean medir. Las medidas con estos electrodos pueden ser directas, esto es, sin realizar la dilución previa del espécimen, o indirectas, diluyendo el espécimen.

AMPLIFICADOR Y CONVERTIDOR ANALÓGICO/DIGITAL

Por lo común, las señales eléctricas de los detectores deben amplificarse. Asimismo, hay que convertir en digitales las señales analógicas amplificadas. Las señales analógicas que proceden de los detectores se transforman en digitales por medio de los convertidores adecuados.

PROCESADORES DE DATOS, PANTALLA E IMPRESORA

Los datos digitales se procesan con los algoritmos programados para transformarlos en resultados que luego se imprimen. Mediante la pantalla, el operador está en todo momento informado de la situación del analizador. La pantalla se utiliza también para programar el analizador y solicitar las calibraciones y las pruebas a realizar sobre cada espécimen.

SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS ANALIZADORES

La selección de un analizador es un proceso complejo que comprende el análisis de las especificaciones del analizador, así como un análisis de costes. Una vez contemplados estos parámetros se llega a un grupo reducido de analizadores que tienen que evaluarse antes de proceder a la elección.

SELECCIÓN

Principios generales

La selección adecuada y la evaluación cuidadosa de los analizadores automáticos que han de emplearse en los laboratorios clínicos son aspectos esenciales para el buen funcionamiento de estos. Un analizador automático ideal debería reunir estas características:

- **Fiabilidad**, es decir, proporcionar resultados reproducibles y exactos.
- **Versatilidad**, de forma que pueda trabajar con diferentes metodologías y tipos de especímenes para determinar una gama amplia de sustancias.
- **Facilidad de uso**, para que puedan trabajar con él muchas personas del laboratorio sin requerir un entrenamiento especial.
- **Exigir poca atención** de parte del operador.
- **Instalación sencilla**, sin requerimientos complejos.
- **Economía**, tanto en el precio de compra o alquiler como en el de los reactivos y materiales adicionales y desechables, y el consumo eléctrico y de agua.
- **Compatibilidad** con el sistema informático del laboratorio.

Los pasos que suelen seguirse para elegir un analizador automático son:

- Determinar las necesidades del laboratorio.
- Definir los requerimientos que debe reunir el analizador.
- Estudiar los sistemas del mercado y seleccionar los candidatos.
- Analizar los costes y las modalidades de adquisición de cada candidato.
- Concertar demostraciones de los mismos.
- Valorar la aceptación por los operadores del candidato elegido.

Especificaciones de los analizadores

Las especificaciones de los analizadores que ayudan a seleccionar los candidatos son:

1. **Características generales**: tipos de análisis, cadencia de las pruebas, tiempo de puesta en marcha, tiempo que tarde en proporcionar el resultado, metodologías y conexiones informáticas.
2. **Requisitos de instalación y uso** (consumo eléctrico y de agua, y temperaturas de trabajo).
3. **Manipulación e identificación de los especímenes**: cuántos pueden cargarse a la vez, líquidos biológicos que analiza, protección de los especímenes, identificación de estos, volumen muerto y de espécimen, y detector de nivel.
4. **Tratamiento y gestión del medio de reacción**: volumen de reacción, presentación, capacidad y número de determinaciones de los reactivos, posiciones de reactivos refrigeradas y no refrigeradas, identificación de reactivos y reactivos por prueba.

5. Tratamiento de la medida: fuente de luz, tipos de medida y electrólitos.
6. Tratamiento y explotación de la información: tipos y frecuencia de las calibraciones, gestión del control de la calidad, diluciones automáticas, repetición automática de análisis y pruebas reflejas.
7. Sistema informático y conexión al ordenador central.
8. Prestaciones analíticas: exactitud, precisión, intervalo analítico, especificidad e interferencias.
9. Necesidades de personal.
10. Materiales adicionales.

Análisis de costes

El análisis de costes debe diferenciar los de adquisición, los de las determinaciones y los de operación. En los primeros hay que tener en cuenta las diferentes modalidades, como la compra directa, la amortización en un tiempo determinado, el *leasing* por consumo de reactivos, etc. En cada caso deben valorarse diferentes aspectos, como las facilidades de pago, el período establecido para la amortización —considerando la depreciación y el tiempo de obsolescencia—, el consumo de reactivos necesario para posibilitar el *leasing* y la adecuación de este a las necesidades del laboratorio.

En lo referente a los costes de las determinaciones, han de valorarse los de los reactivos, las calibraciones, los controles, el cebado de los reactivos y los materiales adicionales (detergentes, cubetas de reacción, etc.). Con estos datos debe llegarse a un p^orecio por determinación de cada sustancia que vaya a medirse con el analizador.

Los costes de operación comprenden el consumo eléctrico, de agua y de materiales desechables, y el contrato de mantenimiento. Es importante saber a cuánto ascienden estos gastos en un sistema, pues puede haber un analizador cuyas determinaciones cuesten poco y tenga costes operacionales altos, y viceversa.

EVALUACIÓN

La evaluación de un analizador automático para bioquímica clínica es un proceso complejo que comprende diversas etapas. Una primera etapa implica la evaluación de la practicabilidad, que incluye aspectos como el espacio necesario, el manejo del aparato, la organización del trabajo y, en general, la adecuación del analizador al entorno del laboratorio. En una segunda etapa deben evaluarse las prestaciones analíticas, que incluyen, entre otras, la imprecisión, la inexactitud, la linealidad, la sensibilidad y el límite de detección de cada método. En una tercera etapa deben evaluarse los diferentes componentes del analizador. A continuación se detalla la actuación en cada una de estas etapas.

Evaluación de la practicabilidad

La evaluación de la practicabilidad de un analizador debe incluir estos nueve aspectos:

1. *Entorno:*
 - a. Espacio requerido (volumen del analizador y espacio necesario a su alrededor).
 - b. Suministro y consumo de energía eléctrica.
 - c. Suministro y consumo de agua desionizada.
 - d. Requerimiento de aire acondicionado.
 - e. Requerimiento de desagüe para las soluciones reactivas.
 - f. Nivel de ruido (comparación con la situación actual del laboratorio).
2. *Disposiciones espaciales:*
 - a. Localización del enchufe de corriente eléctrica, la conexión/contenedor de agua, el contenedor de desechos y los contenedores de reactivos.
 - b. Posición del teclado, la pantalla y la impresora.
 - c. Localización del suministro de papel de la impresora y su recogida.
3. *Facilidad de operación:*
 - a. Curso de aprendizaje.
 - b. Operación (grado de dificultad y requerimientos del operador).
 - c. Manual de instrucciones: totalidad, comprensión y explicaciones, organización, índice de palabras e instrucciones breves.
4. *Organización del trabajo:*
 - a. Puesta en marcha del instrumento: diaria, pasos necesarios, programable de forma automática, duración, etc.
 - b. Disponibilidad las 24 h del día.
 - c. Procesado de los especímenes:
 - Número de especímenes que admite el analizador por bandeja.
 - Posibilidad de caga continua/discontinua.
 - Carga máxima de especímenes.
 - Posición para calibradores, controles, especímenes urgentes y especímenes especiales.
 - Uso de tubos primarios y tamaño de estos.
 - Cuando se emplean copas secundarias, volumen de estas y volumen muerto.
 - Evaporación y sistemas de protección para evitarla.
 - Predilución del espécimen (automática, programable y margen).
 - Volumen del espécimen (máximo/mínimo para todas las pruebas).
 - Sensor de nivel para el volumen de espécimen insuficiente.
 - Identificación del espécimen (código de barras, otros códigos, ajuste de códigos y bandeja especial para el código de barras) e identificación de copas secundarias (número de identificación y campo de comentarios).
 - d. Manipulación de los reactivos:
 - Preparación de los reactivos: medida del volumen, transferencia de liofilizados/tabletas/líquidos, tiempo de reconstitución y requerimientos del operador.
 - Carga de reactivos (facilidad de manejo).
 - Identificación de los reactivos (código de barras/posición).
 - Refrigeración de los reactivos.
 - Estabilidad de los reactivos en el analizador y control de esta.
 - Volumen muerto de los reactivos.

- Alarma de cambio de reactivos.
 - Cambio de reactivo durante la operación o el reposo.
 - Caducidad de los reactivos.
 - Comprobación del volumen de los reactivos (por medida o por cálculo).
 - Número de pruebas por recipiente (máximo/mínimo).
 - Capacidad de almacenamiento para 3 meses.
 - Desecho del material de embalaje y de los recipientes.
- e. Calibración:
- Frecuencia (diaria, factor fijo y estabilidad).
 - Lineal/no lineal.
 - De partida.
 - Tiempo medio de la calibración diaria.
 - Lista de carga de la calibración.
 - Informe de la calibración.
 - Gráfica de la calibración.
 - Repetición de la calibración/calibración automática.
 - Integración en el procedimiento de trabajo normal (prioridades).
 - Alarma de calibración (avisos suficientes, demasiado frecuentes o ininteligibles).
 - Procedimiento (grado de dificultad).
- f. Seguimiento:
- Procesado del espécimen.
 - Procesado de los reactivos.
 - Procesado de las medidas (gráficas de absorbancia/tiempo, control de la linealidad, control del agotamiento del sustrato y comprobación prozona).
 - Control de la temperatura.
 - Control fotométrico.
- g. Control de la calidad:
- Número de especímenes de control.
 - Magnitudes a definir (valor asignado, desviación estándar e intervalo).
 - Datos estadísticos calculados.
 - Tiempo real, diario, acumulado y numérico, y gráficos.
 - Alarmas de errores aleatorios o sistemáticos.
- h. Procesado de los resultados:
- Modo de impresión (lista de resultados por paciente o informe de paciente).
 - Almacenamiento de los resultados de los pacientes.
 - Impresión de los datos originales (absorbancia).
 - Gráficos (control de la calidad, calibración, absorbancia/tiempo).
- i. Desconexión:
- Procedimiento.
 - Tiempo.
5. *Mantenimiento*:
- a. Gasto (grado de dificultad y tiempo, diario, semanal, mensual y trimestral).
 - b. Función de aviso.

- c. Efectividad de la solución de lavado.
 - d. Consumo de reactivos para el cebado.
 - e. Alarmas (audibles, visibles, inteligibles, lista, consecuencia/solución).
 - f. Llamadas al servicio técnico (durante la evaluación, número, tiempo).
 - g. Programa de diagnóstico (ligado a módem).
 - h. Disponibilidad del servicio técnico.
 - i. Competencia del servicio técnico.
 - j. Accesorios.
6. *Flexibilidad:*
- a. Modos de análisis.
 - b. Facilidad de aplicación.
7. *Programas informáticos:*
- a. Menú de usuario.
 - b. Cambio al último menú (número de toques para ir al menú principal).
 - c. Línea de situación para orientarse en cada pantalla.
 - d. Pantalla de seguimiento con estructura del programa.
 - e. Funciones de ayuda (solución a los problemas, seleccionable en cualquier momento para cada menú).
 - f. Referencia cruzada.
 - g. Estructura de la pantalla de la operación de rutina.
 - h. Salvaguardia de los datos (palabra de paso).
 - i. Estadística para la administración (recuento de pruebas y duración de los defectos).
 - j. Precisión.
 - k. Media diaria/cálculo de mediana.
 - l. Correlación.
 - m. Peticiones de los pacientes: continua, limitada por el estado de la operación, selección de pruebas, relaciones, comentario y cambio de peticiones antes y después del procesado.
8. *Comunicación con el ordenador principal:*
- a. *Interfaz* (protocolo de comunicación uni- y bidireccional).
 - b. Manual de la *interfaz*.
9. *Tiempos:*
- a. De espécimen/cadencia (fijo/independiente de las pruebas solicitadas).
 - b. Tiempo de arranque (pruebas de rutina).
 - c. Tiempo de calibración (pruebas de rutina).
 - d. Tiempo de urgencia.
 - e. Tiempo para procesar un número diferente de especímenes (25, 50 o 100) y diferentes solicitudes de pruebas.
 - f. Registro del tiempo del operador.

Evaluación de las prestaciones analíticas

Una vez completada la evaluación de la practicabilidad, se realiza la de las prestaciones analíticas. Generalmente, la información suministrada por el fabricante contiene datos sobre estas, pero suele ser en condiciones ideales, en sus labora-

torios o en centros seleccionados. Cuando el aparato lleve cierto tiempo en el mercado, habrá publicaciones al respecto en revistas especializadas. En cualquier caso, siempre conviene realizar, al menos, una evaluación corta —inexactitud e imprecisión intraserial de cada método que se vaya a aplicar en el analizador—, en las condiciones de trabajo del laboratorio, para comprobar las prestaciones analíticas reales y, en definitiva, determinar si son o no aceptables en función de que se cumplan los objetivos de calidad analítica establecidos.

La evaluación será más o menos completa, dependiendo del tiempo disponible y de que exista información publicada sobre las prestaciones analíticas del analizador. Como no hay un protocolo aceptado internacionalmente que señale la forma de evaluar y los objetivos de calidad analítica, debe recurrirse a las guías facilitadas por organizaciones nacionales e internacionales.

Las prestaciones analíticas que deben estudiarse en una evaluación completa de cada método son: la imprecisión, la inexactitud, la linealidad, la especificidad y las interferencias, la sensibilidad y el límite de detección. En el capítulo 7 se detalla la evaluación de los métodos analíticos.

Evaluación de los componentes del analizador

En los analizadores automáticos, además de evaluar los métodos que se van a utilizar, debe valorarse también el funcionamiento de sus componentes principales. Hay que valorar el dispositivo de carga de los especímenes, los dispositivos de toma y dispensación de los especímenes y los reactivos, el sistema de termostatación, el fotométrico y el de lavado. En los apartados siguientes se relacionan cada uno de estos procesos.

Dispositivo de carga de los especímenes

En los dispositivos de carga de los especímenes debe valorarse la evaporación de estos durante su permanencia hasta su toma por las pipetas de dispensación, ya que puede ser una fuente de error importante. Ha de tenerse en cuenta que muchos analizadores emplean pocillos de espécimen con un gran cociente superficie/volumen, aspecto que influye mucho en la evaporación. El modo de evaluar la de los especímenes consiste en utilizar un suero teñido con un colorante orgánico (negro amido) para evitar o reducir los errores debidos a diferencias en las propiedades fisicoquímicas del suero y el agua. Se deposita el espécimen en el analizador, se dispensa 0,15 M de NaCl y se determina la absorbancia a 550-650 nm, a intervalos de 30 min, durante una jornada de trabajo. Luego se comparan las lecturas obtenidas con las proporcionadas por especímenes que, una vez teñidos, se habían protegido de la evaporación. Las diferencias se expresan en forma de porcentaje.

Dispositivos de toma y dispensación de los especímenes y los reactivos

Los sistemas de dispensación de los especímenes y los reactivos de los analizadores automáticos suelen estar formados por jeringas de volumen variable. Debe valorarse la inexactitud y la imprecisión de los volúmenes siguientes: mínimo, $(2 \text{ mín} + \text{máx})/3$, $(\text{mín} + \text{máx})/2$, $(\text{mín} + 2\text{máx})/3$ y máximo. Este análisis se realiza con métodos fotométricos, por lo que se necesita un fotómetro de inexactitud e imprecisión conocidas. Para llevarlo a cabo se emplean soluciones de NADH o p-nitrofenilfosfato (PNP), que se pipetea por el anali-

zador para llevar la cantidad pipeteada a un volumen determinado con agua destilada. Se realizan 30 lecturas, que se comparan con las obtenidas efectuando el mismo proceso con una pipeta de inexactitud e imprecisión conocidas.

Para calcular la imprecisión se determina la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación, teniendo en cuenta que la imprecisión calculada se debe tanto al sistema de pipeteo como al fotómetro, por lo que hay que restar la de este. La inexactitud se expresa en forma de porcentaje de la diferencia entre la absorbancia teórica obtenida con la dilución manual y la obtenida pipeteando el analizador. También debe tenerse en cuenta la inexactitud de la pipeta manual utilizada.

Otra forma de calcular la inexactitud y la imprecisión del sistema de pipeteo es mediante métodos isotópicos, utilizando un contador de centelleo de imprecisión e inexactitud conocidas, y realizando las cuentas cuando el analizador haya dispensado soluciones de un isótopo adecuado.

Sistema de termostatación

Respecto al sistema de termostatación del baño de incubación, hay que valorar el tiempo necesario para alcanzar la temperatura de trabajo y su estabilidad. Este tiempo se determina con una sonda térmica y agua destilada. Se deposita el agua en la cubeta de reacción, se coloca la sonda y se representan las temperaturas frente al tiempo a intervalos de 15 s, hasta conseguir tres lecturas consecutivas con una variación de $\pm 0,1$ °C.

Una vez alcanzada la temperatura de trabajo, se estudia también su estabilidad realizando 30 lecturas de la temperatura durante 10 min. Se representa la temperatura frente al tiempo, y se calcula la media y la desviación estándar de las 30 lecturas, descontando la imprecisión debida al termómetro. La estabilidad de la temperatura se expresa como dos desviaciones estándar.

Sistema fotométrico

Se valoran las características fundamentales del sistema fotométrico que puedan afectar a la medida. Las características principales del fotómetro que han de evaluarse son: la exactitud de la longitud de onda, la de las absorbancias y la imprecisión, la estabilidad y la linealidad fotométricas.

Exactitud de la longitud de onda. Si el analizador tiene un monocromador, se utilizará una disolución acuosa de perclorato de holmio, que presenta una serie de máximos a diferentes longitudes de onda, y se efectuará un espectro de absorbancias. Se observa dónde aparecen los máximos y se expresan las diferencias entre la longitud de onda a la que han aparecido y los valores teóricos, en forma de porcentaje y con un signo + o - para cada longitud de onda. Si el sistema selector fuera de filtros de interferencia, se desmontarán estos y se sustituirá en un fotómetro de inexactitud conocida, y luego se realizará la prueba con la disolución de perclorato de holmio como en el caso anterior.

Exactitud de las absorbancias. La evaluación de la exactitud de las absorbancias se realiza con disoluciones de absorbancia teórica conocida. Se comparan los valores medidos con los teóricos obtenidos a partir de los coeficientes de absorción molar, y se expresan los resultados como un porcentaje de inexactitud. Las disoluciones de referencia son, para 340 nm, el NADH y, para 405 nm, el p-nitrofenilfosfato.

Imprecisión fotométrica. Para valorar la imprecisión fotométrica se utiliza cualquiera de las disoluciones empleadas para estudiar la inexactitud. Se preparan diluciones que den lecturas de absorbancia comprendidas entre 0,05 y 2 unidades de absorbancia, y se realizan 30 determinaciones de cada dilución. Se obtiene la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Estabilidad fotométrica. Evaluar la estabilidad fotométrica permite estimar la variabilidad que aparece con el tiempo. Para estudiarla se emplea una disolución muy estable de PNP con una absorbancia de 1. Durante el proceso de valoración deben mantenerse todo tipo de precauciones para evitar la evaporación. Los estudios de estabilidad se pueden efectuar a corto, medio y largo plazo. A corto plazo, se determinan cada minuto las lecturas por triplicado durante 30 min. A medio plazo, se determinan cada hora durante 24 h, utilizando diferentes alícuotas. A largo plazo, se determinan cada día durante 30 días con diferentes alícuotas. Idealmente, cuando no hay deriva, la representación de las lecturas frente al tiempo proporcionará una recta de pendiente 0. También pueden obtenerse la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Linealidad fotométrica. Para valorar la linealidad fotométrica se emplean disoluciones de NADH para 340 nm, y de PNP, para 405 nm. Se parte de disoluciones de 2 unidades de absorbancia a las que se realizan diluciones seriadas con pipetas de inexactitud conocida. Las absorbancias teóricas se comparan con las medidas, y se efectúa una representación gráfica de las rectas que se obtengan.

Sistemas de lavado

La mayoría de los analizadores lleva incorporado un sistema de lavado de las cubetas de reacción y/o lectura. Un lavado deficiente de estos componentes es una causa importante de error, sobre todo cuando la reacción proporciona una lectura muy alta de absorbancia y luego otra muy baja. Para evaluar el sistema de lavado se utiliza un colorante de absorbancia alta y otro de absorbancia baja. Se pipetea por el analizador la disolución de absorbancia alta en todas las cubetas de reacción o de lectura y se hacen las medidas. Posteriormente, y tras el lavado mecánico, se pipetea la disolución de absorbancia baja y se realizan las lecturas. Y, finalmente, tras el lavado manual o después de sustituir las cubetas por otras nuevas, se hace de nuevo la prueba. Se determina la imprecisión de las medidas en ambos casos y se observa si hay diferencias significativas en las lecturas de la disolución de absorbancia menor. Si fueran importantes o las lecturas tuvieran una imprecisión diferente, se debería a que el lavado habría sido desigual o insuficiente.

Criterios de aceptabilidad

La valoración de los datos obtenidos al evaluar un analizador automático proporciona conclusiones subjetivas y objetivas. Las primeras aparecen al considerar aspectos como la facilidad de uso, la comprensión de las instrucciones del manual, el grado de atención personal que requiere, el ruido producido, el manejo de los especímenes, la solución de las alarmas, etc. Las valoraciones objetivas son las que corresponden a la evaluación de las prestaciones analíticas. Al expresarlas hay que evitar cualquier juicio que utilice términos como

bastante buena, adecuada, mala, etc., y ceñirse a si cumple o no los objetivos analíticos o criterios de aceptabilidad. Estos criterios son los que siguen:

Imprecisión analítica

La imprecisión analítica (interserial e intraserial) se considera aceptable cuando el coeficiente de variación es la mitad o menos de la variación biológica intraindividual de la sustancia. En caso de que no se cumpla este criterio, antes de rechazar el método se intentará mejorar el resultado con series nuevas, cambiando la concentración del calibrador o repitiendo la prueba.

Inexactitud analítica

Si se ha llevado a cabo la prueba por comparación de métodos, la exactitud es aceptable cuando se cumple:

- $r > 0,99$.
- La pendiente no difiere significativamente de 1.
- La intersección no es significativamente diferente de 0.
- Las medias no son significativamente distintas.

Cuando no se cumplan estos criterios, se podrá intentar que mejore el resultado utilizando otros estándares de concentración o de procedencia diferentes. Cuando se ha evaluado la inexactitud utilizando materiales con valores asignados, es difícil definir la inexactitud analítica aceptable, sobre todo por la dificultad de establecer el valor verdadero de un componente determinado en un espécimen. Como valor verdadero suele utilizarse el valor medio obtenido por muchos laboratorios que utilicen métodos semejantes. Este planteamiento parece correcto, pues los valores así obtenidos son muy semejantes a los que proporcionan los métodos definitivos. En este caso, se compara la diferencia entre los valores obtenidos y los asignados, con el error permisible máximo. Si el criterio no se cumple, podrá mejorarse usando materiales de procedencias más fiables o con matrices más parecidas a las de los especímenes de rutina.

Otros criterios

Superados los objetivos establecidos, incluidos los de los estudios específicos, se realizarán los estudios de linealidad, especificidad, interferencias y límite de detección para definir qué especímenes, por sus propiedades fisicoquímicas, su concentración u otras características, no son adecuados para analizarlos con el analizador y el método empleado.

PRINCIPALES ANALIZADORES COMERCIALES

En el momento actual existen en el mercado muchos sistemas automáticos para bioquímica clínica. Según su capacidad de procesado pueden dividirse en tres grupos: grandes sistemas y células de trabajo (*work cell*), sistemas para volúmenes elevados y sistemas para volúmenes medios-bajos. Los grandes sistemas y células de trabajo son para grandes laboratorios con gran capacidad de especímenes, mientras que los otros sistemas se ajustan a laboratorios de diferentes tamaños. En las tablas 12-2 y 12-3 se presentan los principales sistemas comerciales para volúmenes medios-altos y bajos.

TABLA 12-2 *Analizadores automáticos para bioquímica clínica y volúmenes medios-altos*

| Fabricante | Analizador | Año de comercialización y volumen | Técnicas simultáneas |
|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| Abbott | Architect c4000 | 2009 (medio) | 58 |
| | Architect c8000 | 2003 (medio) | 68 |
| | Architect c16000 | 2007 (alto) | 68 |
| Beckman Coulter | Unicel DxC 600i Synchron | 2009 (alto) | 115 |
| | Unicel DxC 680i Synchron | 2009 (alto) | 115 |
| | Unicel DxC 860i Synchron | 2009 (alto) | 120 |
| | Unicel DxC 600 | 2004 (medio) | 65 |
| | Unicel DxC 600i | 2006 (medio) | 89 |
| | Unicel DxC 800 | 2005 (alto) | 70 |
| | Unicel DxC 800i | 2008 (alto) | 120 |
| Olympus | AU480 | 2009 (medio) | 63 |
| | AU680 | 2008 (medio) | 63 |
| | AU2700 | 2000 (alto) | 51 |
| | AU5421 | 2001 (alto) | 99 |
| | AU5431 | 2001 (alto) | 99 |
| Ortho | Vitros 5600 | 2008 (alto) | 106 |
| | Vitros 350 | 2005 (medio) | 60 |
| | Vitros 5,1 FS | 2004 (alto) | 125 |
| Roche | Cobas Integra 800 | 2001 (medio) | 72 |
| | Cobas C501 | 2006 (medio) | 63 |
| | Modular | 1998 (alto) | 47-100 |
| Siemens | Dimension Vista 500 | 2009 (medio) | > 100 |
| | ADVIA 1200 | 2005 (medio) | 43 |
| | ADVIA 1800 | 2006 (medio) | 55 |
| | ADVIA 2400 | 2003 (alto) | 49 |
| | Dimension Vista 1500 | 2006 (alto) | > 100 |

TABLA 12-3 *Analizadores automáticos para bioquímica clínica y volúmenes bajos*

| Fabricante | Analizador | Año de comercialización |
|-----------------|------------------------|-------------------------|
| Beckman Coulter | AU480 | 2009 |
| Ortho | Vitros DT60 II | 1993 |
| Roche | Cobas c311 | 2009 |
| | Cobas Integra 400 Plus | 1999 |
| | Cobas c111 | 2007 |
| Siemens | Dimension Xpand Plus | 2004 |

AUTOMATIZACIÓN TOTAL DEL LABORATORIO

En los laboratorios clínicos de gran volumen, totalmente automatizados, los tubos se llevan mediante una cinta transportadora a los módulos analíticos correspondientes, donde se cargan para procesarlos. El diseño del sistema de

automatización y el de los analizadores se encarga de dirigir la conexión con la cadena. Hay dos tipos principales de conexiones: toma de muestra directa del tubo primario o de una alícuota de la cadena y toma de muestra por brazo robotizado que puede extraer temporalmente el tubo de la cadena.

Los fabricantes de los distintos sistemas indican que pueden aceptar analizadores de otras marcas, pero en la práctica estas conexiones no se hacen habitualmente y la mayoría de los analizadores son del mismo vendedor que la cadena.

Técnicas electroquímicas.

Medida de iones y pH y gases en sangre

INTRODUCCIÓN

Las técnicas electroquímicas miden la corriente o el voltaje generado por la actividad de especies iónicas específicas. Las principales técnicas electroquímicas son la potenciometría, la amperometría, la voltametría/polarografía, la coulombimetría y la conductimetría. Las técnicas electroquímicas tienen aplicaciones importantes en los laboratorios clínicos, como la medida de electrólitos y la determinación del pH y los gases en sangre. En este capítulo se presentan los fundamentos de las técnicas electroquímicas y su aplicación en los laboratorios clínicos.

CÉLULAS ELECTROQUÍMICAS

En la figura 13-1 se presenta de forma esquemática una célula electroquímica característica. Se divide en dos semicélulas, cada una de las cuales contiene un electrodo —una barra de cinc en la de la izquierda y una barra de cobre en la de la derecha— inmerso en una disolución de sus iones (ZnSO_4 a la izquierda y CuSO_4 a la derecha). Ambas semicélulas están unidas por un puente salino que contiene un electrólito inerte, como el KCl. El electrodo de la izquierda es el ánodo y en él se produce la oxidación del cinc metálico:

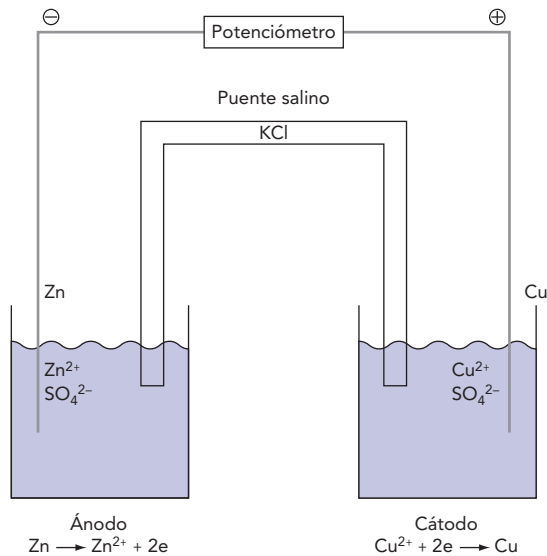
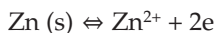
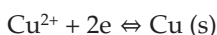


FIGURA 13-1
Célula electroquímica.



Y el electrodo de la derecha es el cátodo, en el que se produce la reducción del Cu^{2+} :



De esta forma, los electrones van desde el ánodo (cinc) al cátodo (cobre). Una célula electroquímica como esta se representa de la forma:



El potencial de una célula electroquímica ($E_{\text{célula}}$) viene dado por:

$$E_{\text{célula}} = E_{\text{c}} - E_{\text{a}}$$

donde E_{c} y E_{a} son los potenciales de reducción de las reacciones que se producen en el cátodo y en el ánodo. Estos potenciales dependen de las concentraciones de las especies responsables de los potenciales de electrodo, de acuerdo con la ecuación de Nernst:

$$E = E^0 = \frac{RT}{nF} \ln c$$

donde E^0 = potencial estándar, que es una constante característica de cada par, que se obtiene en unas condiciones determinadas; R = constante de los gases; T = temperatura en grados Kelvin; n = número de electrones que se intercambian en el proceso; F = constante de Faraday; c = concentración del ión.

TÉCNICAS POTENCIOMÉTRICAS

Las técnicas potenciométricas se basan en la medida del potencial eléctrico entre los dos electrodos de una célula electroquímica. Si se conoce la concentración del componente de una de sus semicélulas (generalmente el cátodo), por medio de la medida del potencial eléctrico podrá calcularse la concentración del componente de la otra semicélula. Sin embargo, como la ecuación de Nernst es una función de las actividades de los iones y no de las concentraciones, lo que se obtiene es la actividad, relacionada con la concentración por un factor llamado coeficiente de actividad, $a_i = f_i \times c_i$. Los coeficientes de actividad, cuyo valor es siempre menor de 1, dependen de la fuerza iónica de la disolución y, en general, disminuyen al aumentar esta fuerza. Sin embargo, debido a la incertidumbre de la contribución de los iones proteicos a la fuerza iónica, es difícil calcular exactamente los coeficientes de actividad de la mayoría de los líquidos biológicos. Para el plasma sanguíneo, se ha calculado un valor de 0,75 para el Na^+ , de 0,74 para el K^+ y de 0,31 para el Ca^{2+} .

Los resultados de las medidas potenciométricas en sangre, plasma o suero sin diluir suelen darse en forma de actividad multiplicada por un factor adecuado. En general, las determinaciones de la actividad se basan en comparar el potencial de la solución desconocida con el de varias soluciones calibradoras

de actividad conocida. Cuando las medidas potenciométricas se utilicen para determinar la concentración de los iones totales (los libres más los unidos), el espécimen deberá diluirse con un diluyente adecuado que libere el ión unido. Al mismo tiempo, la dilución establece una fuerza iónica constante, de forma que se obtiene un coeficiente de actividad también constante e independiente de la fuerza iónica del espécimen original. A este tipo de métodos se los denomina potenciometría indirecta, en contraste con la potenciometría directa que realiza la medida en el espécimen sin diluir.

ELECTRODO DE REFERENCIA

Como se ha señalado, las células electroquímicas se construyen de forma que una de las semicélulas proporcione un potencial de referencia conocido y el de la otra semicélula señale la concentración del compuesto. Hay tres electrodos que se suelen usar como referencia: el de hidrógeno, el de calomelanos y el de plata/cloruro de plata.

Electrodo de hidrógeno

Habitualmente, no se utiliza, pero es importante conocerlo porque es el electrodo de referencia que se emplea para establecer los potenciales de estado estándar. Consta de un electrodo de platino sumergido en una disolución con una actividad de H^+ igual a 1, sobre la que se burbujea H_2 gaseoso a la presión de 1 atm. La reacción que tiene lugar en el electrodo es esta:



Electrodo de calomelanos

El electrodo de calomelanos está formado por mercurio recubierto de una capa de calomelanos (Hg_2Cl_2) en contacto con una disolución electrolítica de Cl^- . El proceso que tiene lugar en el electrodo es este:



Electrodo de plata/cloruro de plata

El electrodo de plata/cloruro de plata consta de una barra de plata, recubierta térmica o electrolíticamente con cloruro de plata e introducida en una disolución de Cl^- . El proceso en el electrodo es este:



ELECTRODOS METÁLICOS

Los electrodos metálicos están formados por un metal inmerso en una disolución que contiene sus iones. Cuando el metal es inestable en forma pura, se utiliza una amalgama del mismo. El potencial de un electrodo metálico lo da la posición de una reacción redox en la interfase electrodo-disolución.

ELECTRODOS SELECTIVOS A LOS IONES

Principios generales

Los potenciales de membrana son diferencias de potencial que se establecen entre los dos lados de una membrana debido a su permeabilidad a determinados iones. Supongamos una membrana selectiva para un ión que separa dos compartimentos, 1 y 2, con disoluciones del ión de actividades a_1 y a_2 . Si la primera actividad es mayor que la segunda, en el compartimento 1 los iones se unirán a grupos específicos de la superficie de la membrana, lo que hará que se separen iones unidos en el lado 2 de la membrana. Es como si la membrana fuera permeable al ión. El proceso sigue hasta que se alcance el equilibrio, lo cual tiene lugar cuando la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana compensa la diferencia de actividad del ión que difunde.

El potencial de membrana (E) viene dado por la ecuación de Nernst:

$$E = RT/nF \ln a(2)/a(1)$$

Si en 2 hay una disolución de referencia de actividad constante, la ecuación se transforma en:

$$E = E' + N/n \log a(1)$$

donde $E' = \text{constante}$.

Así, el potencial de membrana es directamente proporcional al logaritmo de la actividad del ión difusible en la disolución que se quiere medir.

Los potenciales de las disoluciones 1 y 2 se miden con un electrodo adecuado. Para membranas de vidrio, el potencial de la disolución de referencia (2) se mide con un electrodo de Ag/AgCl, y el potencial de la disolución que quiere medirse (1) se obtiene con un electrodo selectivo. Cada electrodo tiene una sensibilidad s , que suele estar comprendida entre 0,9 y 1.

Tipos

Los principales electrodos selectivos a los iones son los de vidrio, los de estado sólido y los de cambio de ión.

Electrodos de vidrio

Los electrodos de vidrio se construyen con vidrios especiales permeables a los iones como H^+ , Na^+ , K^+ , Li^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ag^+ y NH_4^+ . Los electrodos de vidrio de pH se producen de una forma combinada que incluye el electrodo indicador y el de referencia. Usar un solo electrodo simplifica mucho la medición del pH. En la figura 13-2 se presenta un electrodo de pH combinado.

Electrodos de estado sólido

Los electrodos de estado sólido están hechos de membranas formadas por cristales homogéneos o por una sustancia activa embebida en una matriz inerte. Los cristales y la matriz contienen una sal poco soluble del anión que quiere determinarse. Se han construido electrodos con cristales homogéneos para

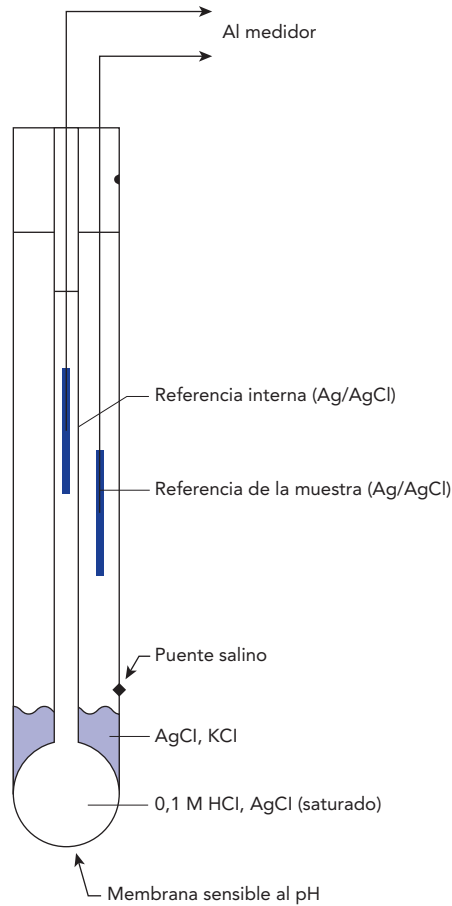


FIGURA 13-2
Electrodo de pH combinado.

medir el F^- (cristal de fluoruro de lantano), el Cl^- (cristal de cloruro de plata), el Br^- (cristal de bromuro de plata), el S^{2-} (cristal de sulfato de plata) y el Se^{2-} (cristal de seleniuro cúprico).

Electrodos de cambio de ión

Los electrodos de cambio de ión se construyen con membranas que incluyen un transportador selectivo para un ión disuelto en un disolvente inerte. Tanto el transportador como el disolvente son insolubles en agua. Para el K^+ se usa un electrodo cuyo transportador es el antibiótico valinomicina, y para el Ca^{2+} se ha construido un electrodo cuyo transportador es el dioctil-fosfonato.

ELECTRODO DE PCO_2

El electrodo de pCO_2 (presión de dióxido de carbono) (fig. 13-3), se denomina también electrodo de Severinghaus y es un electrodo selectivo para los iones modificado. Consta de un electrodo de vidrio de pH sumergido en una disolución de bicarbonato 5 mM, que está separada del espécimen por una membrana de teflón permeable a las moléculas de CO_2 . Esta membrana permite que

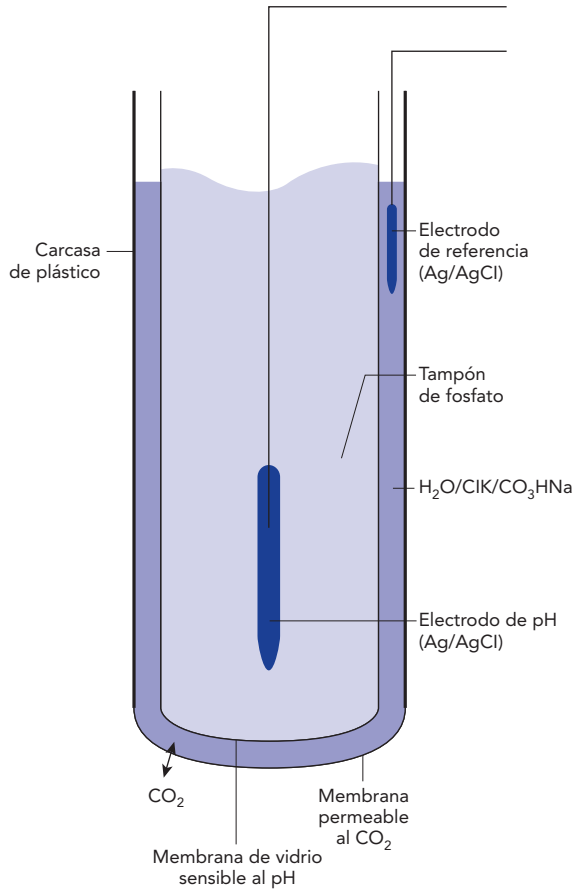


FIGURA 13-3
Electrodo de $p\text{CO}_2$.

pasen a través de sus moléculas sin carga eléctrica como el CO_2 , e impide que lo hagan las moléculas cargadas. Entre la disolución y el vidrio sensible a los H^+ del electrodo de medida hay un espaciador de nailon o celofán. El electrodo contacta también con el electrodo de referencia de Ag/AgCl .

El CO_2 disuelto se difunde desde el espécimen a través de la membrana y produce un cambio de pH de la disolución de bicarbonato, de acuerdo con los equilibrios:



Como las variaciones de la $p\text{CO}_2$ producen variaciones del pH en la disolución electrolítica, la diferencia de potencial eléctrico es una función de la $p\text{CO}_2$.

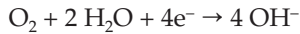
TÉCNICAS AMPEROMÉTRICAS

Las técnicas amperométricas son técnicas electroquímicas que se basan en la medida de la intensidad de la corriente que pasa por una célula electroquímica cuando se aplica un potencial constante entre los electrodos.

ELECTRODO DE PO₂

El electrodo de pO₂ (presión de oxígeno) se denomina electrodo de Clark (fig. 13-4). Consta de una célula electroquímica con un cátodo de platino y un ánodo de Ag/AgCl sumergido en una disolución de cloruro potásico y amortiguador fosfato. Este conjunto está separado del espécimen por una membrana de polipropileno permeable a las moléculas de O₂.

Se aplica al cátodo de platino una corriente eléctrica de polarización de -630 mV, que es el potencial del par O₂/H₂O. A este potencial específico, sólo se reducen las moléculas de O₂, lo que crea una corriente de electrones proporcional a la cantidad de moléculas presentes, de acuerdo con la reacción:



Los electrones provienen del ánodo de Ag/AgCl, de acuerdo con esta reacción:

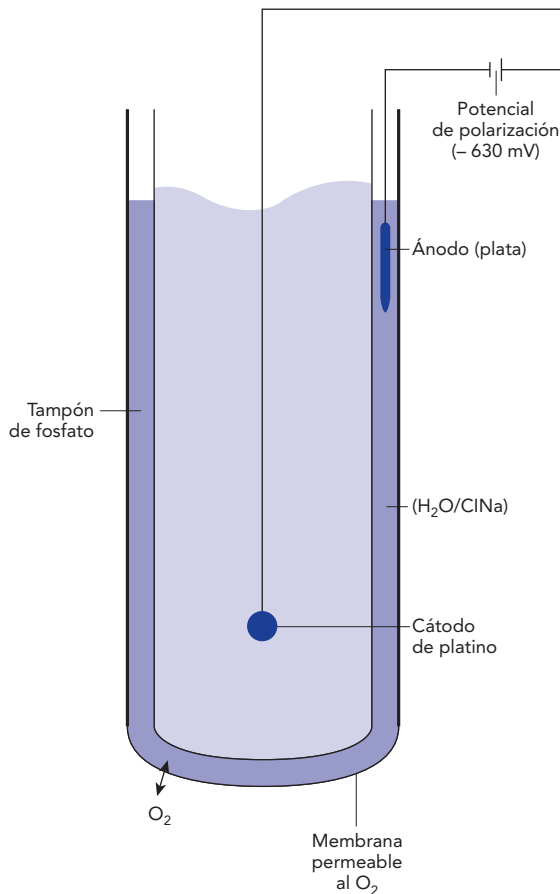


FIGURA 13-4
Electrodo de pO₂.

Cuando no hay oxígeno, la corriente entre los electrodos es cero, pero cuando hay, en el espécimen se produce la difusión a través de la membrana y llega hasta el cátodo, donde se reduce y se forma OH^- . Siempre que el pH de la disolución interna sea constante, la corriente producida entre el cátodo de platino y el ánodo de Ag/AgCl será proporcional a la presión de oxígeno del espécimen.

VOLTAMETRÍA/POLAROGRAFÍA

La voltimetría es una técnica electroquímica en la que se mide la corriente de la célula electroquímica cuando el potencial entre el electrodo de medida y el de referencia varía con el tiempo. Por su parte, la polarografía describe el caso especial en que el electrodo de trabajo es un electrodo de goteo de mercurio. Los métodos voltamétricos son muy sensibles y capaces de analizar simultáneamente varios elementos, y permiten hacer estudios de especiación (estados de oxidación).

En los métodos voltamétricos, el electrodo de trabajo se coloca en la disolución. Al aumentar el potencial del electrodo se alcanza un valor en el que empieza a fluir corriente, lo que indica el inicio de una reacción electroquímica.

VOLTAMETRÍA ANÓDICA DE REDISOLUCIÓN

En este método, se utiliza una célula voltaica cuyo electrodo está formado por una barra de grafito recubierta de mercurio. Cuando se aplica un potencial negativo al ánodo, los metales catiónicos se depositan sobre él en sus formas metálicas. Entonces se detiene el voltaje aplicado. Como sobre el ánodo hay un exceso de electrones, la corriente fluye hacia el cátodo. Cada metal depositado sobre el ánodo volverá a oxidarse a sus formas iónicas respectivas, esto es, se redisolverá del ánodo. Los metales con menores potenciales de oxidación se redisuelven primero; es decir cada metal se redisuelve del ánodo en el orden de potencial de oxidación, que se registra como el potencial a mitad de onda, que es una constante para un metal dado. La corriente total asociada con la redisolución de cada metal es proporcional a la concentración del mismo. Esta técnica se emplea para determinar oligoelementos y puede determinar varios a la vez.

TÉCNICAS CULOMBIMÉTRICAS

La culombimetría es una técnica electroquímica en que se mide la carga que pasa entre los dos electrodos de una célula electroquímica. De acuerdo con la ley de Faraday, la carga es proporcional a la cantidad de sustancia:

$$Q = nFm$$

donde Q = carga en culombios; n = número de electrones del proceso; F = constante de Faraday; m = cantidad de sustancia oxidada o reducida.

La aplicación principal de la culombimetría en los laboratorios clínicos ha sido determinar el Cl^- , y aunque esta técnica prácticamente ya no se utiliza, se describe a continuación con fines formativos.

El sistema electrolítico consta de un electrodo generador y otro auxiliar. El generador es de plata y, al aplicar la corriente, se produce la reacción:



Los iones Ag^+ precipitan con los iones Cl^- presentes en la disolución del espécimen. Una concentración baja de electrólito transportador (iones de nitrato) hace que se establezca una pequeña corriente entre los electrodos indicados durante la valoración. En el punto final, cuando aparecen en la disolución iones Ag^+ —que no han precipitado por agotarse los iones Cl^- —, la intensidad de la corriente aumenta y este aumento dispara un circuito que detiene la medida del tiempo. El sistema se calibra con soluciones de concentración conocida de Cl^- .

CONDUCTIMETRÍA

La conductimetría mide el flujo de corriente entre dos electrodos despolarizados entre los que se ha establecido un potencial eléctrico conocido. La conductimetría de las disoluciones acuosas depende de la concentración de electrólitos y de su fuerza iónica. El método de Coulter para recontar electrónicamente las células sanguíneas en suspensión (v. capítulo 20) se basa en que la conductividad de las células sanguíneas es menor que la de la disolución salina utilizada como medio de suspensión.

BIOSENSORES

Los biosensores son dispositivos que constan de un componente bioquímico o biológico como elemento de reconocimiento molecular, y un transductor que convierte la señal biológica en otra eléctrica que se puede cuantificar. El componente detector de la mayoría de los biosensores está inmovilizado en una membrana o dentro de un gel, de forma que el biocatalizador se mantenga en contacto íntimo con el transductor y pueda reutilizarse.

La naturaleza de la interacción entre el sensor biológico y el transductor físico da lugar a los diferentes tipos de biosensores. Los principales transductores que se utilizan en estos son amperométricos, electrodos selectivos a los iones, transistores de efecto de campo, fotomultiplicadores o termistores.

TIPOS DE BIOSENSORES

Enzimáticos

En los biosensores enzimáticos se acopla una reacción enzimática con un electrodo amperométrico o potenciométrico.

Amperométricos

En 1962 se describió un electrodo enzimático para glucosa que acoplaba un electrodo de pO_2 con una reacción catalizada por la glucosa oxidasa. Se medía el descenso de la pO_2 , que es proporcional a la concentración de glucosa. La glucosa oxidasa puede inmovilizarse en la cara externa de la membrana per-

meable al oxígeno frente al cátodo de diversas formas. La más habitual es integrarla en un gel o unirla de forma covalente a la superficie del electrodo de oxígeno.

Se han diseñado biosensores amperométricos para medir la acetilcolina con acetilcolinesterasa, el lactato con lactato oxidasa, el ácido úrico con uricasa y el etanol con alcohol oxidasa. El sustrato difunde hacia la capa enzimática, donde se deshidrogena y se forma peróxido de hidrógeno, que difunde hacia el ánodo y produce una corriente proporcional a la formación de peróxido de hidrógeno.

Potenciométricos

Los primeros electrodos enzimáticos potenciométricos se basaban en el electrodo de pH o en los electrodos sensibles a los iones. Un ejemplo es el electrodo de urea, que se funda en la hidrólisis de esta por la ureasa. La reacción enzimática produce amoníaco, que se hidroliza para dar NH_4^+ , detectado luego por el electrodo.

Los electrodos potenciométricos sensibles a los gases que incorporan enzimas se han diseñado para medir el amoníaco y el dióxido de carbono. Estos sensores se emplean con desaminasas y descarboxilasas, que producen sendos gases que pasan a través de la membrana permeable al gas del electrodo sensible a los gases.

Inmunológicos

Los biosensores inmunológicos o inmunosensores son dispositivos analíticos que detectan la unión de un antígeno a su anticuerpo específico, acoplado a la reacción inmunoquímica a la superficie de un dispositivo transductor. Según el transductor que se utilice, los inmunosensores pueden ser de tres clases: ópticos, piezoeléctricos y electroquímicos. Además, de acuerdo con el formato de inmunoanálisis que se use, pueden ser directos, en los que la reacción inmunoquímica se determina directamente midiendo los cambios físicos que induce la formación del complejo, o indirectos, en los que se combina un marcaje detectable con el anticuerpo o el antígeno de interés.

ANÁLISIS DE ELECTRÓLITOS EN LOS LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

La mayoría de los analizadores automáticos para bioquímica clínica incorporan un módulo para medir electrólitos (Cl^- , Na^+ y K^+) en los líquidos biológicos. Los dispositivos electroquímicos que más se usan en estos analizadores para medir electrólitos son los electrodos selectivos, construidos generalmente con vidrios especiales de borosilicato y permeables a los iones que se desean medir. Las medidas con los electrodos selectivos pueden ser directas, esto es, sin dilución previa del espécimen, o indirectas, diluyéndolo.

VALORES DE REFERENCIA

En la tabla 13-1 se dan los valores de referencia de los electrólitos en suero y orina.

TABLA 13-1 Valores de referencia de los electrólitos en sangre y orina

| Electrólito | Suero (mmol/l) | Orina (mmol/día) |
|-------------|----------------|------------------|
| Cloruro | 97-107 | 110-250 |
| Sodio | 136-145 | 75-200 |
| Potasio | 3,5-5,3 | 25-123 |

PRINCIPALES ALTERACIONES

Sodio

Las principales alteraciones del sodio son la hipernatremia y la hiponatremia. Las causas principales de *hipernatremia* son la deshidratación, esto es, una pérdida mayor de agua que de sodio, o el exceso absoluto de sodio. La deshidratación puede deberse a una gran sudación, vómitos, diarrea, poliuria, una disminución de la secreción o de la actividad de la hormona antidiurética, y a diuresis osmótica. Con relación al exceso absoluto de sodio, sus causas principales son la administración de una solución salina, el hipoaldosteronismo y —asociado con hipercalcemia e hipopotasemia— la enfermedad hepática, la insuficiencia cardíaca, el embarazo y las quemaduras.

Las causas de la *hiponatremia* pueden ser la pérdida absoluta de sodio del organismo o su dilución. Entre las causas de la pérdida absoluta de sodio se encuentran la sudación excesiva, los vómitos prolongados, la diarrea persistente, las enteropatías perdedoras de proteínas y la pérdida renal de sodio (uso inadecuado de diuréticos, carencia de aldosterona, poliuria grave, acidosis metabólica, diuresis osmótica y acidosis tubular renal). Entre las causas de la dilución se encuentran una retención excesiva de agua, un edema, la insuficiencia cardíaca, una diabetes mellitus descontrolada, la cirrosis hepática, el síndrome nefrótico, la malnutrición y el síndrome de secreción inadecuada de la hormona antidiurética.

Potasio

Las alteraciones del potasio son la hiperpotasemia y la hipopotasemia. La *hiperpotasemia* puede deberse a un aumento absoluto del contenido de potasio del organismo o a una desviación del potasio intracelular hacia el líquido extracelular. Las causas principales del incremento del potasio corporal son la administración de diuréticos y el descenso de la excreción de potasio por la orina, por ejemplo en la insuficiencia renal, la acidosis y la insuficiencia suprarrenal. Las desviaciones del potasio intracelular hacia el líquido extracelular se deben, entre otras circunstancias, a la deshidratación y a la cetoacidosis diabética.

La *hipopotasemia* puede tener por causas un descenso de la ingestión de potasio, una redistribución de este desde el líquido extracelular hacia el interior de las células o un aumento de las pérdidas de potasio por el tubo digestivo (vómitos, diarrea y fístulas intestinales) o el riñón (hiperaldosteronismo y diuréticos).

Cloruros

Las *hipercloremias* se deben a deshidratación, acidosis tubular renal, insuficiencia renal aguda, diabetes insípida, intoxicación por salicilatos o alcalosis respiratoria. Las causas de las *hipocloremias* son la nefritis con pérdida de sal, los vómitos prolongados, la acidosis metabólica, la alcalosis metabólica y la secreción gástrica persistente.

ANALIZADORES AUTOMÁTICOS DE PH Y GASES

Los analizadores automáticos de pH y gases sanguíneos son aparatos que miden el pH, la presión parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$) y la presión parcial de oxígeno ($p\text{O}_2$) mediante electrodos específicos y, a partir de las medidas y con algoritmos programados, calculan diversos parámetros derivados, muy útiles para clasificar y tratar las alteraciones del equilibrio acidobásico de la sangre.

La evolución de los analizadores de pH y gases en sangre durante los últimos años ha sido enorme. Estos analizadores proporcionan resultados que deben conocerse lo antes posible y su uso se ha extendido cada vez más hacia la cabecera del enfermo en los servicios de urgencia y unidades de cuidados intensivos. Estas circunstancias han hecho que se diseñen aparatos cada vez más pequeños, más fáciles de manejar y con un menor mantenimiento. Se ha pasado de los equipos con sistemas de electrodos grandes y de mantenimiento complejo a aquellos con electrodos miniaturizados y desechables. Asimismo, en el momento actual sólo los aparatos más grandes utilizan bombonas de gases con sistemas de humidificación para la calibración. Hay dos clases principales de analizadores de pH y gases en sangre; los que emplean casetes de un solo uso y los que emplean cartuchos de reactivos de uso múltiple.

SISTEMAS DE CASETES DE UN SOLO USO

El aparato utiliza casetes de un solo uso que contienen la solución de calibración y los sensores electroquímicos miniaturizados necesarios para el análisis. Los electrodos sensores se autocalibran y proporcionan alarmas cuando haya un error de calibración. El analizador y los electrodos no necesitan mantenimiento y los problemas de bloqueo por coágulos de sangre quedan confinados a la casete que se usa. Tras la medida, la casete con los desechos se extrae del analizador y se elimina mediante los sistemas de eliminación de residuos del laboratorio.

SISTEMAS DE CARTUCHOS DE REACTIVOS DE USO MÚLTIPLE

En estos sistemas, los electrodos sensores y los reactivos (calibradores, solución de lavado y controles de la calidad) se encuentran en contenedores individuales. Asimismo, el cartucho lleva incorporado un depósito cerrado de recogida de desechos. El número de muestras que pueden realizarse con cada cartucho varía de unos analizadores a otros y suele estar comprendido entre 25 y 750. Una vez cargado en el analizador y abierto, el cartucho tiene una vida de entre 15 y 30 días. La mayoría de analizadores requiere un mantenimiento mínimo.

INTRODUCCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra se introduce en la mayoría de los analizadores por aspiración de un volumen determinado. La cantidad de espécimen necesario varía de unos analizadores a otros y suele oscilar entre 50 y 150 μl . La muestra puede aspirarse de jeringas, capilares, tubos, ampollas y recipientes con gases espirados. La medición se realiza a 37 °C. La termostatación es un requisito fundamental, pues las variaciones de temperatura en los electrodos causan variaciones del resultado del pH y de la $p\text{CO}_2$. En el caso del primero, cada aumento de dos grados centígrados provoca un descenso de 0,03 unidades, mientras que en el de la $p\text{CO}_2$, un aumento de un grado hace aumentar esta aproximadamente un 4-5%.

CALIBRACIÓN

La calibración es la operación que ajusta las respuestas de los electrodos con un estándar de referencia. La calibración correcta es uno de los pilares esenciales de la fiabilidad de los resultados. Los analizadores de pH y gases se calibran a 1 punto o a 2 puntos. La calibración a 1 punto ajusta el electrodo a una concentración (alta o baja) y normalmente se realiza a intervalos frecuentes e incluso, en algunos sistemas, antes de cada medición. La calibración a 2 puntos ajusta el electrodo a dos concentraciones (alta y baja) y generalmente se realiza a intervalos programables que van de 2 a 24 h.

Los analizadores de pH y gases en sangre se calibran utilizando soluciones de calibración con un pH y unas concentraciones de CO_2 y O_2 conocidas. Para el pH se emplean disoluciones amortiguadoras con pH alto y bajo. Con los dos puntos de calibración, el analizador establece la linealidad de la medición. La $p\text{O}_2$ y la $p\text{CO}_2$ se calibran con gases de calibración con una fracción volumétrica constante de O_2 y CO_2 y con un sistema de humidificación, o por medio de líquidos previamente equilibrados con gases de concentración conocida, gracias a un mezclador de gases.

Habitualmente, se combinan las mezclas de gases, de manera que con dos botellas o con dos ampollas con gases se calibren ambos electrodos a dos puntos. Las mezclas más usadas son estas: gas de calibración (5% de CO_2 , 12% de O_2 y 87% de N_2) y gas de pendiente (10% de CO_2 , 0% de O_2 y 90% de N_2). Los analizadores tienen incorporado un barómetro y convierten automáticamente los porcentajes en mmHg según estas fórmulas:

$$p\text{CO}_2 = [\text{presión barométrica (mmHg)} - 47 \text{ mmHg}] \% \text{CO}_2 / 100$$

$$p\text{O}_2 = [\text{presión barométrica (mmHg)} - 47 \text{ mmHg}] \% \text{O}_2 / 100$$

donde 47 mmHg es la presión de vapor del agua.

Las composiciones de los gases de calibración corresponden a un intervalo de 38 a 76 mmHg para la $p\text{CO}_2$, y de 0 a 152 mmHg para la $p\text{O}_2$.

MAGNITUDES DERIVADAS

A partir del pH, la $p\text{CO}_2$ y la $p\text{O}_2$, y utilizando los algoritmos adecuados, los analizadores de pH y gases en sangre calculan diversas magnitudes

derivadas, útiles para evaluar los trastornos del equilibrio acidobásico de la sangre. A continuación se describen las magnitudes derivadas más importantes:

- CO_3H^- : concentración de hidrogenocarbonato plasmático (bicarbonato real, en mmol/l). Se obtiene a partir del pH y la pCO_2 mediante la expresión:

$$\text{CO}_3\text{H}^- = 0,0307 \times (\text{pCO}_2) \times 10^{(\text{pH}-6,1)}$$

Expresión que se obtiene de la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log [\text{CO}_3\text{H}^-]/[\text{CO}_2] = 6,1 + \log[\text{CO}_3\text{H}^-]/0,0307 (\text{pCO}_2)$$

donde 0,0307 es el coeficiente de solubilidad del CO_2 en la sangre.

- CO_2 total: concentración total del dióxido de carbono en sangre. Está formado por CO_3H^- , CO_3^{2-} y carbaminos, y por CO_3H_2 y CO_2 disuelto (mmol/l). Se obtiene de la suma $0,0307 (\text{pCO}_2) + \text{CO}_3\text{H}^-$.
- Exceso de base (BE): concentración de ácido o base necesaria para llevar la sangre a un pH de 7,40, con una pCO_2 de 40 mmHg y a 37 °C. Se calcula con el nomograma de Siggaard-Andersen:

$$\text{BE} = [1-0,014 \text{ Hb}] [\text{CO}_3\text{H}^-] - 24,8 + (1,43 \text{ Hb} + 7,7) (\text{pH} - 7,4)$$

- BE-ecf: exceso de base del líquido extracelular. Se obtiene mediante la ecuación:

$$\text{BE-ecf} = \text{CO}_3^- - 24,8 + 16,2 (\text{pH} - 7,4)$$

- $\text{st CO}_3\text{H}^-$: hidrogenocarbonato estándar para una pCO_2 de 40 mmHg (mmol/l).
- st pH : pH estándar para una pCO_2 de 40 mmHg.
- $\text{O}_2 \text{ sat}$: saturación de oxígeno (%).
- $\text{O}_2 \text{ cont}$: contenido total de oxígeno (mmol/l). Equivale a la suma del oxígeno libre más el unido a la hemoglobina (Hb), y se obtiene por medio de la fórmula:

$$0,0014 \times \text{pO}_2 + 1,39 \times \text{Hb} \times \text{O}_2 \text{ sat}$$

donde el coeficiente 0,0014 es la solubilidad del oxígeno en la sangre a 37 °C, la saturación de oxígeno se obtiene a partir de diversos nomogramas y el coeficiente 1,39, que representa mililitros de oxígeno por gramo de hemoglobina se obtiene a partir de la expresión:

$$4 \times 22.400/66.546 = 1,39$$

donde 4 = número de moles de oxígeno que puede unir una molécula tetramérica de hemoglobina; 22.400 = volumen que ocupa un mol; 64.456 = peso molecular de la hemoglobina.

CAUSAS DE ERROR EN LOS ANALIZADORES DE PH Y GASES

Las causas principales de error en las medidas del pH y los gases en sangre se deben al procesamiento inadecuado de los especímenes, las alteraciones de los electrodos de medida y los fallos de la termostatación.

Procesamiento inadecuado de los especímenes

La recogida y el tratamiento preanalítico adecuados de las muestras para los análisis de gases en sangre son fundamentales para obtener unos resultados exactos y un buen funcionamiento del analizador. Debe emplearse el anticoagulante correcto, la muestra debe mezclarse suavemente en el dispositivo de recogida y hay que realizar el análisis lo antes posible. Este procedimiento reducirá el riesgo de introducir coágulos sanguíneos en el analizador. Algunos analizadores están diseñados para evitar que los coágulos lleguen a los sensores al hacer la puerta de entrada la parte más estrecha de la ruta de la muestra.

Uno de los fallos más frecuentes se produce por la entrada de aire en el espécimen, que puede tener lugar en el recipiente de extracción o en la cámara de medida. Como el aire ambiental tiene una pO_2 de 160 mmHg y una pCO_2 prácticamente igual a cero, los gases se equilibran entre el contenido del espécimen y el aire, y por ende disminuye la pCO_2 del espécimen y aumenta la pO_2 . Otra causa frecuente de error es la demora en realizar el análisis, ya que entonces las células sanguíneas consumen O_2 y producen CO_2 .

Alteraciones de los electrodos

En lo referente a las alteraciones de los electrodos, pueden producirse en los tres tipos: el de pH, el de pCO_2 y el de pO_2 . El electrodo de vidrio para la medida del pH es susceptible de deshidratación y se contamina con frecuencia con las proteínas de la sangre. En tales casos, la respuesta del electrodo es lenta y suele proporcionar pH bajos. Para evitar este problema, debe pasarse con frecuencia una solución desproteinizante.

La membrana del electrodo de pCO_2 ha de cambiarse periódicamente. Al envejecer la membrana, aparecen alteraciones materiales, se contamina con proteínas y se hace permeable a los H^+ . Esto hace que la respuesta del electrodo sea lenta y los resultados de la pCO_2 , bajos. Como el electrodo de pCO_2 está lleno de una solución de electrolitos que puede contaminarse o salirse del recipiente, hay que comprobar su estado periódicamente.

Los problemas principales del electrodo de pO_2 también proceden de la membrana. Las alteraciones materiales y la contaminación con proteínas producen respuestas lentas y resultados bajos anómalos. Cuando esto ocurra, deberá cambiarse la membrana. Asimismo, el electrodo de pO_2 plantea el problema de la pérdida de O_2 por difusión, cuando el instrumento se calibra con una pO_2 muy diferente a la de los especímenes. Por esto, hay que calibrar el analizador con presiones parciales de O_2 cercanas a la de la sangre. Por otra parte, el depósito de plata en el cátodo conduce a resultados erróneos, por lo que debe limpiarse periódicamente el electrodo de platino con una sustancia adecuada. Otra fuente importante de problemas del electrodo de pO_2 deriva

de la contaminación del electrólito de relleno o de su pérdida. Asimismo, el electrodo de pO_2 proporciona resultados bajos anómalos cuando se contamina con microorganismos aerobios.

Fallos de la termostatación

Los fallos de la termostatación de la cámara de medida son otra fuente posible de error. Las temperaturas por encima de $37\text{ }^\circ\text{C}$ producen valores menores de pH y mayores de pCO_2 , y viceversa, las temperaturas por debajo de $37\text{ }^\circ\text{C}$ proporcionan valores mayores de pH y menores de pCO_2 .

MATERIALES PARA CONTROLAR LA CALIDAD DEL PH Y LOS GASES

Control del pH

Para controlar las medidas del pH hay amortiguadores de fosfato, certificados como materiales de referencia. El valor del pH se establece con el amortiguador certificado, que recibe el nombre de material primario de control de la calidad y debe utilizarse tras la tonometría —ver *infra*— tan pronto como se pueda.

Control de la pO_2 y la pCO_2

En cambio, no hay soluciones de referencia para controlar las medidas de pO_2 y pCO_2 . El material de control ideal debe tener unas propiedades acidobásicas, una capacidad de amortiguar el O_2 y una curva oxígeno-hemoglobina similares a las de la sangre, y el único material de control que puede reunir estas propiedades es la misma sangre.

Así pues, el material ideal para controlar la calidad del pH y los gases en sangre es la sangre total fresca con valores de pCO_2 y pO_2 conocidos. La sangre empleada en el control de la calidad no debe contener plaquetas ni leucocitos, para reducir el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono. Esto se consigue centrifugando la sangre, separando la capa superior por aspiración y resuspendiendo los eritrocitos en el plasma. Luego, para establecer los valores de pCO_2 y pO_2 , la sangre reconstituida se equilibra en un tonómetro.

La tonometría consiste en poner en contacto un espécimen líquido con un gas de composición conocida, hasta conseguir el equilibrio entre las dos fases, la líquida y la gaseosa, de forma que se establezca una presión parcial conocida del gas en el líquido. Hay dos tipos fundamentales de tonómetros: unos están formados por un recipiente de vidrio fijado a un eje y cerrado en una cámara de humidificación a la temperatura constante de $37\text{ }^\circ\text{C}$, y en ellos se produce una superficie máxima para el intercambio gaseoso. En otros, llamados tonómetros de burbujeo, se introduce el gas a presión dentro del recipiente que contiene el espécimen.

Hasta el momento no se ha encontrado un tipo de solución ideal para sustituir a la sangre fresca, que, como se ha visto, tiene limitaciones e inconvenientes. Se han probado soluciones acuosas con un amortiguador de hidrogenocarbonato, soluciones con etilenglicol, otras acuosas con proteínas o con compuestos fluorocarbonados, suspensiones de eritrocitos estabilizados, solu-

ciones de hemolizados de eritrocitos y soluciones acuosas con hemoglobina humana. Varias casas comerciales venden soluciones de control para el pH y los gases en sangre adecuadas para los analizadores automáticos. La mayoría de ellas tienen asignados tres valores (fisiológico, de acidosis y de alcalosis) con los que se puede realizar un control de la calidad. Sin embargo, cada solución tiene ventajas y desventajas propias que deberá evaluar el laboratorio.

COOXIMETRÍA

Es la medida de la concentración de las diversas especies de hemoglobina de la sangre. Los cooxímetros son dispositivos que llevan algunos analizadores de pH y gases en sangre con los cuales se determina la concentración de hemoglobina oxigenada (oxiHb), la hemoglobina desoxigenada (desoxiHb), la carboxihemoglobina (COHb) y la metahemoglobina (MetHb) en forma de porcentaje de la concentración total de la muestra de sangre.

El cooxímetro es un espectrofotómetro con lectura a varias longitudes de onda. Cada especie de hemoglobina presenta una curva de absorción característica. Los instrumentos con lecturas a cuatro longitudes de onda determinan las cuatro especies de hemoglobinas señaladas anteriormente. Los aparatos con lecturas a más longitudes de onda pueden reconocer además colorantes y pigmentos, otras especies de hemoglobina o proteínas anómalas.

La cooximetría se utiliza cuando se sospecha una intoxicación, la hipoxia no mejora con la administración de oxígeno, hay una discrepancia entre la pO_2 de una determinación de gases en sangre y la saturación de oxígeno mediante oximetría de pulso o el clínico sospecha otras dishemoglobinemias como la metahemoglobinemia o la carboxihemoglobinemia.

PRINCIPALES ANALIZADORES COMERCIALES PARA EL PH Y LOS GASES

En la tabla 13-2 se ofrece una relación de los principales analizadores del mercado. Además del pH, la pCO_2 y la pO_2 , se indican los sistemas que miden otros parámetros, como los iones (Na^+ , K^+ y Cl^+), Ca^{2+} , Mg^{2+} , la glucosa, el lactato, la urea y la creatinina.

VALORES DE REFERENCIA DEL PH Y LOS GASES EN SANGRE, Y PRINCIPALES ALTERACIONES

Valores de referencia

En la tabla 13-3 se presentan los valores de referencia de los parámetros del equilibrio acidobásico y de la presión de oxígeno de las sangres arterial y venosa en adultos.

Principales alteraciones

Las alteraciones del equilibrio acidobásico pueden clasificarse en dos grandes grupos: metabólicas y respiratorias. En ambos casos, cuando el pH de la sangre desciende por debajo de 7,35, se produce acidosis y, cuando supera 7,45, alcalosis.

TABLA 13-2 Principales analizadores de pH y gases en sangre del mercado

| Fabricante y modelo | Año | Tiempo de análisis (s) | Volumen para gases (μl) | Iones | Otros parámetros | Cooxímetro |
|----------------------|------|------------------------|-------------------------|-------|------------------|------------|
| Abbott | | | | | | |
| i-Stat I | 2001 | 130-200 | 95 | Sí | Sí | No |
| IL | | | | | | |
| Gem Premier 3500 | 2009 | 85 | 135 | Sí | Sí | No |
| Gem Premier 4000 | 2006 | 95 | 150 | Sí | Sí | Sí |
| Nova | | | | | | |
| Critical Care Xpress | 2003 | 62 | 60-210 | Sí | Sí | Sí |
| Serie pHox | 2002 | 45-52 | 40-125 | Sí | Sí | No |
| Radiometer | | | | | | |
| ABL 80 | 2006 | 100-140 | 70-105 | Sí | Sí | Sí |
| ABL 800 | 2004 | 145-200 | 35-195 | Sí | Sí | Sí |
| Roche | | | | | | |
| Cobas b221 | 2004 | 66-120 | 40-186 | Sí | Sí | Sí |
| Siemens | | | | | | |
| Rapid Point 300 | 2009 | 125 | 75-120 | Sí | Sí | No |
| Rapid Point 400 | 2001 | 60 | 100 | Sí | Sí | No |
| Rapid Point 1200 | 2005 | 60 | 60-175 | Sí | Sí | Sí |

losis. Asimismo, las alteraciones de dicho equilibrio pueden ser simples o mixtas y, a su vez, las simples pueden ser descompensadas o compensadas.

Alteraciones simples

En la tabla 13-4 se presentan las alteraciones de los parámetros del equilibrio acidobásico en los trastornos simples compensados:

TABLA 13-3 Valores de referencia de los parámetros del equilibrio acidobásico y de la presión de los gases sanguíneos

| Parámetro | Sangre arterial | Sangre venosa |
|--|-----------------|---------------|
| pH | 7,35-7,45 | 7,33-7,43 |
| pCO ₂ (mmHg) | 35-45 | 38-50 |
| HCO ₃ ⁻ (mmol/l) | 22-26 | 23-27 |
| CO ₂ total (mmol/l) | 23-27 | 24-28 |
| pO ₂ (mmHg) | 80-100 | 30-50 |
| Saturación de O ₂ (%) | 94-100 | 60-85 |

TABLA 13-4 Alteraciones de los parámetros del equilibrio acidobásico en los trastornos simples compensados

| Trastorno | pH | pCO ₂ | HCO ₃ ⁻ | CO ₂ t |
|------------------------|----|------------------|-------------------------------|-------------------|
| Acidosis metabólica | | | | |
| No compensada | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Compensada | = | ↓ | ↓ | ↓ |
| Alcalosis metabólica | | | | |
| No compensada | ↑ | = ↑ | ↑ | ↑ |
| Compensada | = | ↑ | ↑ | ↑ |
| Acidosis respiratoria | | | | |
| No compensada | ↓ | ↑ | = ↑ | ↑ |
| Compensada | = | ↑ | ↑ | ↑ |
| Alcalosis respiratoria | | | | |
| No compensada | ↑ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Compensada | = | ↓ | ↓ | ↓ |

Metabólicas. Las principales causas de la acidosis metabólica se delimitan en la tabla 13-5. En cuanto a la alcalosis metabólica, sus causas más importantes son la administración excesiva de alcalinos y la pérdida masiva del ácido clorhídrico del estómago por vómitos o una obstrucción pilórica o del intestino alto.

Respiratorias. Las causas principales de la acidosis respiratoria son las que producen una disminución de la eliminación de CO₂, y pueden ser de índole mecánica, como en la bronconeumonía, el enfisema pulmonar y la fibrosis pulmonar, o de tipo orgánico, como las enfermedades cardíacas que reducen la circulación sanguínea. Finalmente, las causas más relevantes de la alcalosis respiratoria son las que aumentan la eliminación de CO₂, como la histeria, el llanto prolongado, el embarazo, la intoxicación por salicilato, el asma, la fiebre, el embolismo pulmonar y la ventilación mecánica excesiva.

Alteraciones mixtas

Las alteraciones mixtas del equilibrio acidobásico son las que presentan de forma simultánea dos o tres alteraciones simples que no se deben a mecanis-

TABLA 13-5 Principales causas de la acidosis metabólica

| |
|---|
| <i>Aumento de la producción de ácidos</i> |
| Acidosis láctica (hipoxia tisular) |
| Cetoacidosis diabética (ácido β-hidroxibutírico y ácido acetoacético) |
| <i>Retención de ácidos</i> |
| Insuficiencia renal |
| Acidosis tubular renal |
| <i>Pérdida de bicarbonato</i> |
| Diarrea abundante |

mos compensadores. Las alteraciones mixtas pueden dividirse en tres grandes grupos: metabólicas mixtas, metabólico-respiratorias y triples.

Metabólicas. Las alteraciones metabólicas mixtas más frecuentes son la acidosis metabólica mixta y la acidosis y la alcalosis simultáneas. Respecto a la primera, cabe citar la que se produce cuando existen una acidosis tubular renal y una acidosis urémica. La acidosis y la alcalosis simultáneas se presentan en la cetoacidosis y el tratamiento con diuréticos, la insuficiencia renal con vómitos y la acidosis láctica con vómitos. Sólo con los datos del laboratorio es difícil determinar estas alteraciones, ya que suelen tener parámetros casi normales del equilibrio acidobásico. Esto hace que, para catalogarlas, sean imprescindibles los datos clínicos.

Metabólico-respiratorias. Las alteraciones mixtas metabólico-respiratorias pueden presentar cuatro combinaciones posibles: acidosis metabólica y acidosis respiratoria, acidosis metabólica y alcalosis respiratoria, alcalosis metabólica y acidosis respiratoria y alcalosis metabólica y alcalosis respiratoria.

Las *acidosis metabólica y respiratoria simultáneas* se presentan en la insuficiencia cardíaca congestiva y en la asfixia. Se caracterizan por un descenso del pH, un aumento de la $p\text{CO}_2$ y un descenso del HCO_3^- .

La *acidosis metabólica y alcalosis respiratoria* se dan en la intoxicación por salicilatos. El pH está dentro de los valores de referencia, pero disminuyen la $p\text{CO}_2$ y el HCO_3^- .

En cuanto a la *alcalosis metabólica y acidosis respiratoria*, se presentan en los pacientes con trastornos respiratorios crónicos obstructivos tratados con diuréticos. El pH se encuentra dentro de la normalidad, y la $p\text{CO}_2$ y el HCO_3^- son muy elevados.

Las *alcalosis metabólica y respiratoria simultáneas* se producen en la insuficiencia hepática y el tratamiento con diuréticos. Esta alteración se caracteriza por un pH y un HCO_3^- elevados y una $p\text{CO}_2$ baja.

INTRODUCCIÓN

La cromatografía es una técnica física que se emplea en los laboratorios clínicos para separar y cuantificar una gran variedad de sustancias. En este capítulo se presentan los conceptos básicos de la cromatografía y los principales mecanismos de separación. Asimismo, se da cuenta de los diferentes tipos de cromatografía y su aplicación en los laboratorios clínicos.

PRINCIPIOS GENERALES

La cromatografía es un proceso físico en el que los componentes de una mezcla se separan por la distribución diferente entre una fase móvil y una fase estacionaria. Durante el proceso cromatográfico de separación, la fase móvil transporta el espécimen a lo largo de la capa o columna que contiene la fase estacionaria. A medida que la fase móvil fluye por la estacionaria, los solutos se distribuyen entre ambas fases. Los que son más afines a la fase móvil viajan más rápido que los que no lo son.

CLASIFICACIÓN DE LAS SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS

Las separaciones cromatográficas pueden clasificarse de tres formas: de acuerdo con el estado físico de las fases móvil y estacionaria, según el método de contacto entre estas fases y según los mecanismos físicos de separación. En función del estado físico de las fases móvil y estacionaria, la cromatografía puede ser de gas-líquido (fase móvil gaseosa y fase estacionaria líquida) y de líquido-líquido (ambas fases líquidas). Según el método de contacto entre las fases, la cromatografía se divide en: cromatografía en columna, en la que la fase estacionaria se coloca en una columna delgada por la que se mueve la fase móvil bajo la influencia de la gravedad o la presión; y cromatografía en placa, en la que la fase estacionaria recubre una placa plana de vidrio, metal o plástico que se coloca en contacto con la fase móvil. De acuerdo con el mecanismo de separación la cromatografía puede clasificarse en: de adsorción, de reparto, de cambio de ión, de exclusión y de afinidad. A menudo, en algunos métodos cromatográficos de separación coexisten dos o más tipos de mecanismos. En los laboratorios clínicos se emplean fundamentalmente los mecanismos de intercambio iónico y de reparto.

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: TEORÍA GENERAL

PRINCIPIOS GENERALES

De los dos métodos de contacto de las fases estacionaria y móvil, el más importante es el que se realiza en columna. Un cromatograma es el dibujo de la señal del detector en función del tiempo o del volumen de fase móvil que eluye. El

tiempo de retención (t_r) es el que transcurre desde la introducción del soluto en la columna hasta el máximo del pico. El volumen de elución es el volumen de fase móvil necesario para que salga la sustancia de la columna. El tiempo de retención y el volumen de elución se usan en la cromatografía en columna para los estudios cualitativos. Otro parámetro importante es la anchura del pico en la línea de base. Se determina por la intersección con esta línea de las tangentes trazadas por los puntos de inflexión sobre cada lado del pico cromatográfico (fig. 14-1).

La capacidad de separación de dos picos en un proceso cromatográfico en columna se mide por medio de la resolución (R), que se calcula dividiendo la diferencia de los tiempos de retención (t_{r1} y t_{r2}) por la media de la anchura de los picos (A_1 y A_2):

$$R = \frac{t_{r1} - t_{r2}}{(A_1 + A_2)/2} = \frac{2\Delta t_r}{A_1 + A_2}$$

Cuanto mayor sea R , mejor será el grado de separación entre dos picos cromatográficos. La resolución se puede mejorar aumentando la diferencia de los tiempos de retención (Δt_r) o disminuyendo A_1 o A_2 . Δt_r puede aumentarse potenciando la interacción de los solutos con la columna o aumentando la selectividad de la columna para alguno de ellos. La anchura de los picos dependerá de diversos factores que, de forma general, se llaman *eficacia de la columna*.

MEDIDA DE LA EFICACIA

Una medida de la eficacia de la columna utiliza el concepto de *plato teórico*, que es el espacio necesario para que se produzca el equilibrio de una sustancia entre las dos fases. La longitud de columna que contiene un plato teórico se denomina *altura del plato* (H), y se mide habitualmente en mm. Tanto el valor numérico de N (número de platos teóricos) como el de H de una columna se expresan para una sustancia determinada. La altura del plato está relacionada

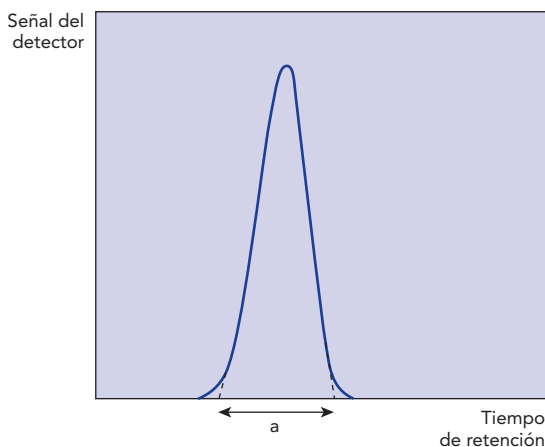


FIGURA 14-1

Anchura del pico en la línea de base.

con la amplitud del pico de la sustancia y con la distancia que recorre en la columna, mediante la ecuación:

$$H = \frac{\sigma^2}{x}$$

El número de platos teóricos de la columna viene dado por:

$$H = \frac{L}{H} = \frac{Lx}{\sigma^2}$$

donde L es la longitud de la columna.

Esta ecuación también puede expresarse en unidades de tiempo, en lugar de longitud:

$$N = 16 \left(\frac{tr}{A} \right)^2$$

Para las columnas más eficaces, el valor de N puede llegar hasta 50.000-100.000 por metro. El valor correspondiente de H puede ser de unos pocos μm . Cuanto menor sea la altura del plato, más estrecho será el pico de la sustancia. Sin embargo, la difusión de la sustancia se opone a esta estrechez del pico.

Es importante señalar que el plato teórico es un tema conceptual, ya que, en realidad, en la columna no hay estos platos. De hecho, el número de platos teóricos depende tanto de las propiedades de la columna como de las del soluto. En consecuencia, en una columna este número no es fijo y varía de un soluto a otro.

CUANTIFICACIÓN

En la cromatografía en columna, el área de los picos se utiliza para los análisis cuantitativos. Esta área se obtiene mediante la integración por ordenador. La precisión de todas las medidas hechas a partir de un cromatograma dependerá de que haya un detector con una respuesta lineal a la concentración. Además, el flujo de la fase móvil debe ser constante.

Los análisis cuantitativos pueden realizarse con dos métodos: el de estándar externo y el de estándar interno. En el primero se inyectan en el sistema estándares de concentración conocida de la sustancia y se compara su respuesta con la de los especímenes.

En la técnica de estándar interno se añade al espécimen una cantidad conocida de una sustancia que no esté en el mismo y que se utiliza como referencia. La respuesta de este estándar se compara con la de las sustancias problema. Sin embargo, como el detector puede responder de formas diferentes al estándar interno y a la sustancia que quiera medirse, habrá que obtener un factor de respuesta del detector para cada componente del espécimen en relación con el estándar interno.

CROMATOGRAFÍA DE REPARTO

La cromatografía de reparto consigue separar las sustancias tomando como base su diferente distribución entre dos fases líquidas inmiscibles. Este tipo de cromatografía puede realizarse en papel, en capa fina o en columna. Se llama R_f de una sustancia al cociente entre la distancia migrada por ella y la recorrida por el frente cromatográfico. El R_f de cada sustancia tiene un valor característico en cada sistema de separación que sirve para identificarla. Dicho cociente es una magnitud influida por factores ambientales, como la temperatura, el pH del medio, la saturación de la cámara de desarrollo, la cantidad de sustancia aplicada, etc.

La *cromatografía en capa fina* es una técnica de reparto líquido-líquido en la que son muy importantes las interacciones por adsorción. Esta clase de cromatografía utiliza como soportes gel de sílice, celulosa, poliaminas, gel de óxido de aluminio y gel de silicato magnésico. Los geles se extienden sobre una placa rígida de vidrio, plástico o aluminio, formando una capa fina cuyo espesor puede ajustarse a conveniencia. Una vez producida la cromatografía, las sustancias se localizan en la placa por su color, la absorción ultravioleta o el revelado específico con los reactivos adecuados. Pueden cuantificarse por densitometrado o eluyéndolas de la placa. En los laboratorios clínicos se ha utilizado la cromatografía en capa fina para la separación y medida de hidratos de carbono, lípidos, aminoácidos, porfirinas, hormonas esteroideas y ácidos orgánicos. Su principal ventaja es su gran simplicidad y el bajo coste del equipo y los reactivos. En la actualidad ya casi no se emplea al haber sido sustituida por otras técnicas.

CROMATOGRAFÍA DE CAMBIO DE IÓN

La cromatografía de cambio de ión separa las sustancias sobre la base de las interacciones electrostáticas que se producen entre los grupos ionizables de los compuestos que quieren separarse y los grupos cargados unidos a un soporte sólido.

CAMBIADORES IÓNICOS

Los cambiadores iónicos son sustancias insolubles que contienen grupos cargados con iones móviles de signo contrario que neutralizan los grupos fijos. Estos iones móviles o contraiones pueden intercambiarse de forma reversible con otros iones de la misma carga.

Los cambiadores pueden ser catiónicos, si intercambian iones del medio con carga positiva, o aniónicos, si intercambian iones negativos. Los grupos cargados de la matriz insoluble determinan el tipo y la fuerza del cambiador. Los grupos fenólicos, carboxílicos y sulfónicos se utilizan como cambiadores catiónicos, mientras que los grupos amino, alifáticos y aromáticos, se utilizan como aniónicos. Los grupos sulfónicos y amino cuaternarios son cambiadores fuertes, mientras que los otros grupos son cambiadores débiles.

MECANISMO DE SEPARACIÓN

El mecanismo por el que se produce la separación en la cromatografía de cambio de ión es la unión reversible de los compuestos a los cambiadores que, de

forma esquemática, se explica en la figura 14-2. En primer lugar, se añade el espécimen sobre la columna que contiene el cambiador. Las sustancias quedan más o menos retenidas, según las interacciones de sus grupos ionizables con este. Las sustancias que han quedado unidas se separan pasando a través de la columna un amortiguador cuyos pH, fuerza iónica o ambos se modifican respecto del amortiguador en que se aplicó el espécimen. Finalmente, se regenera la columna pasando contraiones del cambiador, de forma que quede dispuesta para utilizarse de nuevo.

APLICACIONES

En los laboratorios clínicos, la cromatografía de cambio de ión se aplica para separar aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos y, en general, para todos los compuestos de naturaleza iónica. Asimismo, en dichos laboratorios, además de utilizarse en los analizadores de aminoácidos, se usa para separar hemoglobinas, isoenzimas, esteroides y otras sustancias cargadas de interés clínico. La cromatografía de intercambio iónico se emplea también para preparar agua desionizada con columnas que contienen mezclas de resinas aniónicas y catiónicas (v. capítulo 2).

CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN

PRINCIPIOS GENERALES

La cromatografía de exclusión, antes llamada filtración en geles, es una técnica que separa las moléculas en función de su tamaño y de su forma. La fase estacionaria es un gel, un polímero anhidro muy hidrófilo, que se hincha cuando se sumerge en agua o en soluciones electrolíticas.

Esta cromatografía se realiza en columna y la elución o salida de las sustancias es independiente del eluyente o fase móvil utilizada, de su pH y su fuerza iónica y, como se ha indicado, sólo es función de la forma y del tamaño de las sustancias y de los poros del gel. Los principales geles que se utilizan en la cromatografía de exclusión son de dextrano (Sephadex y Sephacryl), agarosa (Sheparosa y Bio-Gel) y poliácridamida (Bio-Gel).

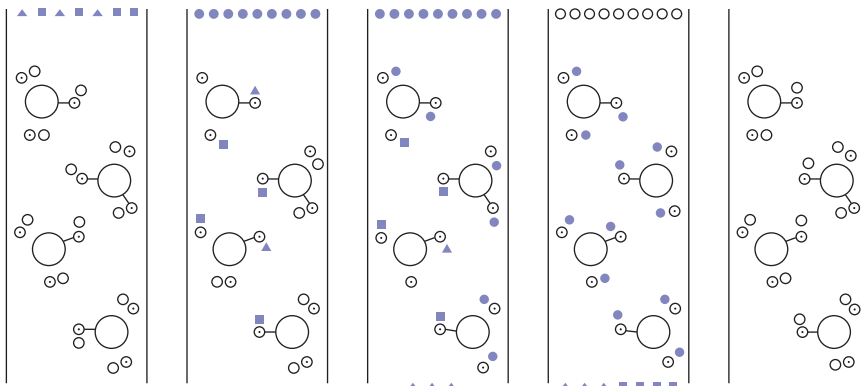


FIGURA 14-2 Base de separación en la cromatografía de cambio de ión.

MECANISMO DE SEPARACIÓN

El mecanismo de separación de este tipo de cromatografía se representa en la figura 14-3. El espécimen se aplica sobre el lecho del gel y, al pasar a través de la columna, las moléculas mayores que el diámetro máximo de los poros de los geles pasan por los espacios que dejan entre sí los granos del gel y salen pronto. En cambio, las moléculas menores quedan retenidas en los granos. Cuanto menores sean las moléculas, más tardarán en salir de la red porosa y, por tanto, saldrán de la columna más tarde. De este modo, en la cromatografía de exclusión la elución se produce en orden decreciente de tamaño molecular. Como la separación de las diferentes moléculas de una mezcla viene dada por el espacio recorrido, la resolución es una función de la longitud de la columna y del tamaño de las partículas del gel. El diámetro de la columna sólo determina la cantidad de espécimen que puede aplicarse.

APLICACIONES

La cromatografía de exclusión se aplica fundamentalmente a separar sustancias de peso molecular elevado, como péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y otros compuestos de interés biológico. En los laboratorios clínicos, esta cromatografía se usa para purificar en técnicas hormonales.

CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

La cromatografía de afinidad utiliza para separar las sustancias interacciones biológicas muy específicas, como las de enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo y hormona-receptor. La técnica requiere que el compuesto que quiera separarse se una reversiblemente a un ligando específico que se ancla a una matriz insoluble. Así, la fase estacionaria se prepara inmovilizando el ligando sobre el soporte sólido, bien directamente o empleando un brazo espaciador.

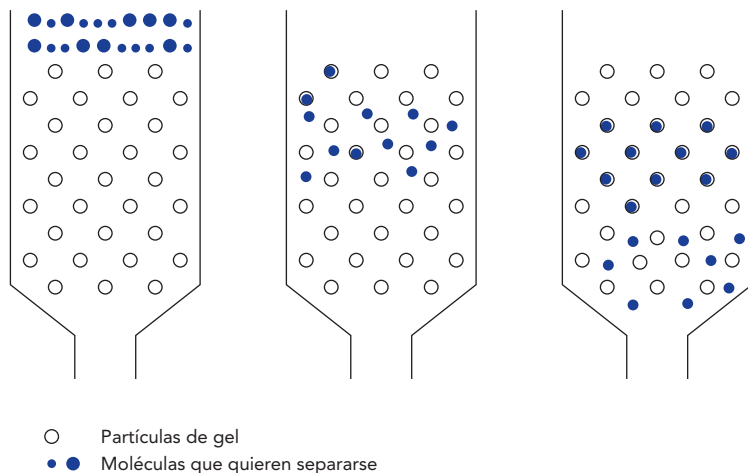


FIGURA 14-3 Mecanismo de separación de la cromatografía de exclusión.

Para realizar la cromatografía se añade la mezcla que contiene la sustancia que se desea separar al ligando inmobilizado; generalmente, este está contenido en una columna cromatográfica, aunque también puede encontrarse en disolución. El compuesto que se quiere separar se une al ligando y el resto de las sustancias se eliminan mediante lavado.

La separación o elución de la sustancia que se pretende separar se consigue alterando las condiciones experimentales, por variación del pH o de la fuerza iónica o pasando un ligando distinto al anclado en la columna por el que la sustancia tenga mayor afinidad.

La cromatografía de afinidad se emplea en los laboratorios de bioquímica clínica para separar la glucohemoglobina y las catecolaminas.

CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases es una técnica de reparto líquido-gas que se realiza en una columna rellena de un sólido, finamente dividido, que actúa como soporte. La fase estacionaria está formada por un líquido no volátil que impregna el soporte, y la fase móvil es un gas inerte —nitrógeno, helio, hidrógeno o argón— que fluye por la columna a velocidad constante.

Los componentes principales de un cromatógrafo de gases son estos (fig. 14-4):

- Sistema suministrador del gas portador.
- Bloque inyector a temperatura elevada.
- Horno para la columna.
- Columna de separación.
- Detector.
- Ordenador para controlar el sistema y procesar los datos.

FASE MÓVIL

Como se ha señalado, las fases móviles más habituales son el helio, el argón, el hidrógeno y el nitrógeno, que tienen la ventaja de ser químicamente inertes,

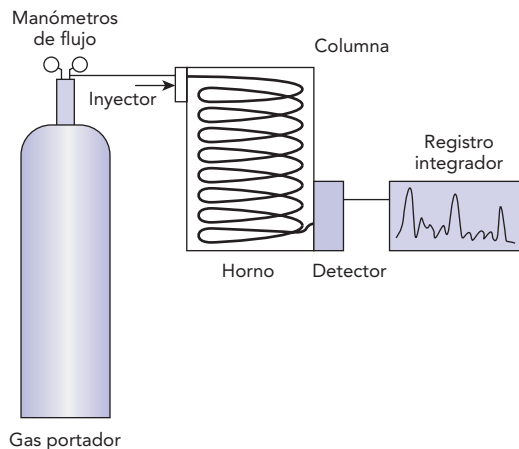


FIGURA 14-4
Componentes de un cromatógrafo de gases.

tanto con relación al espécimen como a la fase estacionaria. La elección del gas portador la determina el detector. El flujo de dicho gas es la fuerza que transporta los compuestos que se separarán a lo largo de la columna, y suele estar comprendido entre 10 y 60 ml/min en las columnas normales, y entre 1 y 2 ml/min en las capilares. Los flujos se miden con medidores situados a la salida de la columna.

BLOQUE INYECTOR

Todos los constituyentes que se inyectan en el cromatógrafo de gases deben ser volátiles. Y como muchos de los compuestos de interés clínico no lo son, hay que modificarlos de forma química con un proceso llamado derivatización. Se suele aumentar la volatilidad transformando los grupos funcionales polares (hidroxilo, amino y cetona) en grupos apolares (trimetilsililo y monoxima).

Los especímenes se introducen disueltos en un pequeño volumen de fase móvil a través de un tabique de goma, utilizando una microjeringa. El bloque inyector se ha calentado a una temperatura de al menos 50 °C por encima del punto de ebullición del componente que lo tenga mayor. De esta forma, se garantiza la evaporación instantánea de todo el espécimen. Una vez evaporado este, el gas portador lo capta y transporta a la columna.

La cantidad del espécimen inyectado debe ser lo más pequeña posible. Suelen utilizarse de 1 a 10 µl. La inserción y la inyección de la aguja en el bloque han de hacerse lo más rápido que se pueda. Hay inyectores automáticos del espécimen que se colocan en un carrusel, introducidos en recipientes adecuados. Según el programa que se establezca, los especímenes se inyectan cada cierto tiempo de modo secuencial.

COLUMNA

Las columnas suelen ser de acero inoxidable, vidrio, cobre o aluminio, tienen una longitud de entre 2 y 6 m y un diámetro interno de 1 a 4 mm. No obstante, las capilares pueden tener hasta 100 m de longitud y un diámetro interno de entre 0,1 y 0,5 mm. Las columnas están rellenas de un soporte particulado inerte, finamente dividido, y los soportes más utilizados son la tierra de diatomeas, las microesferas de vidrio y los polímeros porosos.

FASE ESTACIONARIA

La elección de la fase estacionaria influye en la selectividad de la cromatografía de gases. En esta, el orden de elución está determinado, principalmente, por el punto de ebullición del soluto y, en menor medida, por la interacción de este con la fase estacionaria. De forma general, los solutos apolares se separan más fácilmente con una fase estacionaria apolar, y los solutos polares, con una fase estacionaria polar.

Los criterios principales al elegir una fase estacionaria son: debe ser químicamente inerte, térmicamente estable, tener poca volatilidad y una polaridad adecuada para los solutos que vayan a separarse. Las principales fases estacionarias que se emplean en la cromatografía de gases son el apieznón L, el polidimetil siloxano (SE-30), el 50% de metil-50% de fenil polisiloxano (OV-171), el 50% de

trifluoropropil-50% de metil polisiloxano (OV-210), el 50% de cianopropil-50% de fenilmetil polisiloxano (OV-225) y el polietilenglicol (Carbowax 20M).

HORNO

En la cromatografía de gases es esencial controlar la temperatura de la columna para conseguir una buena separación. Por este motivo, las columnas se alojan en un horno termostatzado. La cromatografía puede realizarse a temperatura constante o programarse para que varíe con el tiempo. En este caso, la temperatura inicial se ajusta por debajo del punto de ebullición del soluto que lo tenga menor. Al avanzar la separación, se aumenta la temperatura lentamente de forma uniforme o a pasos.

DETECTORES

En este tipo de cromatografía, los principales sistemas detectores son los de conductividad térmica, los de ionización de llama y los de captura electrónica.

Detector de conductividad térmica

Este detector mide la variación de la resistencia de un conductor eléctrico (alambre de platino) producida por los cambios de temperatura del gas portador que causan los compuestos separados. Debido a su gran conductividad térmica, el helio es la fase móvil más adecuada cuando se utiliza este detector. Las ventajas principales de este son que sirve para cualquier sustancia y que proporciona una respuesta lineal para concentraciones de soluto en un intervalo de 10^4 - 10^5 órdenes de magnitud. Su desventaja más importante es que es el menos sensible de los detectores para cromatografía de gases, pues su límite de detección está entre 0,1 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Detector de ionización de llama

El detector de ionización de llama mide el aumento de la conductividad eléctrica que se produce cuando la mezcla hidrógeno/aire, utilizada para producir la, está contaminada con cantidades muy pequeñas de compuestos orgánicos. La respuesta de este tipo de detectores es directamente proporcional al número de átomos de carbono de una molécula unidos a átomos de hidrógeno o a otros de carbono. El detector de ionización de llama es el más utilizado para compuestos orgánicos. Su límite de detección es de alrededor de 1 ng.

Detector de captura electrónica

En los detectores de captura electrónica, las partículas β emitidas por una chapa de níquel radiactivo ionizan la fase móvil, que normalmente es N_2 . Esto da lugar a la producción de más electrones, que crean una pequeña corriente eléctrica constante. Cuando un soluto sale de la columna capta electrones y disminuye la corriente.

Estos detectores son muy selectivos para los solutos con grupos funcionales electronegativos, como los halógenos y los grupos nitro, y relativamente insen-

sibles a las aminas, los alcoholes y los hidrocarburos. Aunque su límite de detección es excelente, su intervalo de linealidad sólo abarca unos dos órdenes de magnitud.

Detectores fotométrico de llama y termoiónico

Otros dos detectores, con un diseño semejante al de ionización de llama, son el fotométrico de llama, en el que la emisión óptica del fósforo y el azufre proporciona una detección selectiva para los compuestos que contengan estos elementos, y el detector termoiónico, que responde a los compuestos que contengan nitrógeno o fósforo.

Espectrómetros de masas y de infrarrojos

Dos detectores que cada vez se utilizan más y son también aparatos independientes son los espectrómetros de masas y los de infrarrojos con transformada de Fourier.

En la combinación cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas, lo que sale de la columna se introduce directamente en la cámara de ionización de dicho espectrómetro de forma que se elimina la mayor parte del gas portador. En la cámara de ionización, se ionizan todas las moléculas y los iones se separan de acuerdo con su cociente masa/carga, que sirve para identificar el compuesto. Los espectrómetros de masas proporcionan unos límites de detección muy buenos (entre 25 fg y 100 pg), con unos intervalos de linealidad que se extienden en cinco órdenes de magnitud.

En cuanto a la combinación cromatógrafo de gases-espectrómetro de infrarrojos con transformada de Fourier, el efluente de la columna pasa por una célula óptica, construida con un tubo de vidrio Pyrex de entre 10 y 40 cm de largo y un diámetro interno de 1 a 3 mm. La superficie interior de la célula está cubierta de una capa de oro reflectante. Según se transmiten a lo largo de la célula, las reflexiones múltiples de la fuente de radiación aumentan la longitud de paso óptico a lo largo del espécimen.

APLICACIONES

En los laboratorios clínicos, las aplicaciones principales de la cromatografía de gases son el análisis de fármacos y la determinación del monóxido de carbono en sangre. La combinación cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas se usa principalmente para analizar drogas en la medicina del deporte (control antidopaje).

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

PRINCIPIOS Y COMPONENTES

La cromatografía en columna puede utilizar cualquiera de los tipos de interacciones entre la fase móvil y la estacionaria que se han señalado. Hasta hace unos años, la separación en columna se hacía usando el flujo gravitatorio como fuerza impulsora de la fase móvil, lo que exigía tiempos de separación largos.

La construcción de sistemas impulsores de la fase móvil con mucha presión, y la obtención de rellenos de las columnas cuya actuación es muy eficaz han permitido tiempos cortos de separación y una gran selectividad. La cromatografía que emplea estos métodos se denomina cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Un *cromatógrafo de HPLC* está formado por los siguientes componentes (fig. 14-5):

- Reservorio de la fase móvil.
- Bomba impulsora.
- Inyector.
- Columna.
- Detector.
- Registro.
- Ordenador.

BOMBAS IMPULSORAS

Los sistemas de bombeo para impulsar la fase móvil son uno de los componentes más críticos de los cromatógrafos de HPLC. Las principales características de un buen sistema de bombeo son tres: debe proporcionar presiones de al menos 5×10^7 Pa; no ha de dar pulsos, esto es, variaciones cíclicas de la presión, ya que esto afectaría a la respuesta del detector; y la capacidad de flujo debe ser de 10 ml/min como mínimo y poder llegar a 100 ml/min para las separaciones preparativas.

Hay varios sistemas de bombeo. Las bombas más utilizadas son las de desplazamiento constante de dos pistones de movimiento alternativo.

La bomba de los cromatógrafos líquidos puede actuar de modo isocrático o de modo gradiente. En el primero, la composición de la fase móvil permanece

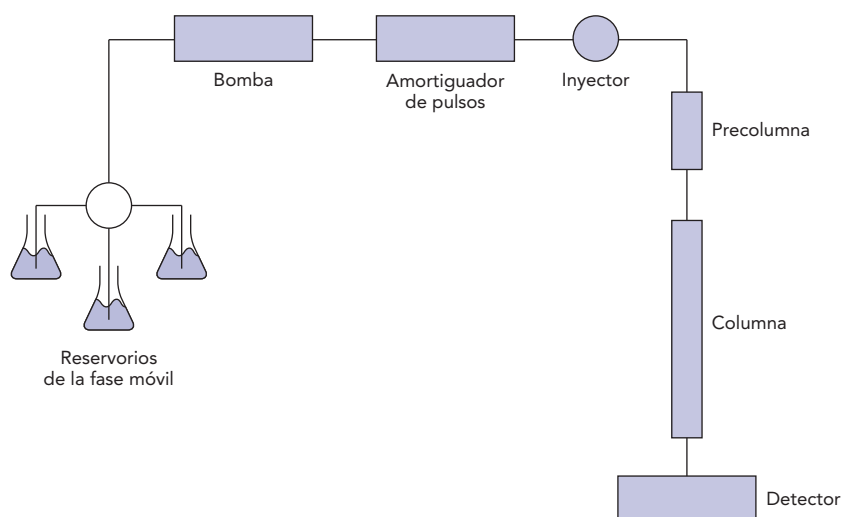


FIGURA 14-5 Componentes de un cromatógrafo de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución).

constante durante todo el proceso, mientras que en el segundo va cambiando durante la cromatografía.

INYECTOR

La presión de trabajo de la cromatografía líquida es tan alta que es imposible inyectar el espécimen de la misma forma que en la cromatografía de gases. Por este motivo, se utilizan inyectores de bucle (fig. 14-6). En la posición de carga, el bucle del espécimen está aislado de la fase móvil y abierto a la atmósfera. Con una jeringa cuya capacidad es varias veces mayor que la del bucle, se coloca el espécimen en este. Cualquier cantidad que sobre saldrá por la línea de desecho. Tras cargar el espécimen, se gira el inyector a la posición de inyección, en la que la fase móvil se dirige a lo largo del bucle y el espécimen es arrastrado a la columna.

COLUMNA

Tipos de columnas

En la HPLC suele haber dos columnas: una analítica en la que se produce la separación y una precolumna que se coloca delante para proteger de la contaminación. Las principales columnas que se usan en la cromatografía líquida de alta eficacia son de acero inoxidable y tienen un diámetro interno de entre 0,3 y 5 mm, y una longitud de entre 5 y 25 cm. Estas columnas están rellenas con partículas de sílice porosas de 3 a 10 μm , con una forma irregular o esférica. También se emplean microcolumnas construidas con capilares de sílice fundidos, con diámetros internos de 0,1 a 0,5 mm y longitudes de hasta varios metros.

Normalmente, la precolumna tiene el mismo material de relleno y la misma fase estacionaria que la columna analítica, es bastante más corta y barata que esta y se cambia con frecuencia.

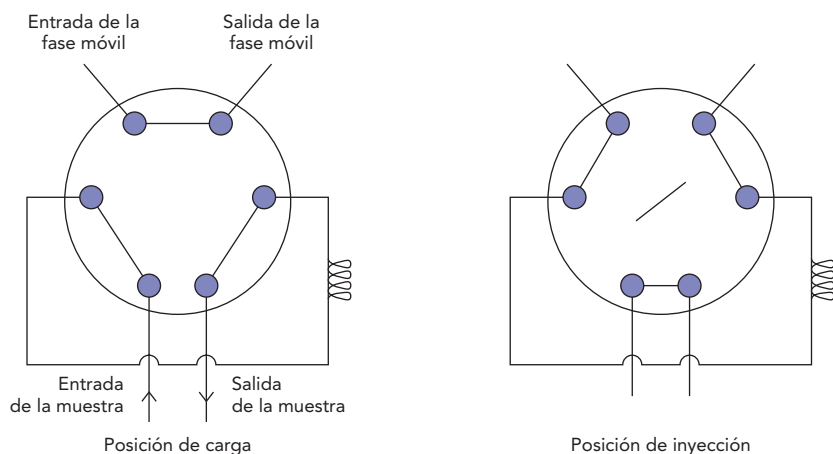


FIGURA 14-6 Inyector de bucle.

Material de relleno y fases

El material de relleno de las columnas puede ser de tres tipos: soportes microporosos, soportes de película y fases unidas. En la cromatografía de reparto, la fase estacionaria puede recubrir los soportes inertes microporosos o los de película. También pueden emplearse fases unidas, en donde el material de soporte es la sílice. Las fases estacionarias unidas se obtienen haciendo reaccionar las partículas de sílice con un organoclorosilano de fórmula general $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{RCl}$, donde R es un grupo alquilo o alquilo sustituido. Las propiedades de la fase estacionaria son determinadas por la naturaleza del grupo alquílico organosilano. Si R es un grupo funcional polar, la fase estacionaria también será polar. Entre las fases estacionarias polares están aquellas en las que R contiene un grupo funcional ciano, diol o amino. En cambio, las principales fases estacionarias apolares utilizan un organoclorosilano en que el grupo R es una cadena de hidrocarburo n-octil o n-octildecil. En la tabla 14-1 se dan algunos ejemplos de fases estacionarias que se emplean en la HPLC.

La fase móvil suele elegirse utilizando el índice de polaridad P' . En la tabla 14-2 se presentan los índices de polaridad de sustancias muy utilizadas como fase móvil. Los valores más elevados de P' corresponden a los disolventes más polares.

Las fases líquidas estacionarias son generalmente polares, mientras que las fases móviles son apolares. En este sentido, los líquidos estacionarios más usados son el agua y el etilenglicol, y las fases móviles más típicas, el hexano, el metanol y las mezclas hexano/isopropanol. Esta combinación de una fase estacionaria polar y una móvil apolar se llama cromatografía líquida en fase normal. Cuando la fase estacionaria es apolar, como un hidrocarburo, y se utilizan como fase móvil sistemas acuosos, la cromatografía se denomina en fase reversa.

DETECTOR

Los principales detectores que se utilizan en la HPLC son los fotométricos y los electroquímicos.

TABLA 14-1 Ejemplos de fases estacionarias utilizadas en la HPLC

| Principio de separación | Nombre comercial | Naturaleza de la fase estacionaria | Tipo de soporte |
|---|--------------------------|------------------------------------|-----------------|
| Adsorción | Partisil C ₈ | Octilsilano | Poroso |
| | Corasil | Sílice | Película |
| | Pellumina | Alúmina | Película |
| | Partisil | Sílice | Microporoso |
| Reparto | Bondapack | Octadecilsilano | Poroso |
| Intercambio iónico | Partisil-SAX | Base fuerte | Poroso |
| | Micropak-NH ₂ | Base débil | Poroso |
| Exclusión | | | |
| HPLC, cromatografía líquida de alta resolución. | | | |

TABLA 14-2 Índices de polaridad de algunas sustancias utilizadas en la HPLC

| Fase móvil | Índice de polaridad (P') | Fase móvil | Índice de polaridad (P') |
|-------------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|
| Ciclohexano | 0,04 | Acetato de etilo | 4,4 |
| n-hexano | 0,1 | Dioxano | 4,8 |
| Tetracloruro de carbono | 1,6 | Metanol | 5,1 |
| Tolueno | 2,4 | Acetonitrilo | 5,8 |
| Éter dietílico | 2,8 | Agua | 10,2 |
| Etanol | 4,3 | | |

HPLC, cromatografía líquida de alta resolución.

Detectores fotométricos

Los detectores más usados se basan en medidas espectroscópicas, como las de la absorción en el UV/visible y la fluorescencia. La detección se realiza en una cubeta de flujo que se construye con materiales que no absorban las longitudes de onda de medida. La célula de flujo suele tener un volumen de 1 a 10 μl y una longitud de paso de entre 0,2 y 1 cm. Por otra parte, la fase móvil no debe absorber con fuerza a la longitud de onda elegida. Los detectores de absorban- cia tienen unos límites de detección de 10^{-11} g de la sustancia inyectada.

Los detectores de fluorescencia requieren que el compuesto tenga esta propiedad. Los límites de detección de los detectores de fluorescencia son de 10^{-14} g de la sustancia inyectada.

Detectores electroquímicos y otros detectores

La mayoría de los detectores electroquímicos utilizan la detección amperométrica (v. capítulo 13). El fluido de la columna pasa por el electrodo, que se mantiene a un potencial que favorece la oxidación o la reducción de las sustancias. Se mide la corriente que fluye entre los electrodos. Los límites de detección son de 10^{-10} - 10^{-11} g de la sustancia inyectada.

Otros detectores son los de índice de refracción, cuyo límite de detección es de 10^{-9} - 10^{-10} g, y los espectrómetros de masas, cuyo límite de detección es de 10^{-7} - 10^{-9} g.

APLICACIONES

Las principales aplicaciones clínicas de la cromatografía líquida de alta eficacia son separar aminoácidos del suero y la orina, cuantificar fármacos en estos líquidos, separar catecolaminas en líquidos biológicos y cuantificar la glucohe- moglobina.

OTRAS FORMAS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

En la HPLC se usan también como base de separación la exclusión y el inter- cambio iónico.

INTRODUCCIÓN

Se denomina electroforesis al transporte de partículas cargadas en un campo eléctrico. Es una técnica de separación en la que las partículas cargadas se separan mediante la diferencia de su velocidad de migración. Se usa para separar compuestos con carga neta, como aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos. En este capítulo se presentan los principales conceptos de esta técnica analítica y las principales aplicaciones en los laboratorios clínicos.

MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

La electroforesis es un proceso en el que un gradiente de potencial produce el transporte de las partículas cargadas. En el transporte electroforético, a la fuerza del campo ($F_{\text{eléc}} = Z \times e \times E$) se opone la resistencia viscosa del medio ($F_{\text{res}} = f \times v$), lo que produce, cuando se igualan, una velocidad constante de las partículas. El proceso puede escribirse así:

$$F_{\text{eléc}} = F_{\text{res}}$$

$$Z \times e \times E = f \times v$$

donde Z = número de cargas de unidad e ; E = valor del campo eléctrico; v = velocidad de las partículas; f = coeficiente de rozamiento.

La movilidad electroforética (u) de una partícula es la velocidad de migración por unidad de campo eléctrico:

$$u = v/E$$

$$\text{De } Z \times e \times E = f \times v$$

tenemos:

$$v = Z \times e \times E/f$$

y sustituyendo este valor de v se obtiene la ecuación:

$$u = Z \times E/f$$

Así pues, la movilidad electroforética de una molécula depende directamente de su carga e e inversamente del coeficiente de rozamiento, que a su vez depende directamente del tamaño y la forma de la molécula y la viscosidad del medio. La migración de las partículas depende del pH del medio en que estén, ya que su carga neta depende del pH.

En la electroforesis, el *amortiguador* ejerce dos funciones: por un lado, lleva la carga eléctrica y, por otro, determina la carga neta de las moléculas que se

separan y, por ende, la dirección de la migración electroforética. La fuerza iónica del amortiguador determina la anchura de la nube iónica que rodea las moléculas cargadas. Cuanto mayor es la fuerza iónica, más estrechas son las bandas de separación. Sin embargo, mucha fuerza iónica produce un calentamiento mayor y tal vez la desnaturalización de las sustancias que van a separarse, por lo que hay que llegar a una solución de compromiso.

ELECTROFORESIS DE ZONA

En el medio electroforético, los soportes inertes producen separaciones más nítidas, pues evitan las corrientes de convección debidas al calentamiento durante la electroforesis libre. Los principales soportes para la electroforesis son el papel, las membranas de acetato de celulosa y los geles de agar, agarosa, almidón y poliacrilamida.

Uno de los problemas de la electroforesis de zona es el flujo electroosmótico, que se debe a la presencia de grupos cargados sobre la superficie del medio de soporte. Por ejemplo, el papel tiene algunos grupos carboxilo; la agarosa, grupos sulfato; y la superficie de las paredes de vidrio que se utiliza en la electroforesis capilar contiene grupos silanol (Si-OH). Los iones positivos del amortiguador forman nubes de carga alrededor de las cargas negativas inmóviles de los soportes. Cuando se aplica la corriente eléctrica, mientras las cargas negativas permanecen fijas, las positivas, muy hidratadas, se mueven hacia el polo opuesto, lo que produce el movimiento del disolvente. Como las macromoléculas que se mueven en dirección contraria tienen que hacer frente a este flujo de iones positivos hidratados, cuando la carga neta de las mismas es pequeña pueden quedar inmóviles e incluso ir hacia el polo opuesto.

ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA

Respecto al papel, las *membranas de acetato de celulosa* tienen las ventajas de ser químicamente más homogéneas y poder transparentarse, por lo que, una vez teñidas o reveladas las sustancias que se separan, podrán cuantificarse por densitometría de transparencia. Las membranas de acetato de celulosa son muy elásticas cuando están húmedas, y frágiles y quebradizas cuando están secas. Requieren una cantidad de espécimen mucho menor que el papel, del orden de 1 a 2 μ l.

Este tipo de membranas se utilizan mucho en los laboratorios clínicos por su fácil manipulación y la rapidez de sus separaciones electroforéticas. Su aplicación principal es *separar las proteínas del suero*, el llamado *proteinograma*. Las tiras de acetato de celulosa se colocan en la cámara (fig. 15-1) entre dos compartimentos que contienen los electrodos, que están sumergidos en el mismo amortiguador. El amortiguador más utilizado es el de veronal de pH 8,6. Como en estas condiciones las proteínas tienen una carga neta negativa, el espécimen ha de aplicarse en el extremo de la tira cercano al polo negativo, ya que aquellas migrarán hacia el polo positivo. Se conecta la fuente de alimentación y se aplican unos 2,5 mA por tira. En estas circunstancias, las proteínas se separarán en 25 min.

Una vez separadas, las proteínas se localizan en las tiras de acetato de celulosa por medio de diversos colorantes; los más habituales son el rojo Ponceau

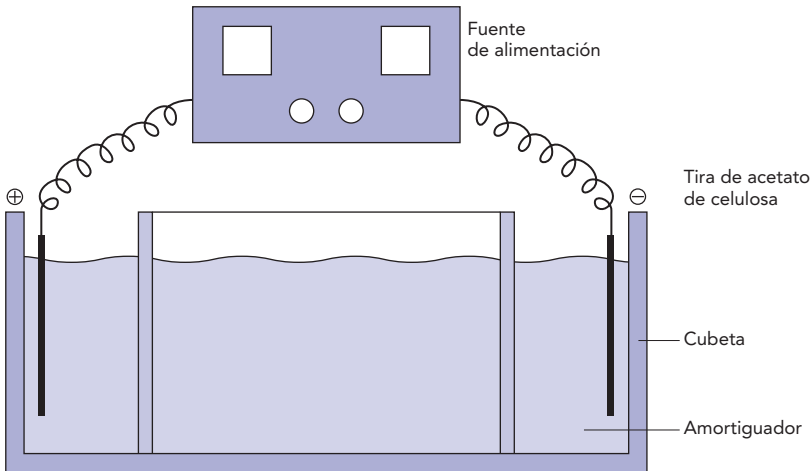


FIGURA 15-1 Sistema para electroforesis en acetato de celulosa.

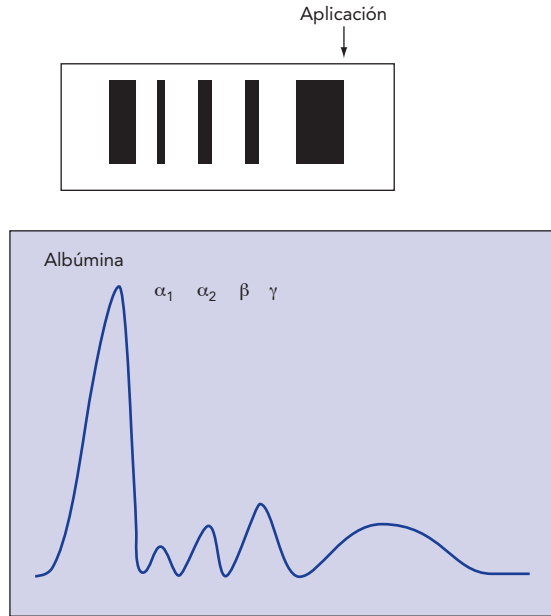
y el negro amido. Luego, las tiras se transparentan tratándolas con varios disolventes orgánicos y con calor, y quedan listas para la densitometría.

Con esta se determina el porcentaje de cada fracción y, conocidas las proteínas totales, la cantidad de cada una. Los *densitómetros* tienen un sistema de arrastre de los soportes teñidos que hace que estos pasen por una rendija de luz, que luego incide sobre un detector. La luz que llega a este produce una señal eléctrica que es recogida en la pluma de un registrador. Cuanto mayor es la intensidad de la banda, menor es la luz que llega al detector, y mayor la deflexión de la pluma del registrador, que dará un pico más alto. Por medio de integradores incluidos en los densitómetros, se mide el área de cada pico y se calcula el porcentaje de cada fracción. Los densitómetros pueden leer las bandas electroforéticas por transparencia o por reflexión. Asimismo, tienen filtros para leer bandas de diferentes coloraciones y leer la luz ultravioleta por sistemas de fluorescencia.

La electroforesis en acetato de celulosa separa las proteínas del suero en *cinco fracciones*, que son la albúmina y las globulinas α_1 , α_2 , β y γ . En la tabla 15-1 se muestran los porcentajes y las concentraciones de referencia de cada fracción, y en la figura 15-2 se presenta el esquema de una separación de las proteínas del suero en tiras de acetato de celulosa, y la lectura densitométrica correspondiente.

TABLA 15-1 Porcentajes y concentraciones de referencia de las fracciones proteicas separadas por electroforesis en acetato de celulosa

| Fracción | Porcentaje | Concentración (g/dl) |
|-----------------------|------------|----------------------|
| Albúmina | 53-67 | 3,2-5 |
| Globulinas α_1 | 2,5-5 | 0,1-0,4 |
| Globulinas α_2 | 7-13 | 0,6-1 |
| Globulinas β | 9-14 | 0,6-1,3 |
| Globulinas γ | 10-21 | 0,7-1,5 |

**FIGURA 15-2**

Esquema de una separación de proteínas del suero en tiras de acetato de celulosa y gráfico de la lectura densitométrica correspondiente.

La electroforesis en acetato de celulosa se ha aplicado también para separar las lipoproteínas del suero, las isoenzimas de la lactato-deshidrogenasa (LDH) y la creatincinasa (CK) del suero.

ELECTROFORESIS EN GEL

Los geles de agarosa, almidón y poliacrilamida no son sólo soportes que evitan la difusión, pues, modificando la concentración de los componentes que forman el gel, pueden conseguirse diferentes porosidades y la separación, además de por diferencias de carga, se produce también por diferencias de tamaño.

GEL DE AGAROSA

La electroforesis en gel de agarosa produce buenas resoluciones en períodos de tiempo cortos. Además, como la agarosa es transparente, se puede medir la intensidad de las fracciones separadas por densitometría.

Normalmente, la agarosa se emplea con concentraciones entre el 1 y el 3%. Los geles de este polisacárido se forman suspendiéndolo en un amortiguador. Después se hierve la mezcla hasta que se forme una disolución clara, se vierte en el molde y se deja enfriar a temperatura ambiente para formar un gel rígido. Los geles de agarosa se emplean para la electroforesis de proteínas y ácidos nucleicos.

GEL DE ALMIDÓN

El almidón para la electroforesis en gel debe estar parcialmente hidrolizado, ya que el almidón nativo no forma geles. El poro del gel puede variarse hasta

lograr el tamaño adecuado modificando la concentración de almidón. El principal problema de los geles de almidón es que su preparación es engorrosa.

GEL DE POLIACRILAMIDA

Los geles de poliacrilamida se forman polimerizando el monómero acrilamida ($\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) y el comonómero de entrecruzamiento N,N' -metileno-bisacrilamida ($\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH} = \text{CH}_2$). Variando las concentraciones del monómero y del comonómero de entrecruzamiento se consiguen geles de poliacrilamida con poros de tamaño amplio, cuya amplitud puede ajustarse para optimizar la separación de los componentes del espécimen. Los geles de acrilamida pueden prepararse con un contenido de acrilamida entre el 3 y el 30%. Los de porcentaje bajo tienen poros de gran tamaño y se emplean en la electroforesis de proteínas o para separar fragmentos grandes de ADN. En cambio, los geles de porcentaje alto tienen poros pequeños y se usan para separar fragmentos pequeños de ADN.

La electroforesis en gel se aplica en los laboratorios clínicos para separar proteínas, lipoproteínas, isoenzimas y ácidos nucleicos.

SISTEMAS AUTOMÁTICOS

Los grandes laboratorios clínicos realizan diariamente muchas separaciones electroforéticas, principalmente de las proteínas del suero (proteinogramas). En el mercado hay varios sistemas automáticos para la electroforesis que emplean acetato de celulosa o agarosa. Realizan de forma automática todas las etapas del proceso: la aplicación del espécimen, el desarrollo de la electroforesis, el teñido, el decolorado de las tiras y la lectura densitométrica.

ENFOQUE ISOELÉCTRICO

Se trata de una técnica de separación electroforética que hace migrar los compuestos anfotéricos, como las proteínas, en un medio con un gradiente estable de pH. Las moléculas se mueven hasta la zona en la que el pH es igual a su punto isoeléctrico. Entonces la carga neta es cero y la molécula detiene su migración.

El gradiente de pH se crea por medio de unas sustancias denominadas anfólitos, que son ácidos poliaminocarboxílicos con pesos moleculares comprendidos entre 300 y 1.000 Da. Los anfólitos pueden cubrir diferentes intervalos de pH, bien uno amplio (pH de 3 a 10) o estrechos (pH entre 7 y 8). El intervalo se elige de acuerdo con los puntos isoeléctricos de las moléculas que quieran separarse. El enfoque isoeléctrico puede realizarse en gel de poliacrilamida, gel de agarosa o en membranas de acetato de celulosa. Los sistemas más utilizados para el enfoque isoeléctrico son los de geles horizontales sobre placas de vidrio o tiras de plástico. La técnica de enfoque isoeléctrico tiene un gran poder de resolución y se utiliza, fundamentalmente, con fines analíticos.

ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis capilar es una técnica en la que la electroforesis de zona se realiza en *capilares* de 75 μm de diámetro interno y 25 cm de longitud. El tubo

capilar se conecta a un detector en un extremo, y a una fuente de corriente a través de recipientes con un amortiguador (fig. 15-3). Las principales ventajas de que los capilares tengan un diámetro tan pequeño son que se logra una mayor disipación del calor, un menor volumen del espécimen y una anchura menor de las zonas de separación. La gran disipación del calor permite aplicar grandes voltajes, de unos 5.000 V, que mejoran la eficacia de la separación y reducen el tiempo de esta.

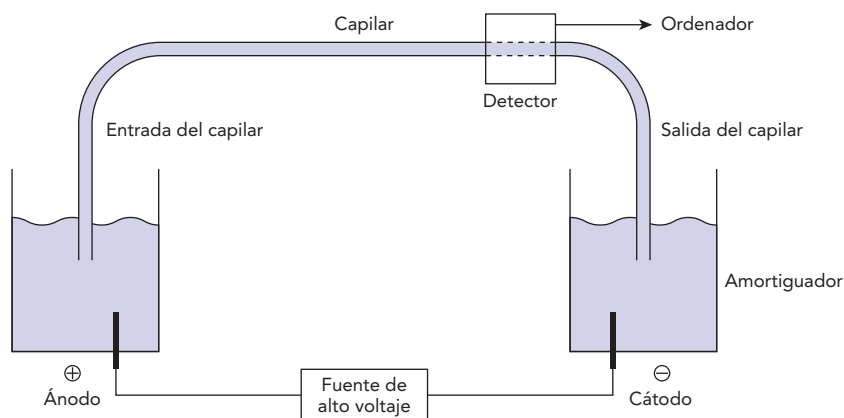
APLICACIÓN DEL ESPÉCIMEN

La aplicación del espécimen puede realizarse de dos formas: por inyección de alto voltaje o por inyección de presión. En la primera, con el voltaje desconectado, se cambia el recipiente del amortiguador en el electrodo positivo por otro que contiene el espécimen, y se introduce este aplicando brevemente el voltaje. A continuación, tras desconectar de nuevo el voltaje, se sustituye el recipiente del amortiguador, se aplica otra vez el voltaje y comienza la separación.

En la inyección de presión, se separa el capilar del recipiente positivo del amortiguador y se inserta en el espécimen. Este se introduce en el capilar aplicando presión, y luego se lleva el capilar al recipiente positivo del amortiguador y se aplica el alto voltaje.

DETECTORES

Los detectores principales que se utilizan en la electroforesis capilar son los de absorción en el ultravioleta/visible (UV/vis), de fluorescencia, de conductividad, los amperométricos y los de espectrometría de masas. Siempre que se pueda, la detección se realiza en la columna, antes de que los solutos hayan eluido del tubo capilar y se produzca un ensanchamiento de las bandas. El detector UV/vis es el más utilizado. La pequeña longitud de paso del capilar produce señales pequeñas y para aumentar la longitud de paso se emplean varios procedimientos. Los límites de detección son de unos 10^{-7} M. Utilizando la fluorescencia se obtienen límites mejores, y con láseres puede llegarse a límites de hasta 10^{-16} M.



TIPOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR

Hay varias *formas de electroforesis capilar* y cada una tiene sus ventajas. La más simple es la de zona (*Capillary zone electrophoresis*: electroforesis capilar de zona, CZE).

En la electroforesis capilar en gel (CGE), se llena el capilar con un gel polimérico. Dado que este es poroso, los solutos migran a través del gel a una velocidad que depende tanto de la movilidad electroforética como de su tamaño. Este método es útil para solutos con movilidades similares, como los fragmentos de ADN.

APLICACIONES

En los laboratorios clínicos, la electroforesis capilar se aplica para separar proteínas en líquidos biológicos, principalmente en el suero. Los sistemas de electroforesis capilar también automatizan el proteinograma, pues emplean la toma del espécimen de forma automática y realizan a la vez diversas separaciones usando varias columnas.

INTRODUCCIÓN

La orina que se forma constantemente en la nefronas constituye el vehículo por donde se eliminan muchos productos de desecho del metabolismo. El análisis de la orina se utiliza en los laboratorios clínicos para el diagnóstico y seguimiento de diversos procesos patológicos, tanto renales como no renales. En este capítulo se describen los principales métodos de estudio de la orina que emplean los laboratorios clínicos.

FORMACIÓN DE LA ORINA

La composición química de la orina es muy variable, y sólo se encuentran en cantidades constantes las sustancias de origen endógeno que se eliminan por la orina. A menudo aparecen en este líquido biológico sustancias que, en condiciones normales, no se eliminan en cantidades significativas. Estas circunstancias suelen deberse a la alteración de algún órgano corporal o a un problema renal.

La formación de la orina consta de tres procesos: la filtración del plasma sanguíneo en los glomérulos, la reabsorción tubular y la secreción de determinados componentes en los túbulos renales. El primer paso es la filtración del plasma por la cual pasan libremente desde este al filtrado las moléculas pequeñas, como la glucosa, la urea y los aminoácidos, y quedan excluidas las moléculas con un tamaño superior a 15 kDa, como la mayoría de las proteínas. Los constituyentes sanguíneos que pasan a través del glomérulo se denominan filtrado glomerular. La cantidad de filtración glomerular en un adulto es de unos 125 ml/min.

Durante el paso de este ultrafiltrado a través de los túbulos, la reabsorción de solutos y agua en diversas regiones de los túbulos reduce el volumen total de orina. Asimismo, durante el paso por los túbulos se produce la secreción de diversas sustancias. El principal componente de la orina es el agua y los principales solutos, urea, cloruro, sodio y potasio; a continuación, fosfato, sulfato, creatinina y ácido úrico.

ANÁLISIS SISTEMÁTICO DE ORINA

El análisis sistemático de orina consta tradicionalmente de dos partes: determinaciones fisicoquímicas y observación microscópica del sedimento urinario. Los aspectos físicos pueden proporcionar indicios o pistas sobre algunas alteraciones. Por medio de las determinaciones químicas se detectan las sustancias que normalmente no se eliminan por la orina y en el sedimento urinario se observan los elementos formes de la orina. En el capítulo 5 se ha descrito la recogida de los especímenes de orina para su análisis.

ANÁLISIS FÍSICOS

El primer paso en el análisis de orina es la evaluación de las propiedades físicas; estas son el aspecto, el color y el olor. La orina recién emitida es normal-

mente clara o transparente, aunque en algunas ocasiones presenta un aspecto nuboso o turbio. Los principales motivos de turbidez de la orina son la presencia de sustancias mucosas, bacterias, leucocitos, uratos amorfos, fosfatos amorfos o eritrocitos.

La orina tiene normalmente un color amarillo claro que se debe a la presencia de urocromo y pequeñas cantidades de uroeritrina y urobilina. La intensidad del color amarillo normal depende, en gran medida, de su concentración. De forma anormal, la orina puede tener tonalidades naranja, roja, verde, azul, parda o incluso negra. Las variaciones de color pueden indicar la presencia de una enfermedad, una anomalía metabólica o la ingestión de un alimento o un fármaco.

Finalmente, la orina normal reciente tiene un olor característico, no desagradable, que se atribuye a la presencia de cantidades pequeñas de ésteres, no muy bien caracterizados, que se eliminan continuamente por el riñón. Las orinas con un número elevado de bacterias pueden tener un olor muy desagradable, pestilente o pútrido, que se debe a la acción de las bacterias sobre la urea, con producción de amonio, junto con la degradación de las proteínas presentes en estas orinas. Diversas enfermedades del metabolismo de los aminoácidos producen olores característicos de la orina.

ANÁLISIS QUÍMICO

El análisis químico de la orina se realiza utilizando tiras reactivas que son tiras de plástico que llevan fijadas varias zonas donde se encuentran impregnados los reactivos, con las que se determinan diversas sustancias de forma cualitativa o semicuantitativa. Tras introducir la tira en la orina y sacarla de esta, se producen las reacciones que dan lugar a un cambio de color que puede valorarse visualmente o mediante espectroscopia de reflexión con un sistema manual o automático. Los parámetros que se miden con la mayoría de las tiras reactivas comercializadas son: glucosa, cuerpos cetónicos, bilirrubina, urobilinógeno, proteínas, hemoglobina, leucocitos, nitritos, densidad y pH. Las principales tiras reactivas del mercado para orina son Combur (Roche), Multistix (Siemens), Uri-clip (Menarini).

GLUCOSA

La glucosa se mide con el método de la glucosa oxidasa. La zona reactiva contiene glucosa oxidasa, peroxidasa y un cromógeno. La glucosa oxidasa oxida la glucosa a gluconolactona, con la producción de peróxido de hidrógeno. Este es posteriormente reducido por la peroxidasa con la oxidación concurrente del cromógeno. Las tiras Multistix utilizan yoduro potásico y el cambio de color va de azul a pardo; las tiras Combur emplean aminopropil-carbazol y el cambio de color va de amarillo a naranja-pardo. En todas las tiras el cambio de color debe leerse en un tiempo determinado tras la adición de la muestra.

La presencia de glucosa en orina se denomina glucosuria y se produce siempre que la concentración de glucosa en sangre supera el umbral renal, que es la capacidad de reabsorción de los túbulos. Este umbral corresponde a una glucosa sanguínea de 180-200 mg/dl (de 9,99 a 11,10 mmol/l), aunque la glucosa puede aparecer en la orina con valores menores de glucosa en suero,

dependiendo de las personas. Además de la concentración en suero de glucosa, hay otros factores que afectan a la aparición de glucosa en orina, como el flujo sanguíneo glomerular, la reabsorción tubular y el flujo urinario. La causa principal de glucosuria es la diabetes mellitus. Otras causas de glucosuria son la hiperglucemia debida a trastornos del metabolismo por infecciones, quemaduras, enfermedades hepáticas, obesidad, etc. La glucosuria sin hiperglucemia se debe a alteraciones tubulares renales (glucosuria renal).

CUERPOS CETÓNICOS

Los cuerpos cetónicos se detectan con Multistix por su reacción con nitroprusiato sódico en medio alcalino. Reacciona el ácido acetoacético y no lo hacen la acetona y el ácido β -hidroxibutírico. El cambio de color va de beige a violeta. Combur utiliza nitroferricianuro sódico y glicina con un amortiguador alcalino. El cambio de color va de *beige* a violeta. En ambos casos la lectura ha de hacerse a un tiempo concreto.

La determinación de cuerpos cetónicos en orina se utiliza fundamentalmente para el seguimiento de los pacientes con diabetes, especialmente los que tienen diabetes de tipo 1, el embarazo y la diabetes mellitus gestacional.

BILIRRUBINA

La detección de bilirrubina se basa en la reacción con una sal de diazonio en medio ácido. Cada tira utiliza una sal de diazonio diferente. Multistix emplea 2,4-dicloroanilina diazotada con un cambio de color de crema a canela; Combur emplea 2,6-diclorobenceno diazonio tetrafluoroborato y el cambio de color va de rosa a violeta. El cambio de color debe leerse a los 60 s. La bilirrubina resulta de la degradación de la hemoglobina. La presencia de bilirrubina en orina indica hiperbilirrubinemia conjugada, que puede producirse por obstrucción biliar o por una enfermedad hepatocelular que haga que la bilirrubina conjugada no pueda eliminarse de forma adecuada a la bilis.

UROBILINÓGENO

El urobilinógeno se mide con la reacción de Ehrlich en la que el p-dimetilaminobenzaldehído reacciona con él en medio ácido dando un color ocre, o por la formación de un azocolorante rojo a partir de un compuesto de diazonio. Se produce un incremento del urobilinógeno en orina siempre que disminuya la función hepatocelular o que haya un exceso de urobilinógeno en el tubo digestivo que supere la capacidad del hígado para eliminarlo. Como ejemplos, las hepatitis víricas, la cirrosis y la hemólisis.

PROTEÍNAS

Las proteínas se miden con la tira reactiva basándose en la propiedad que tienen de alterar el color de algunos indicadores ácido-base sin variar el pH, lo que se conoce como error proteico del indicador. Se emplea azul de tetrabromofenol y un amortiguador citrato a pH 3. El azul de tetrabromofenol es verde en presencia de proteínas a pH 3 y amarillo en su ausencia. El color de la tira

debe leerse a los 60 s. La prueba de proteínas con la tira reactiva puede detectar de 5 a 20 mg/dl de albúmina (dependiendo del método) y es menos sensible a las globulinas, a la proteína de Bence Jones y a las mucoproteínas. Por regla general, la proteinuria es un síntoma frecuente, aunque inespecífico de nefropatía. La proteinuria transitoria se asocia con el ejercicio extenuante, el frío extremo, la administración de adrenalina, la insuficiencia cardíaca congestiva y las convulsiones. Por otro lado, la proteinuria ortostática se caracteriza por la presencia de proteinuria en la posición erecta y su ausencia en la posición tumbada.

ERITROCITOS

Las tiras reactivas para la detección de eritrocitos se basan en el mismo principio químico: la actividad peroxidasa del hemo. La zona reactiva está impregnada con el cromógeno tetrametilbenzidina y un peróxido orgánico. Por la actividad peroxidasa del hemo, el peróxido se reduce y el cromógeno se oxida produciendo un cambio de color de amarillo a verde. Los eritrocitos intactos se lisan en la zona reactiva liberando hemoglobina y produciendo un patrón de puntos verdes. La hematuria, esto es, la presencia de eritrocitos en la orina, es un síntoma de diversas enfermedades. Las principales causas de hematuria son los cálculos, los tumores renales, las glomerulonefritis y la pielonefritis.

LEUCOCITOS

Los leucocitos se detectan por la actividad esterasa de los granulocitos. La zona reactiva contiene un éster pirrólico y una sal de diazonio. La esterasa cataliza la hidrólisis del éster pirrólico para liberar 3-hidroxi-5-fenilpirrol. Este pirrol reacciona a continuación con la sal de diazonio para dar un compuesto violeta. El color debe leerse a los 2 min. La presencia de leucocitos en orina es un síntoma de inflamación en los riñones o las vías urinarias.

NITRITOS

La prueba se basa en la conversión de nitrato a nitrito que producen diversas especies bacterianas. La zona reactiva para nitritos de Multistix contiene ácido p-arsanílico y tetrahydro-benzoquinolin-3-ol. El nitrito reacciona con el ácido p-arsanílico para dar un compuesto de diazonio que, a continuación, se acopla con el quinolol para dar un color rosa. Este debe leerse a los 60 s. Las tiras Combur contienen una benzoquinolina y sulfanilamida que producen un azocolorante rosa con nitrito a los 30 s. La determinación de nitritos es indicativa de la presencia de bacterias que degradan nitrato en la orina.

La presencia de leucocitos y los nitritos positivos sugieren una infección del tracto urinario.

DENSIDAD

La densidad se determina por la variación de pH de determinados polielectrolitos tratados en relación a la concentración iónica. La zona reactiva para la

densidad contiene azul de bromotimol, polimetilvinil éter e hidróxido sódico. Los iones presentes en la orina liberan protones del polimetilvinil éter. Al liberarse los protones, desciende el pH, lo cual produce la variación de color del indicador (azul de bromotimol) desde azul-verdoso a baja densidad (1) hasta amarillo-verdoso a densidad elevada (1,030).

La densidad proporciona una indicación de la concentración de la orina y, por tanto, de la capacidad de los riñones para concentrar o diluir la orina. Los valores con una función renal normal van de 1,002 a 1,035.

pH

El pH se mide con un indicador doble (rojo de metilo/ azul de bromotimol) que proporciona un amplio intervalo (5-9) con unas variaciones de color que van del naranja (pH 5) al azul (pH 9). La variación de color debe leerse a los 60 s. El valor del pH de la orina depende de la alimentación, del estado metabólico, de la presencia de diversas enfermedades y de la toma de algunos medicamentos. Normalmente varía entre 4,5 y 8.

SEDIMENTO URINARIO

Recibe este nombre la fracción que queda cuando se centrifuga la orina. En el sedimento de la orina se analizan los elementos formes o estructuras organizadas: células, cilindros y cristales. Los elementos celulares tienen dos procedencias: (1) las células de descamación del riñón o del tracto urinario inferior y (2) las células de origen sanguíneo (eritrocitos y leucocitos). Los cilindros son estructuras alargadas que pueden ser celulares o acelulares y se forman en los túbulos renales y los conductos colectores. Los cristales tienen diferentes significados clínico-patológicos.

PREPARACIÓN DE LA URINA

Un método de procesado sistemático para obtener el sedimento urinario es centrifugar los tubos de fondo cónico con 12 ml de orina durante, aproximadamente, 5 min a 1.500 rpm en una centrífuga con un rotor de 15 cm de radio. Tras la centrifugación, se sacan los tubos de la centrífuga con cuidado para no remover el sedimento. Luego se vuelca el sobrenadante dejando 1 ml que se mezcla con el sedimento. Para realizar esta operación se han diseñado pipetas especiales que se ajustan a los tubos y dejan ese volumen de 1 ml cuando se vuelcan estos. Hay que colocar una gota en el portaobjetos, cubrirla con el cubreobjetos y observar con el microscopio.

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

El sedimento se observa inicialmente a bajos aumentos y baja iluminación para observar los cilindros. Posteriormente se observa a más aumentos para ver las células, los cilindros, los cristales y los microorganismos. Se cuentan varios campos y se obtiene la media de cada una de estas estructuras que se observen. En los párrafos siguientes se indican las características de cada uno de estos elementos tal cual se observan al microscopio.

ERITROCITOS

Son de pequeño tamaño (8 μm de diámetro y 3 μm de profundidad) con forma de discos bicóncavos y con refracción moderada. Pueden observarse desde cualquier ángulo; de forma lateral pueden tener forma de vidrio de reloj y desde arriba como discos con una palidez central. En orinas hipertónicas se hacen más pequeños al perder agua por ósmosis y arrugarse. Al arrugarse, pierden su forma de disco bicóncavo y se transforman en esferas con espículas. En las orinas hipotónicas los eritrocitos se hinchan y liberan su hemoglobina transformándose en «células fantasmas». Es posible también observar eritrocitos dismórficos.

En la orina de las personas normales se observan entre 0 y 3 eritrocitos por campo o de 3 a 12 por μl de sedimento urinario. El aumento del número de eritrocitos en orina se produce en diversas situaciones tanto renales como generales; entre ellas, las enfermedades renales como la glomerulonefritis, los cálculos renales, las infecciones, el traumatismo renal, los tumores y algunas reacciones a fármacos. Entre las causas fisiológicas se encuentra el ejercicio. Cuando aumentan los eritrocitos en orina y aparecen cilindros eritrocitarios, la sangre es de origen renal. La presencia de eritrocitos dismórficos en orina sugiere una enfermedad glomerular como la glomerulonefritis.

LEUCOCITOS

Los neutrófilos son los leucocitos granulocíticos más comunes de la orina. Son mayores que los eritrocitos, con un diámetro de 10 a 14 μm . Son células esféricas con gránulos citoplasmáticos característicos. Sin teñir tienen un tono grisáceo y parecen granulosos. Pueden presentarse aislados o en racimos.

El incremento del número de leucocitos en orina se denomina leucocituria o piuria. Casi todas las enfermedades renales y los trastornos inflamatorios del tracto urinario producen un incremento del número de leucocitos de la orina, especialmente de neutrófilos.

CÉLULAS EPITELIALES DE DESCAMACIÓN

Son células grandes y planas con un tamaño entre 25 y 40 μm y forma irregular que contienen un pequeño núcleo en el centro. Se desprenden de la uretra y la vagina y no tienen significación clínica.

CÉLULAS EPITELIALES RENALES

Estas células son algo mayores que los eritrocitos y tienen un núcleo en el centro. Su incremento señala una lesión tubular y daño de la membrana basal epitelial. Cuando se encuentran de forma aislada no tienen significado clínico, pero cuando se encuentran en el interior de cilindros señalan un origen tubular.

CILINDROS

Los cilindros son los únicos elementos formes de la orina cuyo único origen es el riñón. Son difíciles de observar e identificar. Se clasifican de acuerdo con su aspecto y sus componentes celulares. Los principales son los hialinos, los granu-

losos, los céreos y los celulares. Los hialinos son incoloros, semitransparentes y homogéneos. Su observación en cantidades significativas señala una enfermedad renal. Los granulados tienen diversas formas y tamaños con texturas variadas entre finas y gruesas dentro de su matriz hialina. Proceden de la degeneración de los cilindros celulares y su presencia señala una enfermedad renal. Los céreos poseen un elevado índice de refracción. Presentan un aspecto homogéneo con bordes bien definidos y extremos romos irregulares. Son incoloros o con un ligero color entre gris y amarillo. Los cilindros céreos se asocian con inflamación y degeneración tubular. Se observan en la insuficiencia renal crónica grave, la hipertensión maligna y la insuficiencia renal aguda.

Los cilindros celulares contienen las células dentro de su matriz hialina. Las células pueden ser eritrocitos, leucocitos y células epiteliales. Los cilindros eritrocitarios aparecen en la glomerulonefritis aguda, la nefritis grave y otras enfermedades renales. Los cilindros leucocitarios en la pielonefritis, la infección renal, la inflamación renal, las enfermedades renales crónicas y las glomerulonefritis aguda. Los cilindros epiteliales contienen células epiteliales tubulares en la matriz y señalan una enfermedad tubular.

CRISTALES

Las forma cristalinas no suelen observarse en las orinas recién emitidas y aparecen cuando se deja reposar la orina. El pH de la orina es fundamental para la aparición de los cristales. En orinas ácidas los principales cristales son los de ácido úrico y los uratos amorfos y los de oxalato cálcico. En orinas alcalinas los principales son los de fosfato triple y carbonato cálcico. En general, la presencia de cristales tiene poco significado clínico.

Los cristales de ácido úrico son de color amarillo, con diferentes formas; las más habituales son las romboideas. Los de oxalato cálcico son incoloros con forma de sobre, con las diagonales señaladas. En cantidades elevadas indican una enfermedad renal grave o intoxicación con etilenglicol. Los de fosfato triple son incoloros con forma de prisma o tapa de ataúd. Finalmente, los de carbonato cálcico son incoloros, pequeños y con forma esféricas.

MICROORGANISMOS

Los principales microorganismos que se observan en el sedimento urinario son las bacterias y las levaduras. Las bacterias son cocos o bacilos que aparecen de forma aislada o en cadenas. Pueden ser contaminantes de origen externo. Cuando la orina se ha recogido de forma adecuada indican una infección del tracto urinario.

Las levaduras son células incoloras con forma oval, de las que la más habitual es *Candida albicans*. Con frecuencia presentan gemaciones y pseudohifas. Pueden confundirse con los eritrocitos. Se encuentran en las infecciones del tracto urinario, especialmente en los pacientes diabéticos.

ANALIZADORES AUTOMÁTICOS DE ORINA

Existen en el mercado diversos instrumentos para automatizar los análisis sistemáticos de orina. Por un lado, están los analizadores de las determinaciones

químicas que emplean la tecnología de las tiras reactivas y, por el otro, los sistemas para el análisis del sedimento. Ambos equipos pueden conectarse para dar lugar a un sistema completo de análisis automático de orina.

ANALIZADORES AUTOMÁTICOS DEL SEDIMENTO URINARIO

En la actualidad, se dispone de dos sistemas para el análisis automático del sedimento urinario, el Sysmex, con sus modelos UF-50, UF-100 y UF-1000i y el Iris iQ200. Los sistemas Sysmex son citómetros de flujo, mientras que el iQ200 emplea el análisis de imagen para clasificar las partículas utilizando una cámara de vídeo.

SYSMEX UF-1000I

Es el modelo más reciente de los citómetros de flujo comercializados por Sysmex para el análisis del sedimento urinario. Sin ningún tipo de preparación previa se colocan los tubos con la orina en el muestreador del aparato. La muestra de orina se mezcla de forma automática y se aspira un volumen de 1,2 ml para el análisis. La orina se mezcla con los reactivos que contienen colorantes de polimetina. Por medio de un flujo hidrodinámico se llevan las partículas a la célula de flujo, por donde pasan alineadas de una en una. En cada una de ellas se mide la luz dispersada hacia delante y lateralmente, así como la fluorescencia inducida por el láser.

Las células y los elementos formes se categorizan en un espacio multidimensional de acuerdo con su tamaño, forma, volumen y características de tinción. Otros componentes sin cuantificar, pero potencialmente patológicos, se detectan y marcan como alarmas donde los umbrales los define el usuario: cristales, levaduras, células pequeñas redondas, espermatozoides, moco y cilindros patológicos, así como eritrocitos anómalos.

IRIS IQ200

El iQ200 puede analizar 60 muestras a la hora. Aspira 0,95 ml de orina a un microscopio de flujo. Una cámara digital capta 500 imágenes de la orina a su paso tras haber sido llevada a una cámara de flujo plana mediante un líquido envolvente de flujo hidrodinámico. El procesador de análisis identifica y recuenta las partículas utilizando el programa informático del analizador. Cada imagen se clasifica automáticamente por el tamaño, la forma, el contraste y la textura. Los resultados se colocan de forma automática en 12 categorías y se dan de forma cuantitativa las concentraciones de eritrocitos, leucocitos, agregados leucocitarios, cilindros hialinos, cilindros patológicos (o cilindros no clasificados), células epiteliales escamosas, células epiteliales no escamosas, bacterias, levaduras, moco y espermatozoides. Los resultados pueden revisarse y modificarse antes de dar el informe final.

Técnicas de diagnóstico molecular

INTRODUCCIÓN

El análisis de los genes mediante diversas técnicas, que de forma general se llaman de diagnóstico molecular, permite diagnosticar con rapidez y precisión enfermedades hereditarias, infecciosas y neoplásicas. Estas técnicas se están incorporando de forma progresiva a los laboratorios clínicos, donde van a ocupar un puesto importante. En este capítulo se presentan las principales características de las técnicas de diagnóstico molecular y su aplicación en los laboratorios clínicos.

AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Aunque las técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos han hecho posible la realización de los análisis moleculares empleando directamente los especímenes sin necesidad de aislar los ácidos nucleicos, algunas técnicas de diagnóstico molecular requieren el aislamiento de los ácidos nucleicos. Una vez hecho esto, a menudo es necesario saber la cantidad de ácido nucleico. A continuación se exponen estas técnicas de aislamiento y cuantificación.

ESPECÍMENES

El ácido nucleico puede obtenerse a partir de homogeneizados de tejidos o a partir de células sanguíneas. Los especímenes de tejidos sólidos deben romperse antes de comenzar cualquier procedimiento de aislamiento del ADN. Normalmente, esto se realiza sometiendo el espécimen a fuerzas mecánicas que proporcionen células individuales disociadas con un mínimo de lisis. La rotura mecánica se consigue, generalmente, con un homogeneizador. Sin embargo, cuando se desea ADN de gran peso molecular, deben inhibirse las nucleasas manteniendo los especímenes de tejido a temperaturas muy bajas. Para ello, justo después de la escisión, se congela el espécimen en nitrógeno líquido y a continuación se realiza la rotura pulverizando el tejido en presencia de hielo seco con un mezclador eléctrico o un mortero y un pistón. Tras sublimar el hielo seco de la mezcla de polvo resultante, pueden resuspenderse las células para iniciar el procedimiento de aislamiento del ADN.

Para los especímenes de sangre, se recoge sangre con etilendiaminotetraacetato (EDTA) como anticoagulante. Aunque los leucocitos nucleados son sólo una pequeña minoría del total de las células sanguíneas, pueden separarse fácilmente del plasma y de los glóbulos rojos mediante centrifugación. La capa resultante de leucocitos se separa y se resuspende en un tampón adecuado para aislar el ADN. El contenido de este ácido de las células humanas es de unos 5 pg, y a partir de 20 ml de sangre anticoagulada con EDTA pueden obtenerse entre 250 y 500 µg.

El diagnóstico prenatal requiere ADN del feto o de tejidos derivados de este, como las vellosidades coriónicas. Los especímenes de biopsias de estas vellosidades deben diseccionarse para separar el tejido fetal del materno. En algunas ocasiones, se emplea líquido amniótico para el diagnóstico prenatal. En este caso, las células se aíslan por centrifugación y se emplean para extraer el ADN.

AISLAMIENTO DEL ADN

Los métodos de extracción de ADN pueden ser de extracción en fase líquida o en fase sólida. En los métodos de extracción en fase líquida existen muchas variaciones en los detalles de los protocolos de aislamiento, pero todos requieren, como primer paso la lisis de las células y los núcleos. Con este fin, se incubaba la suspensión celular con detergentes y/o enzimas líticas. El paso siguiente es disociar el ADN de las proteínas que lleva unidas. La mayoría de los protocolos utilizan una enzima proteolítica fuerte como la proteinasa K. Este paso también inactiva las nucleasas celulares que degradan el ADN. Las proteínas parcialmente degradadas se eliminan de la disolución mediante una extracción con fenol/cloroforno o una precipitación salina. El ADN genómico que permanece en solución se precipita por adición de etanol. En la figura 17-1 se presenta un esquema de los pasos de un procedimiento de extracción de ADN en fase líquida. El ADN en forma de grumos puede recogerse con una varilla de vidrio. Se seca y se redisuelve en un tampón acuoso adecuado y, de esta forma, es estable durante varios años.

Los métodos de extracción de ADN en fase sólida utilizan membranas de sílice o partículas magnéticas. En ambos casos el ADN se une de forma reversible a estas fases sólidas. Hay extractores automáticos de ADN, capaces de preparar varios especímenes en unas pocas horas y que hacen mínima la intervención de los operadores.

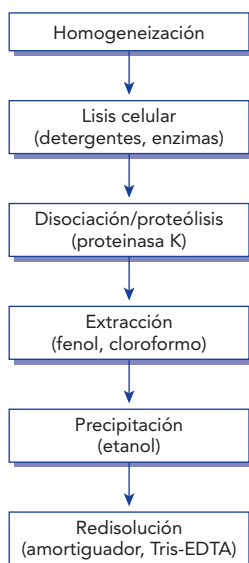


FIGURA 17-1
Pasos para aislar el ADN de células y tejidos.

AISLAMIENTO DEL ARN CELULAR TOTAL

A diferencia del ADN, el ARN tiene una cadena sencilla y es relativamente inestable. Durante el aislamiento y almacenamiento del mismo debe tenerse mucho cuidado para impedir que lo degraden las ribonucleasas (RNAsas). Para aislar el ARN, las células o los tejidos se homogeneizan en una solución que contenga inhibidores de las RNAsas, como el agente caotrópico isotiocianato de guanidinio. Igual que en el caso del ADN, existen métodos en fase líquida y fase sólida. Para el paso siguiente existen muchos métodos que implican separar el ARN del ADN genómico. Como en el aislamiento del ADN, el ARN purificado se precipita con etanol durante el paso final de todos los procedimientos. Las disoluciones acuosas de ARN deben almacenarse congeladas.

AISLAMIENTO DE ARN MENSAJERO

Muchas aplicaciones no pueden realizarse con ARN total y debe aislarse ARN mensajero (ARNm). Para ello se aprovecha la circunstancia de que la mayoría de los ARNm tienen una cola de poli-A. Se pasa el ARN celular total por una columna que contiene poli-dT unido a una fase sólida. El ARNm se une al poli-dT y queda retenido en la fase sólida, el resto de ARN se eluye y, posteriormente, se eluye también el ARNm.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO

La cantidad total de ADN de un espécimen puede determinarse midiendo su absorbancia a 260 nm y a 280 nm con un espectrofotómetro. La absorbancia a 260 nm se emplea para calcular la concentración de ADN. Una disolución de 50 µg/ml proporciona una absorbancia de 1, por lo que la concentración de ADN en el espécimen en mg/ml es igual a $50 \times A_{260}$. El cociente de absorbancias 260/280 se utiliza para calcular la pureza de la preparación. Un cociente inferior a 1,8 indica que hay impurezas.

La cantidad de ARN en una disolución se mide también por espectrometría. A 260 nm, una solución de este ácido de 40 µg/ml presenta una absorbancia de 1, por lo que la concentración de ARN en el espécimen, en µg/ml, es igual a $40 \times A_{260}$.

TÉCNICAS DE SEPARACIÓN DEL ADN

La electroforesis es la principal técnica para separar las moléculas de ADN. Como en cualquier fragmento dado de este ácido la carga por unidad de longitud es la misma, debido a los grupos fosfato, todos los especímenes de ADN deberían moverse hacia el ánodo con la misma movilidad. Sin embargo, en los geles se consigue la separación debido a la resistencia al movimiento de los especímenes producida por la matriz del gel. Las moléculas más grandes de ADN tienen mayor dificultad para pasar a través de los poros de este, mientras que las moléculas más pequeñas están menos impedidas. Consecuentemente, la movilidad de las moléculas durante la electroforesis en gel depende del tamaño, de forma que las menores se mueven más rápido.

ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA Y POLIACRILAMIDA

Existen dos tipos de matrices de gel que se emplean para los análisis de ADN: la de agarosa y la de poliacrilamida. Los poros de los geles de agarosa tienen un tamaño comprendido entre 100 y 300 nm³, mientras que los de los geles de poliacrilamida tienen menor tamaño. Para adecuarse al intervalo de tamaño de las moléculas que van a separarse, hay que elegir las concentraciones del gel. Los geles que contienen un 0,3% de agarosa separan las moléculas de ADN de doble cadena de entre 5 y 60 kb, mientras que los que tienen un 2% se utilizan para las moléculas de entre 0,1 y 3 kb. Sin embargo, muchos laboratorios usan como rutina geles del 0,8% que son adecuados para separar moléculas de ADN en el margen de 0,5 a 10 kb.

Los geles de poliacrilamida se usan para separar fragmentos de ADN más pequeños, ya que tienen mayor poder de resolución. Los geles más utilizados son aquellos cuya concentración de acrilamida está entre el 5 y el 15%, pues proporcionan buenas separaciones en el margen de 100 a 1.000 pares de bases. Como los geles separan el ADN según el tamaño, su peso molecular puede determinarse a partir de su movilidad electroforética, utilizando estándares de peso molecular conocido.

Los geles de agarosa para ADN se corren de forma horizontal totalmente sumergidos en el amortiguador, por lo que la electroforesis de ADN recibe a menudo el nombre de submarina. Los geles habituales tienen una longitud de unos 25 cm y 12 cm de ancho, y se corren a un voltaje de 1,5 V/cm durante una noche. Para los análisis rápidos que no necesitan una separación muy grande de las moléculas de ADN, pueden utilizarse minigeles, que tienen menos de 10 cm de longitud. De esta forma, podrá obtenerse la separación en 2 o 3 h.

Los geles de acrilamida suelen emplearse de forma vertical. Una vez que ha corrido el sistema, el ADN separado en los geles deberá teñirse y visualizarse. El reactivo más empleado es el colorante fluorescente bromuro de etidio.

ELECTROFORESIS EN GEL CON CAMPOS PULSANTES

Generalmente, la electroforesis en gel no permite separar moléculas muy grandes de ADN debido a que un campo eléctrico estacionario las extiende, de forma que se mueven a lo largo del gel con un movimiento serpenteante, a una velocidad independiente de su longitud. La electroforesis en geles con campos pulsantes (PFGE) permite separar las moléculas muy grandes de ADN. En la PFGE, la dirección del campo eléctrico cambia periódicamente, lo que obliga a las moléculas a reorientarse antes de continuar su movimiento serpenteante a través del gel. Como esta reorientación requiere más tiempo de las moléculas grandes, estas se mueven más lentamente.

ENZIMAS UTILIZADAS EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Para los estudios moleculares en los que hay que analizar el ADN se utilizan diversas enzimas. Las más importantes son las endonucleasas de restricción, las ADN ligasas, las ADN polimerasas y la transcriptasa inversa. Las endonucleasas de restricción se utilizan para cortar trozos grandes de ADN en frag-

mentos más pequeños y para preparar los fragmentos que van a clonarse. Estas endonucleasas reconocen secuencias de ADN con una longitud de 4 a 6 nucleótidos, que rompen de una forma definida. Reconocen secuencias palindrómicas, es decir, que se leen igual en ambas direcciones cuya rotura produce extremos cohesivos o romos (fig. 17-2).

Las polimerasas son esenciales en los procedimientos de amplificación de los ácidos nucleicos. Por su parte, la transcriptasa inversa se emplea para hacer copias de ADN complementario (ADNc) de moléculas de ARN para su clonación, preparar sondas y analizar ácidos nucleicos.

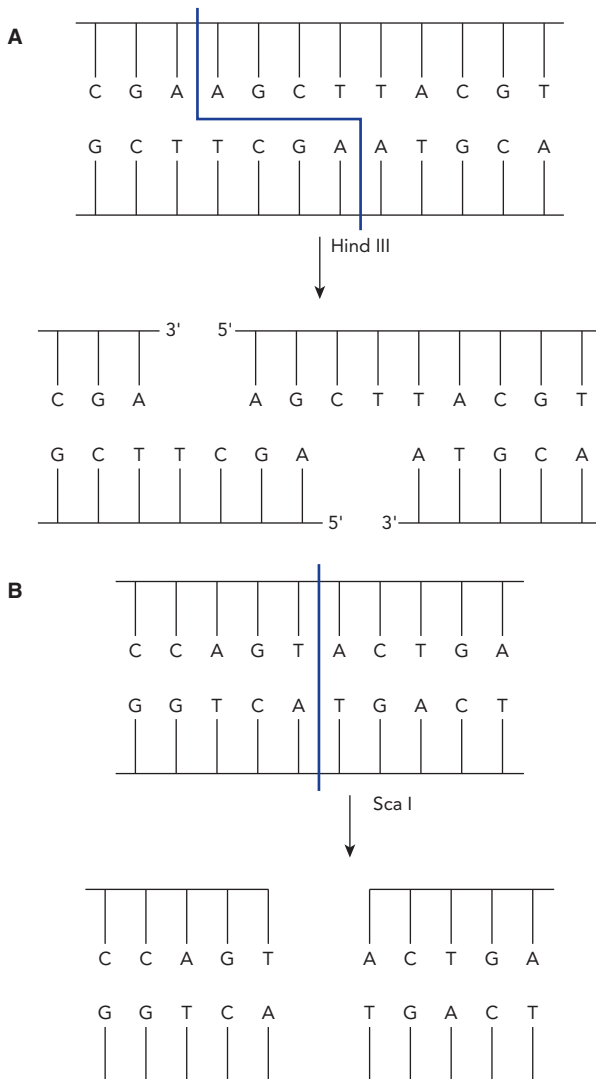


FIGURA 17-2 Mecanismo de acción de las endonucleasas de restricción. **A.** Con formación de extremos cohesivos. **B.** Con formación de extremos romos.

Las técnicas de amplificación son aquellas que incrementan la cantidad de la diana o la señal con el fin de conseguir límites de detección adecuados. En la amplificación de la diana se produce un número elevado de copias de la región de interés en el ADN mediante métodos *in vitro*. En la amplificación de la señal, la cantidad de la diana permanece constante y se incrementa la señal por diversos métodos. Los principales métodos de amplificación de la diana son la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) y la reacción en cadena de la ligasa (*ligase chain reaction*, LCR). Dentro de las técnicas de amplificación de la señal se encuentra la del ADN de cadena ramificada (*branched-chain DNA*).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

PRINCIPIOS Y PROCESO GENERAL

El fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) es la repetición cíclica de tres reacciones simples, que varían sólo en la temperatura de incubación. Este método emplea una ADN polimerasa termoestable, grandes cantidades de los desoxinucleósidos trifosfato (trifosfato de desoxiadenosina [dATP], desoxiguanosina [dGTP], desoxicitidina [dCTP] y desoxitimidina [dTTP]) y dos oligonucleótidos cebadores de cadena sencilla, complementarios de secuencias conocidas del ADN diana.

En la figura 17-3 se describe de forma esquemática el proceso de la reacción en cadena de la polimerasa. El primer paso es desnaturalizar por calentamiento a gran temperatura el ADN nativo de doble cadena para obtener cadenas sencillas. En el segundo paso, que se realiza a temperatura reducida, los dos oligonucleótidos cebadores se hibridan con sus secuencias complementarias en las cadenas opuestas del ADN que se quiere amplificar. Se eligen oligonucleótidos que encierren el material genético que se desea amplificar. Los dos cebadores no deben hibridarse uno con otro y sus lugares de hibridación deben encontrarse lo bastante alejados entre sí para que sea posible sintetizar productos nuevos. La especificidad del método deriva de la precisión, aun con cebadores cortos, de esta reacción de hibridación ADN:ADN. La especificidad de la hibridación puede controlarse ajustando la temperatura, de forma que se pueda amplificar las secuencias flanqueadas por regiones similares, aunque no idénticas, en complementariedad con los cebadores.

El tercer paso es sintetizar una segunda cadena complementaria de nuevo ADN, que se produce al extenderse cada cebador utilizando la ADN polimerasa Taq (de la bacteria *Thermus aquaticus*), en presencia de un exceso de desoxirribonucleósidos trifosfato, y copiando la secuencia de ADN molde adyacente. Por cada cebador se sintetiza una nueva cadena. Las propias cadenas de ADN resintetizadas son moldes de los cebadores, por lo que los ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación del cebador y extensión producen una acumulación exponencial del ADN.

Los dos cebadores y los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato deben hallarse inicialmente en grandes cantidades respecto a la cantidad de ADN o

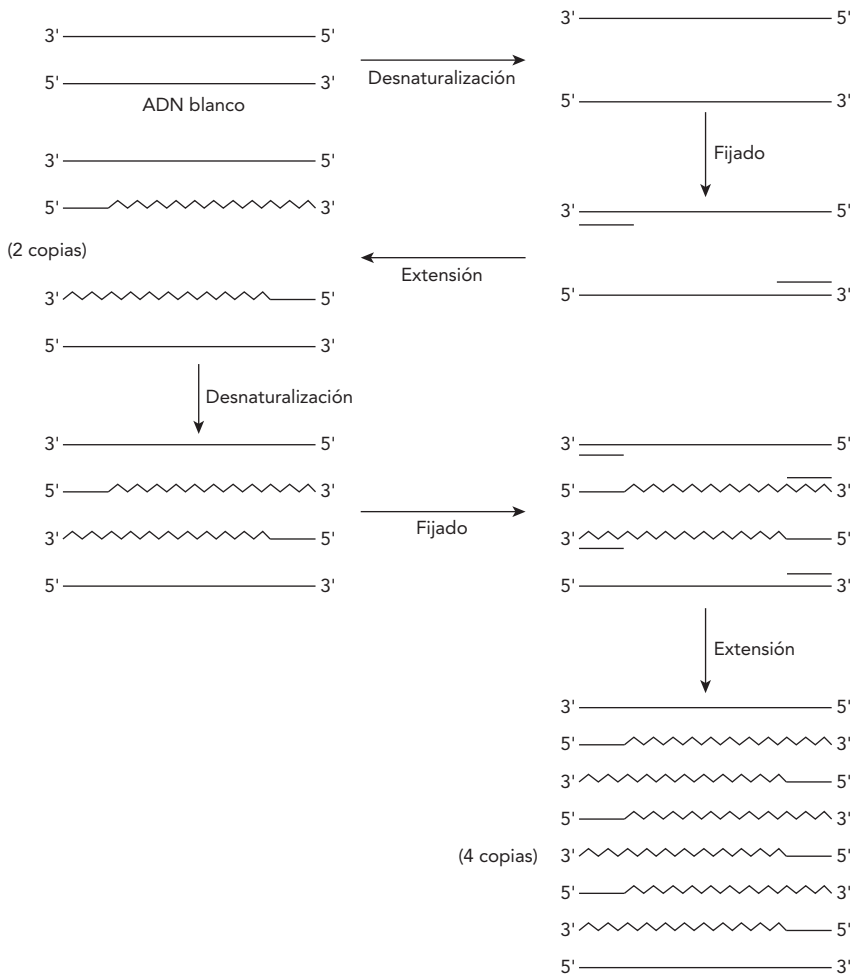


FIGURA 17-3 Mecanismo de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa.

sustrato, ya que los cebadores son necesarios para comenzar cada cadena de ADN, y los desoxirribonucleósidos, para sintetizarlas.

Tras la extensión de los cebadores el ciclo se repite. Primero, aumentando la temperatura de modo que todo el ADN de doble cadena se convierta en ADN de cadena sencilla y abortando cualquier polimerización que avance; y luego, disminuyendo la temperatura para que puedan tener lugar los pasos de hibridación y extensión.

Un ejemplo de las condiciones de un proceso de PCR es:

- Desnaturalización inicial 94 °C/5 min
- 25 ciclos de:
 - Desnaturalización 94 °C/1 min
 - Hibridación 60 °C/1 min
 - Extensión 70 °C/1 min
- Extensión final 70 °C/10 min

En la figura 17-4 se describen los constituyentes y la realización práctica de un proceso de PCR. Este dura aproximadamente 2 h y el volumen de reacción se mantiene aproximadamente en 100 μ l. El proceso de PCR no requiere purificar el ADN que se amplifica. Las proteínas contaminantes que pueden interferir se inactivan durante el paso inicial de desnaturalización. El procedimiento exige también conocer suficientemente la secuencia del ADN sustrato, al menos la del lugar de hibridación de los cebadores, para poder sintetizar los cebadores complementarios adecuados. En la actualidad se comercializan equipos de reactivos para realizar los procesos de PCR. Contienen todos los reactivos necesarios para realizar la amplificación (ADN polimerasa Taq, dATP, dTTP, dGTP, dCTP y amortiguadores), excepto el ADN que se quiere amplificar y los oligonucleótidos cebadores correspondientes.

CANTIDAD DE AMPLIFICACIÓN

La cantidad de amplificación del proceso de PCR viene dada por la fórmula:

$$N = n(1 + E)^c$$

donde N = cantidad de producto final; n = cantidad inicial de fragmentos de ADN diana que van a amplificarse; E = eficacia media; c = número de ciclos.

En la figura 17-5 se muestra la amplificación geométrica del proceso de PCR. La visualización de una banda en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio requiere alrededor de 10^{12} pb. Así, en condiciones óptimas, una sola molécula de 100 nucleótidos produce una banda adecuada tras 39 ciclos. Sin embargo, 10^5 moléculas de 100 nucleótidos producirán la misma cantidad de ADN tras sólo 21 ciclos.

Mezcla de reacción con un volumen de 100 μ l

1 mg de muestra de ADN
oligonucleótidos cebadores
1 mmol/l



Desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dTTP y dGTP)
200 mmol/l cada uno

Amortiguador Tris pH 8,3 10 mmol/l
MgCl 1,5 mmol/l
KCl 50 mmol/l
Dimetilsulfoxido 100 ml/l

*Paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 min
*25-30 ciclos de los tres pasos siguientes:

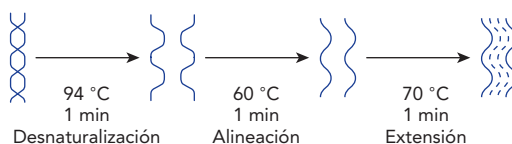


FIGURA 17-4

Constituyentes y realización práctica de un proceso de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

*Paso final de extensión a 70 °C durante 10 min

| Ciclo | Cantidad relativa | Ciclo | Cantidad relativa |
|-------|-------------------|-------|-------------------|
| 1 | 2 | 16 | 65.636 |
| 2 | 4 | 17 | 131.072 |
| 3 | 8 | 18 | 262.144 |
| 4 | 16 | 19 | 524.288 |
| 5 | 32 | 20 | 1.048.576 |
| 6 | 64 | 21 | 2.097.152 |
| 7 | 128 | 22 | 4.194.304 |
| 8 | 256 | 23 | 8.388.608 |
| 9 | 512 | 24 | 16.777.216 |
| 10 | 1.024 | 25 | 33.554.432 |
| 11 | 2.048 | 26 | 67.108.864 |
| 12 | 4.096 | 27 | 134.217.728 |
| 13 | 8.192 | 28 | 268.435.456 |
| 14 | 16.384 | 29 | 536.870.912 |
| 15 | 32.768 | 30 | 1.073.741.824 |

FIGURA 17-5

Amplificación geométrica del proceso de la reacción en cadena de la polimerasa.

Tras 20 ciclos, una eficacia del 100% producirá $N = (1 + 1)^{20} = 1.048.576$ moléculas, mientras que con un 80% de eficacia sólo producirán $N = (1 + 0,8)^{20} = 127.482$ moléculas, tras el mismo número de ciclos; esto es, el rendimiento sólo será del 12%. En esta situación, siempre que se tengan diez copias del molde por reacción se tendrá un 100% de casos positivos, mientras que cinco copias producirán un 99%, y una copia, sólo un 63%.

AUTOMATIZACIÓN

Dado que las tres reacciones del proceso de PCR tienen lugar en el mismo tubo de reacción y todos los componentes (polimerasa Taq, cebadores y desoxirribonucleósidos trifosfato) son termoestables, esta técnica es fácil de automatizar. Se ha conseguido utilizando el llamado amplificador de ADN o *termociclador*. El proceso puede realizarse en tubos de microcentrífuga, placas de microtitulación o tubos capilares.

AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLEX

Se denomina *amplificación múltiplex* al método que se usa para amplificar más de un fragmento simultáneamente durante un proceso de PCR. Los cebadores deben elegirse de forma que no hibriden entre sí y que generen fragmentos de tamaños diferentes para que puedan separarse adecuadamente por electroforesis en gel. Al aumentar el número de fragmentos que se amplifican a la vez, hay que aumentar el tiempo de extensión que puede ser de hasta varios minutos por ciclo.

La gran sensibilidad del proceso de PCR lo hace muy vulnerable a la contaminación por cantidades mínimas arrastradas de experimentos anteriores. Cuando se realice este proceso deben extremarse las precauciones para minimizar la formación de aerosoles y otras posibilidades de contaminación. Deben separarse físicamente las áreas del laboratorio donde se efectúen las PCR de aquellas en las que se analicen los productos de la reacción. Hay que tener un gran cuidado con las pipetas, las puntas de pipeta y los reactivos.

DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS

El método más empleado para analizar los productos del proceso de PCR es la electroforesis en gel. Se utilizan geles de agarosa o de poliacrilamida, según el tamaño de las secuencias de ADN amplificadas. Los productos de amplificación separados en el gel pueden visualizarse directamente con colorantes fluorescentes como el bromuro de etidio.

La forma más frecuente de identificar los productos del proceso de PCR es usar sondas marcadas con las que hibridar, bien en fase sólida o en fase líquida. Las sondas pueden marcarse con isótopos radiactivos o con marcadores no radiactivos. El isótopo radiactivo más utilizado para este fin es el ^{32}P . Para la rutina de los laboratorios clínicos se prefieren los marcajes no radiactivos. Se han utilizado sondas de oligonucleótidos marcadas con ésteres de acridinio, peroxidasa, fosfatasa alcalina, digoxigenina, colorantes fluorescentes y quimioluminiscencia.

Los productos del proceso de PCR pueden secuenciarse para su detección. Se han descrito varios protocolos para la secuenciación directa de estos productos. Tras eliminar los desoxinucleótidos y los cebadores que no se hayan utilizado, el producto de doble cadena podrá secuenciarse por los métodos habituales. Puede obtenerse el producto del proceso de PCR de una sola cadena mediante una técnica llamada reacción en cadena de la polimerasa asimétrica, en la que se utiliza una cantidad mucho menor de uno de los cebadores, la digestión enzimática selectiva de una de las cadenas o la captura selectiva de una de ellas marcando un oligonucleótido con biotina e inmovilizando el producto sobre lechos magnéticos recubiertos de estreptavidina.

El ADN amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa también se cuantifica e identifica mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA O A TIEMPO REAL

Esta técnica permite obtener la concentración inicial del ADN molde. Uno de los métodos más utilizados es el sistema de detección 5'-nucleotidasa o prueba *Taq-Man*. En esta se marca uno de los oligonucleótidos cebadores con un compuesto fluorescente y una molécula apagadora en cada extremo. Cuando los cebadores se unan a su secuencia diana, la actividad 5-exonucleasa de la polimerasa *Taq* degradará y liberará el compuesto fluorescente del apagador. De esta forma, se generará una señal que aumentará de forma proporcional al número de moléculas iniciales. El sistema de detección es capaz de inducir y detectar la fluorescencia en tiempo real a medida que avanza el proceso de PCR.

REACCIÓN EN CADENA DE LA LIGASA

El método de reacción en cadena de la ligasa utiliza una ligasa termoestable. En la figura 17-6 se presenta el proceso esquemáticamente. Se utilizan cuatro cebadores que hibridan en regiones inmediatamente adyacentes al molde. Dos de ellos hibridan con la cadena superior. El segundo par de cebadores es complementario del primero e hibrida con la cadena opuesta. La hibridación entre los cebadores se evita incluyendo ADN portador y una cola 3' en cebadores opuestos. Estos cebadores se mezclan con el molde y la ligasa termoestable, y se incuban a 95 °C durante 1 min para la desnaturalización, y a continuación a 65 °C durante 4 min para la hibridación del cebador y la ligazón. Los pasos de desnaturalización y alineación/ligazón se repiten 10-20 ciclos.

La amplificación se produce sólo tras la ligazón de los oligonucleótidos adyacentes. El cebador de adelante debe estar fosforilado en el extremo 5', ya que la ADN ligasa requiere como sustrato un 5'-fosforilado y un 3' libre. El cebador 5' está marcado en su extremo con ^{32}P , y los productos amplificados se observan tras la electroforesis en gel y la autorradiografía. Alternativamente, para la detección no radiactiva de estos productos pueden sintetizarse cebadores que lleven biotina.

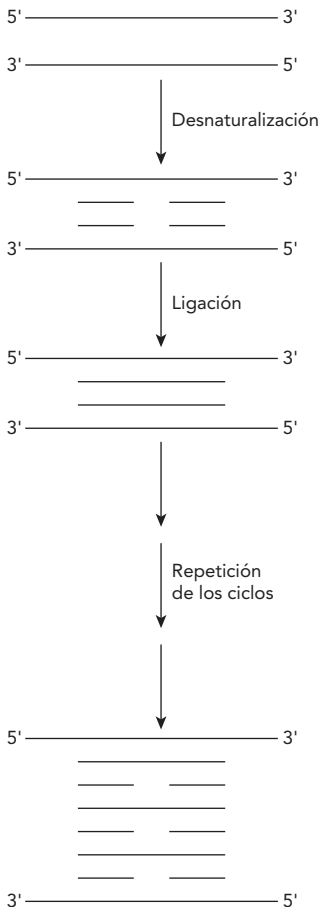


FIGURA 17-6

Proceso de amplificación de la reacción en cadena de la ligasa.

MÉTODO DEL ADN DE CADENA RAMIFICADA

Este método amplifica la señal. Para ello se hace hibridar el ácido nucleico diana con un gran número de sondas de captura fijadas a un pocillo. A continuación se produce la hibridación con una serie de sondas de extensión. El resultado final es una sonda de amplificación muy ramificada con muchas copias de enzimas generadoras de señal que actúan sobre un sustrato quimio-luminiscente para producir la luz.

SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Una sonda es un fragmento de ácido nucleico que se usa para el reconocimiento específico de una molécula determinada de ácido nucleico de cadena sencilla en un proceso de hibridación. Las sondas pueden o no estar marcadas con una o varias moléculas reporteras dependiendo de la técnica utilizada para detectar la hibridación. Las sondas pueden obtenerse por clonación, producirse mediante PCR o sintetizarse.

SONDAS CLONADAS

Se obtienen mediante técnicas de ADN recombinante insertando el fragmento de ADN en un plásmido que luego se propaga en una bacteria. La sonda resultante es de doble cadena y debe desnaturalizarse antes de ser utilizada.

SONDAS PRODUCIDAS POR PCR

Durante la amplificación, el producto de la PCR se marca utilizando nucleótidos radiactivos o un compuesto fluorescente.

SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Estas sondas tienen una longitud de entre 15 y 45 nucleótidos, son de cadena sencilla y se sintetizan por métodos químicos a partir de una secuencia especificada. Se sintetizan con sistemas automáticos que emplean el método en fase sólida de la fosoramidita. Para ello, se une el primer nucleótido por su hidroxilo 3' a la matriz sólida. A continuación se añade el segundo nucleótido, con un grupo fosoramidita en su hidroxilo 3' y otro bloqueante en el hidroxilo 5', con lo que se produce la reacción de unión de los dos nucleótidos. Luego se elimina el grupo bloqueante del extremo 5' del segundo nucleótido, se añade el tercer nucleótido con un grupo fosoramidita en el extremo 3' y otro bloqueante en el hidroxilo 5', y se repite el proceso anterior. De esta forma, se va sintetizando la secuencia programada desde el extremo 3' al 5'. El sintetizador de ADN ensambla oligonucleótidos con una longitud de hasta 200 nucleótidos y una tasa de síntesis de 12 a 15 min por ciclo.

Las principales características de las sondas de oligonucleótidos sintéticos son su producción rápida y barata y su excelente estabilidad. Sus desventajas más importantes son que exigen conocer la secuencia de nucleótidos con la que van a hibridar, y unas condiciones de hibridación y de lavado más rigurosas.

MARCAJE DE LAS SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Las sondas se marcan durante su síntesis o, posteriormente, utilizando isótopos radiactivos o marcadores no radiactivos. La actividad específica de la sonda depende de la del marcaje introducido en ella y de la densidad de este.

El isótopo radiactivo más utilizado para marcar los nucleótidos en la mayoría de las técnicas de ADN es el ^{32}P , mientras que el ^3H y el ^{35}S se usan principalmente para la hibridación *in situ*. Como la mayoría de los isótopos utilizados para marcar las sondas de ácidos nucleicos tienen una vida media corta, hay que preparar las sondas frecuentemente. Las marcadas con isótopos radiactivos se detectan cuantitativamente por contaje en centelleo líquido, y cualitativamente por autorradiografía, por exposición sobre una película fotográfica. El límite de detección es de 0,2 a 1 pg de ADN.

Para la rutina en los laboratorios clínicos se prefieren los marcajes no radiactivos. Pueden ser directos, uniendo directamente el marcador al ácido nucleico mediante un enlace covalente, o indirectos, uniendo un hapteno al ácido nucleico que luego se detecta. Se dispone de varios procedimientos para introducir marcajes no radiactivos en las moléculas de ADN de cadena sencilla; entre otros, la biotilación covalente, la biotilación enzimática y la poliadenilación, así como la unión directa de enzimas marcadoras, como la fosfatasa alcalina y la peroxidasa.

La estrategia general para el marcaje no isotópico de los oligonucleótidos sintéticos comprende cinco pasos básicos: síntesis de los oligonucleótidos; funcionalización de los mismos; rotura y desprotección en soporte sólido; unión del marcaje; y purificación y análisis.

HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La hibridación es el proceso de complementación de pares de bases entre dos cadenas sencillas de ADN, ADN y ARN, o ARN con y sin sentido. La fuerza de hibridación entre las secuencias de los ácidos nucleicos es proporcional a su grado de homología.

La sensibilidad de las reacciones de hibridación entre un fragmento de ADN y una sonda depende de varios factores. Los más importantes son la longitud y la complementariedad de la sonda, la concentración de esta, las condiciones de hibridación, la actividad específica de la sonda marcada y la concentración del ADN que se va a identificar.

En la mayoría de los casos, el fin principal de la hibridación es conseguir la máxima interacción entre la sonda y la molécula de ácido nucleico que se quiere detectar. Cuando la molécula de ácido nucleico está inmovilizada sobre un soporte sólido, se establecen unas condiciones de hibridación que hagan máximas las interacciones con la sonda, independientemente de la especificidad de las uniones. A continuación, se establece la especificidad aumentando gradualmente el rigor de las soluciones de lavado, desde condiciones permisivas con bajas temperaturas y fuerzas iónicas elevadas hasta condiciones muy rigurosas con altas temperaturas y fuerzas iónicas bajas.

Como en toda técnica analítica, hay que procesar controles positivos y negativos. Los primeros contienen secuencias complementarias de la sonda. Se utilizan para comprobar que la preparación del espécimen es adecuada para pro-

ducir la hibridación y para asegurar que la sonda hibridará de forma específica en las condiciones de la prueba. La sonda de control puede emplearse también para valorar la sensibilidad de la prueba, cuando se elija un control positivo cercano al límite inferior de detección. Por su parte, el control negativo, esto es, un espécimen que no contenga secuencias complementarias a las de la sonda, se utiliza para valorar la especificidad de las interacciones sondadiana.

Los controles de la sonda incluyen secuencias vector o sondas no relacionadas que se marcan, hibridan y detectan en condiciones idénticas a las de la prueba. Estos controles permiten seguir la señal de fondo generada por la localización de la sonda mediante el atrapamiento físico o interacciones de carga sin hibridación.

Hay varias técnicas de hibridación; las más usadas son la hibridación en disolución, la hibridación directa, la hibridación sándwich y la hibridación *in situ*.

HIBRIDACIÓN EN DISOLUCIÓN

En la hibridación en disolución, la sonda y el espécimen interactúan en disolución. La hibridación puede detectarse por la unión específica de los híbridos a una matriz sólida, como la hidroxiapatita, que une sólo estructuras dúplex. Una vez unidos los híbridos, la sonda que no ha hibridado puede eliminarse mediante lavado. La detección del marcaje en la sonda unida permite cuantificar la reacción de hibridación.

Como en este tipo de hibridación sólo se desean los híbridos de la sonda con las moléculas de ácido nucleico que quieren detectarse, sus condiciones de hibridación son mucho más rigurosas que en otras técnicas. Se establecen las condiciones óptimas de cada variable, como la temperatura y la fuerza iónica, para maximizar el número de especies específicas que permanecen tras completarse la hibridación.

HIBRIDACIÓN DIRECTA

Consiste en la reacción de las sondas marcadas de cadena sencilla con el ADN o el ARN del espécimen que se ha desnaturalizado e inmovilizado sobre un soporte sólido. Después de la reacción, la fase sólida se lava y se cuantifica la sonda hibridada. Los métodos de hibridación directa más empleados son la hibridación en filtro, la transferencia Southern y la transferencia Northern.

Hibridación en filtro

La hibridación en filtro es la técnica de hibridación más simple. Consiste en colocar ADN o ARN desnaturalizados, extraído de células o tejidos, sobre una membrana que actúa como soporte inerte del ácido nucleico y lo hace accesible a la hibridación con las sondas marcadas. La modificación más efectiva de esta técnica es el llamado *dot blot*, que permite procesar fácilmente sobre una misma membrana más de 70 especímenes diferentes. Las principales ventajas de este método son su rapidez, ya que no requiere un tratamiento con enzimas de restricción ni electroforesis en gel, y que puede utilizarse para muchos especímenes a la vez. Que todos los especímenes y controles estén expuestos exacta-

mente a los mismos reactivos y condiciones aumenta la coherencia interna de la prueba. La técnica es muy sensible, aunque a veces no sea muy específica.

Transferencia Southern

En la transferencia Southern (fig. 17-7) se separan los fragmentos de ADN, obtenidos tras la acción de una endonucleasa de restricción, por electroforesis en gel de acuerdo con su tamaño. Los fragmentos mayores se mueven más lentos que los pequeños. Una vez separados los fragmentos se transfieren a una membrana inerte de nailon y la separación producida permanece en el gel. Para transferir los fragmentos de ADN del gel al soporte sólido, generalmente se emplea un tratamiento ácido que elimina las purinas y fragmenta los trozos de ADN separados, haciéndolos más pequeños y fáciles de eluir del gel. Luego se desnaturalizan las bases, ya que las cadenas sencillas se unen a las membranas con mayor eficacia, y se neutraliza.

Los primeros métodos de transferencia utilizaban la acción capilar con la membrana en contacto con el gel. En la parte superior se colocaba un papel

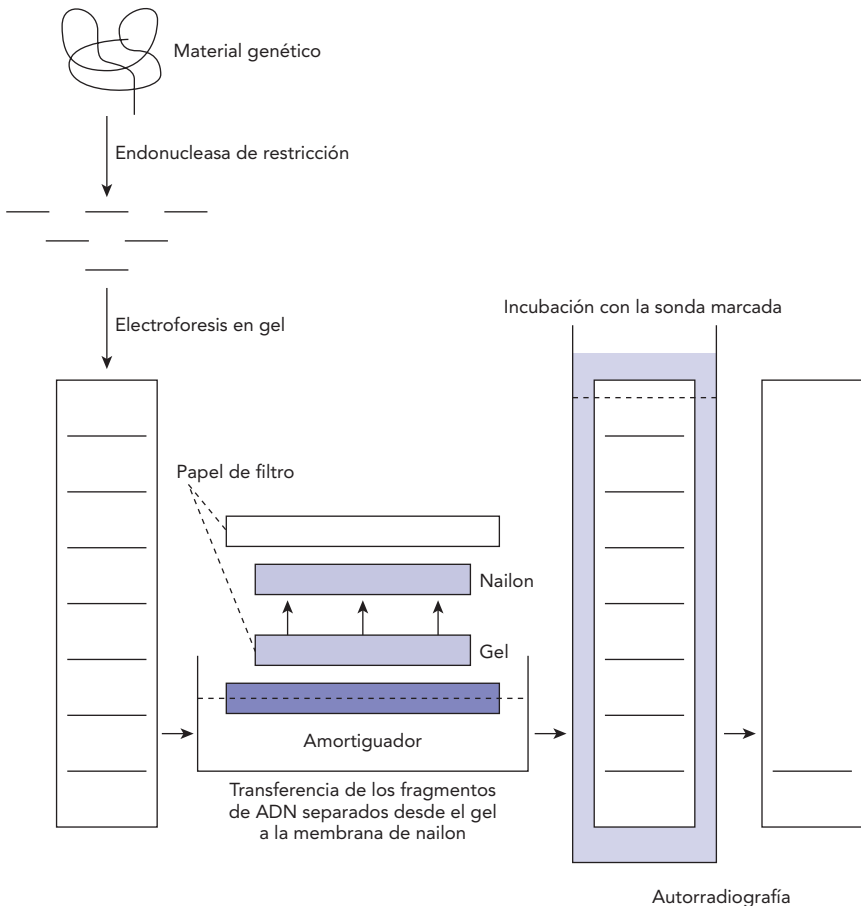


FIGURA 17-7 Transferencia Southern.

absorbente para embeber el tampón de transferencia y el ADN al filtro. Así se permitía que se produjera la transferencia durante la noche. En cambio, en la actualidad, se emplean sistemas de vacío o de presión para acelerar la transferencia.

Consumada esta, el ADN se inmoviliza de forma permanente sobre el filtro, por calentamiento o tratamiento con luz ultravioleta. En este momento, el filtro está listo para la hibridación. Para ello, se sumerge la membrana en una solución de hibridación que contiene la sonda marcada de cadena sencilla. En la membrana tiene lugar la reacción de hibridación con la sonda, fijándose esta a las secuencias complementarias, por lo que es retenida en el filtro en aquellas posiciones donde haya fragmentos complementarios de ADN de la sonda marcada. Transcurrido el tiempo suficiente para que se produzca el proceso de fijado, se saca la membrana de la solución de hibridación y se lava. La localización de los fragmentos que hayan hibridado se realiza por autorradiografía, si la sonda estaba marcada radiactivamente, o mediante otras técnicas, si se usaron sondas marcadas con compuestos no radiactivos.

La interpretación se lleva a cabo observando las bandas por autorradiografía o espectroscopia, que indican la presencia de ácido nucleico en el espécimen que hibrida con la sonda aplicada. La ausencia de bandas indicará que no hay secuencias complementarias.

Transferencia Northern

La técnica de transferencia Northern es similar a la Southern, pero se utiliza para detectar la presencia de moléculas específicas de ARN. Para ello, se desnaturalizan las moléculas de ARN tratándolas con formamida o glioxal, que rompen los puentes de hidrógeno entre los pares de bases, para asegurar que el ARN esté en forma lineal sin pliegues. A continuación, se realiza una electroforesis en gel del ARN y luego se transfiere a la membrana de nailon. Se produce la hibridación con una sonda de ADN marcada complementaria del ARN, y después se lleva a cabo la autorradiografía. Las transferencias Southern y Northern no sólo proporcionan información sobre la presencia de moléculas que hibridan, sino que también permiten determinar el tamaño molecular de las especies hibridantes.

HIBRIDACIÓN SÁNDWICH

Este tipo de hibridación requiere dos fragmentos diferentes de ácido nucleico de dos partes adyacentes, aunque no solapantes, del genoma. Utiliza un sistema de tres componentes: una sonda de captura unida a una fase sólida, el fragmento de ADN diana y una sonda que genera la señal. Se inmoviliza la sonda captora de ADN de cadena sencilla sobre un soporte sólido y se añade el espécimen junto con la sonda marcada. Si el resultado es positivo, el ADN del espécimen hibridará con los del filtro y de la sonda marcada, uniendo la sonda al filtro. El fragmento de ADN que quiere detectarse actúa como enlace de la sonda sobre el soporte sólido y la sonda generadora de la señal. Debido a que los ADN que se utilizan como reactivos no tienen secuencias comunes, no se formarán híbridos con ácidos nucleicos incorrectos. El resultado de la reacción de unión es un sándwich de hibridación con tres ADN componentes.

HIBRIDACIÓN *IN SITU*

La hibridación *in situ* permite detectar secuencias específicas de ADN genómico o de ARNm en secciones de tejidos intactas, células dispersas o preparaciones cromosómicas. Permite demostrar la información genética dentro de un contexto morfológico y es análoga a la inmunohistoquímica. La sensibilidad de la hibridación *in situ* está limitada por varias variables, incluidas la conservación del ácido nucleico durante la fijación, la accesibilidad de la sonda molecular a los ácidos nucleicos durante la hibridación, la actividad específica de la sonda marcada y la sensibilidad del sistema de detección.

El tejido se trata con una proteasa para que la sonda pueda acceder al ADN nuclear que se desnaturaliza por calor. Se añade la sonda en un amortiguador y la hibridación se produce cuando se halle presente ADN complementario. Con un lavado se separan la sonda marcada no unida y las secuencias mal apareadas. Después se detecta la sonda con diversos métodos. Para la hibridación *in situ* con todo tipo de sondas moleculares se han utilizado sistemas de detección isotópicos y no isotópicos. Las sondas de ARN complementario (ARNc) marcadas radiactivamente son las más sensibles para detectar números pequeños de copias de secuencias específicas de ARNm o de ADN en secciones de tejidos. En cuanto a las sondas de ADN marcadas con sustancias fluorescentes, son las más útiles para células intactas en la hibridación *in situ* con detección por citometría de flujo y ofrecen un gran potencial para las preparaciones cromosómicas.

La hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) utiliza sondas de ADN marcadas con fluorescencia que hibridan con cromosomas desperdigados para detectar no sólo la presencia o la ausencia de la región cromosómica correspondiente a la sonda, sino también su posición en el genoma. Pueden usarse de forma simultánea varias sondas marcadas con diferentes compuestos fluorescentes.

La técnica FISH es particularmente adecuada para detectar aneuploidías, microdeleciones, duplicaciones y reagrupamientos complejos. Se ha combinado la hibridación *in situ* con la inmunocitoquímica para detectar ARN y proteínas víricas en la misma célula. Una modificación de la hibridación *in situ* es la cuantificación de la fluorescencia de la hibridación de secuencias de ADN de núcleos en interfase en suspensión mediante la citometría de flujo.

SECUENCIACIÓN DE ADN

MÉTODO DE SANGER AUTOMATIZADO

La secuenciación de ADN se realiza en la actualidad de forma rutinaria en los laboratorios clínicos. El método más habitual utiliza un paso inicial de PCR para amplificar la región que se desea secuenciar y luego se introduce la secuenciación empleando una modificación del método de Sanger de terminación de cadena (fig. 17-8). De acuerdo con este método, a partir de un ADN molde monocatenario y de un cebador marcado radiactivamente, utilizando la ADN polimerasa de *Escherichia coli* se preparan cuatro sistemas de reacción, cada uno de los cuales tiene los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato y uno de los cuatro desoxirribonucleósidos en cada sistema en forma de 2',3'-didesoxirribonucleósido. Estos compuestos detienen la síntesis de la cadena, ya que

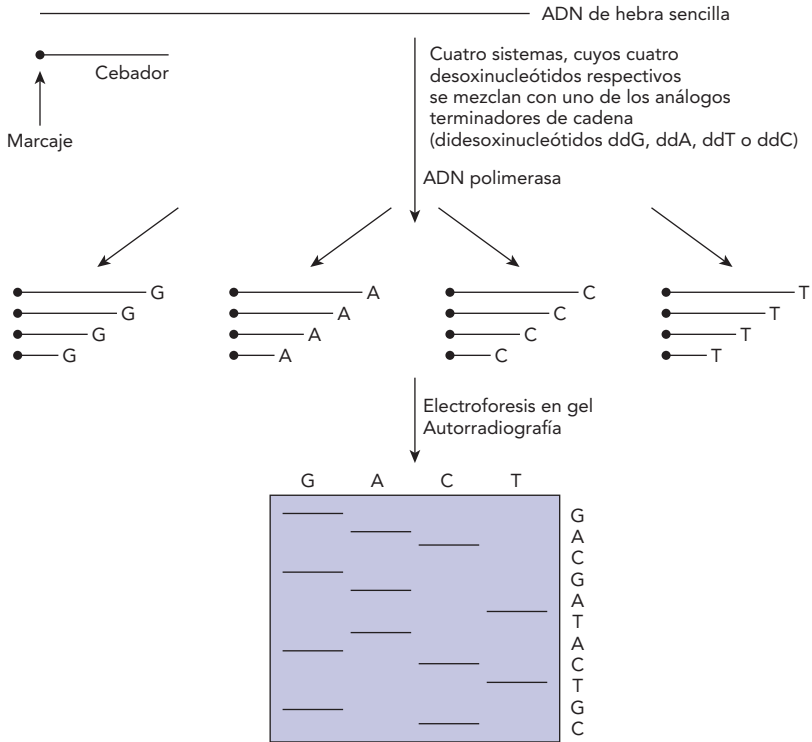


FIGURA 17-8 Método de Sanger de secuenciación del ADN.

no tienen el grupo 3'-OH. La incorporación del análogo tiene lugar al azar, por lo que cada sistema produce una mezcla de cadenas marcadas que terminan con el mismo nucleótido.

Se separan los fragmentos marcados radiactivamente por electroforesis en gel de poliacrilamida en cuatro calles adyacentes, una para cada nucleótido según su tamaño. Mediante autorradiografía, se obtiene una imagen de los fragmentos separados. La secuencia de nucleótidos del segmento de ADN se deduce a partir del orden de tamaños de los fragmentos del ácido resueltos en las cuatro calles.

En el método de Sanger, cada una de las cuatro reacciones puede codificarse también con un color, utilizando cebadores de secuencia marcados con un compuesto fluorescente distinto. Los productos pueden combinarse y separarse en una sola calle de un gel de poliacrilamida o utilizando electroforesis capilar. Con un láser, se dirige el rayo hacia un segmento horizontal de la parte baja del gel o en la salida del capilar electroforético. Al pasar los fragmentos marcados con el compuesto fluorescente, se excitan y producen la fluorescencia. Tras pasar a través de cuatro filtros fluorescentes sobre una rueda que gira, la luz emitida se recoge en un detector. La identidad del nucleótido terminador de cada fragmento que pasa se identifica por la fluorescencia asociada con él. Asimismo, el orden temporal de las moléculas fluorescentes que pasan se traduce automáticamente en una secuencia lineal de ADN que se almacena en el ordenador. Con este método se obtienen con facilidad secuencias de hasta 600 nucleótidos.

PIROSECUENCIACIÓN

La pirosecuenciación es un método para determinar la secuencia de fragmentos cortos de ácidos nucleicos sin necesidad de electroforesis. Se hibrida un cebador de secuenciación con un molde monocatenario generado por PCR. En la mezcla de reacción se incluyen cuatro enzimas: ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa; y dos sustratos: adenosina 5'-fosfosulfato y luciferina. Se añade uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato a la reacción. Si la base es complementaria de la cadena molde, la ADN polimerasa cataliza su incorporación. Cada incorporación produce la liberación de pirofosfato (PPi) que se determina por la conversión con la adenosina 5'-fosfosulfato en ATP por la ATP sulfurilasa. Luego el ATP produce la conversión de la luciferina en oxiluciferina que genera luz visible. La luz producida es proporcional al número de nucleótidos incorporados. La apirasa degrada continuamente el ATP y los desoxinucleótidos no incorporados. El proceso se repite añadiendo cada vez un desoxinucleótido, con lo que se determina la secuencia de la cadena complementaria del ADN. La técnica está automatizada.

DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS

Las enfermedades genéticas se producen a consecuencia de cambios del ADN. De hecho, se conocen los genes alterados de muchas enfermedades genéticas. Con frecuencia, el gen que codifica una proteína determinada presenta formas diferentes en las personas normales. Se denomina alelos a los múltiples genes del mismo *locus* genético que codifican la misma proteína. De cada *locus*, cada persona posee dos alelos, uno del padre y otro de la madre. Si los dos son iguales, la persona se llama homocigoto, mientras que si son distintos, se denomina heterocigoto.

La existencia de alelos se debe a las mutaciones de un precursor producidas durante la evolución de las especies. Los alelos suelen diferenciarse en el cambio de una base por otra, que generalmente es una mutación de sentido erróneo. En la mayoría de los casos, las proteínas producidas por los alelos de un *locus* dado funcionan de forma análoga, debido a que la diferencia del aminoácido no suele afectar la estructura ni la función de la proteína. La mayoría de los *loci* genéticos presentan un alelo normal, que es el que tiene la mayoría de la población, y alelos alternativos raros. Sin embargo, existen algunos *loci* que no presentan un alelo con la frecuencia suficiente para llamarle normal. Esta situación representa un ejemplo extremo de polimorfismo genético. En términos estrictos, se dice que hay polimorfismo cuando el alelo más común de un *locus* genético dado representa menos del 99% de los alelos de la población. Por definición, cuando existe polimorfismo en un *locus*, al menos el 2% de la población debe ser heterocigota para ese *locus*.

Las enfermedades genéticas pueden clasificarse así:

- Alteraciones cromosómicas. Suponen la pérdida, el incremento o el agrupamiento anómalo de uno o más cromosomas.
- Alteraciones mendelianas o monogénicas. Son aquellas en las que se afecta un único gen. Según su forma de herencia se agrupan en:
 - a) autosómicas dominantes, que afectan a heterocigotos para el gen

mutado con una copia defectuosa del gen; b) autosómicas recesivas, que afectan a los homocigotos con dos copias defectuosas del gen; c) recesivas ligadas al sexo, que afectan sobre todo a los varones con una mutación en la única copia de un gen ligado al cromosoma X, y d) dominantes ligadas al sexo, que son muy raras. En algunas enfermedades monogénicas se ha detectado una sola alteración de la secuencia de ADN, pero lo más frecuente es que existan varias alteraciones, lo que produce variantes de la misma enfermedad.

- Alteraciones multigénicas. Se producen por interacción entre varios genes y varios factores exógenos o ambientales.
- Alteraciones del ADN mitocondrial. Se heredan por vía materna.

En el diagnóstico molecular, el problema principal es la heterogeneidad de las alteraciones genéticas de las enfermedades hereditarias. La función genética puede modificarse por una gran variedad de cambios, que van desde la pérdida completa de un gen a la sustitución de una base por otra en un nucleótido del ADN. A nivel molecular, algunas enfermedades son relativamente homogéneas, como la anemia drepanocítica, en la que siempre se encuentra la sustitución de A → T en el sexto codón del gen de la β-globina, mientras que otras tienen un gran número de mutaciones diferentes. La posibilidad de una gran variabilidad complica el diseño de una prueba que trate de detectar todas las alteraciones en una misma enfermedad.

ELECCIÓN DE LAS TÉCNICAS

Las alteraciones voluminosas de los genes, como las pérdidas, las inserciones o los reagrupamientos de cientos, miles o más pares de bases y potencialmente muchos genes pueden detectarse mediante el análisis microscópico de preparaciones de cromosomas teñidos en metafase. Sin embargo, la mayoría de las pérdidas son demasiado pequeñas para la microscopía óptica, aunque con frecuencia pueden verse con FISH.

La alteración genética más dramática es la pérdida de un gen entero o de una parte importante de un gen. Es difícil detectar estos cambios, ya que, como los genes no ligados al sexo están en dos copias, el gen normal tiende a enmascarar la pérdida de toda la otra copia o parte de ella. Los genes ligados a X son fáciles de detectar, pues como el varón tiene un solo cromosoma X, la pérdida de una secuencia de X no deja otra representación de la misma. Por lo tanto, una transferencia Southern después de tratar el ADN con una endonucleasa de restricción mostrará la ausencia de una banda.

Un procedimiento más rápido es usar la PCR para amplificar la secuencia deseada. El tamaño del producto amplificado puede determinarse por electroforesis en gel de agarosa. También pueden utilizarse diferentes cebadores. El uso de la PCR es especialmente útil para las enfermedades ligadas al cromosoma X, donde sólo hay una copia del gen.

Las mutaciones puntuales pueden detectarse por:

- Análisis con endonucleasas de restricción (con o sin PCR).
- Hibridación con oligonucleótidos (con o sin PCR).

- Análisis de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP).
- Análisis heterodúplex.
- Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante tras una PCR.
- Secuenciación de nucleótidos tras una PCR.

Análisis con endonucleasas de restricción

Algunas mutaciones puntuales pueden detectarse mediante análisis con endonucleasas de restricción, cuando la enzima corte en el lugar de la mutación, esto es, la mutación elimine o cree una secuencia de nucleótidos que reconozca una determinada enzima. Sólo alrededor del 5 al 10% de las mutaciones puntuales pueden detectarse por los análisis con endonucleasas de restricción. Como los dinucleótidos CG son lugares hipervariables del genoma humano, las enzimas que los poseen en su secuencia de reconocimiento, como la *TaqI* y la *MspI*, son muy útiles para detectar las mutaciones que se producen en esos lugares.

La aplicación de la técnica de PCR al análisis con endonucleasas de restricción ha aumentado mucho su rendimiento. La ventaja principal que aporta la PCR es que pueden utilizarse enzimas que tengan una secuencia de reconocimiento de cuatro nucleótidos, y estudiar por ende pequeños fragmentos de ADN. Además, el uso de la PCR hace innecesarios los isótopos radiactivos.

Hibridación con oligonucleótidos

Otra forma de detectar mutaciones puntuales conocidas es la hibridación con oligonucleótidos. Como sondas, se utilizan oligonucleótidos sintéticos que reconocen específicamente los alelos normal y mutante. La hibridación con oligonucleótidos puede realizarse con ADN genómico o con secuencias de ADN amplificadas por PCR.

Análisis de polimorfismos de conformación de cadena sencilla

El análisis de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (*single-strand conformation polymorphisms*, SSCP) es una técnica en la que se amplifica mediante PCR la región del gen que quiere estudiarse. El producto amplificado de doble cadena se desnaturiza por medio de calor y se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante. Durante esta, los fragmentos de ADN de cadena sencilla se pliegan en una forma tridimensional de acuerdo con su secuencia. La separación depende, por tanto, de la forma de las moléculas de cadena sencilla. Si los productos normal y mutante difieren en algún nucleótido adoptarán estructuras tridimensionales diferentes y mostrarán distintas movilidades electroforéticas.

Análisis heterodúplex

En esta técnica se mezcla un fragmento de ADN normal con el fragmento mutante. Se forma un heterodúplex con un mal apareamiento, que proporciona una movilidad electroforética diferente.

Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante

La electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) se basa en la diferente desnaturización de las moléculas de ADN de doble cadena de acuerdo con sus secuencias. Un cambio de la secuencia del ADN de doble cadena debido a una mutación cambia la temperatura de fusión del ADN, y esto produce la separación parcial de la cadena de ADN en el lugar de un mal apareamiento y altera la movilidad del ADN mal apareado en un gel desnaturizante.

En esta técnica se amplifican mediante PCR fragmentos de ADN de personas normales y afectadas, y se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida con una concentración creciente de agentes desnaturizantes, como la urea o la formamida. Las moléculas de ADN con sólo un mal apareamiento de bases presentan una movilidad diferente y pueden detectarse con esta técnica.

Secuenciación del producto amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa

La secuenciación del producto amplificado por la PCR se está convirtiendo en el método principal para detectar mutaciones. La secuenciación no sólo detecta la mutación, sino que también define su naturaleza. El método más utilizado para secuenciar ADN es el de Sanger en su forma automatizada.

ALGUNOS EJEMPLOS DE ENFERMEDADES ESPECÍFICAS

La tabla 17-1 presenta algunas enfermedades específicas para cuyo diagnóstico se emplean las técnicas de biología molecular. A continuación se consideran brevemente algunas de ellas.

Fibrosis quística

La fibrosis quística es una de las enfermedades de origen genético más frecuente. Es una enfermedad multiorgánica que afecta sobre todo a los aparatos respiratorio, digestivo y reproductor. El gen se encuentra en el cromosoma 7 en 7q31 y es muy grande, con 27 exones. El gen codifica una proteína grande (1.480 aminoácidos) que actúa como canal iónico a la que se ha llamado regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística. Se han identificado más de 800 mutaciones que producen la enfermedad. La principal es la pérdida de los tres nucleótidos del codón 508 que codifica la fenilalanina ($\Delta F508$). Esta mutación representa alrededor del 50% de los casos de mutación en la población española. Por otra parte, en España, menos de 20 mutaciones engloban la mayoría de los casos de fibrosis quística, pero a pesar de este número relativamente pequeño, es imposible excluir la enfermedad sólo con el análisis de ADN. Para el diagnóstico se utiliza la amplificación por PCR y la hibridación.

Distrofia muscular de Duchenne

La distrofia muscular de Duchenne es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X que la produce la mutación de una proteína que se llama distrofina.

TABLA 17-1 Ejemplos de algunas enfermedades genéticas específicas en las que se emplea el diagnóstico molecular

Fibrosis quística
 Distrofia muscular de Duchenne
 Enfermedades neurodegenerativas
 Expansiones de trinucleótidos repetidos
 Hemocromatosis
 Déficit de α_1 -antitripsina
 Trombofilias hereditarias
 Enfermedades mitocondriales
 Hemoglobinopatías y talasemias

Un 65% de las mutaciones son deleciones de parte del gen, mientras que el resto son duplicaciones (5%) y mutaciones puntuales (35%). Las deleciones suelen detectarse mediante PCR multiplex, que amplifica simultáneamente varios exones de diferentes regiones del gen. Para las mutaciones puntuales se emplean otras técnicas, como los SSCP y la DGGE, seguida de la secuenciación.

Enfermedades neurodegenerativas

Entre las enfermedades neurodegenerativas hay dos grandes categorías: las enfermedades producidas por expansiones de trinucleótidos repetidos y las producidas por depósitos de proteínas.

Las enfermedades producidas por expansiones del trinucleótido repetido CAG son la enfermedad de Huntington, las ataxias espinocerebelosas, la atrofia dentato-rubro-pálido-luysiana y la atrofia muscular bulboespinal. En la ataxia de Friedreich se produce la expansión del trinucleótido repetido GAA dentro de un intrón. El diagnóstico de laboratorio de las expansiones de trinucleótidos repetidos utiliza la amplificación por PCR y la separación de los productos amplificados mediante electroforesis en gel, y determina el tamaño de las repeticiones expandidas.

Hemocromatosis hereditaria

La hemocromatosis hereditaria es un trastorno autosómico recesivo que produce una absorción inadecuada de hierro, lo que se traduce en un aumento de la concentración de hierro en suero y de los depósitos de hierro en los tejidos. Actualmente, se sabe que la mayoría de los casos de hemocromatosis hereditaria se deben a las mutaciones del gen HFE que codifica una proteína de 343 aminoácidos. Se han descrito varias mutaciones de este gen; la más frecuente es un cambio de G a A en la posición 845 en el exón 4 (G845A), que produce un cambio de cisteína a tirosina en el aminoácido 282 (C282T). Se han detectado otras dos mutaciones, una sustitución de C a G en el exón, lo que da la sustitución de histidina por ácido aspártico en el codón 63 (H63D) y un cambio de A a T que da la sustitución de serina por cisteína en el codón 65 (S65C) en el exón 2. Las mutaciones se detectan mediante la amplificación con PCR y electroforesis.

DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Las técnicas moleculares utilizan sondas de ácidos nucleicos para detectar directamente el material genético de los microorganismos. En los capítulos correspondientes se señalan los principales métodos moleculares para diagnosticar enfermedades infecciosas.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

El empleo de las técnicas de diagnóstico molecular para el diagnóstico de las neoplasias hematológicas ha adquirido en los últimos años una posición central. Las anomalías genéticas características de leucemias y linfomas sirven para su más exacta clasificación y tienen también un valor pronóstico e implicaciones terapéuticas. Las pruebas moleculares más utilizadas para la evaluación de las neoplasias hematológicas son las de reagrupamiento de los genes del receptor de antígenos y los análisis de las translocaciones cromosómicas recurrentes.

ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS

Los oncogenes son un grupo de genes presentes en el genoma humano que pueden activarse por alteraciones genómicas cuantitativas o cualitativas y que, cuando están activados, pueden desempeñar un papel importante en la transformación neoplásica. Los genes antecedentes o protooncogenes parecen tener funciones esenciales en la fisiología celular normal y se encuentran, con frecuencia, implicados en la regulación del crecimiento, la proliferación y la diferenciación de las células. Los oncogenes pueden activarse por una mutación puntual, por una translocación cromosómica o por amplificación. Hay también genes supresores de tumores cuya pérdida produce la transformación neoplásica.

Ejemplos de oncogenes formados por mutaciones somáticas de *loci* genéticos normales son el oncogén *abl*, que se activa en la leucemia mielocítica crónica, el oncogén *myc*, que se activa en el linfoma de Burkitt, el oncogén *N-myc*, que se activa en el neuroblastoma, y el oncogén *neu/erb B2*, que se activa en el carcinoma de mama. Otros oncogenes, como los de tipo *ras*, parecen asociarse con varios tipos de tumores. Entre los tumores producidos por la pérdida de genes supresores de tumores está el retinoblastoma.

ANÁLISIS DE IDENTIDAD

Desde hace años el análisis de marcadores de ADN se ha convertido en el mejor método para los estudios de identificación empleados tanto para las pruebas de paternidad como para los análisis forenses. Se utilizan los polimorfismos, que son las diferencias en el ADN de las personas. El análisis del genoma humano ha demostrado la presencia de áreas con gran polimorfismo en las regiones del ADN que no se expresan. En ellas, entre el 20 y el 30% está formado por regiones repetitivas. Muchas de estas regiones repetitivas varían en el número de repeticiones entre las personas y reciben el nombre de número

variable de repeticiones tándem (NVRT). Las unidades que se repiten contienen entre dos y siete nucleótidos (repeticiones tándem cortas, RTC). Los alelos de estos *loci* están definidos por el número de unidades repetidas. Se emplean diversos *loci* RTC para los análisis de identidad, tanto en las pruebas de paternidad como en los análisis forenses.

MICROMATRICES DE ADN

Un *microarray* o micromatriz de ADN es una disposición ordenada de centenares o millares de secuencias de ADN (oligonucleótidos o ADN complementario [ADNc]) depositados sobre una superficie sólida de un tamaño aproximado de $1,2 \times 1,2$ cm. El soporte sólido normalmente es una placa de vidrio, aunque se han empleado también placas de silicio. La micromatriz puede representar el ARNm producido en un determinado tipo celular (micromatrices de expresión de ADNc) o representar regiones codificantes y reguladoras de un determinado gen o grupo de genes. La micromatriz se hibrida con una sonda de ADNc marcada y se mide la hibridación de la sonda con cada componente de la micromatriz para obtener una medida cuantitativa de la abundancia de cada componente en la sonda. Las principales aplicaciones clínicas de las micromatrices son los estudios de la expresión de los genes en los tumores.

Técnicas proteómicas

INTRODUCCIÓN

El término proteoma se utilizó por primera vez en 1995 para describir el conjunto de proteínas de un organismo. Poco después se aplicó el término proteómica al estudio del proteoma. Las tecnologías proteómicas permiten el análisis simultáneo de cientos de proteínas y su identificación, así como el análisis de sus modificaciones estructurales. En este capítulo se presentan las principales técnicas proteómicas y su aplicación en los laboratorios clínicos.

PROTEÓMICA CLÍNICA

La proteómica clínica es la aplicación de las técnicas de la proteómica al campo de la medicina. Comprenden el análisis cuantitativo y cualitativo de las proteínas y los péptidos presentes en los especímenes clínicos, como los tejidos y los líquidos corporales. Uno de los objetivos de la proteómica clínica es la búsqueda de marcadores biológicos (biomarcadores). Los marcadores biológicos son pruebas que reflejan información sobre el estado biológico de la persona que se analiza. Su valor fundamental es su capacidad de diferenciar dos o más estados biológicos. Aunque en la actualidad el principal enfoque de la proteómica clínica es el diagnóstico y el descubrimiento de biomarcadores, la proteómica clínica incluye también la identificación de nuevas dianas terapéuticas, fármacos o vacunas para conseguir mejores resultados terapéuticos y tener éxito en la prevención de las enfermedades.

Los líquidos biológicos son la muestra más adecuada para la búsqueda de marcadores biológicos de diagnóstico, pronóstico y valoración del tratamiento de las enfermedades debido a su fácil accesibilidad en comparación con las biopsias tisulares. El plasma/suero sanguíneo es la principal muestra clínica para el diagnóstico de las enfermedades; otros líquidos son la orina, el líquido cefalorraquídeo, el líquido sinovial, la saliva, el líquido seminal y las lágrimas.

En 2001 se creó la *Human Proteome Organisation* (HUPO) (Organización del Proteoma Humano) con el fin de impulsar el estudio del proteoma del hombre. Desde esa fecha se han realizado un gran número de estudios para descifrar el proteoma normal del ser humano y el proteoma en diferentes líquidos biológicos, tanto en la salud como en diversas enfermedades.

Dos enfoques tecnológicos principales se usan en la aplicación de la proteómica para el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades. Por un lado, la combinación de una técnica de separación de proteínas y la espectrometría de masas para el descubrimiento de biomarcadores de enfermedad y, por otro, las micromatrices proteínicas para analizar simultáneamente muchas proteínas.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LOS ANÁLISIS PROTEÓMICOS

La preparación de las muestras para los estudios proteómicos es un punto fundamental. La preparación debe ser lo más simple posible para obtener una

buena reproducibilidad. Asimismo, debe procurarse que durante la preparación de la muestra las proteínas sufran las menores modificaciones posibles.

Un paso importante en muchos estudios proteómicos es el fraccionamiento previo de la muestra, debido principalmente a que el intervalo de concentraciones de las proteínas en la mayoría de los medios biológicos es muy grande. Otra de las razones para el fraccionamiento previo de las muestras es la gran diferencia de propiedades de las proteínas.

MUESTRAS DE TEJIDOS

Los tres pasos principales en la preparación de las muestras de tejidos son la rotura de las células, la inactivación o eliminación de las sustancias que interfieren y la solubilización de las proteínas. El método de rotura de las células depende del material biológico y puede realizarse por lisis osmótica, ciclos de congelación-descongelación, lisis con detergentes, sonicación, pulverización con o sin nitrógeno líquido, presiones elevadas, homogeneización con bolas de vidrio y una trituradora. Estos métodos pueden combinarse para conseguir una mayor eficacia.

Para evitar la degradación de las proteínas hay que desactivar las proteasas de los tejidos. Se emplean desnaturizantes fuertes, como urea 8 M, ácido tricloroacético al 10% o dodecil sulfato sódico al 2%. Además, la preparación de la muestra debe realizarse a bajas temperaturas.

La precipitación proteínica es un paso opcional en la preparación de la muestra para la electroforesis bidimensional. Los principales métodos de precipitación utilizan sulfato amónico, ácido tricloroacético, acetona, y combinaciones de algunos de estos precipitantes.

MUESTRAS DE PLASMA/SUERO

Los estudios realizados han llevado a recomendar el plasma mejor que el suero para los estudios proteómicos. El suero y el plasma se diferencian como consecuencia de la coagulación. Además de la reducción de las proteínas y el fibrinógeno debido a la cascada de la coagulación, existen otras muchas diferencias. En general, hay más péptidos en suero, pero el tipo de anticoagulante también influye sobre la composición de péptidos.

La concentración de cada una de las proteínas que contiene el plasma sanguíneo presenta una variación muy grande. Así, la albúmina es 10^9 veces más abundante que la troponina I. Un pequeño número de proteínas que incluye la albúmina, las inmunoglobulinas, la transferrina, las haptoglobinas, la α_1 -antitripsina, y la α_1 -glucoproteína, constituyen hasta el 80% de todas las proteínas del plasma humano. Las 22 proteínas más abundantes constituyen más del 99% de la masa de las proteínas plasmáticas. El 1% restante, presumiblemente la población con interés biológico, está compuesta por miles de diferentes proteínas muy poco abundantes. Así pues, la eliminación de las proteínas más abundantes es un paso importante para obtener un perfil proteómico plasmático mejor al expandir el intervalo de concentraciones que pueden detectarse.

Hay muchos métodos para eliminar las proteínas más abundantes del plasma sanguíneo para los estudios proteómicos. Los principales son los que emplean anticuerpos.

MUESTRAS DE ORINA

La orina normal tiene una concentración baja de proteínas con un elevado contenido de sales y otras sustancias de bajo peso molecular que interfieren con los análisis proteómicos. Los principales métodos para aislar/concentrar las proteínas de la orina son la precipitación, la liofilización, la ultracentrifugación y la filtración con centrifugación.

MUESTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

El líquido cefalorraquídeo (LCR) contiene una concentración de proteínas baja y una concentración salina elevada, por lo que hay que enriquecer las proteínas y eliminar las sales antes de las separaciones proteómicas. Se han empleado diversos métodos de desalinización: ultrafiltración, diálisis, precipitación de proteínas y columnas.

MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS

Hasta ahora la técnica predominante de separación de proteínas para los estudios proteómicos ha sido la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE). Más recientemente, se están aplicando cada vez más las técnicas de separación multidimensionales en fase líquida que combinan diversas técnicas cromatográficas o cromatografía y electroforesis capilar.

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

La electroforesis bidimensional es una técnica potente de separación que utiliza dos dimensiones. En la primera dimensión se emplea el enfoque isoeléctrico (*isoelectric focusing*, IEF), y la electroforesis en gel de acrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en la segunda dimensión. Por medio del IEF las proteínas se separan según su punto isoeléctrico y con la SDS-PAGE se separan de acuerdo con su masa molecular. De esta forma, tras la electroforesis bidimensional se obtiene un mapa proteínico en el que las coordenadas de cada proteína corresponden a su punto isoeléctrico y a su masa molecular (fig. 18-1). Según el tamaño del gel y el gradiente de pH utilizado en la primera dimensión, la 2D-PAGE puede resolver más de 5.000 proteínas simultáneamente. Otra de las ventajas es que las proteínas separadas se encuentran en su forma natural por lo que pueden detectarse las modificaciones posteriores a la traducción, que suelen aparecer como «trenes» de manchas diferenciadas en el eje horizontal y/o vertical del gel.

Para la primera dimensión se emplean tiras IPG, que contienen reactivos bifuncionales de inmovilina, que son un conjunto de 10 derivados de acrilamida químicamente bien definidos que forman un conjunto de amortiguadores con diferentes valores de pH entre 1 y 13. Como el extremo reactivo copolimeriza con la matriz de acrilamida, se generan gradientes de pH muy estables, lo cual permite verdaderos enfoques isoeléctricos de estado estacionario con una mayor reproducibilidad. Las tiras IPG pueden contener intervalos de pH lineales y no lineales amplios (pH 3-12), medios (pH 4-7), estrechos (pH 4,5-5,5) o ultraestrechos (pH 4,9-5,3), y con diferentes longitudes (7, 18, 24 cm).

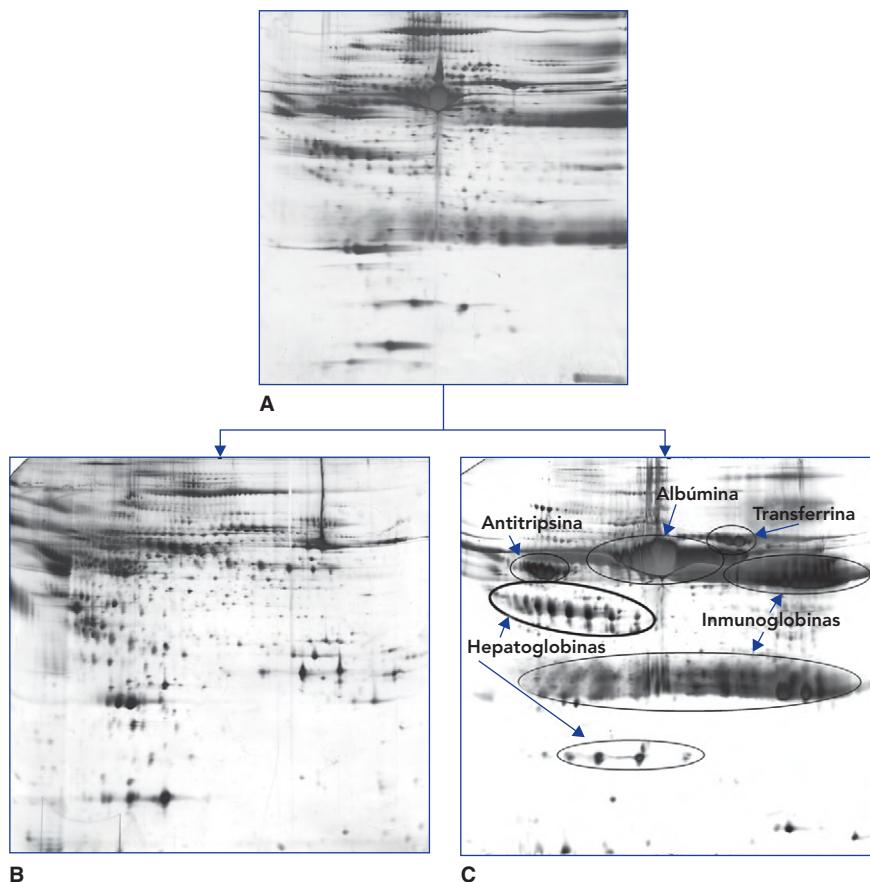


FIGURA 18-1 Mapa proteínico de una muestra de suero humano. **A.** Sin eliminar las proteínas más abundantes. **B.** Eliminadas las proteínas más abundantes. **C.** Proteínas eliminadas.

La segunda dimensión se corre en gel de acrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS) y puede hacerse en sistemas horizontales o verticales. Los poros del gel de la segunda dimensión separan las proteínas de acuerdo con su tamaño, ya que el dodecil sulfato sódico recubre de cargas negativas todas las proteínas de forma proporcional a su masa. El efecto neto es que las proteínas migran como elipsoides con un cociente carga negativa/masa uniforme y una movilidad relacionada de forma logarítmica con la masa. Pueden emplearse geles homogéneos o con gradiente. La electroforesis suele hacerse enfriando mediante recirculación de agua por la cámara que contiene el gel para que no se produzcan temperaturas superiores a los 25 °C.

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Después de la electroforesis bidimensional, las proteínas separadas deben visualizarse, ya sea con métodos de tinción universales o específicos. Entre los métodos universales están la tinción con colorantes aniónicos como el azul Coomassie, la tinción negativa con cationes metálicos, como el cinc, la tinción

con nitrato de plata, la tinción o marcaje fluorescente y los isótopos radiactivos y la posterior detección por autorradiografía. En la actualidad, los marcajes fluorescentes son los preferidos. Se utiliza el SYPRO Ruby y los colorantes de cianuro (Cy2, Cy3, Cy5). El empleo de colorantes fluorescentes aumenta la sensibilidad, ofrece un intervalo dinámico lineal y permite la comparación cuantitativa de los patrones en los geles.

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN GEL DIFERENCIAL (DIGE-2D)

En esta técnica se emplean dos colorantes fluorescentes para marcar las proteínas de dos muestras que van a compararse. Se mezclan las dos muestras marcadas y se separan en un gel 2D. La señal de los dos colorantes puede diferenciarse y obtenerse el cociente de los dos marcajes, lo cual permite la comparación cuantitativa de las muestras.

TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE IMAGEN

Para analizar la expresión diferencial se emplean programas de ordenador de análisis de imagen. Las imágenes se capturan con escáneres, dispositivos de carga acoplada o captosres fluorescentes. Una vez capturadas, se digitalizan para su análisis.

SEPARACIONES MULTIDIMENSIONALES

Son separaciones en fase líquida que combinan diversos métodos de cromatografía líquida (LC) y de electroforesis capilar (CE). La muestra se separa primero por un método y luego los componentes separados se vuelven a separar por al menos otro método adicional independiente. Cada mecanismo de separación descansa en una propiedad física independiente de la sustancia que hay que separar. Las propiedades físicas independientes corresponden a «dimensiones», y pueden ser: tamaño, carga, hidrofobicidad o afinidad a un sustrato determinado. Los principales sistemas utilizados son los bidimensionales. Las mejores separaciones bidimensionales se consiguen cuando se acoplan mecanismos de separación muy diferentes. Una combinación muy utilizada es la cromatografía líquida de intercambio iónico y la cromatografía en fase reversa (v. el capítulo 14).

Los sistemas multidimensionales pueden acoplarse entre ellos de diferentes formas. El eluyente del primer sistema de separación puede transportarse de forma manual al siguiente sistema (*off-line*), de forma automática con un robot o mediante un tubo o válvula que lleva directamente una corriente líquida al sistema siguiente (*on-line*).

Una ventaja fundamental de los métodos líquidos de separación es que pueden acoplarse directamente a los espectrómetros de masas.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Técnica analítica cualitativa y cuantitativa de gran capacidad que permite elucidar las estructuras y las propiedades químicas de las moléculas. Su límite de

detección se acerca a 10^{-2} gramos que equivalen a 10^{-15} moles de un compuesto con una masa molecular de 1.000 dalton. Estas cifras señalan que es posible la identificación de compuestos que se encuentren en concentraciones de hasta 1 parte por billón (10^{12}) en muestras químicas complejas.

COMPONENTES DE UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS

Los espectrómetros de masas (EM) son aparatos que miden la masa de las moléculas que previamente se han transformado en iones. En un espectro de masas se representan las relaciones masa/carga (m/z) de todas las especies iónicas producidas a partir de la molécula. Cuando los iones tienen carga 1, la relación m/z es igual a la masa molecular de la especie iónica expresada en dalton.

Los dos componentes fundamentales de los EM son el sistema de volatilización/ionización y el analizador de masa.

SISTEMA DE VOLATILIZACIÓN/IONIZACIÓN

Existen dos tipos de técnicas para volatilizar e ionizar las proteínas, que son la ionización por pulverización eléctrica (*electrospray ionization*, ESI) y la desorción/ionización por láser con ayuda de una matriz (*matrix-assisted desorption/ionization*, MALDI).

En la técnica ESI se pulveriza una disolución de las proteínas en forma de gotitas desde un capilar de vidrio bajo un campo eléctrico fuerte. Las gotitas captan cargas positivas al salir del capilar. La evaporación del disolvente deja moléculas con muchas cargas. Una proteína de unos 20 kDa capta entre 10 y 30 cargas positivas. El espectro de masas de esta proteína muestra todas las especies cargadas en forma de un conjunto de picos agudos cuyos valores consecutivos m/z se diferencian por la carga y la masa de un único protón. La técnica ESI es fácil de acoplar a la mayoría de los métodos de separación de sustancias en fase líquida como la cromatografía y la electroforesis.

En la técnica MALDI, la muestra se solidifica dentro de una matriz sólida. Un pulso láser excita la matriz creando un microplasma que transfiere la energía a las proteínas ionizándolas y haciéndolas pasar a la fase gaseosa. Entre los productos se encuentran moléculas que han captado un solo protón. Como la técnica MALDI sólo produce la adición de un único protón, el espectro de masas sólo presenta un único pico correspondiente a ese ión.

ANALIZADORES DE MASA

Los analizadores de masa separan los iones de acuerdo con su cociente m/z . El movimiento del ión en el analizador de masa se manipula mediante campos eléctricos o magnéticos para dirigir el ión hacia el detector que registra el número de iones de cada valor individual m/z . En la investigación proteómica se emplean cuatro tipos de analizadores de masa: de trampa iónica, de tiempo de vuelo, de cuadrupolo y de resonancia ión ciclotrón con transformada de Fourier. Cada uno de ellos difiere considerablemente en sensibilidad, resolución, exactitud de masa y posibilidad de fragmentar los iones peptídicos.

CLASES DE ESPECTRÓMETROS DE MASA

La combinación del sistema de ionización con el analizador de masas determina la aplicación del espectrómetro de masas. La técnica ESI se acopla frecuentemente con las trampas iónicas y las combinaciones cuadrupolo/TOF (espectrómetro tándem o MS/MS). La técnica MALDI se acopla con analizadores TOF (MALDI-TOF). Esta combinación se utiliza con frecuencia para obtener las huellas de masa. La espectrometría de masas tándem o MS/MS se realiza con dos espectrómetros de masas secuenciales con una célula de colisión entre ellos. Estos sistemas se emplean para la secuenciación de péptidos.

IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Las manchas que interesen de un gel 2D-PAGE pueden extraerse y someterse a una digestión proteolítica. Los péptidos resultantes se analizan mediante espectrometría de masas. En la figura 18-2 se muestra el espectro de masas de una proteína. Cada uno de los picos corresponde a un péptido, formados tras la digestión con tripsina. La identificación de una proteína específica a partir de los datos de espectrometría de masas puede hacerse mediante la huella de masas peptídica o por secuenciación de péptidos. En el primer caso, se comparan las masas de los péptidos con los espectros de masas de proteínas en bases

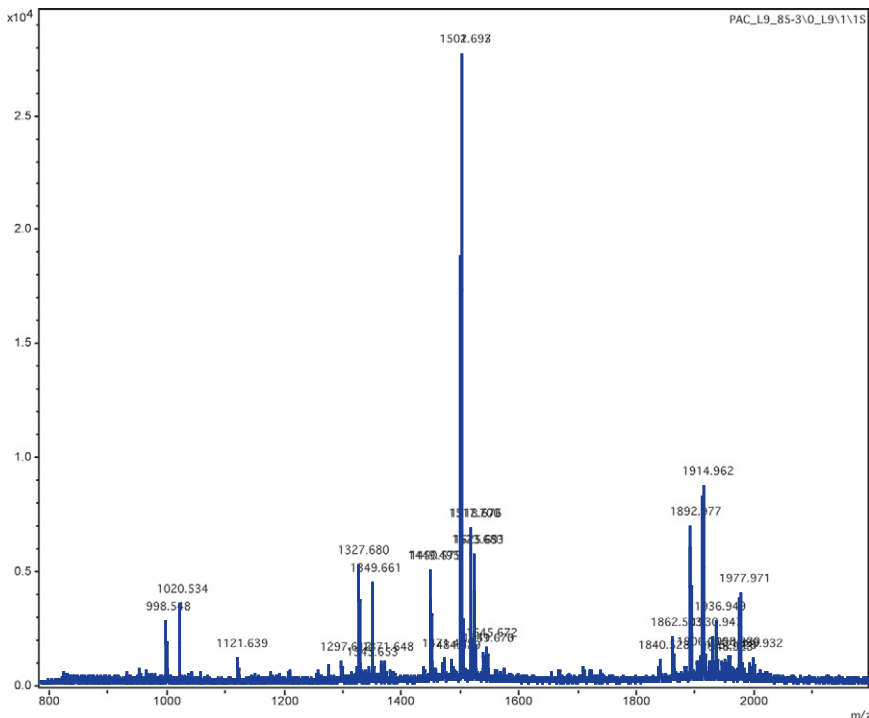


FIGURA 18-2 Espectro de masas de una proteína. Cada uno de los picos corresponde a un péptido obtenido tras la digestión de la proteína con tripsina después de extraerla de un gel de 2D-PAGE.

de datos utilizando los programas adecuados. La secuenciación de péptidos mediante espectrometría de masas utiliza dos espectrómetros de masas conectados en serie. Los péptidos cargados se separan en el primer espectrómetro de masas. Se selecciona el que interesa secuenciar y se lleva a una cámara de colisión donde se produce la fragmentación del esqueleto peptídico entre los aminoácidos. Estos se llevan al segundo espectrómetro de masas donde se deduce la secuencia. Como en el primer caso, se emplean programas para comparar las secuencias obtenidas de los diferentes péptidos con las bases de datos.

MICROMATRICES PROTEÍNICAS

Las micromatrices están formadas por moléculas biológicas inmovilizadas sobre una superficie plana. Estas moléculas pueden ser oligonucleótidos, productos de PCR, proteínas, péptidos u otras moléculas pequeñas. Las micromatrices proteínicas y, en particular, las micromatrices de anticuerpos ofrecen posibilidades únicas para desarrollar análisis de gran volumen, múltiplex y ultrasensibles que permitan obtener perfiles de estados patológicos.

Una alternativa a las micromatrices proteínicas utilizada en los estudios del cáncer es la técnica SELDI-TOF que emplea chips proteínicos acoplados a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS). Las proteínas de la muestra se adsorben inicialmente sobre el chip y luego se extraen mediante desorción/ionización por láser y se introducen en el TOF-MS. La técnica genera un mapa en el que las proteínas individuales se presentan en forma de picos separados de acuerdo con su cociente m/z . La comparación de la huella de masa entre los controles sanos y los pacientes puede detectar los biomarcadores de enfermedad.

PROTEÓMICA DEL PLASMA SANGUÍNEO

El plasma sanguíneo es un gran depósito de proteínas que contiene miles de proteínas diferentes procedentes de todos los tejidos del organismo. Aunque parece ideal para el análisis proteómico, su estudio es más complicado que el de otros medios. Uno de los objetivos de la HUPRO es el Proyecto del Proteoma Plasmático (PPP), que pretende el análisis completo de los constituyentes proteínicos del plasma y el suero humano y la identificación de sus variaciones debidas a aspectos fisiológicos, como la edad y el sexo, o patológicos. Se han realizado muchos estudios para obtener la imagen más completa de las proteínas del plasma. Se han detectado e identificado más de 5.000 proteínas diferentes.

Con relación a la patología, el mayor número de estudios se ha realizado en el cáncer. La técnica más utilizada ha sido la espectrometría de masas SELDI-TOF. Esta metodología se ha aplicado al cáncer de ovario, mama, cabeza y cuello, gastrointestinal, pancreático, hepático y prostático. Los estudios realizados hasta el momento han proporcionado datos prometedores, pero la mayoría de ellos no han dado lugar a resultados concluyentes.

Otras enfermedades en las que se han aplicado estrategias proteómicas para la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico o seguimiento han sido las coronarias y las hepáticas.

PROTEÓMICA DE LA ORINA

El proteoma urinario contiene no sólo proteínas plasmáticas, sino también proteínas renales y proteínas del aparato urinario inferior. En las personas sanas, aproximadamente el 30% de las proteínas de la orina son plasmáticas, mientras que el otro 70% corresponden a proteínas renales. Se está analizando el proteoma urinario normal y se están buscando en la orina utilizando las técnicas proteómicas posibles biomarcadores de enfermedades renales y no renales. Recientemente, se han identificado más de 1.500 proteínas en la orina de las personas sanas. Sorprendentemente, casi la mitad de las proteínas identificadas son proteínas de membrana. Las principales enfermedades renales estudiadas con un enfoque proteómico han sido las glomerulares, el rechazo del injerto renal en los trasplantes y los cánceres urológicos.

PROTEÓMICA DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

El líquido cefalorraquídeo (LCR) es especialmente importante para la identificación de biomarcadores en las enfermedades neurológicas. Más del 80% del contenido de proteínas del LCR se origina a partir del plasma sanguíneo por ultrafiltración y pinocitosis; el resto procede de la síntesis intratecal. Se han identificado un gran número de proteínas en el LCR, con un solapamiento parcial con el proteoma plasmático. Diversas enfermedades neurodegenerativas han sido objeto de estudios proteómicos en el LCR a fin de descubrir biomarcadores para el diagnóstico o seguimiento. Se han estudiado en la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis múltiple, entre otras patologías.

Pruebas cerca del paciente

INTRODUCCIÓN

Las pruebas cerca del paciente (PCP) son aquellas que se realizan directamente al lado de este, de forma que los resultados se obtienen en un corto período de tiempo y es mayor su utilidad. Estas pruebas pueden hacerse en las unidades de cuidados intensivos, los servicios de urgencia, las consultas médicas o los propios domicilios de los pacientes. En este capítulo se presentan las principales características de los sistemas que se utilizan para la realización de las pruebas cerca del paciente.

LABORATORIOS CENTRALIZADOS Y PRUEBAS CERCA DEL PACIENTE

El laboratorio clínico es el lugar habitual de realización de las pruebas analíticas. La mayoría de los hospitales dispone de un laboratorio de urgencias donde llegan los especímenes mediante tubo neumático para facilitar el transporte rápido. La comunicación de los resultados se hace a través del sistema informático del laboratorio. Todas las operaciones deben realizarse con tiempos de respuesta pequeños, ya que se ha comprobado que el valor de muchas pruebas analíticas es mucho mayor cuando el resultado se obtiene en un tiempo breve. Por este motivo, en muchas instituciones se ha planteado la posibilidad de realizar estas pruebas cerca del paciente. El objetivo de las pruebas cerca del paciente es facilitar un diagnóstico rápido y unas decisiones más rápidas sobre el tratamiento para mejorar el cuidado del paciente y reducir la morbilidad y mortalidad.

Las necesidades de cada institución acerca de las pruebas de laboratorio son muy variables y son posibles muchas soluciones que dependen de diversos factores complejos y con frecuencia contradictorios. En general, la mayoría de los hospitales emplean ambas opciones en mayor o menor medida: el laboratorio de urgencias y las pruebas cerca del paciente en el servicio de urgencias y en las unidades de cuidados intensivos y las plantas de hospitalización.

PRINCIPALES PRUEBAS QUE SE REALIZAN CERCA DEL PACIENTE

En la tabla 19-1 se presentan las principales pruebas que se realizan cerca del paciente.

TÉCNICAS Y MÉTODOS EMPLEADOS PARA LAS PRUEBAS CERCA DEL PACIENTE

Para las pruebas cerca del paciente se emplean diversas técnicas y métodos, que van desde las tiras reactivas cualitativas o semicuantitativas de lectura visual hasta los analizadores automáticos. De forma general, los métodos para las PCP pueden dividirse en dos grandes grupos: los que no requieren instrumentos y los que sí los emplean.

TABLA 19-1 Principales pruebas que se realizan cerca del paciente

| |
|--|
| Glucosa |
| Gases y electrolitos en sangre |
| Coagulación (tiempo de protrombina, tiempo de coagulación activado) |
| Marcadores cardíacos (troponinas, CK-MB, mioglobina) |
| Hemoglobina A1c |
| Urianálisis con tiras reactivas |
| Pruebas de embarazo en orina |
| Hormona paratiroidea intraoperatoria |
| Enfermedades infecciosas (estreptococos A, gripe A/B, virus sincitial respiratorio, VIH) |

SISTEMAS SIN INSTRUMENTOS

Estos sistemas utilizan tiras de plástico o cartuchos con todos los reactivos necesarios para producir la reacción y dar un producto que puede evaluarse de forma visual. Utilizan reacciones químicas, reacciones enzimáticas o inmunoanálisis. Pueden analizarse diversos especímenes como sangre total, suero o plasma, orina, líquido amniótico, saliva y heces. Las formas predominantes son los análisis cualitativos con una lectura positiva o negativa, aunque también hay sistemas semicuantitativos. Entre estos sistemas se encuentran las tiras reactivas para los análisis de orina, las pruebas de embarazo (determinación de la gonadotropina coriónica humana), las drogas de abuso, los marcadores cardíacos (troponinas), los marcadores de enfermedades infecciosas (VIH), la sangre oculta en heces y las tiras reactivas para las determinaciones de glucosa.

SISTEMAS CON INSTRUMENTOS

Los avances tecnológicos han hecho posible el diseño de instrumentos de pequeño tamaño que proporcionan resultados cuantitativos que pueden utilizarse para PCP. En la actualidad hay dispositivos que pueden realizar un gran número de pruebas químicas, pruebas de coagulación e inmunoanálisis en una única plataforma.

Los primeros instrumentos empleados para las PCP fueron los medidores de glucosa en sangre. Inicialmente se concibieron para el uso domiciliario de los pacientes diabéticos y posteriormente se han incorporado también a las plantas de hospitalización. Los análisis de glucosa a la cabecera del enfermo se utilizan de forma casi universal para el control rutinario de los pacientes diabéticos durante su estancia hospitalaria. Además, se ha comprobado que el mantenimiento de un control glucémico ajustado en las unidades de cuidados agudos puede reducir de forma significativa la morbilidad y mortalidad, incluso en los pacientes que no son diabéticos.

Otro de los instrumentos más utilizados para las pruebas cerca del paciente son los analizadores automáticos de pH, gases y electrolitos en sangre, que se colocan en los servicios de urgencias o en las unidades de reanimación o de cuidados intensivos.

Los instrumentos para las pruebas cerca del paciente deben ser fáciles de manejar y eficaces en la realización de múltiples tareas. Otro aspecto importante de estos sistemas es el volumen, tipo y matriz del espécimen.

CONTROL DE LA CALIDAD EN LAS PRUEBAS CERCA DEL PACIENTE

Un aspecto fundamental para proporcionar unos resultados fiables en las pruebas cerca del paciente es el control de la calidad. Las formas tradicionales de control de la calidad, como los controles líquidos de diversas concentraciones, son, con pocas excepciones, demasiado complejas para ser prácticas en las pruebas cerca del paciente. Para solventar este hecho, algunos fabricantes han propuesto el denominado control electrónico de la calidad, mediante el cual se verifica la electrónica de los dispositivos, aunque no los propios reactivos de análisis. Esta propuesta se basa en que los reactivos son estables desde su fabricación hasta su utilización, siempre que se almacenen de forma adecuada. Esta estrategia elimina la necesidad de un control de la calidad en forma líquida y facilita en gran medida el funcionamiento y la gestión de las pruebas cerca del paciente.

Posteriormente se ha propuesto el control de la calidad automático, en el que se analizan controles de la calidad líquidos de forma automática por los aparatos sin intervención de los operadores. Esta estrategia, además de controlar la electrónica de los aparatos, verifica la integridad de los reactivos. En algunos instrumentos se programan de forma que avisan al usuario cuando se detectan fallos y sea necesario el control de la calidad.

En los casos de lectura visual, suelen emplearse controles positivos incorporados a las pruebas que se realizan junto con el análisis del espécimen.

PRINCIPALES SISTEMAS UTILIZADOS PARA LAS PRUEBAS CERCA DEL PACIENTE

A continuación se señalan las principales características de los sistemas más utilizados para las pruebas cerca del paciente.

ANALIZADORES DE GLUCOSA

Las metodologías actuales para la determinación de glucosa cerca del paciente se basan en reacciones enzimáticas con la medida espectrofotométrica o electroquímica del producto de la reacción. Se emplean tiras reactivas que contienen todos los componentes de la reacción, y las principales enzimas utilizadas son la glucosa oxidasa, la glucosa deshidrogenasa y la hexoquinasa. La tira es una membrana compleja que filtra el espécimen de sangre, de forma que sólo alcanza el lugar de la reacción el componente acuoso. En el lugar de la reacción, la glucosa del espécimen reacciona con la enzima utilizada (que depende del fabricante) y da un producto de reacción proporcional a la concentración de glucosa. En los equipos que utilizan métodos electroquímicos, se genera una corriente que es proporcional a la concentración de glucosa.

Los resultados de las determinaciones de glucosa con los analizadores para el uso cerca del paciente no son intercambiables con los del laboratorio, pues la concentración de glucosa plasmática obtenida en el laboratorio general es un 11% mayor que la obtenida en sangre debido a las diferencias de los componentes acuosos de los compartimentos celular y no celular de la sangre. La glucosa se difunde libremente en el componente acuoso de la sangre y, como

el plasma tiene una concentración acuosa mayor, la concentración de glucosa será menor. Para tener en cuenta esta circunstancia, la mayoría de los analizadores de glucosa para las pruebas cerca del paciente tienen un factor de calibración del 11%, de forma que los resultados sean comparables con los que se obtengan en el laboratorio. Este factor es para un hematocrito del 45%.

Se han detectado dos problemas analíticos específicos para los analizadores de glucosa: la degradación enzimática y el efecto del hematocrito. La degradación enzimática como consecuencia de un almacenamiento inadecuado de las tiras o del uso de tiras caducadas con una eficacia disminuida puede afectar los resultados. Asimismo, los hematocritos extremos afectan los resultados de forma que los elevados se asocian con resultados falsamente disminuidos, mientras que los hematocritos bajos producen resultados falsamente elevados. No se conoce exactamente el porqué de estos efectos, y los mecanismos que se han propuesto han sido las variaciones de viscosidad, la impedancia mecánica de los eritrocitos a nivel del filtro de la membrana, la formación de microcoágulos o los depósitos de proteínas.

También se han observado interferencias por diversos fármacos. El paracetamol y el ácido ascórbico en los métodos de glucosa oxidasa y glucosa deshidrogenasa, y la dopamina y el manitol en el de la glucosa deshidrogenasa.

Es importante señalar que las tiras están diseñadas para su uso con especímenes de sangre capilar, de forma que la utilización de otros especímenes como la sangre arterial o venosa puede producir resultados erróneos.

SISTEMAS DE ANÁLISIS PARA PRUEBAS DE COAGULACIÓN

Se han comercializado dispositivos para el análisis cerca del paciente de diversas pruebas de coagulación. Hay dispositivos para determinar el tiempo de protrombina con resultados en forma de cociente internacional normalizado (INR) para el control del tratamiento anticoagulante, entre los que se encuentra el CoaguChek (Roche). Este sistema utiliza tiras reactivas que se cargan con 10 μ l de sangre total capilar reciente. La muestra se aplica directamente sobre la tira reactiva. La tromboplastina recombinante humana inmovilizada en la tira activa la cascada de la coagulación y la formación de trombina. Se determina de forma electroquímica la actividad de la trombina al transformar un sustrato presente en la tira (fenilendiamina). Los electrodos de oro de la tira reactiva registran la diferencia de potencial traduciéndolo en tiempo de protrombina.

El tiempo de coagulación activado (TCA) se emplea para el control del tratamiento con heparina durante la cirugía cardíaca y vascular. Entre los dispositivos para su uso cerca del paciente se encuentran los sistemas ACT PLUS (Medtronic) y Hemochrom FTCA 510 (Biomed). Para realizar la prueba, se inicia la coagulación en una muestra de sangre por un activador de la vía intrínseca y se mide en segundos el tiempo que tarda en formarse el coágulo. Debe señalarse que los resultados de los dispositivos para el TCA de los distintos fabricantes no son intercambiables.

SISTEMAS PARA EL ANÁLISIS DE LA SANGRE OCULTA EN HECES

La detección sistemática del cáncer de colon y recto ha demostrado un descenso de la mortalidad al identificar los pólipos adenomatosos y las lesiones

malignas localizadas que pueden curarse mediante la resección quirúrgica. La prueba de sangre oculta en heces (SOH) y la prueba inmunoquímica fecal (PIF) detectan cantidades mínimas de sangre procedente de los pólipos precancerosos y cancerosos mediante métodos químicos e inmunoquímicos. La prueba de ADN fecal es una prueba nueva para la detección del cáncer de colon y recto que emplea técnicas moleculares para detectar mutaciones genéticas asociadas con la transición de un pólipo adenomatoso a un carcinoma de colon y recto.

Prueba del guayacol

Los métodos del guayacol para detectar sangre oculta se basan en una reacción química de oxidación entre el hemo y el ácido α -guayacónico. Los principales sistemas comerciales son Hemoccult (Beckman) y Coloscreen (Helena). Los eritrocitos liberados por el pólipo o lesión contienen hemoglobina como principal constituyente intracelular. El grupo hemo posee una actividad pseudoperoxidasa que puede catalizar la oxidación del ácido α -guayacónico mediante el peróxido de hidrógeno. La reacción de oxidación produce una quinona de color azul.

Los equipos comerciales contienen tarjetas con una placa o tarjetas con dos placas o cintas, todas ellas con un papel impregnado de ácido α -guayacónico. El paciente recoge la muestra con el aplicador y coloca una fina extensión sobre la placa A. Con el otro extremo del mismo aplicador recoge otra muestra de otra parte de las heces y coloca una fina extensión sobre la placa B. De esta forma las muestras son estables hasta 14 días a temperatura ambiente, y pueden enviarse al laboratorio para su revelado. Este también puede hacerse por el propio paciente. Para ello se colocan directamente sobre cada extensión de las heces sobre el papel con el ácido α -guayacónico dos gotas del revelador que contiene peróxido de hidrógeno y se leen los resultados a los 60 s. La presencia de cualquier color azul señala un resultado positivo. Deben añadirse también gotas del revelador sobre las áreas de control positivo y negativo para garantizar la integridad de las reacciones y los reactivos.

Las carnes rojas con un contenido elevado de hemo y las plantas con una actividad peroxidasa elevada pueden producir resultados falsos positivos. Por este motivo deben seguirse cuidadosamente las instrucciones sobre la preparación de los pacientes antes de realizar la prueba.

Prueba inmunoquímica

Esta prueba utiliza anticuerpos antihemoglobina humana. Las heces se aplican en una extensión fina sobre una tarjeta. La extensión fecal seca se transfiere a otra tarjeta de análisis. A continuación se rehidrata la muestra con una solución amortiguadora que contiene azida sódica y albúmina de suero bovino. Se cierra el dispositivo de análisis poniendo en contacto la muestra con la tira de análisis e iniciando el flujo cromatográfico de la muestra. Al fluir la muestra por la tira rehidrata el conjugado de oro coloidal antihemoglobina humana. Si hay hemoglobina en la muestra se forma un complejo con el anticuerpo. Este inmunocomplejo es capturado sobre la tira en una zona con anticuerpos antihemoglobina humana para formar una línea visible que se interpreta como

resultado positivo. En cada dispositivo hay un control positivo y negativo para garantizar que los reactivos y la prueba funcionan correctamente.

SISTEMAS PARA MARCADORES CARDÍACOS

Los marcadores bioquímicos de daño cardíaco son fundamentales para el diagnóstico, pronóstico, seguimiento y estratificación del riesgo en los pacientes en los que se sospecha un ataque cardíaco. Los principales marcadores que se emplean son las troponinas cardíacas I y T, la creatina cinasa MB, la mioglobina, el péptido natriurético de tipo B (BNP) y el NT-proBNP. También pueden emplearse diversas combinaciones de estos marcadores.

Los fabricantes de pruebas para marcadores cardíacos cerca del paciente proporcionan diversas opciones para realizar los análisis en sangre total. Hay pruebas cualitativas que dan los resultados como negativo o positivo con lectura visual o con un lector. Los valores de corte los define el fabricante y no pueden modificarse. Las pruebas cuantitativas emplean aparatos y los valores de corte pueden ajustarse.

El i-STAT cTnI (Abbott) emplea un cartucho para realizar una prueba de ELISA de dos lugares para determinar la troponina cardíaca I (cTnI). Utiliza sangre total heparinizada o plasma. Los anticuerpos de captura específicos para cTnI humana están inmovilizados sobre un sensor electroquímico fabricado en un chip de silicón. El segundo anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina se encuentra cerca del lugar de aplicación de la muestra en el cartucho. Cuando se añade el espécimen, la cTnI de la muestra reacciona primero con el anticuerpo de detección marcado con la fosfatasa alcalina. Este complejo antígeno-anticuerpo migra dentro del cartucho y es capturado por los anticuerpos sobre la superficie del sensor electroquímico. Los excesos del conjugado con la enzima y de la matriz de la muestra son eliminados del sensor por un lavado. Este líquido contiene también el sustrato de la fosfatasa alcalina que lo transforma en un producto que puede detectarse de forma electroquímica. La señal generada es proporcional a la cantidad de cTnI de la muestra.

El sistema cardíaco Triage (Biosite) consta de dos componentes básicos, un cartucho de análisis que contiene todos los reactivos analíticos necesarios para un inmunoanálisis de dos lugares y un medidor. Emplea sangre anticoagulada con EDTA o plasma. El sistema utiliza microcapilares y la detección por inmunofluorescencia. Tras aplicar la muestra, se eliminan por filtración las células sanguíneas y el plasma entra en la cámara de reacción donde solubiliza los anticuerpos de detección marcados con fluorescencia que posteriormente se unen a la CK-MB, cTnI y mioglobina de la muestra. A medida que fluye la muestra por el dispositivo, los complejos de los marcadores con los anticuerpos son captados por los segundos anticuerpos respectivos situados en lugares específicos para cada marcador. De esta forma, cada marcador queda inmovilizado en una zona diferente. El medidor detecta el marcador inmovilizado al excitar el marcaje en cada zona con un láser y detectar la señal fluorescente.

El lector cardíaco de Roche emplea un cartucho en el que se produce una inmunocromatografía para medir cTnT o mioglobina. La técnica es un inmunoanálisis sándwich en un paso. Se emplea sangre total con EDTA o plasma y los componentes celulares se separan por filtración antes de los pasos cromatográficos.

tográficos. Tras la prueba los resultados pueden leerse de forma cualitativa o cuantitativa utilizando un lector para el sistema.

ANALIZADORES DE ELECTRÓLITOS Y PH Y GASES EN SANGRE

En el capítulo 13 se han presentado las principales características de los analizadores de electrolitos y de pH y gases en sangre. La determinación de estos parámetros es una de las pruebas más características de los servicios de urgencias y las unidades de cuidados intensivos. Por este motivo, se han diseñado aparatos de pequeño tamaño y fácil manejo y mantenimiento que puedan utilizarse cerca del paciente. Tal y como se ha señalado en el capítulo 13, los principales modelos utilizan casetes de un solo uso que contienen los sensores electroquímicos miniaturizados y las soluciones de calibración. Tras la medida, el casete se extrae del analizador y se desecha.

SISTEMA PARA HEMOGLOBINA GLUCOSILADA

El DCA 2000 (Siemens) es un sistema de cartuchos para determinar la hemoglobina A1c. Emplea un inmunoanálisis de dispersión de luz para determinar la hemoglobina glucosilada, junto con un análisis fotométrico para la hemoglobina total. El cartucho tiene una estructura relativamente compleja que contiene partículas de látex recubiertas con el antígeno, anticuerpos contra HbA1c y reactivos de lisado que se mezclan tras la adición de la muestra. La medida tiene lugar tras introducir el cartucho con la muestra en el lector con temperatura controlada. El tamaño del dispositivo hace que pueda utilizarse en las consultas de diabéticos, donde también puede emplearse para medir la albúmina y la creatinina en orina, en el modelo más reciente.

Técnicas y métodos hematológicos básicos

INTRODUCCIÓN

Una de las determinaciones solicitadas con mayor frecuencia a los laboratorios clínicos es el denominado análisis sistemático de sangre o hemograma, que comprende el recuento de las células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos y plaquetas), la fórmula leucocitaria, el hematocrito y la concentración de hemoglobina. En la actualidad, estas determinaciones se realizan con analizadores automáticos. Otras técnicas hematológicas básicas son el recuento de reticulocitos, el de eritrocitos nucleados y la determinación de la velocidad de sedimentación globular. Asimismo, el análisis de la médula ósea proporciona datos sobre la hematopoyesis. En este capítulo se presentan las principales técnicas y métodos básicos del análisis sistemático de sangre y de la médula ósea.

CÉLULAS SANGUÍNEAS

Las principales células sanguíneas son los eritrocitos, los leucocitos y las plaquetas.

ERITROCITOS

Son las células más abundantes de la sangre. Los *eritrocitos* son discos bicóncavos con un diámetro de entre 6 y 8 μm y una vida media de 120 días. Carecen de núcleo y de orgánulos citoplasmáticos. Su función principal es transportar hemoglobina, la proteína que lleva el oxígeno desde los pulmones a las células de los tejidos. Los eritrocitos son flexibles y deformables, cosa necesaria para que pasen a través de los capilares más finos.

LEUCOCITOS

Los *leucocitos* son un conjunto de células que desempeñan diversas funciones, aunque todas relacionadas con la defensa del organismo frente a la infección y a la presencia de sustancias ajenas. A diferencia de los eritrocitos y las plaquetas, tienen núcleo y orgánulos citoplasmáticos. Los leucocitos se dividen en clases según su función, su lugar de origen y su morfología. Las clases principales son los polimorfonucleares o granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y los mononucleares (linfocitos y monocitos). Los polimorfonucleares tienen un núcleo multilobulado y una granulación citoplásmica abundante, mientras que los mononucleares tienen un núcleo redondeado, que está en el centro de la célula.

PLAQUETAS

Las *plaquetas* son discos finos de 2 a 4 μm de diámetro y un volumen de 5 a 7 fl que carecen de núcleo. Participan en la hemostasia, en el mantenimiento de la integri-

dad vascular y en el proceso de coagulación de la sangre. En el lugar de la lesión se forma un tapón plaquetario por la adhesión de las plaquetas al tejido expuesto del subendotelio; luego se produce la activación de las plaquetas que conduce a su agregación. Con la formación de un tapón transitorio se activa la hemostasia secundaria y se deposita fibrina para reforzarlo hasta que se repara la lesión.

CITOMETRÍA HEMÁTICA

De forma general, las técnicas para recontar las células de la sangre reciben el nombre de citometría hemática o *hemocitometría*. Hasta hace 40 años, estas técnicas se realizaban de forma manual utilizando pipetas y soluciones de dilución y cámaras de recuento; desde entonces, el empleo de las técnicas manuales ha ido disminuyendo y, hoy en día, aunque en algunos casos siguen siendo los métodos de referencia, prácticamente no se utilizan. En pocas palabras, para realizar los recuentos con estos métodos se diluyen los especímenes de sangre con una solución adecuada, que permita identificar las células que se quieran contar o que destruya las otras, y luego se depositan en las cámaras de recuento. Para el recuento celular, los especímenes de sangre han de obtenerse con un anticoagulante. Como se señala en el capítulo 5, los anticoagulantes más adecuados para los análisis sistemáticos de sangre son el oxalato y etilendiaminotetraacetato (EDTA), aunque también puede usarse heparina. Con fines didácticos, en este apartado se describen los principales métodos de dilución, las soluciones de dilución, las cámaras y los métodos que se utilizan en las técnicas manuales de recuento de las células sanguíneas.

UNIDADES DE CONCENTRACIÓN DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

El recuento de eritrocitos, leucocitos y plaquetas se expresa en unidades de concentración, en forma de células por unidad de volumen de sangre. Tradicionalmente, la unidad de volumen se ha expresado en mm^3 , debido a las dimensiones de las cámaras de recuento, y más recientemente en μl , que es una unidad equivalente. El Comité Internacional de Estandarización en Hematología recomienda usar el litro (l) como unidad de volumen. A continuación, mediante unos ejemplos, se exponen las relaciones entre estas unidades:

$$\text{Eritrocitos: } 4,5 \times 10^6 / \text{mm}^3 = 4,5 \times 10^6 / \mu\text{l} = 4,5 \times 10^{12} / \text{l}$$

$$\text{Leucocitos: } 6 \times 10^3 / \text{mm}^3 = 6 \times 10^3 / \mu\text{l} = 6 \times 10^9 / \text{l}$$

$$\text{Plaquetas: } 250 \times 10^3 / \text{mm}^3 = 250 \times 10^3 / \mu\text{l} = 250 \times 10^9 / \text{l}$$

MÉTODOS DE DILUCIÓN

La dilución de los especímenes de sangre se ha realizado tradicionalmente con unas pipetas diseñadas al efecto, que ya casi no se usan. Las describiremos brevemente. En la figura 20-1 se ha dibujado una pipeta de Thoma para eritrocitos, que tiene un bulbo situado alrededor de los dos tercios del extremo. La pipeta está dividida en 10 partes iguales y la marca 101 se sitúa por encima del bulbo.



FIGURA 20-1
Pipeta de Thoma.

Cuando este se llena hasta dicha marca, contiene 100 veces el volumen de las diez divisiones de la pipeta. Esta se llena con sangre hasta la marca 0,5 y el resto con la solución de dilución, con lo que se obtiene una dilución de 1/200.

Para los leucocitos se utiliza una pipeta de Thoma con un bulbo cuyo contenido es diez veces el de la pipeta. Se llena con sangre hasta la marca 0,5 y el resto con la solución de dilución, con lo que se obtiene una dilución de 1/20. En años más recientes, se han empleado diluidores automáticos que aspiran el volumen adecuado del espécimen y le añaden el líquido de dilución para producir la dilución requerida.

SOLUCIONES DE DILUCIÓN

La dilución de la sangre para recontar cada tipo celular se realiza con soluciones adecuadas, que permitan identificar las células o que destruyan el resto. Para el recuento de eritrocitos, como solución diluidora se utiliza el líquido de Hayem, formado por cloruro mercuríco (0,25 g), cloruro sódico (0,50 g) y sulfato sódico (2,50 g) en agua destilada (100 ml). Este líquido destruye los leucocitos y mantiene intactos los eritrocitos.

Para recontar leucocitos se usa el líquido de Türk, formado por ácido acético al 2-3%, al que se añade violeta de genciana hasta que la solución tome una coloración azul violeta pálido. El ácido acético hipotónico se usa para destruir los eritrocitos y el violeta de genciana para resaltar los leucocitos, que se tiñen ligeramente.

Para el recuento de plaquetas, se usa como líquido de dilución oxalato amónico al 1%, que produce la destrucción de los eritrocitos y de esta forma se pueden recontar sin interferencias.

CÁMARAS DE RECUESTO

Las cámaras para recontar las células sanguíneas se llaman *hemocitómetros*. Como se ha señalado, en los laboratorios clínicos ya casi no se emplean las cámaras de recuento, excepto para algunos recuentos de plaquetas y de concentraciones bajas de leucocitos.

En estos casos se utiliza la *cámara de Neubauer* (fig. 20-2), cuya distancia entre el cubreobjetos y la base de la cuadrícula es de 0,1 mm. La cuadrícula es un cuadrado de 3 mm de lado, dividido en nueve cuadrados grandes de 1 mm de lado, divididos a su vez en 16 cuadrados de 0,25 mm de lado (0,0625 mm² de área). El cuadrado central se divide en 400 cuadrados pequeños de 0,05 mm de lado (0,0025 mm² de área). El volumen total de la cámara de Neubauer es de 0,9 mm³ = 0,9 µl, y el volumen de cada uno de los nueve cuadrados de 1 mm de lado es de 0,1 mm³ = 0,1 µl.

En la *cámara de Fuchs-Rosenthal* (fig. 20-3), que se utiliza para recontar células en el líquido cefalorraquídeo y otros líquidos corporales, la distancia entre el cubreobjetos y la base de la cuadrícula es de 0,2 mm. La cuadrícula es un cuadrado de 4 mm de lado, dividido en 16 cuadrados de 1 mm² de área. Cada

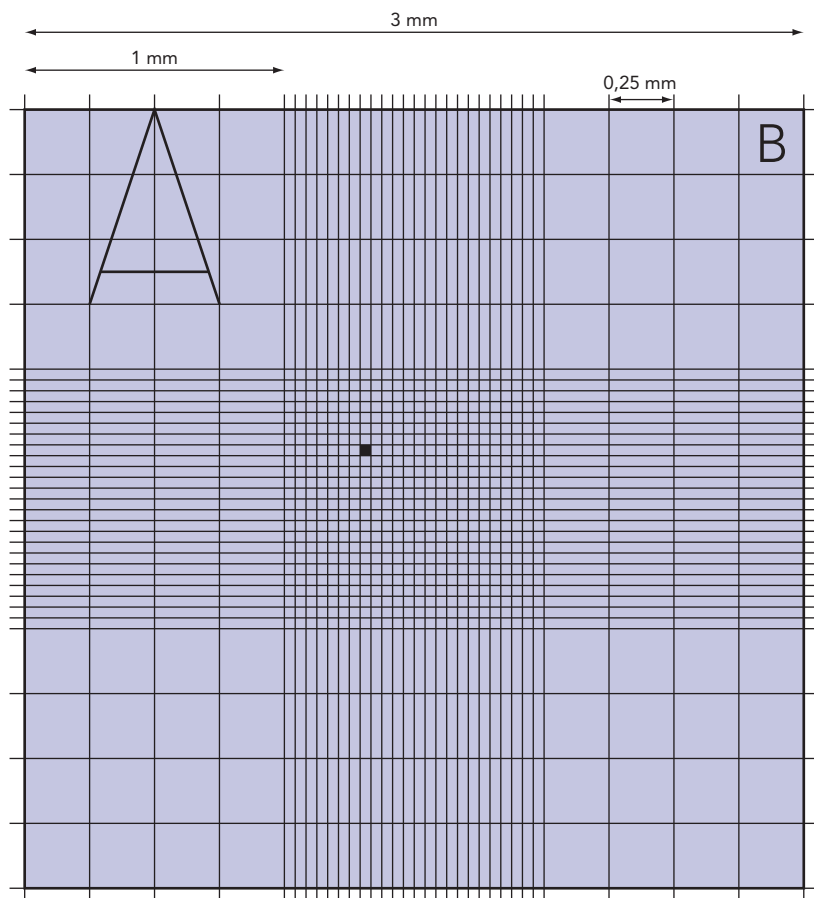


FIGURA 20-2 Retículo de la cámara de Neubauer.

cuadrado grande se divide, a su vez, en 16 cuadrados pequeños. El volumen total de la cámara de Fuchs-Rosenthal es de $16 \times 0,2 \text{ mm}^3 = 3,2 \mu\text{l}$.

TÉCNICAS DE RECUESTO

El recuento en cámara se realiza como sigue. Hay que tener en cuenta que es muy importante que el cubreobjetos se adhiera perfectamente a la cámara, de forma que el volumen que ocupe la dilución de la sangre sea exacto. Antes de depositar en la cámara el espécimen diluido, se agita bien y se desechan las primeras gotas; luego se deposita una gota en el borde de la cámara y se deja que se llene por capilaridad. Se esperan unos minutos para que sedimenten las células sobre el retículo y se procede al recuento.

Eritrocitos

Los eritrocitos se cuentan en 80 cuadrados pequeños de la cámara de Neubauer. Se cuentan cinco grupos de 16 cuadrados pequeños cada uno, que son los cuatro de las esquinas y uno de los centrales escogido de manera aleatoria:

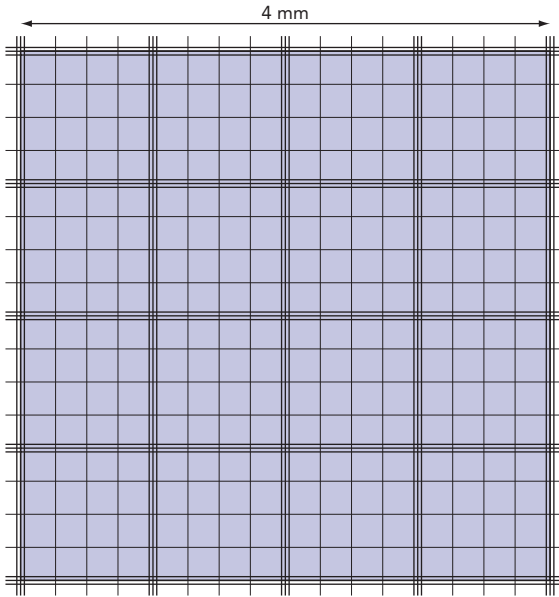


FIGURA 20-3
Retículo de la cámara de Fusch-Rosenthal.

$$\text{Área de los cuadrados contados} = 80 \times 0,0025 \text{ mm}^2 = 0,2 \text{ mm}^2$$

$$\text{Volumen de la zona contada} = 0,2 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,02 \text{ mm}^3$$

$$\begin{aligned} \text{Número de eritrocitos} &= N \times 1/0,02 \times 200 \text{ (dilución)} = \\ &= N \times 10.000 \text{ eritrocitos}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

Leucocitos

Se cuentan los leucocitos en cuatro cuadrados grandes del retículo de la cámara de Neubauer:

$$\text{Área de los cuadrados contados} = 4 \times 1 \text{ mm}^2 = 4 \text{ mm}^2$$

$$\text{Volumen de la zona contada} = 4 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,4 \text{ mm}^3$$

$$\text{Número de leucocitos} = N \times 1/0,4 \times 20 \text{ (dilución)} = N \times 100 \text{ leucocitos}/\mu\text{l}$$

Plaquetas

Se cuentan las plaquetas en diez cuadrados pequeños, cinco en cada lado de la cámara de Neubauer. Cuando el número de plaquetas sea menor de 100, se contarán más cuadrados pequeños hasta registrar por lo menos 100 plaquetas:

$$\text{Área de los cuadrados contados} = 10 \times 0,0025 \text{ mm}^2 = 0,025 \text{ mm}^2$$

Volumen de la zona contada = $0,025 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,0025 \text{ mm}^3$

Número de plaquetas = $N \times 1/0,0025 \times 100$ (dilución) =
 $N \times 40.000$ plaquetas/ μl

ERRORES EN LOS RECUEENTOS EN CÁMARA

Los principales errores al determinar las células sanguíneas en cámara son de tres tipos: personales, instrumentales e inherentes a la técnica. Los *errores personales* se producen fundamentalmente en la toma del espécimen, en la mezcla, en el llenado de la cámara y en el recuento. El personal técnico debe ser muy cuidadoso en las manipulaciones para que los errores personales sean mínimos. Por lo que se refiere a los *errores instrumentales*, debe señalarse que el material ha de comprarse a las mejores marcas, hay que comprobar su exactitud y su precisión antes de usarlo, y cuidar su limpieza y conservación. Los *errores inherentes a la técnica* se refieren a la distribución de las células en la cámara de recuento y son, por tanto, inevitables. Pueden reducirse contando muchas células.

MÉTODOS ELECTRÓNICOS DE RECUESTO CELULAR

Los métodos electrónicos de recuento celular se fundamentan en los principios de impedancia eléctrica y dispersión de la luz.

IMPEDANCIA ELÉCTRICA

Las células no son buenos conductores eléctricos debido a la gran resistividad de la membrana. Cuando una célula suspendida en una disolución electrolítica atraviesa una ranura por la que pasa una corriente eléctrica, se produce una variación de la resistencia eléctrica que se cuenta como un pulso de voltaje. En la figura 20-4 se muestra un dispositivo de recuento de impedancia eléctrica.

La resistencia eléctrica del líquido que pasa a través del orificio se mide con dos electrodos situados a ambos lados del mismo. Mientras pase diluyente, la resistencia eléctrica será mínima y constante, pero cuando atravesase el orificio una célula sanguínea se producirá un aumento de la resistencia y un cambio de potencial entre los electrodos, que permanecerá mientras la célula siga atravesándolo. El incremento de la resistencia eléctrica, reflejado en la cuantía del pulso de voltaje, es proporcional al volumen de la célula. Los pulsos de voltaje generados se llevan a un circuito discriminador que los separa por tamaños. De esta manera, es posible determinar las distribuciones de tamaño de diferentes poblaciones celulares.

La relación cuantitativa entre el volumen celular y la altura del pulso eléctrico generado resulta compleja y depende de diferentes variables como la forma y la orientación de la célula, su trayectoria y la deformación que experimente al pasar a través de la apertura, la concentración de hemoglobina, la distribución del campo eléctrico en la apertura y los efectos de coincidencia.

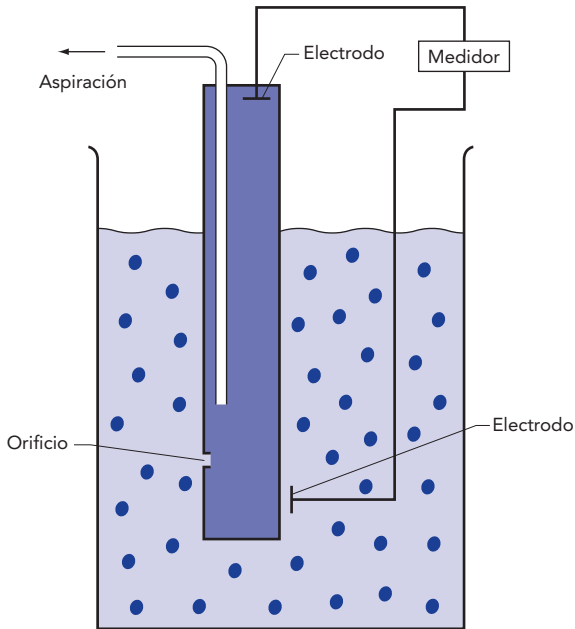


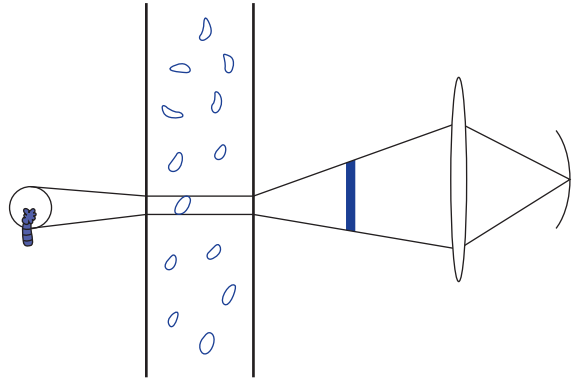
FIGURA 20-4
Dispositivo de recuento de impedancia eléctrica.

DISPERSIÓN DE LA LUZ

El paso de una célula a través de una pequeña área iluminada produce la dispersión de la luz. Este fenómeno depende de muchas características celulares, como el tamaño, la forma, la orientación y el índice de refracción. Las células sanguíneas, cuyo tamaño es mayor que la longitud de onda de la luz incidente, dispersan la luz a una región angular estrecha en dirección hacia adelante. El tamaño de esta región está definido por el ángulo para el que la intensidad de la luz dispersada alcanza su primer mínimo. Al aumentar el ángulo de observación por encima de este mínimo, la intensidad de la luz dispersada variará en una secuencia alternante de máximos y mínimos producidos por las interferencias de las ondas rerradiadas desde varias partes de la célula. La cantidad de luz dispersada en este intervalo angular proporciona una medida del volumen celular (teoría óptica de Mie). En la figura 20-5 se muestra el esquema de un dispositivo de recuento con el principio de dispersión de luz.

VALORES DE REFERENCIA Y ALTERACIONES DE LOS RECuentOS CELULARES

En la tabla 20-1 se presentan los valores de referencia de los eritrocitos, los leucocitos y las plaquetas en sangre periférica. Los recuentos celulares de estos corpúsculos se modifican por causas fisiológicas y patológicas. De forma fisiológica, varían con la edad y el sexo. Además, situaciones como el embarazo, los ritmos circadianos, la postura y el ejercicio también producen modificaciones.

**FIGURA 20-5**

Dispositivo de recuento de dispersión de luz.

CONCENTRACIÓN DE ERITROCITOS

El aumento de la concentración de eritrocitos en sangre con un contenido normal de hemoglobina se llama *poliglobulia*. Sus causas principales son, entre otras, la insuficiencia respiratoria crónica y, en los fumadores, el aumento de la carboxihemoglobina. La disminución de la concentración de eritrocitos en sangre se produce siempre que desciende la concentración de hemoglobina, lo cual ocasiona *anemia* (véase el capítulo 22).

CONCENTRACIÓN DE LEUCOCITOS

El aumento de la concentración de leucocitos por encima de 11.000/ μl recibe el nombre de *leucocitosis*, mientras que el descenso por debajo de 4.000/ μl se denomina *leucopenia*. Los factores primarios que afectan al recuento leucocitario son la salida de los leucocitos desde la médula ósea, la proporción de células en los compartimentos marginal y circulante, la salida de los leucocitos de la sangre periférica y/o los aumentos de las pérdidas celulares. De forma fisiológica, se produce leucocitosis en el embarazo y tras un ejercicio físico intenso; y de forma patológica, entre otras situaciones, en las infecciones, las intoxicaciones y las leucemias. La leucopenia se produce en muchas

TABLA 20-1 Valores de referencia de eritrocitos, leucocitos y plaquetas en sangre periférica

| | Eritrocitos ($\times 10^{12}/\text{l}$) | Leucocitos ($\times 10^9/\text{l}$) | Plaquetas ($\times 10^9/\text{l}$) |
|----------------------|---|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Recién nacidos | 4,7-6,3 | 9-30 | 150-400 |
| Niños (2-12 años) | 4-5,3 | 5-14 | 200-450 |
| Jóvenes (12-18 años) | | | |
| Varones | 4,5-5,3 | 4,5-11 | 130-360 |
| Mujeres | 4,1-5,1 | 4,2-11 | 170-380 |
| Adultos (19-60 años) | | | |
| Varones | 4,6-5,9 | 4,1-10 | 143-390 |
| Mujeres | 4,1-5,2 | 3,6-9 | 160-420 |

circunstancias, entre ellas, en la aplasia o la hipoplasia medulares y en determinadas infecciones bacterianas y víricas.

CONCENTRACIÓN DE PLAQUETAS

El aumento de la concentración de plaquetas se denomina *trombocitosis* y sus causas pueden ser primarias o secundarias. Las principales causas primarias son la trombocitopenia esencial, la policitemia verdadera, la leucemia mieloide crónica y la mielofibrosis idiopática. Entre las causas secundarias están las infecciones, las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, las hemorragias agudas, la deficiencia de hierro, la anemia hemolítica y las enfermedades malignas. La disminución de la concentración de plaquetas se llama *trombopenia*. Puede deberse a un descenso de la formación de plaquetas, a un aumento de la destrucción periférica de estas, al hiperesplenismo o a mecanismos complejos.

FÓRMULA LEUCOCITARIA

Se denomina *fórmula leucocitaria* a la proporción presente en la sangre de cada tipo de leucocito. Tradicionalmente, se ha determinado por medio de extensiones sanguíneas; sin embargo, desde hace ya muchos años, la mayoría de los laboratorios clínicos realizan la fórmula leucocitaria en los analizadores automáticos, mediante métodos que se exponen más adelante. La observación de la morfología leucocitaria en las extensiones queda como método de referencia y para cuando los analizadores den resultados anómalos.

REALIZACIÓN MANUAL DE LA EXTENSIÓN SANGUÍNEA

Las extensiones se realizan colocando una gota de sangre en uno de los extremos de un portaobjetos bien limpio y sin grasa. Con otro portaobjetos esmerilado, y manteniendo una inclinación de unos 30° , se extiende la gota de sangre, procurando que quede repartida de forma homogénea (fig. 20-6). Cuanto más rápido es el movimiento, más fina será la extensión resultante. Por otro lado, también afecta al grosor el ángulo que se dé al portaobjetos usado para extender. Es fundamental considerar que las extensiones han de estar bien hechas

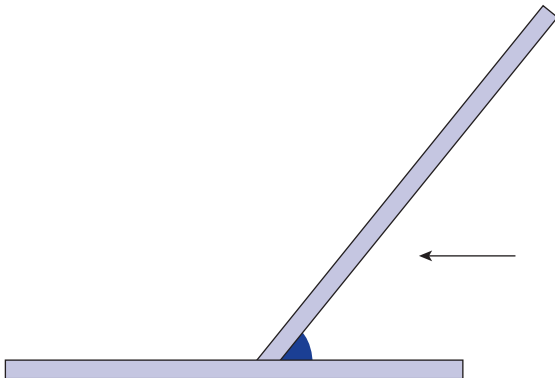


FIGURA 20-6

Forma de realizar una extensión de sangre con dos portaobjetos. El que se utiliza para extender debe estar esmerilado.

para evitar que se alternen las células. En las extensiones se producen tres zonas de grosor diferente, que presentan una distribución distinta de los leucocitos:

1. Zona gruesa, que corresponde a la parte cercana al punto de comienzo de la extensión. En ella los linfocitos están aumentados.
2. Zona central de la extensión, donde los linfocitos se reparten de forma equilibrada.
3. Zona fina, al final de la extensión, donde se acumulan granulocitos y monocitos.

TINCIÓN DE LA EXTENSIÓN SANGUÍNEA

Una vez efectuada la extensión, se deja secar al aire, se fija sobre el portaobjetos y, a continuación, se produce la tinción. Los métodos más utilizados para teñir las extensiones de sangre derivan del método de Romanowsky, que utiliza azul de metileno y eosina. Los principales son los de Giemsa, May Grünwald-Giemsa y Wright. Para conseguir el espectro completo de colores que proporciona el método de Romanowsky, el método de referencia del International Council for Standardization in Haematology (ICSH) (1984) combina dos colorantes, azul B y eosina Y.

En el *método de Giemsa*, una vez seca la extensión, se fija introduciéndola en alcohol metílico durante 3 min. A continuación se seca de nuevo y se introduce en el colorante de Giemsa diluido durante 10 min. Se lava con agua y se deja secar otra vez, de modo que la extensión quede lista para observarla en el microscopio.

En el *método de May Grünwald-Giemsa* se fija la extensión con alcohol metílico durante 5 min y se lleva al colorante de May Grünwald diluido entre 3 y 5 min. Se trasvasa sin lavar a un Giemsa diluido y se deja unos 10 min. Luego se lava y se seca, y la extensión queda lista para observarla con el microscopio.

En el *método de Wright*, se introduce la extensión sin fijar en el colorante durante 2 min. Se diluye el colorante a la mitad y se deja actuar otros 2 min. Después se lava y se seca, y se lleva la extensión para observarla en el microscopio.

En el *método de el ICSH* se fija la extensión y se aplica la solución colorante (azul B y eosina Y) durante 10 min. Se sustituye la solución por una solución amortiguadora de pH 5,8 y se deja 1 min. Luego se lava con agua y se seca.

Las tinciones basadas en el método de Romanowsky dan resultados muy semejantes. La tabla 20-2 presenta las principales características de tinción de los leucocitos sanguíneos. Los diferentes leucocitos teñidos se observan con el microscopio tal y como se expone en la figura 20-7.

PROBLEMAS PRINCIPALES CON LAS EXTENSIONES

Los problemas principales que se pueden presentar al realizar las extensiones son:

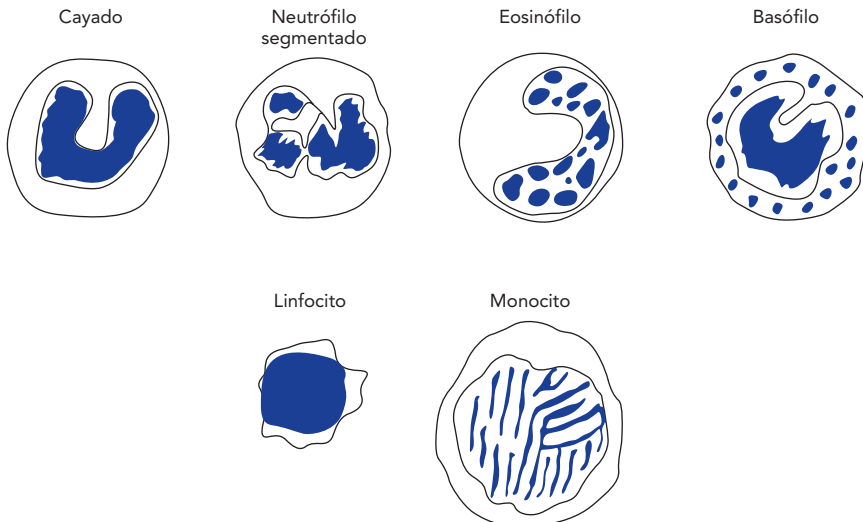
- Una coloración demasiado azul, que puede deberse a un lavado insuficiente, un exceso de tiempo en el colorante o el empleo de un colorante alcalino.

TABLA 20-2 Características de tinción de las principales células sanguíneas teñidas según los métodos basados en el de Romanovsky

| Células | Características de tinción |
|---------------------------|---|
| Eritrocitos | Rosa pálido o rojo amarillento |
| Leucocitos | |
| Polinucleares neutrófilos | Núcleo: azul oscuro Citoplasma: rosa pálido Gránulos: lila rojizo |
| Eosinófilos | Núcleo: azul Citoplasma: azul Gránulos: rojo o rojo anaranjado |
| Basófilos | Núcleo: púrpura o azul oscuro Citoplasma: azul Gránulos: púrpura oscuro, casi negro |
| Linfocitos | Núcleo: violeta Citoplasma: azul celeste |
| Monocitos | Núcleo: violeta Citoplasma: escaso azul celeste |

- Una coloración excesivamente rosada, que suele deberse a un colorante muy ácido.
- Alteraciones morfológicas originadas por el anticoagulante.
- Alteraciones provenientes de la suciedad, el rayado o la presencia de grasa en el portaobjetos.

Cuando se realiza la fórmula leucocitaria con el microscopio y se observan las extensiones de sangre teñidas, ha de tenerse en cuenta lo indicado antes, es decir, que las células se distribuyen de forma irregular en el portaobjetos, por

**FIGURA 20-7** Tinción de las diferentes clases de leucocitos.

lo que se deben observar diferentes zonas de la extensión. De forma general, las células grandes, los monocitos y los eosinófilos se acumulan en los bordes, mientras que las células pequeñas y los linfocitos se sitúan en el centro. Se cuentan 100 células y se clasifica cada leucocito que se observe.

SISTEMAS AUTOMÁTICOS PARA LAS EXTENSIONES SANGUÍNEAS Y SU TINCIÓN

Existen en el mercado sistemas automáticos para realizar las extensiones sanguíneas y teñirlas. Utilizan para las extensiones el mismo sistema del porta que las manuales, pero pueden programarse diversos parámetros, como el hematocrito, de forma que todas las extensiones sean lo más homogéneas posible.

FÓRMULA LEUCOCITARIA AUTOMÁTICA

La fórmula leucocitaria automática puede realizarse de acuerdo con los principios siguientes: análisis digital de imagen, citoquímica celular y análisis de volúmenes celulares.

ANÁLISIS DIGITAL DE IMAGEN

Se basa en el reconocimiento de los leucocitos por medio del análisis computarizado de las imágenes que proporciona un microscopio a partir de extensiones sanguíneas teñidas con tinción panóptica. Aunque actualmente el método de análisis digital de imagen ya no se emplea para la fórmula leucocitaria automática, se describe a continuación con fines didácticos. La extensión teñida se coloca en la platina del microscopio, que se mueve controlada por ordenador. El análisis de la extensión por el instrumento se realiza con una sistemática de rastreo similar a la empleada de forma manual. Así, la platina se desplaza bajo el objetivo de modo automático con una rapidez superior a la manual, recorriendo toda la superficie de la extensión hasta que se analice un número determinado de células previamente fijado por el operador. Cuando se localiza un leucocito, se detiene el microscopio y la imagen óptica captada por la cámara de vídeo se digitaliza mediante el ordenador, que compara las características morfológicas de la célula con las programadas en la memoria para los distintos tipos de leucocitos. En este sentido, se analiza el tamaño celular, el contorno nuclear y la coloración o la presencia de granulaciones citoplasmáticas, y se clasifican los leucocitos en cinco categorías: polinucleares neutrófilos (segmentados y no segmentados), linfocitos, monocitos, polinucleares eosinófilos y polinucleares basófilos. Algunos sistemas son capaces de identificar otros elementos celulares que pueden aparecer en la sangre periférica, como los mielocitos, los metamielocitos, los promielocitos, las células plasmáticas, los linfocitos atípicos y los blastos.

Cuando las características morfológicas de la célula observada se ajusten a alguna de las programadas, el sistema la identificará, y si no, la clasificará como desconocida. El aparato proporciona las coordenadas de las células desconocidas para que el operador las clasifique. Debido a que los sistemas de la fórmula leucocitaria de análisis de imagen identifican las células según aspectos morfológicos, estas no sólo deben estar perfectamente conservadas en la

extensión sanguínea, sino que sus características de tinción han de ser siempre las mismas. Cualquier variación de la morfología o de la tinción que no dependa estrictamente de la célula puede conllevar su identificación errónea por el sistema óptico o su consideración como célula atípica no clasificada. Por ello, el análisis digital de imagen precisa siempre emplear un mecanismo para realizar las extensiones de sangre que proporcione una capa monocelular, donde la heterogeneidad de la distribución de las células se reduzca al mínimo, y un sistema de tinción automático capaz de realizar una coloración óptima y en condiciones constantes de tiempo, pH y temperatura.

CITOQUÍMICA CELULAR

Los sistemas de citología celular obtienen la fórmula leucocitaria de acuerdo con el tamaño de los leucocitos y su tinción con determinados colorantes. La ventaja principal del sistema de recuento diferencial de leucocitos por este tipo de tinción radica en que en cada espécimen se cuentan muchas células (unas 10.000), y esto hace que aumente la precisión. Este sistema utiliza dos canales: el de la peroxidasa y el de basófilos/lobularidad.

Canal de la peroxidasa

La enzima peroxidasa se encuentra presente de forma activa en varios tipos de leucocitos. En presencia de H_2O_2 y de un cromógeno aceptor de electrones (4-cloro-1-naftol), la peroxidasa da lugar a un material coloreado oscuro que precipita en las células.

La reacción citológica de la peroxidasa consta de dos pasos, conocidos como R-1 y R-2. En el primer paso, el espécimen de sangre se diluye con un diluyente que contiene dodecil-sulfato sódico (SDS), formaldehído y sorbitol en un amortiguador fosfato de pH 7,2. En este diluyente se combinan grandes concentraciones de formaldehído y sorbitol para dar una disolución hipertónica que produzca la deshidratación de los leucocitos. El SDS, junto con el golpe térmico producido por un aumento de la temperatura desde 30 a 78 °C en 17 s, produce la lisis de los eritrocitos. Por su parte, el formaldehído fija los leucocitos y sus enzimas intracelulares. El ambiente hipertónico hace que se encojan los leucocitos y aumente el índice de refracción de las células, y realza la detección de aquellos sobre el ruido de fondo. De este modo mejora la determinación de la fórmula.

Durante el *paso R-2*, los sustratos se convierten en un precipitado por la acción de la peroxidasa en los neutrófilos, eosinófilos y monocitos. La intensidad de la tinción depende de la actividad de la peroxidasa: los eosinófilos poseen una actividad peroxidasa intensa; los neutrófilos, una gran actividad; y los monocitos, una actividad débil. Los linfocitos, los basófilos y los LUC (*large unstained cells*, grandes células no teñidas) que no contienen peroxidasa no se tiñen.

El canal de la peroxidasa tiene dos detectores: uno de absorbancia, donde se mide la tinción de las células, y otro de dispersión de luz, donde se mide el tamaño. La información que proporcionan estos detectores se utiliza para agrupar las poblaciones celulares en histogramas que permiten clasificar e identificar los diferentes tipos de leucocitos. La dispersión se representa en el

eje y y la absorbancia en el x . Cada célula proporciona un punto, cuya posición depende de la combinación de las luces dispersada y absorbida por la célula. En el canal de la peroxidasa se obtiene la siguiente información:

- Número de leucocitos.
- Clasificación de los leucocitos por tamaño: pequeños, medianos y grandes.
- Clasificación por la tinción específica.

La clasificación por tamaño agrupa a los leucocitos en: eosinófilos, promielocitos-metamielocitos, neutrófilos-segmentados, otras células y linfocitos pequeños.

De acuerdo con la actividad peroxidasa, se tienen estos grupos: células muy teñidas (eosinófilos), células teñidas normalmente (neutrófilos, cayados, metamielocitos y mielocitos), células poco teñidas (monocitos y basófilos) y células sin teñir (plaquetas, linfocitos pequeños, linfocitos grandes atípicos y células blásticas). Las células que tienen una actividad peroxidasa media, generalmente los polimorfonucleares neutrófilos, forman una población que no tiene una actividad enzimática homogénea, sino que presenta una distribución de tipo gaussiano que permite diferenciar tres zonas: la de células con una actividad peroxidasa media, en la que están los neutrófilos normales; la zona de células con una actividad peroxidasa menor de un 2% de la actividad media, donde están los monocitos y los basófilos; y la zona de células con una actividad peroxidasa mayor de un 2% de la actividad media (células HP \times o de hiperactividad peroxidasa), en la que están los cayados, los metamielocitos y los mielocitos.

De acuerdo con esta información del canal de la peroxidasa, se obtiene la representación de la figura 20-8, en la que pueden observarse las zonas siguientes:

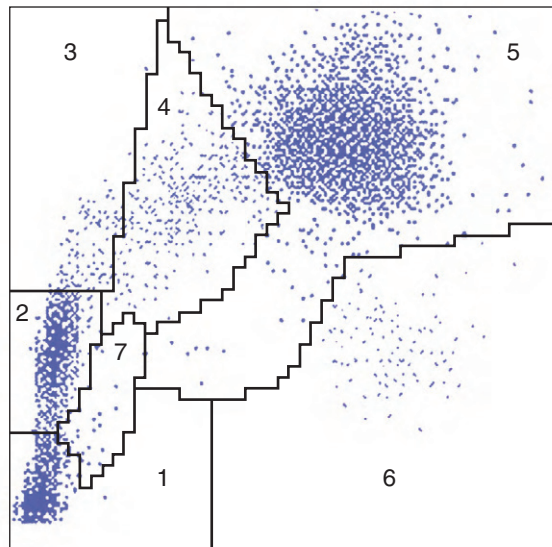


FIGURA 20-8

Canal de la peroxidasa, en el que se muestran siete zonas que corresponden a:

- (1) ruido/residuos y eritrocitos nucleados;
- (2) linfocitos;
- (3) linfocitos atípicos y blastos;
- (4) monocitos;
- (5) neutrófilos;
- (6) eosinófilos, y
- (7) plaquetas/ruido.

1. Células pequeñas sin actividad peroxidasa. Corresponde a los eritrocitos, las plaquetas y ruido.
2. Células medianas sin actividad peroxidasa. Corresponde a los linfocitos.
3. Células grandes sin actividad peroxidasa. Corresponde a los blastos, los linfocitos grandes atípicos, las células plasmáticas y los eritroblastos grandes. Son las células que el sistema proporciona como LUC.
4. Células medianas con poca actividad peroxidasa. Corresponde a los monocitos.
5. Células medianas y grandes con poca actividad peroxidasa. Corresponde a los neutrófilos y los granulocitos inmaduros.
6. Células medianas con gran actividad peroxidasa. Corresponde a los eosinófilos.
7. Células con hiperactividad peroxidasa (HPx). Corresponde a los cayados, los metamielocitos, los mielocitos y los promielocitos.

Canal de basófilos/lobularidad

Este canal proporciona un recuento exacto de los basófilos y una medida de la lobularidad celular que puede usarse como indicación de desviación a la izquierda. A la sangre se añade un reactivo que contiene un ácido y un surfactante. Así, se hemolizan los eritrocitos y se separan las membranas de los neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos y el núcleo queda desnudo. Sin embargo, las membranas de los basófilos permanecen intactas, lo que permite el recuento específico de estas células.

En el sistema de detección se mide la dispersión de la luz a dos ángulos (bajo y alto). La dispersión de ángulo bajo mide el tamaño. Como los basófilos son resistentes a la lisis y siguen intactos, proporcionan un tamaño mucho mayor que los núcleos desnudos de los otros leucocitos. La dispersión de ángulo elevado responde a la lobularidad del núcleo, de forma que cuanto más lobulado sea el núcleo, mayor será la señal. El núcleo de los polimorfonucleares (PMN) aparece a la izquierda con un valle entre ellos. En consecuencia, en este canal los leucocitos se clasifican en tres categorías: basófilos, mononucleares (MN) y polimorfonucleares. Además, se obtiene un índice denominado de lobularidad (PMN/MN), que es un índice del grado de segmentación nuclear de los PMN; un valor bajo del mismo sugiere una desviación a la izquierda.

ANÁLISIS DE LOS VOLÚMENES CELULARES

Los sistemas de análisis del volumen celular permiten diferenciar varios tipos de leucocitos merced al análisis del tipo de curva de distribución de los volúmenes leucocitarios. Analizan la distribución de los volúmenes del núcleo celular o de la célula entera para cada población. Debe tenerse en cuenta que las medidas no proporcionan la fórmula leucocitaria, en el sentido de ser capaces de distinguir diferentes tipos celulares por características específicas. No realizan una fórmula leucocitaria propiamente dicha, sino que suministran información sobre el número de células presentes en las principales subpoblaciones leucocitarias. El histograma de volumen se elabora de forma electrónica para identificar los distintos tipos celulares. Hay dos formas diferentes de

obtener las poblaciones leucocitarias analizando la distribución de los volúmenes: el análisis del volumen del núcleo y el del volumen de la célula intacta.

Análisis del volumen del núcleo

Algunos sistemas analizan la población leucocitaria después de eliminar el citoplasma. La adición de un agente lítico hace contraer la membrana y el citoplasma de los leucocitos, lo cual los colapsa y encoge alrededor del núcleo de la célula. Esto acentúa la diferencia de tamaño entre las distintas células. Las poblaciones se clasifican en tres tipos (fig. 20-9): pequeñas, que corresponden a los linfocitos; medianas, que corresponden a las células mononucleares (monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos grandes); y grandes, que corresponden a los neutrófilos. Es importante notar que el ajuste adecuado de los umbrales es fundamental para obtener un recuento idóneo y una diferenciación de los leucocitos por su tamaño. Los ajustes dependerán del agente lítico utilizado, el diluyente y la apertura del tubo de recuento.

Análisis del volumen de la célula intacta

Otros sistemas analizan el volumen de las células intactas por medio de un rayo láser, que al incidir sobre su citoplasma produce una sombra en un detector, la cual depende de las características del citoplasma. Cuando las células pasan a través del rayo, producen una luz difundida a 0° y otra a 90° , que se analizan juntas para clasificar las subpoblaciones leucocitarias. Con este sistema se consigue una buena resolución en el análisis de los leucocitos. Sin modificar significativamente las propiedades físicas de las células, la medida de la luz dispersada en dos direcciones no sólo permite un análisis cuantitativo, sino también hacer un examen cualitativo más detallado.

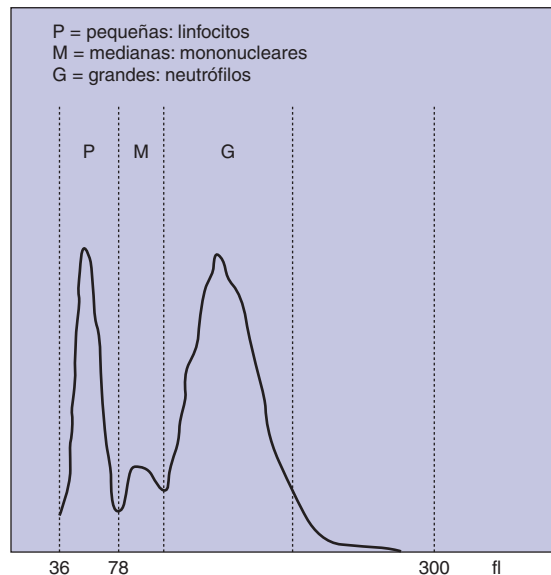


FIGURA 20-9
Análisis de volúmenes celulares.

VALORES DE REFERENCIA Y ALTERACIONES DE LA FÓRMULA LEUCOCITARIA

VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia de la fórmula leucocitaria se presentan en la tabla 20-3. La fórmula puede expresarse en forma de porcentaje, lo cual da el número relativo de cada tipo de leucocito. Si se multiplica el porcentaje de cada tipo celular por el número total de leucocitos, se obtiene el número absoluto de cada tipo de estos. La interpretación correcta de los aumentos o descensos de una determinada clase de leucocitos requiere la concentración absoluta de los mismos.

ALTERACIONES

Las alteraciones de la fórmula leucocitaria pueden ser de dos tipos: cuantitativas y cualitativas. Las alteraciones cuantitativas son aquellas en las que se producen modificaciones del número de células de alguna subpoblación, mientras que las cualitativas implican alteraciones morfológicas de las células que pueden asociarse a variaciones del número de estas. En el capítulo 23 se presentan las alteraciones cuantitativas y cualitativas de los leucocitos.

HEMOGLOBINA

La hemoglobina (Hb) es el componente principal de los eritrocitos, donde actúa como vehículo para transportar oxígeno desde los pulmones a los tejidos. La medida de la concentración de hemoglobina en sangre es fundamental para diagnosticar la anemia.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA

El método de referencia de la Sociedad Internacional de Hematología es el de la cianmetahemoglobina. En este método, la hemoglobina se convierte en cianmetahemoglobina al tratar la sangre con una disolución de ferrocianuro potásico y cianuro sódico. La intensidad del color producido es proporcional a la cantidad de hemoglobina presente. La lectura se realiza a una longitud de onda de 540 nm. Asimismo, en la técnica se usa como patrón de referencia una disolución de cianmetahemoglobina cuya absorbancia corresponde a una con-

TABLA 20-3 Valores de referencia de la fórmula leucocitaria en adultos

| Célula | Porcentaje | Valor absoluto ($\times 10^9/l$) |
|-------------|------------|------------------------------------|
| Neutrófilos | 55-75 | 2,5-7,5 |
| Eosinófilos | 1-4 | 0,05-0,5 |
| Basófilos | 0,2-1,2 | 0,01-0,15 |
| Linfocitos | 17-45 | 1,5-4,5 |
| Monocitos | 2-8 | 0,2-0,8 |

centración determinada de hemoglobina. Este patrón debe estar contrastado con el patrón primario.

El método de la cianmetahemoglobina mide todas las formas de hemoglobina, incluidas la metahemoglobina y la sulfohemoglobina. Los valores de referencia de la concentración de hemoglobina en sangre están comprendidos entre 13,5 y 17,5 g/dl en los varones, y entre 12 y 16 g/dl en las mujeres.

DERIVADOS DE LA HEMOGLOBINA

Las dos hemoglobinas fisiológicas, que son la oxihemoglobina y la hemoglobina reducida, se convierten en otros compuestos por la acción de ácidos, álcalis, sustancias oxidantes y reductoras, el calor y otros compuestos.

La *metahemoglobina* es un derivado de la hemoglobina en el que el hierro ferroso (II) se ha oxidado a férrico (III), de forma que no puede unirse reversiblemente con el oxígeno. En condiciones normales puede haber hasta un 1,5% de metahemoglobina. La metahemoglobinemia, que es el aumento por encima de los valores de referencia de la metahemoglobina de los eritrocitos, puede ser hereditaria o adquirida. La hereditaria se debe a una disminución de la capacidad de los eritrocitos para reducir la metahemoglobina. La mayor parte de los casos de metahemoglobinemia son adquiridos y se deben, principalmente, a la exposición a fármacos y sustancias químicas.

La *sulfohemoglobina* es una mezcla de formas oxidadas y parcialmente desnaturalizadas de la hemoglobina que se forman durante la hemólisis oxidativa. Se origina en los tratamientos con sulfamidas, las diarreas y las bacteriemias.

La hemoglobina tiene una capacidad para combinarse con el CO 200 veces superior a la del oxígeno. Se forma *carboxihemoglobina* en las intoxicaciones con monóxido de carbono.

Los derivados de la hemoglobina se determinan por espectroscopia, ya que cada uno tiene un espectro de absorción característico, con máximos a determinadas longitudes de onda (fig. 20-10).

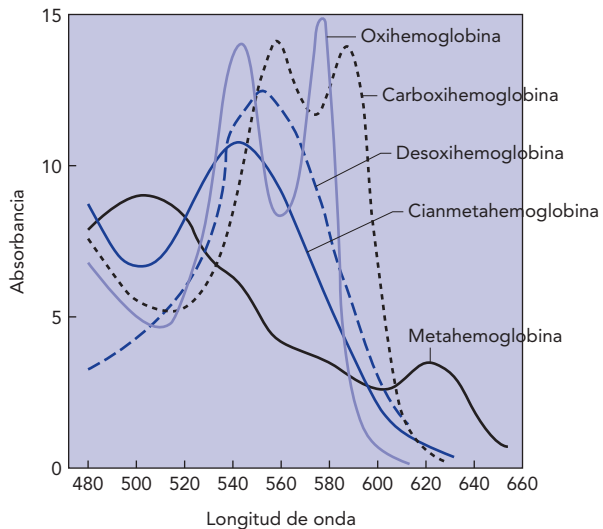


FIGURA 20-10
Espectro de los principales derivados de la hemoglobina.

HEMATOCRITO

El índice hematocrito es el volumen que ocupan los elementos celulares de la sangre. Los eritrocitos son las células que constituyen casi todo el volumen, mientras que los leucocitos y las plaquetas ocupan una parte mínima. El hematocrito se expresa en un porcentaje, y están implícitas las unidades l/l.

En el método del *microhematocrito* se llenan capilares heparinizados de 7 mm de longitud y de 1 mm de diámetro interno. El capilar se llena por capilaridad a partir de una punción o de sangre venosa obtenida con EDTA. Se tapa el extremo vacío con pasta de modelar. El tubo lleno se coloca en una de las ranuras radiales de la centrífuga de microhematocrito, con el extremo sellado lejos del centro. Se centrifuga durante 5 min a 10.000-12.000 g. Una vez centrifugados, el volumen celular se lee con unas escalas de plástico graduadas, corregidas para excluir el plasma atrapado entre las células. Para obtener unos buenos resultados, es fundamental que la duración y la velocidad de centrifugación sean adecuadas. Otras causas posibles de error son mezclar deficientemente la sangre al cargar los capilares y la lectura incorrecta de estos.

Los analizadores hematológicos determinan el hematocrito de forma indirecta a partir del producto del volumen corpuscular medio y el recuento eritrocitario. La principal diferencia entre el hematocrito determinado por centrifugación y el que se obtiene indirectamente por medios electrónicos es que este corresponde al denominado hematocrito real, es decir, al que no considera el efecto del plasma atrapado entre los eritrocitos, que debe tenerse en cuenta al determinar el hematocrito por centrifugación.

Los valores de referencia del hematocrito son del 40 al 54% en los varones, y del 37 al 47% en las mujeres. Un valor por debajo del límite de referencia para la edad y el sexo indica anemia, mientras que un valor por encima del límite señala policitemia.

ÍNDICES CORPUSCULARES ERITROCITARIOS

Utilizando el número de glóbulos rojos, la concentración de hemoglobina y el hematocrito, se obtienen varios parámetros de gran utilidad clínica que reciben el nombre de índices eritrocitarios. Son el volumen corpuscular medio (VCM), la hemoglobina corpuscular media (HCM), la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y la amplitud de distribución de eritrocitos (ADE).

El VCM es el volumen medio de los eritrocitos, expresado en femtolitros (1 fl = 10^{-15} l). Se calcula a partir de la fórmula:

$$\text{VCM (fl)} = \frac{\text{Hematocrito (l/l)}}{\text{Eritrocitos (} 10^{12}/\text{l)}}$$

Por ejemplo, si el hematocrito es 0,45 y los eritrocitos $5 \times 10^{12}/\text{l}$, el VCM será $0,45/5 \times 10^{12} = 90 \times 10^{-15} \text{ l} = 90 \text{ fl}$. Los valores de referencia del VCM están comprendidos entre 80 y 96 fl. El VCM está aumentado en las anemias macrocíticas y disminuido en las deficiencias de hierro, talasemias y anemias secundarias.

La HCM es la cantidad media de hemoglobina que contiene cada eritrocito y se expresa en picogramos (pg). La HCM es directamente proporcional a la cantidad de hemoglobina y también al tamaño de los eritrocitos. Se obtiene por la expresión:

$$\text{HCM (pg)} = \frac{\text{Hemoglobina (g/l)}}{\text{Eritrocitos (1012/l)}}$$

Por ejemplo, si la concentración de hemoglobina es de 150 g/l y la de eritrocitos $5 \times 10^{12}/l$, la HCM será $150/5 \times 10^{12} = 30 \times 10^{-12} \text{ g} = 30 \text{ pg}$. Los valores de referencia de la HCM están comprendidos entre 27 y 32 pg; se encuentra elevada en las anemias macrocíticas y disminuida en las anemias microcíticas.

La CHCM es la cantidad de hemoglobina contenida en 1 l de eritrocitos y se expresa en g/l. Se calcula por medio de la expresión:

$$\text{CHCM (g/l)} = \frac{\text{Hemoglobina (g/l)}}{\text{Hematocrito (l/l)}}$$

Por ejemplo, si la concentración de hemoglobina es de 150 g/l y el hematocrito 0,45, la CHCM es $150/0,45 = 333 \text{ g/l}$. La CHCM presenta unos valores de referencia comprendidos entre 320 y 360 g/l, y es normal o ligeramente baja en las anemias macrocíticas.

La ADE es un cálculo de la anisocitosis de los eritrocitos. La ADE es el coeficiente de variación de la distribución de los volúmenes eritrocitarios individuales. Se ha propuesto un sistema que clasifica las anemias según la ADE y el VCM. Con una ADE normal y un VCM bajo, microcítica pura (β -talasemia, α -talasemia); un VCM normal, normocítica; y un VCM elevado, macrocítica pura (aplasia). Con una ADE elevada y un VCM bajo, microcítica y anisocitosis (anemia ferropénica, $\delta\beta$ -talasemia); un VCM normal, normocítica y anisocitosis (anemia inflamatoria); y un VCM elevado, macrocítica y anisocitosis (anemia megaloblástica).

ÍNDICES PLAQUETARIOS

Los analizadores hematológicos, además del recuento absoluto de las plaquetas, proporcionan otros parámetros plaquetarios como el volumen plaquetario medio (VPM), el plaquetocrito (PCT) y la amplitud de distribución de plaquetas (ADP).

El VPM es una indicación del tamaño de las plaquetas. Los valores de referencia son entre 7 y 11 fl. El VPM puede indicar el recambio de las plaquetas, ya que las más jóvenes tienden a ser mayores. En la sangre obtenida con EDTA, el VPM aumenta con el tiempo hasta llegar a 1 h, es relativamente estable entre 1 y 3 h y luego vuelve a aumentar con el tiempo. Este aumento se debe al cambio de la forma de las plaquetas, que de ser discoide pasa en el EDTA a ser esférica. Por este motivo, se recomienda que las medidas se realicen en el intervalo entre 1 y 3 h. En las personas normales hay una relación inversa no lineal entre el VPM y el recuento de las plaquetas.

RETICULOCITOS

Los reticulocitos son eritrocitos inmaduros sin núcleo que conservan parte de su ARN y continúan sintetizando hemoglobina. Los recuentos seriados de reticulocitos son un indicador sensible de la eritropoyesis. Los recuentos mediante citometría de flujo son más precisos que los realizados mediante una tinción supravital y la inspección visual. En la actualidad, la mayoría de los analizadores hematológicos automáticos incorporan el recuento de reticulocitos.

El recuento manual se efectúa aprovechando la presencia de ARN en los reticulocitos. Se prepara una extensión que se tiñe con azul de metileno reciente al 1% o con azul de cresil brillante al 1%. Los reticulocitos aparecen al microscopio de color azul pálido y contienen material reticular o granular azul oscuro. Se cuentan hasta 100 reticulocitos y se anota el número de campos en los que se han obtenido. También se cuenta el número total de eritrocitos en una décima parte de los campos en que se han contado los cien. La cantidad de reticulocitos se expresa en forma de porcentaje de los eritrocitos totales. A continuación se presenta un ejemplo:

100 reticulocitos en 140 campos
200 eritrocitos en 14 campos

$$\text{Reticulocitos (\%)} = 100/200 \times 100 = 5\%$$

El recuento absoluto de reticulocitos se obtiene multiplicando el porcentaje de los reticulocitos por el número de eritrocitos. Más adelante se describe el recuento automático de reticulocitos que realizan los analizadores automáticos.

Expresados en porcentaje, los valores de referencia de los reticulocitos están entre el 0,5 y el 1,5% en los adultos, y entre el 2,5 y el 6,5% en los recién nacidos; en valores absolutos, están entre 20 y $100 \times 10^6/l$ en los adultos, y entre 100 y $300 \times 10^6/l$ en los niños. El número de reticulocitos aumenta cuando la médula responde a la anemia formando eritrocitos a un ritmo superior al normal. Esta situación puede producirse por hemólisis, hemorragia aguda o por respuesta de una médula agotada a un tratamiento de reposición. El recuento bajo de reticulocitos en un enfermo anémico hará pensar en una enfermedad muy grave de la médula o en una depresión temporal acentuada de la eritropoyesis por un agente infeccioso, una toxina o un fármaco.

ERITROCITOS NUCLEADOS

Los eritrocitos nucleados son precursores de los eritrocitos maduros no nucleados de la sangre. En el ser humano, los primeros generalmente sólo se encuentran en la médula ósea y en la sangre del feto y de los niños muy pequeños. En los adultos, se pueden encontrar en casi todos los pacientes con anemia grave, aunque es raro hallarlos en la anemia aplásica. Los eritrocitos nucleados pueden encontrarse también en los pacientes con anemia drepanocítica (Hb-SS), particularmente durante las crisis dolorosas, y en la talasemia. Otras causas de la presencia de eritrocitos nucleados son la leucemia, los síndromes linfoproliferativos y la carcinomatosis debida a una hematopoyesis extramedular, una

alteración de la arquitectura de la médula ósea o a ambas cosas. Además, cualquier trastorno que produzca una agresión hematopoyética, como las infecciones graves, la hipoxia o una hemorragia aguda masiva, pueden provocar que aparezcan eritrocitos nucleados en la circulación.

Estas células pueden determinarse mediante microscopía o citometría de flujo, o en los contadores hematológicos más recientes que incluyen este parámetro. El método microscópico es laborioso e impreciso. Por otra parte, los contadores electrónicos normales no son capaces de diferenciar los eritrocitos nucleados de los linfocitos. Utilizando anticuerpos monoclonales, pueden determinarse mediante citometría de flujo. En los contadores hematológicos automáticos más modernos se emplea un reactivo que, al mismo tiempo que lisa los eritrocitos, enuclea, encoge y tiñe ligeramente los núcleos de los eritrocitos nucleados presentes.

ANALIZADORES AUTOMÁTICOS PARA HEMATOLOGÍA

Son sistemas mecanizados para realizar el recuento celular sanguíneo y la fórmula leucocitaria. Sus principales componentes son: aspirador/diluidor, dispositivo de medida, transductor, discriminador, lector e impresora.

ASPIRADOR/DILUIDOR

El aspirador-diluidor es el componente del analizador hematológico que toma el espécimen y lo diluye para reducir la concentración de las células sanguíneas y adecuarla a la capacidad del dispositivo de medida. La dilución se realiza en una solución isotónica y los principales sistemas de dilución son el de bomba peristáltica y el de jeringa.

El espécimen se lleva a los diferentes canales de medida. La mayor parte de los analizadores hematológicos tienen dos canales de recuento: uno para los eritrocitos y las plaquetas y otro para los leucocitos y la fórmula leucocitaria. La concentración de hemoglobina puede determinarse por espectroscopia en otro canal o derivarse de los datos obtenidos en el de los eritrocitos.

DISPOSITIVO DE MEDIDA

Las células se hacen pasar por orificios de longitud y tamaño diferentes para cada canal, el de los eritrocitos/plaquetas y el de los leucocitos, donde están situados los dispositivos de medida, que son la parte central del analizador. Como se ha señalado, existen dos tipos fundamentales de métodos de recuento celular automatizado, el de impedancia eléctrica y el de dispersión de luz.

Para conseguir que las células pasen una tras otra se han diseñado varios sistemas, entre los que está el *enfoque hidrodinámico*. En los instrumentos de detección óptica, las células se introducen en la corriente de diluyente salino que penetra en la cámara de forma cónica, que se estrecha hasta tener unos 20 μm , de manera que las células se colocan en una sola fila, una detrás de otra. La intensidad de la luz dispersada y el tiempo de paso de las células permiten determinar el volumen de cada una. Por su parte, en los instrumentos de impedancia eléctrica, se realiza la eyección de las células desde la punta de un tubo

de enfoque, situado aproximadamente a 1 mm de la apertura, lo cual hace que las células se coloquen en línea en un flujo axial.

El flujo de barrido es una corriente estacionaria de diluyente que fluye por detrás de las aperturas de los eritrocitos durante el período de detección y evita que las células entren de nuevo en la zona sensible y se cuenten como plaquetas. A la salida de las aperturas se produce el paso desde un tubo de diámetro pequeño a otro de diámetro grande. El ángulo de divergencia suele ser mayor de 8° para evitar que se separe el flujo y se formen turbulencias.

TRANSDUCTOR

Es el componente del analizador que transforma las modificaciones producidas cuando las células pasan por la zona sensora en pulsos eléctricos.

DISCRIMINADOR

El discriminador diferencia los pulsos producidos por cada tipo celular. Puede ajustarse manualmente o de forma automática.

LECTOR-IMPRESOR

El lector-impresor recoge los datos y los presenta en una pantalla y un sistema impresor registra los resultados. La mayoría de los analizadores hematológicos generan dos tipos de datos: gráficos, con o sin alarmas, para la revisión interna del laboratorio; y numéricos, para entregar a los solicitantes. Los resultados gráficos pueden presentarse en forma de histogramas, donde se representa el número relativo de eritrocitos, leucocitos y plaquetas frente al tamaño celular, y de gráficos dispersivos, en los que se sitúan las subpoblaciones leucocitarias. En la actualidad, la mayoría de los analizadores hematológicos están conectados directamente con el sistema informático del laboratorio y pasan directamente los resultados a este, que los coloca en el registro correspondiente del paciente.

RECUESTO DE ERITROCITOS

En los sistemas de impedancia eléctrica, los eritrocitos se cuentan en diluciones de sangre de 1/50.000, que generalmente se realizan en dos fases; en una primera se diluye a 1/500 y, a partir de esta, se hace otra de 1/100. Estos sistemas emplean 0,5 ml de la suspensión celular, por lo que, generalmente, cuentan más de 50.000 en cada espécimen. Las aperturas utilizadas para contar los eritrocitos son de alrededor de $50\ \mu\text{m}$ de diámetro por $70\ \mu\text{m}$ de longitud. Los pulsos se procesan de forma electrónica para obtener información sobre el número de células y su tamaño. A partir de estos datos se construyen los histogramas de volumen.

En los sistemas de detección óptica, suelen utilizarse diluciones de 1/10.000. La luz dispersada por las células se mide en dos ángulos diferentes, uno alto ($5\text{-}15^\circ$) y otro bajo ($2\text{-}3^\circ$). Cada célula se sitúa en un citograma de acuerdo con las coordenadas de volumen y concentración de hemoglobina (fig. 20-11). A partir del citograma, se elaboran histogramas de distribución de volumen y

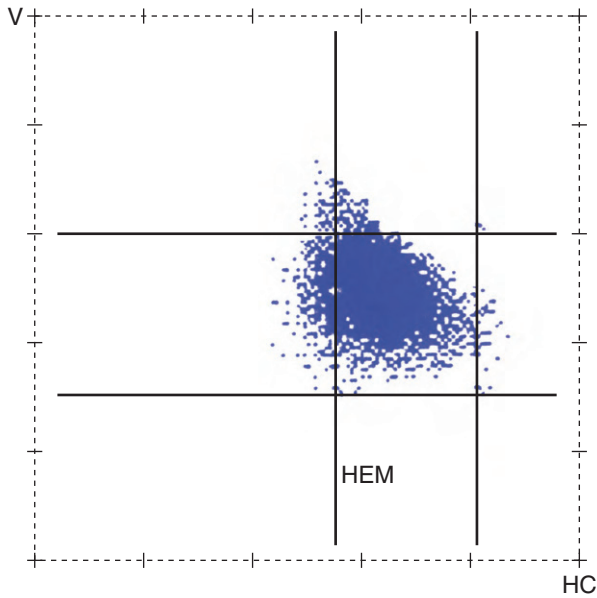


FIGURA 20-11 Citograma del volumen de los eritrocitos y de la concentración de hemoglobina.

concentración de hemoglobina (fig. 20-12). Es posible conocer el porcentaje de células macrocíticas y microcíticas, así como el de células hipocrómicas e hiperocrómicas.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA

La mayoría de los analizadores hematológicos emplean el método de la cianmetahemoglobina, o variantes adaptadas, que como se ha señalado es el método que recomienda el ICSH. Habitualmente, la dilución original, realizada a partir de la sangre completa, se conduce a una cámara de mezcla en donde se añade un agente lítico para lisar los eritrocitos y convertir la hemoglobina en

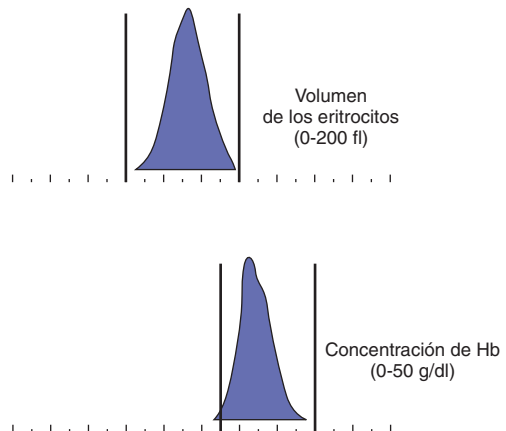


FIGURA 20-12
Histogramas de la distribución del volumen de los eritrocitos y de la concentración de hemoglobina

cianmetahemoglobina. A continuación, se mide la absorbancia a 540 nm y se obtiene la concentración de hemoglobina a partir de una curva de calibración. En algunos analizadores, después de medir la concentración de hemoglobina del espécimen, esa misma dilución se lleva a las cámaras de medida de los leucocitos para contarlos, pues no se han alterado en el proceso previo.

Los errores principales al medir la concentración de hemoglobina en los analizadores hematológicos son los aumentos erróneos debidos a una hemólisis *in vivo*, hiperlipemia, hiperbilirrubinemia y recuentos leucocitarios superiores a 50.000/ μl . También se obtienen descensos erróneos por la coagulación de la sangre.

DETERMINACIÓN DE LOS ÍNDICES CORPUSCULARES ERITROCITARIOS Y DE OTRAS MAGNITUDES DERIVADAS

Como se ha señalado, los analizadores hematológicos suelen determinar el hematocrito mediante un cálculo matemático a partir del producto del volumen corpuscular medio y del recuento eritrocitario. Este hematocrito es el real, ya que no tiene en cuenta el plasma atrapado entre las células, que sí aparece en el determinado por centrifugación.

Los principales errores en el cálculo del hematocrito por métodos electrónicos se deben a un exceso de anticoagulante etilendiaminotetraacetato (EDTA) en el espécimen, a alteraciones proteínicas o electrolíticas del plasma, alteraciones del equipo electrónico y una leucocitosis intensa.

El volumen corpuscular medio, que en los métodos manuales se calcula a partir del hematocrito y del recuento de eritrocitos, se mide directamente en los analizadores hematológicos. En los sistemas basados en el principio de la impedancia eléctrica, la cuantía del pulso generado es proporcional al volumen del eritrocito. En cambio, en los instrumentos que se basan en la dispersión de luz, la cantidad de luz dispersada proporciona una medida del volumen del eritrocito. En estos sistemas, la concentración de hemoglobina del eritrocito también determina su refracción y, por lo tanto, la cantidad de luz dispersada, lo que influye en la determinación del VCM. Entre los factores que producen aumentos falsos de este volumen están las aglutininas frías, la hiperglucemia y los recuentos leucocitarios por encima de 50.000/ μl . Las crioglobulinas producen descensos falsos del VCM.

Los sistemas que emplean la dispersión de luz miden la CHCM, mientras que el resto de los analizadores la calculan a partir de la concentración de hemoglobina y del hematocrito. Se producen elevaciones falsas de la CHCM en la hiperlipemia y en presencia de aglutininas frías, y descensos falsos en los recuentos leucocitarios mayores de 50.000/ μl .

Los analizadores hematológicos pueden obtener la distribución de los volúmenes eritrocitarios. El VCM no proporciona una información adecuada de la forma en que se distribuyen los tamaños de un espécimen de sangre, y da una información equívoca cuando la población de eritrocitos es heterogénea. A partir de los histogramas del volumen eritrocitario se obtiene la magnitud ADE (amplitud de distribución de eritrocitos), que es un índice de la variación del tamaño de estos y equivale a la anisocitosis observada en las extensiones. La ADE es el coeficiente de variación de la distribución de los volúmenes individuales de los eritrocitos.

RECUESTO DE LOS LEUCOCITOS

Todos los métodos para contar automáticamente los leucocitos necesitan un agente hemolizante que elimine los eritrocitos, que superan a los leucocitos unas mil veces. Para ello se utilizan diluciones 1/500 en un agente lítico. Es obvio que una lisis incompleta de los eritrocitos conducirá a concentraciones de leucocitos falsamente elevadas. Por otro lado, un ajuste inadecuado del discriminador producirá, en general, pérdidas en el recuento. En los analizadores hematológicos que utilizan el método de la impedancia eléctrica, las aperturas de los canales de recuento y análisis del tamaño de los leucocitos son de unos 100 μm de diámetro por 50 μm de longitud.

Se producen incrementos falsos del recuento de leucocitos en presencia de eritrocitos nucleados, un apetonamiento de plaquetas, eritrocitos sin lisar y crioglobulinas. Por el contrario, la coagulación de la sangre da lugar a falsas disminuciones de los recuentos leucocitarios.

FÓRMULA LEUCOCITARIA

La fórmula leucocitaria se realiza en los analizadores hematológicos de acuerdo con los principios de la citoquímica celular y el análisis de volúmenes celulares expuestos anteriormente. Diferentes organismos han establecido normas para evaluar el funcionamiento de dichos analizadores respecto a la realización de la fórmula leucocitaria.

RECUESTO DE PLAQUETAS

Las plaquetas son células muy pequeñas que en los analizadores hematológicos producen pulsos muy pequeños. Un error importante al contar las plaquetas se debe a la pseudotrombocitopenia inducida por el anticoagulante. La causa principal de que se aglomeren las plaquetas es la coagulación de la sangre antes de que llegue al anticoagulante. En los analizadores de medidas de dispersión de luz, las plaquetas se cuentan directamente. Se utilizan tres variables: el volumen celular, el índice de refracción y el tiempo de recorrido por la zona de detección. De esta manera, se obtiene una discriminación clara entre las plaquetas y los eritrocitos, que se analizan en el mismo canal.

RECUESTO DE RETICULOCITOS

Las últimas generaciones de analizadores hematológicos de gama alta determinan los reticulocitos. Los métodos automáticos para contarlos se basan en la fluorescencia (naranja de tiazol, auramina O y otros colorantes) o la absorbancia (oxazina 750 y azul de metileno reciente) o en colorantes que interaccionan con el ARN de los reticulocitos. Además de enumerarlos, estos métodos pueden proporcionar información sobre la distribución de la intensidad del teñido en la población de reticulocitos. Se obtienen unos índices celulares reticulocitarios, semejantes a los eritrocitarios, que pueden emplearse para diagnosticar y tratar las enfermedades hematológicas. Uno de estos índices es el contenido de hemoglobina de los reticulocitos (CHr), en pg/célula, que se calcula a partir de las medidas directas del volumen y de la concentración de hemoglobina de

cada reticulocito. Dado que los reticulocitos reflejan el estado funcional de la médula ósea en los 4 o 5 días anteriores, el CHr proporciona un reflejo mejor que la concentración de hemoglobina citoplasmática (CHC) del equilibrio en tiempo real entre el hierro y la eritropoyesis.

ALARMAS EN LOS ANALIZADORES HEMATOLÓGICOS

Las alarmas que proporcionan los analizadores hematológicos identifican qué especímenes requieren una revisión o un estudio posterior. Los analizadores hematológicos se programan para proporcionar diversas alarmas que pueden agruparse en: cualitativas, cuantitativas, útiles y deseables.

Las principales *alarmas cualitativas* son las de blastos, células anormales (variantes de linfocitos), desviación a la izquierda y granulocitos inmaduros. Estas alarmas son básicas en el concepto de detección sistemática (*screening*). Las alarmas de los blastos y otras células anómalas son generalmente muy sensibles, por lo que a menudo se obtienen resultados positivos falsos.

Las *alarmas cuantitativas* se basan en datos del recuento. Las principales alarmas de este tipo son las de anemia/policitemia, leucopenia/leucocitosis, trombopenia/trombocitosis y otras derivadas de los índices eritrocitarios.

Las *alarmas útiles* son las relacionadas principalmente con problemas clínicos relativamente menores, en comparación con las alarmas cualitativas obligadas. Pueden ser muy útiles para el programa del control de la calidad interno, pues apuntan a condiciones que afectan adversamente al recuento sanguíneo. Las principales alarmas de este tipo se refieren a la anisocitosis (ADE), el tamaño de las plaquetas (ADP), dos poblaciones de eritrocitos, la aglutinación de eritrocitos, la aglutinación de plaquetas y las hemoglobinas anormales.

Las *alarmas deseables* corresponden a la eosinofilia, los eritrocitos nucleados, las células drepanocíticas, la esferocitosis, los fragmentos de eritrocitos y las células de frotis.

ERRORES MÁS FRECUENTES EN LOS ANALIZADORES HEMATOLÓGICOS AUTOMÁTICOS

Los recuentos de los analizadores automáticos se realizan con una imprecisión de entre el 1 y el 3%, y con una gran exactitud. Sin embargo, pueden producirse errores, que se agrupan en los que se deben a la naturaleza del espécimen, los correspondientes al operador y los del equipo.

Errores debidos a la naturaleza del espécimen

Los principales errores son:

- Alteración de la distribución de las células y disminución de las concentraciones celulares por la coagulación parcial del espécimen, cuando no se mezcla bien la sangre con el anticoagulante en los tubos de extracción.
- Modificación de los pulsos y resultados erróneos producidos por agregados celulares.

- Recuentos en el canal de los leucocitos que corresponden a eritrocitos residuales que no se han lisado.
- Aumento erróneo de la concentración de hemoglobina, la concentración media de hemoglobina (CMH) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) por concentraciones elevadas de lípidos o proteínas (hiperlipemia y crioglobulinas) que causan turbidez.
- Macrocitosis y concentraciones pequeñas de eritrocitos, junto con valores muy altos de la CHCM, producidos por las grandes concentraciones de aglutininas frías.
- Elevación ligera, pero falsa, de la concentración de hemoglobina en especímenes con recuentos de leucocitos elevados (por encima de $30 \times 10^9/l$) como resultado del enturbiamiento en los contadores que utilizan la misma dilución para medir la concentración de hemoglobina y recontar los leucocitos.
- Incremento del hematocrito y del volumen corpuscular medio (VCM) en los recuentos leucocitarios muy elevados por contarse los leucocitos con los eritrocitos.
- Resultados bajos de los leucocitos en algunos pacientes con leucemia, debido a la fragilidad de sus leucocitos, que hace que escapen al recuento. Este error también puede observarse en la uremia y en algunos pacientes que reciben tratamiento con fármacos inmunodepresores.
- Hematocrito y VCM falsamente elevados y CHCM baja por concentraciones elevadas de glucosa ($> 400 \text{ mg/dl}$) e hiperosmolaridad debida a otras causas. El mecanismo probable que produce estos resultados es que, con la dilución, se hinchan los eritrocitos debido a que el diluyente es relativamente hipotónico en relación con el espécimen de sangre hipertónica.

Errores del operador

Se producen recuentos de leucocitos y del diferencial leucocitario incorrectos, por alteraciones de la homogeneidad de los especímenes, cuando no se han movido bien antes de presentarlos al aspirador. Este error se evita agitando suave y constantemente los especímenes antes de su aspiración empleando mezcladores automáticos.

Errores del equipo

- Aumento de los recuentos celulares por contaminación del líquido de dilución con partículas de polvo, bacterias u hongos.
- Disminución de los recuentos celulares por obstrucción parcial de los capilares de conducción o de los orificios de recuento.
- Arrastre de un espécimen sobre el siguiente, que tiene lugar cuando a un espécimen con un valor elevado de alguna magnitud relacionada con un recuento le sigue otro espécimen con un recuento bajo o normal de la magnitud.
- Presencia de burbujas pequeñas que se cuentan como células.

- Presencia de impulsos parásitos y averías en los componentes electrónicos del instrumento.
- Desajuste electrónico de los cálculos matemáticos que realiza el sistema.
- Medida incorrecta del volumen de recuento que se produce cuando están alterados los sistemas analógicos o digitales de medición del volumen.
- Alteraciones de la dilución cuando no funcionan correctamente los diluidores.
- Alteraciones del dispositivo de medida.
- Alteraciones del discriminador.
- Desajuste de la calibración. Las calibraciones no deben modificarse sólo por una desviación en la determinación de una suspensión de células control. No deben modificarse hasta que se demuestre una desviación de sus valores de forma estadística por procedimientos de control de la calidad.
- Errores de coincidencia, que se consideran a continuación.

Coincidencia

Se denomina *coincidencia* al fenómeno que se produce cuando dos o más células pasan por la zona detectora en el mismo momento, o cuando dos o más pulsos tienen lugar tan juntos que no puedan discriminarse. Cuando dos células se mueven pegadas a través de la apertura, se produce un pulso de tamaño doble y ambas se miden de forma incorrecta como una sola célula de volumen doble. Si las dos se mueven a través de la apertura en tándem, se produce un pulso de joroba doble y se registra un valor erróneo. Este efecto puede detectarse de forma electrónica y eliminarse.

El error de coincidencia depende de la longitud de la zona sensora y de la concentración, la velocidad de flujo y el tamaño de las células. Podría reducirse disminuyendo la concentración de las células y el tamaño de los orificios. Sin embargo, disminuir la concentración de células aumenta el efecto de los errores de dilución y los inherentes al recuento, y se hace más crítico el error por el «ruido» de fondo de las partículas contaminantes. Por otra parte, disminuir el tamaño del orificio plantea el problema de su posible obstrucción parcial o completa.

Para hacer mínimos o suprimir los errores de coincidencia se han introducido mejoras en los analizadores hematológicos automáticos, como el enfoque hidrodinámico. En los aparatos de rutina los circuitos electrónicos editan los pulsos de los eritrocitos y los leucocitos para excluir los producidos por las células no axiales. Los circuitos editores seleccionan sólo los pulsos que provengan de las células que pasan por la parte central de la zona sensora. Estos pulsos tienen relaciones de anchura/altura para cada tipo celular comprendidas dentro de límites definidos.

ANALIZADORES HEMATOLÓGICOS COMERCIALES

En la actualidad, hay cinco fabricantes que comercializan los principales analizadores hematológicos. Son Abbott, ABX, Siemens, Beckman Coulter y Sysmex. En la tabla 20-4 se da una relación de los principales analizadores hematológicos comerciales.

TABLA 20-4 Principales analizadores hematológicos del mercado

| | Año |
|------------------------|------|
| Abbott | |
| CELL-DYN Ruby | 2006 |
| CELL-DYN Sapphire | 2005 |
| CELL-DYN Emerald | 2008 |
| CELL-DYN 3700 | 1999 |
| CELL-DYN 3200 | 1977 |
| Beckman Coulter | |
| LH 1500 | 2003 |
| LH 780/LH 785 | 2007 |
| LH 750/LH 755 | 2001 |
| LH 500 | 2003 |
| HnX | 1999 |
| ABX | |
| Pentra 60+ | 2000 |
| Pentra XL 80 | 2003 |
| Pentra DX 120 | 2004 |
| Siemens | |
| Advia 120 | 1996 |
| Advia 2120 | 2004 |
| Advia 2120i | 2008 |
| XE-5000 | 2007 |
| Sysmex | |
| XE-2100 | 1999 |
| XE-21000 | 2004 |
| XE-ALpha N/HST-N | 2000 |
| XT-2000i | 2001 |
| XT-1800i | 2001 |
| XT-1000i | 2005 |

Una de las mejoras introducidas en los últimos años ha sido la ampliación de la linealidad como consecuencia de avances de los programas informáticos y de los sistemas de lectura. La expansión de la linealidad permite a los instrumentos trabajar con especímenes con grandes recuentos de leucocitos, sin necesidad de diluciones adicionales. Se ha mejorado también la detección de los reticulocitos y las células inmaduras y puede medirse, asimismo, el número de granulocitos inmaduros que está aumentado en las infecciones, muchas enfermedades hemáticas, en afecciones de la médula ósea y en enfermedades inflamatorias.

Uno de los aspectos futuros de los analizadores hematológicos automáticos es la posibilidad de analizar la médula ósea y líquidos como el cefalorraquídeo, el líquido pleural y el líquido ascítico. Alguno de los analizadores más modernos puede utilizar anticuerpos monoclonales marcados para realizar inmunofenotipados (subpoblaciones CD4/8).

Otra característica de los analizadores más modernos es su capacidad para incorporarse a lo que se denomina islas hematológicas de automatización, que

son conjuntos de analizadores integrados con un extensor/teñidor automático, controlados por un ordenador que coordina los movimientos de los especímenes.

VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN GLOBULAR

Cuando se deja reposar la sangre anticoagulada, las células sedimentan hasta formar una columna empaquetada en la parte inferior del tubo que la contiene. La velocidad de este proceso depende de varios factores, tanto plasmáticos como eritrocitarios. Entre los plasmáticos los más importantes son la concentración de fibrinógeno y de globulinas de la sangre. Con relación a los factores eritrocitarios, la velocidad de sedimentación globular (VSG) o eritrosedimentación es directamente proporcional al peso del agregado celular e inversamente al área superficial. Los microcitos sedimentan más lentamente que los macrocitos, que tienen proporciones disminuidas superficie/volumen. Asimismo, los eritrocitos con formas anómalas o irregulares, como los drepanocitos y los esferocitos, tienen VSG menores.

MÉTODOS DE MEDICIÓN

La VSG puede medirse por varios métodos. El ICSH (1993) ha recomendado como método de referencia el método de Westergren, que usa sangre total sin diluir anticoagulada con citrato. La pipeta de Westergren tiene 30 cm de longitud y un diámetro interno de 2,55 mm, y está calibrada en milímetros desde 0 a 200. Contiene alrededor de 1 ml. Para mantener la pipeta en posición completamente vertical se emplea un soporte adecuado. Se carga la pipeta hasta la señal de 0, procurando que no queden burbujas atrapadas, y se coloca en el soporte a temperatura ambiente. Tras exactamente 60 min se lee la distancia en milímetros desde la marca 0 hasta la parte superior de la columna de eritrocitos. Los valores de referencia son de hasta 15 mm/h en los varones y 20 mm/h en las mujeres menores de 50 años, y de hasta 20 mm/h en los varones y 30 mm/h en las mujeres mayores de cincuenta. El método de Westergren modificado utiliza sangre anticoagulada con EDTA y proporciona los mismos resultados. La ventaja de este método es que puede utilizar el mismo tubo que el de los otros estudios hematológicos.

SISTEMAS AUTOMÁTICOS

Hay sistemas para medir la VSG con aspiración neumática de la sangre y cierres herméticos de las partes inferior y superior. Cargan simultáneamente muchos especímenes y un reloj avisador señala el tiempo para proceder a la lectura.

En el mercado existen varios aparatos automáticos que determinan la VSG y utilizan tubos específicos de vacío para extracciones. Estos, de plástico transparente y forma rectangular, se llenan de sangre con los sistemas de extracción de vacío. El tubo se inserta en el aparato, cuya capacidad varía según el modelo, y un lector óptico, que se mueve verticalmente, detecta el nivel de sedimentación. Se realizan las lecturas a los 20 min y los resultados se correlacionan bien con los obtenidos mediante el método de Westergren.

Otro analizador automático para VSG de sistema cerrado utiliza un tubo de toma de muestra estándar. El aparato pincha el tapón con una aguja de aspiración y llena un capilar, que se centrifuga a 20 g a 37 °C. Un fotodiodo detector traza una curva de sedimentación que se transforma en valores comparables a los de Westergren. El sistema mide 110 especímenes por hora y ofrece un resultado cada 32 s en 200 µl de sangre total.

UTILIDAD CLÍNICA

La VSG es un marcador útil, aunque inespecífico, de inflamación. Se produce un aumento fisiológico en el embarazo, con el envejecimiento y durante el crecimiento. Se observan aumentos moderados en muchos procesos, entre otros, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la anemia, las enfermedades infecciosas, el infarto de miocardio y las neoplasias. Los aumentos moderados se observan en las vasculitis, el mieloma múltiple y la macroglobulinemia de Waldeström.

ESTUDIO DE LA MÉDULA ÓSEA

La médula ósea se encuentra en los cuerpos grasos centrales de los huesos esponjosos (esternón, costilla, pelvis) y los huesos largos (fémur, tibia y húmero). La cantidad total de médula ósea de un adulto es de 1.300-1.500 g. Las células hematopoyéticas de la médula ósea producen las células sanguíneas que liberan a la circulación. El examen de la médula ósea es una investigación esencial para el diagnóstico y tratamiento de muchos trastornos de la sangre y de la propia médula ósea. Se ha comprobado que las modificaciones de la médula se producen en todos los lugares al tiempo, por lo que puede elegirse el lugar más adecuado. El lugar anatómico preferido es la cresta ilíaca posterior, cuyo espacio medular grande permite realizar tanto la aspiración como la biopsia. Ambos estudios son complementarios y, cuando se realizan los dos, proporcionan una evaluación completa de la médula ósea. El *mielograma* incluye la evaluación de la cantidad, el tamaño y la forma de los eritrocitos, los leucocitos y los megacariocitos (precursores de las plaquetas). El estudio microscópico incluye la determinación de la celularidad y la presencia de tejido fibrótico o neoplásico.

OBTENCIÓN DE LOS ESPECÍMENES

Tanto la aspiración como la biopsia por trepanación pueden realizarse en primer lugar. Cuando se realiza la aspiración en primer lugar, la biopsia debe realizarse a través de la misma incisión, aproximadamente a 0,5-1 cm del lugar de la aspiración, para evitar obtener una biopsia dañada o hemorrágica.

La aspiración se realiza con una jeringa de plástico de 10 o 20 ml que proporcione una presión negativa adecuada. Para conservar la morfología, la jeringa no debe contener anticoagulante. Se obtiene aproximadamente 0,5 ml del aspirado para realizar las extensiones. El resto se coloca en un tubo con EDTA para hacer extensiones cuando la muestra coagule rápidamente. Se añade una segunda jeringa a la aguja de aspiración para obtener muestras adicionales para las pruebas complementarias, como citometría de flujo, análisis

citogenéticos y estudios de genética molecular, microbiología, microscopía electrónica o cultivos de médula ósea.

PREPARACIÓN DE LAS EXTENSIONES

Las extensiones se realizan de forma análoga a las de la sangre. La biopsia con aguja y las partículas de médula coagulada se fijan. El tejido se embebe en parafina y se realizan cortes que posteriormente se tiñen con hematoxilina-eosina.

Las extensiones se fijan con acetona/metanol y se tiñen con un colorante de Romanowsky, como May-Grünwald Giemsa o Wright Giemsa. Una extensión fijada con metanol se tiñe con azul Prusia y se contratiñe con safranina.

OBSERVACIÓN

La extensión de médula ósea debe observarse al microscopio a baja amplificación ($\times 100$) para determinar el número y la celularidad de las partículas, el número de megacariocitos y observar acumulaciones de célula anómalas y células anómalas de baja incidencia. A elevada amplificación se valora la morfología de las células, los parásitos o las inclusiones celulares.

Debe realizarse un recuento celular diferencial de células nucleadas (RDCN) para valorar la actividad hematopoyética y para comparar las proporciones de los diferentes linajes celulares, y también para cuantificar las células anómalas cuando se encuentren presentes. El RDCN debe comprender blastos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos, cayados, segmentados, eosinófilos, basófilos, mastocitos, promonocitos y monocitos, linfocitos, células plasmáticas y eritroblastos. El RDCN no debe incluir megacariocitos, macrófagos, osteoblastos, osteoclastos y células del estroma. Deben contarse como mínimo 500 células por lo menos en dos extensiones. Debe calcularse el cociente mieloide/eritroide (M/E) expresando el cociente de todos los granulocitos y monocitos y sus precursores (mieloblastos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos, cayados, segmentados, eosinófilos, basófilos, promonocitos y monocitos) entre eritroblastos (en todas las fases de diferenciación).

La tinción con azul Prusia se utiliza para evaluar el hierro almacenado y los sideroblastos.

PRINCIPALES ALTERACIONES

Las principales alteraciones del mielograma son el aumento de la celularidad a expensas de la serie eritropoyética (anemia regenerativa, anemia megaloblástica, anemia diseritropoyética), el aumento de la celularidad a expensas de la serie granulocítica (septicemia, procesos inflamatorios, hepatopatía crónica), el aumento del número de linfocitos, el aumento del número de células plasmáticas, la presencia de abundantes macrófagos o con formas anómalas y la infiltración medular por blastos leucémicos.

Citometría de flujo

INTRODUCCIÓN

La citometría de flujo es una técnica que se emplea para el análisis cualitativo y cuantitativo de células y partículas y para clasificar y separar células. Las aplicaciones principales de la citometría de flujo en el laboratorio clínico son determinar antígenos celulares, cuantificar ácidos nucleicos, detectar apoptosis, estudiar las funciones celulares y analizar la fagocitosis y las estructuras subcelulares. En este capítulo se presentan las principales características de la citometría de flujo, los componentes de los citómetros de flujo y los clasificadores de células y las principales aplicaciones de la citometría de flujo en los laboratorios clínicos.

FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

En la citometría de flujo, las células o las partículas en suspensión, rodeadas por un líquido envolvente, se hacen pasar alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. La interacción de las mismas con el rayo de luz genera señales que se llevan a los detectores adecuados. Las interacciones que se producen son la dispersión de la luz y la fluorescencia, cuando las células o las partículas llevan unidos compuestos fluorescentes. La medida de las señales generadas proporciona datos que se representan como histogramas, y con programas de ordenador se obtiene la información que interesa sobre las células o las partículas.

Hay dos tipos principales de citómetros de flujo: los analizadores y los separadores. Estos últimos no sólo recogen datos de las células o las partículas (las analizan), sino que también separan las que tengan propiedades determinadas, que define el operador, con purezas superiores al 99%.

COMPONENTES DE UN CITÓMETRO DE FLUJO

Los principales componentes de un citómetro de flujo son:

- Sistema para inyectar la muestra.
- Cámara de flujo.
- Fuente de luz.
- Sistema óptico.
- Detectores.
- Amplificador/convertidor.
- Sistema informático.

SISTEMA PARA INYECTAR LA MUESTRA

Los citómetros de flujo utilizan dos tipos de sistemas para introducir la muestra en la boquilla o cámara de flujo: de presión diferencial y volumétrico. El más habitual es el de presión diferencial. Con este sistema, el vial que contiene

la muestra se mantiene a una presión algo mayor que la del contenedor del líquido envolvente. La velocidad del flujo de muestra viene determinada por esta diferencia de presión y por la resistencia del tubo que va del vial de la muestra a la boquilla. Este sistema facilita un lavado rápido y eficaz para eliminar el arrastre entre las muestras, pero no permite la determinación exacta de la velocidad de flujo de la muestra y la concentración celular.

En el sistema de inyección volumétrico, la muestra se inyecta mediante una bomba de jeringa que puede moverse a velocidades calibradas. De esta forma, se puede ajustar el flujo de inyección de la suspensión celular. Además, se puede variar la velocidad del flujo de muestra en un intervalo amplio, incluyendo velocidades bastante bajas. La principal desventaja es que el lavado entre muestras es más complicado y requiere más tiempo. Normalmente, los citómetros de flujo poseen dos o tres velocidades de flujo capaces de proporcionar 12, 30 o 60 $\mu\text{l}/\text{min}$.

CÁMARA DE FLUJO

El sistema de líquidos está constituido, básicamente, por dos compartimentos: el del líquido que contiene la suspensión celular y el del líquido envolvente, que se utiliza para rodear el líquido que contiene la muestra. Empujados por un sistema de presión, los líquidos de ambos compartimentos entran en contacto en la boquilla o cámara de flujo.

Esta cámara es el centro del citómetro, ya que en ella se genera el flujo laminar de células que luego atraviesan el rayo luminoso. En la cámara de flujo, las células se introducen mediante un sistema de presión en el centro del líquido envolvente, que se impulsa a gran velocidad a través de un orificio estrecho. Durante el trayecto, las células han de permanecer en el centro de un caudal de líquido isotónico y deben cruzar perpendicularmente, alineadas y de una en una el rayo luminoso. La velocidad de paso de las células puede ser de entre 1.000 y 1.000.000/ min .

Hay dos tipos de cámaras de flujo: abiertas y cerradas. En las cámaras abiertas de propulsión de aire, la boquilla cónica termina en un orificio del que emerge un flujo laminar. El diámetro del orificio está comprendido entre 50 y 100 μm . En las cámaras de flujo cerradas, la boquilla va a un tubo de sección rectangular de unos 200 μm de diámetro interno, que acaba en un orificio con un diámetro de 50 a 100 μm .

La corriente de flujo con las células en suspensión abandona la cámara por una abertura cuyo tamaño determina el diámetro de la corriente fluida resultante. Esto, junto con el ajuste de la concentración de células de la muestra, permite que haya un flujo secuencial de células individuales a través de la corriente.

En un corte transversal, el flujo está constituido por una porción interna que contiene el líquido con la suspensión celular y una porción externa con el líquido envolvente. La diferencia de presión entre los dos compartimentos hace variar la proporción de sus líquidos en el área de sección del flujo, y esto se traduce en cambios de la velocidad de paso de las células. Así, un incremento del cociente entre la presión del líquido envolvente y la del líquido con el espécimen produce una disminución del volumen de espécimen que pasa ante el rayo luminoso por unidad de tiempo, es decir, una velocidad de paso de las

células menor. A su vez, una disminución de ese cociente se traduciría en una mayor velocidad de paso de las células por delante del rayo.

La cámara de flujo es una parte fundamental de cualquier citómetro de flujo, y la mayoría de los problemas de estos aparatos se deben a las obstrucciones o a la distorsión del flujo producidos por la acumulación de materia en el orificio.

FUENTE DE LUZ

En los citómetros de flujo, la fuente de luz es un rayo láser. Este suele ser de ión argón de 488 nm enfriado por aire y tener una potencia de emisión de 15 mW, aunque también puede ser de helio-neón de 633 nm o de kriptón de 657 nm. También hay láseres de estado sólido que producen luz de las siguientes longitudes de onda: 355, 405, 488, 530, 549, 635 y 780 nm. La mayoría de los láseres de estado sólido tienen una potencia de emisión de 10 a 25 mW. Hay un diodo láser que proporciona 200 mW a 488 nm.

De forma simple, el funcionamiento del láser es como sigue. El tubo láser de ión argón contiene en su interior este gas inerte. Cuando se aplica una corriente, se ioniza el gas y se produce una absorción de energía por los electrones de valencia que los impulsa a un nivel energético superior. Cuando estos vuelven al estado basal se produce un fotón, cuya energía es proporcional al nivel del que cae. El fotón emitido estimula a los iones vecinos para que emitan energía, y todos tienen igual energía (longitud de onda), dirección y fase que el fotón estimulante. Unos espejos reflectores, colocados a ambos extremos del tubo, refuerzan la estimulación a lo largo del eje de este. Asimismo, un prisma puesto frente al espejo de la parte posterior selecciona una sola longitud de onda. En el tubo láser de argón, el rayo láser está ajustado a una longitud de onda de 488 nm. El espejo del extremo frontal (acoplador de salida) permite pasar el 2% de la luz total. Esta luz transmitida aparece como un rayo láser.

Los láseres llevan una lente de enfoque para hacer que el punto de incidencia de la luz sobre las células que cruzan por delante de ellos sea lo menor posible. En términos generales, existen dos tipos de lentes de enfoque: las esféricas y las elípticas. Con el primer tipo de lentes, el punto de enfoque es circular, mientras que con el segundo tipo es una elipse con un eje mayor horizontal y otro menor vertical que coincide con el trayecto del flujo.

SISTEMA ÓPTICO

La mayoría de los citómetros de flujo poseen cinco sistemas ópticos de medida: dos de dispersión de luz, uno hacia delante y otro en ángulo recto, y tres de fluorescencia. Mediante el sistema de dispersión hacia delante se determina el tamaño de las células, y con el de dispersión en ángulo recto la granulosis celular, esto es, la complejidad interna de la célula. Los sistemas de fluorescencia se sitúan en ángulo recto y con ellos se determinan las células marcadas con los compuestos fluorescentes.

La luz correspondiente a las diferentes emisiones fluorescentes se recoge a ángulos cercanos a los 90° junto con la luz dispersada lateralmente. Por ello, se hace necesario un sistema óptico que permita separar la luz que, aunque se recoja lateralmente, aporta una información distinta sobre las características

de cada célula: su complejidad interna y cada una de las emisiones fluorescentes que corresponden a los diversos fluorocromos presentes en la célula y excitados de forma simultánea. Los fotones con diferente longitud de onda se seleccionan por medio de un sistema óptico compuesto por filtros y espejos dicroicos, y se envían a un detector específico.

La posibilidad de utilizar a la vez diferentes fluorocromos depende tanto de las características del citómetro (tipo de láser, longitud o longitudes de onda seleccionadas, juego de lentes y espejos instalados), como de las características celulares que se pretenden analizar (antígenos celulares, ADN, ARN, proteínas, pH intracelular, Ca^{2+} libre en el citoplasma, etc.) y de los fluorocromos disponibles para hacerlo.

En la figura 21-1 se recoge de forma esquemática la disposición de los componentes de un citómetro de flujo, incluida la de los espejos y las lentes. Tres detectores corresponden a señales de fluorescencia en la zona verde, naranja y roja del espectro luminoso.

DETECTORES

De forma característica, los pulsos de luz que llegan a los detectores contienen desde unas centenas a varios millares de fotones. En la actualidad, se utilizan tres tipos de detectores: fotodiodos, fotomultiplicadores y detectores monocromáticos. En cualquiera de ellos se generan pulsos eléctricos cuya área, altura y anchura son directamente proporcionales a la cantidad total de luz, la intensidad máxima detectada y la duración de la señal luminosa, respectivamente. Cada pulso se inicia una vez que la célula se asoma delante del rayo luminoso. Posteriormente, si la velocidad es constante y la célula uniforme para las características estudiadas, el pulso descenderá de forma simétrica hasta que desapa-

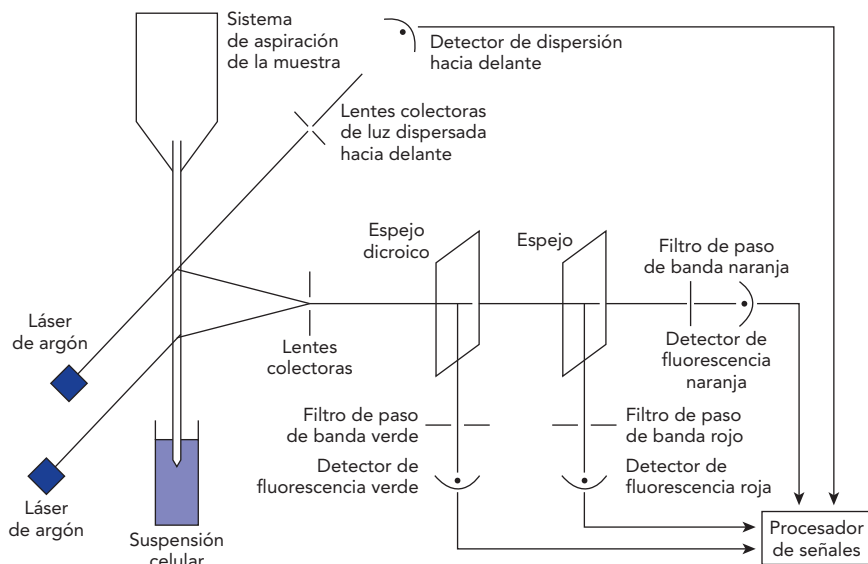


FIGURA 21-1 Disposición de los componentes de un citómetro de flujo, incluidos los espejos y las lentes.

rezca la señal sobre esa célula. En la figura 21-2 se recoge de modo esquemático el proceso de generación y formación de un pulso.

Los *fotodiodos* son detectores de estado sólido que se emplean habitualmente para recoger señales de luz de intensidad relativamente grande, como la luz dispersada frontalmente. Ello se debe a que este tipo de detectores son muy simples y transforman la señal luminosa que les llega en un pulso eléctrico. La intensidad de este es directamente proporcional al número de fotones que lleguen al detector.

Los *fotomultiplicadores* están formados por un tubo en cuyo interior hay varias placas recubiertas por compuestos muy excitables por la luz y que, con una determinada probabilidad (eficacia), multiplican la señal recibida. Al estar colocadas las placas de forma secuencial, el resultado es que se multiplica la señal luminosa. El número de veces que lo haga dependerá del voltaje establecido entre la primera y la última placa.

Los *detectores monocromáticos* se han introducido hace menos tiempo y se caracterizan por recoger luz con una longitud de onda muy concreta.

AMPLIFICADOR/CONVERTIDOR

Cada detector genera una señal electrónica que es proporcional a la cantidad de luz dispersada o a la intensidad de la fluorescencia. Esta señal se amplifica mul-

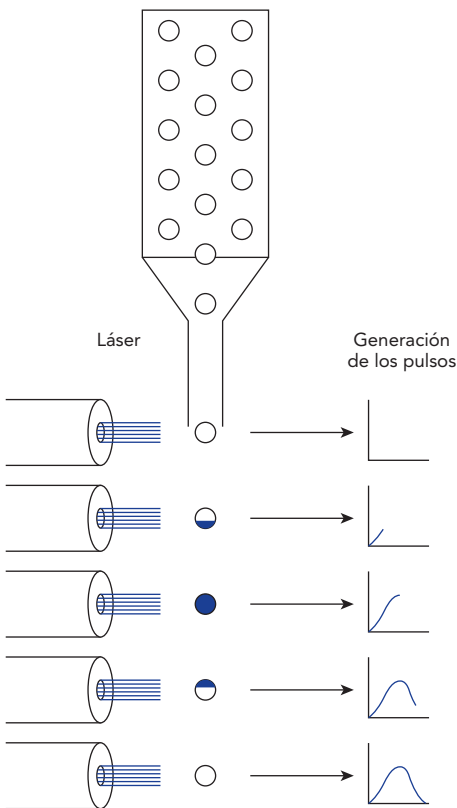


FIGURA 21-2

Proceso de generación y formación de un pulso.

tipicándola por un factor lineal o logarítmico. El pulso amplificado se lleva a un convertidor analógico/digital que convierte la altura del pico, que es análoga a la fuerza de la señal, en una señal digital que puede manejarse con un ordenador.

En el modelo lineal se mide la altura del pulso analógico en términos de aumento del voltaje. Dado que el pulso puede estar entre 0 y 10,24 V, y que los incrementos de la escala de medida son de 0,01 V, se comprueba que hay 1.024 incrementos de 0,01 V. A estos se los denomina canales y reflejan la resolución del sistema detector/amplificador. Cada vez que se genera un pulso, se mide su altura en términos de 0,01 V y se coloca una cuenta en el registro correspondiente al canal adecuado.

Para los parámetros que requieran un intervalo de canales más amplio, como la inmunofluorescencia, donde las poblaciones pueden variar en varios órdenes de magnitud, la señal del amplificador se amplificará logarítmicamente. Para la mayoría de las aplicaciones, la dispersión hacia delante y la lateral se analizan de forma lineal, mientras que la fluorescencia se analiza logarítmicamente.

La cantidad de fluorescencia emitida por una célula es proporcional a la cantidad de compuesto fluorescente asociado con ella, la que, a su vez, es proporcional a la señal producida sobre el detector fluorescente. Así pues, el tamaño de la señal electrónica producida por una célula es una medida cuantitativa de la cantidad de compuesto fluorescente que hay sobre su superficie y refleja el número de receptores/marcadores.

PRESENTACIÓN DE LOS DATOS

Los perfiles de intensidad celular de un citómetro de flujo se presentan normalmente en forma de histogramas de frecuencia. En el eje horizontal se representa el número de canales (de 0 a 1.023) y en el eje vertical, el número de células por canal. En el modo lineal, la diferencia entre los canales es una amplitud de señal de 0,01 V. Otra forma de presentar los datos es enfrentar dos señales como la dispersión hacia adelante y la fluorescencia. Cada punto representa una célula concreta que muestra su tamaño y la fluorescencia asociada. De esta forma, puede relacionarse cualquier pareja de parámetros medidos. Este tipo de representación se llama de puntos o *escategrama*.

También pueden hacerse representaciones en tres dimensiones. Los programas informáticos más recientes permiten incluso representar en un espacio bidimensional más de tres características celulares. En la figura 21-3 se recogen ejemplos de los diferentes tipos de gráficos.

SISTEMA INFORMÁTICO

Usar programas de ordenador adecuados permite hacer un análisis multidimensional sensible y objetivo en cada célula. La mayoría de los citómetros de flujo disponen de programas para manejar los datos.

FUNDAMENTOS DEL SEPARADOR DE CÉLULAS

La mayoría de los citómetros de flujo que se emplean en los laboratorios clínicos están dotados exclusivamente de la capacidad de analizar células o com-

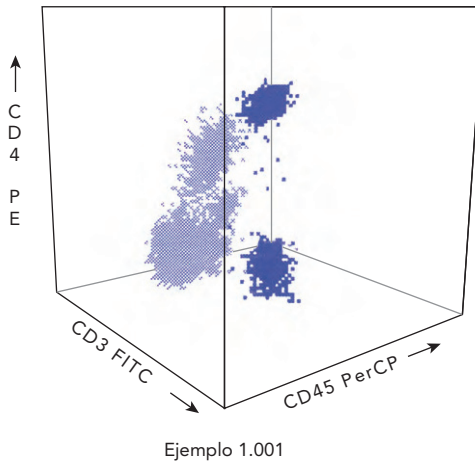
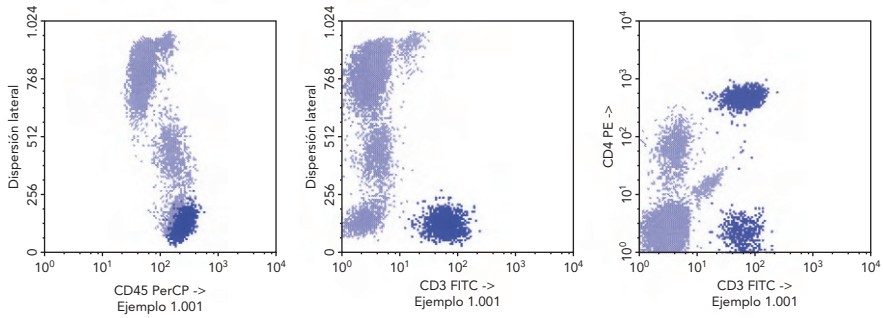


FIGURA 21-3 Diferentes tipos de gráficos de los resultados de un citómetro de flujo.

ponentes subcelulares. No obstante, hay citómetros que, una vez analizadas las células y los elementos subcelulares, disponen de sistemas para separarlas basándose en alguna de sus características o en la combinación de estas. Hay dos tipos principales de separadores: el de gotitas y el de líquido.

SEPARADOR DE GOTITAS

Los separadores de gotitas funcionan al oscilar la célula de flujo a frecuencias elevadas (15-100 kHz), fraccionando la corriente envolvente en una serie regular de gotitas. Cuando se detecta una partícula, se comparan sus propiedades con los criterios introducidos en el ordenador por el operador del citómetro de flujo. Si las propiedades se ajustan a los criterios de separación, la última gota unida a la corriente se carga, justo cuando la alcance la partícula que quiere separarse. Las gotitas pasan entre placas de alto voltaje y cualquier gotita cargada se separa de la corriente principal hacia el recipiente de recogida.

Los separadores de gotitas se subdividen en separadores de velocidad baja y separadores de velocidad elevada. Los de velocidad baja separan unas 10.000-15.000 células/s, mientras que los de alta velocidad separan más de 20.000 células/s. Para conseguir esta gran velocidad de separación se requie-

ren presiones elevadas de 20 a 100 psi o mayores, que en algunos casos pueden tener efectos negativos sobre las células.

SEPARADOR DE LÍQUIDO

Los separadores de líquido se basan en un mecanismo que crea turbulencias en el flujo y lo interrumpe. En algunos citómetros de flujo, esta interrupción se consigue mediante una jeringa que aspira el flujo que contiene las células deseadas. En otros, la turbulencia se crea mediante la vibración controlada de un transductor de cristal ultrasónico o de un transductor piezoeléctrico. En sistemas de diseño más reciente, un brazo mecánico capta la porción de flujo que contiene la célula que se quiera aislar y la traslada a un depósito específico.

Los separadores de líquido poseen ventajas sobre los demás, ya que no producen aerosoles que puedan contaminar al operador. Sin embargo, su velocidad es limitada (hasta 1.000 células/s) y su purificación menor. Además, sólo pueden obtener una población, mientras que los otros pueden obtener dos poblaciones a la vez.

COMPUESTOS FLUORESCENTES QUE SE UTILIZAN EN LA CITOMETRÍA DE FLUJO

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) fue el primer fluorocromo que se empleó para marcar anticuerpos monoclonales en la citometría de flujo. Posteriormente, se ha utilizado la ficoeritrina. El FITC emite a 530 nm, mientras que esta lo hace a 575 nm. En la actualidad, se dispone de un gran número de fluorocromos para su empleo en citometría de flujo. Asimismo, se han diseñado fluorocromos dobles para incrementar el número que pueden emplearse de forma simultánea utilizando una fuente de excitación. Estos fluorocromos dobles se emplean en la citometría de flujo multicolor de alto nivel, necesaria en el estudio de leucemias y linfomas. Entre los fluorocromos dobles se encuentran la ficoeritrina y alocianina y varios colorantes de cianuro.

Recientemente, se han empezado a usar los puntos cuánticos (*quantum dots*), que son nanocristales fluorescentes con un tamaño entre 10 y 20 nm. Sus espectros de emisión son muy estrechos comparados con los de los colorantes convencionales, reduciéndose el solapamiento entre las diferentes fluorescencias. Su uso es especialmente atractivo en inmunología, ya que pueden diferenciarse un gran número de subconjuntos de linfocitos T en un único experimento.

Para estudiar los ácidos nucleicos, los fluorocromos más usados son el yoduro de propidio (emisión a 625 nm), el bromuro de etidio, el naranja de acridina, el Hoechst 33342, el naranja de tiazol, la mitramicina y la cromomicina A3.

PREPARACIÓN DE LOS ESPECÍMENES

Los especímenes que se analizan por citometría de flujo son suspensiones monodispersas, que debe procurarse que no tengan apelotonamientos ni restos. En las muestras de sangre, cuando se estudien las células nucleadas, los eritrocitos se lisan empleando agua destilada, una solución de cloruro amónico o un detergente débil. Todos los especímenes sanguíneos, con independencia del anticoagulante, deben mantenerse a temperatura ambiente.

Las técnicas más usadas para disgregar los tumores sólidos con vistas a los análisis por citometría de flujo se dividen en dos grandes grupos: técnicas enzimáticas, que producen suspensiones celulares, y técnicas con detergentes, que proporcionan núcleos. Las principales enzimas que se utilizan para disgregar las células son la tripsina, la proteasa neutra, la colagenasa, la hialuronidasa y la DNasa, y diferentes combinaciones de estas, según el tipo de tejido tumoral. La preparación de núcleos se emplea para analizar el ADN nuclear o el ciclo celular, y emplea la disgregación mecánica del tejido y el tratamiento con detergentes no iónicos, como el Triton X-100 y el Nonidet P-40.

Las células pueden teñirse con un método directo o indirecto. En el primero, el anticuerpo se encuentra marcado con un fluorocromo y se incuba con las células en un único paso del procedimiento de tinción. En el segundo, las células se incuban con un anticuerpo primario, se lavan y luego se incuban con un anticuerpo secundario que lleva el fluorocromo. Cuando haya que utilizar sólo las células viables, las células no deberán fijarse tras completar el procedimiento de marcado. Si hay que teñir antígenos de superficie e intracelulares, normalmente se tiñen primero los antígenos de superficie y luego se produce la fijación y la permeabilización para teñir los antígenos intracelulares.

APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

En los últimos años ha crecido de forma muy importante el número de aplicaciones de la citometría de flujo. La inmunofluorescencia es la aplicación más extendida de la citometría de flujo. Puede medirse cualquier proteína celular empleando el anticuerpo adecuado. Asimismo, es posible la medida de forma simultánea de varios antígenos. A continuación se describen algunas de las aplicaciones más extendidas de la citometría de flujo en los laboratorios clínicos.

ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

Saber el número y el estado funcional de los diferentes subtipos de linfocitos es útil para estudiar inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades infecciosas, neoplasias y trasplantes. Muchos anticuerpos monoclonales que se utilizan en el fenotipado linfocitario identifican moléculas que poseen una función específica dentro del sistema inmunitario, moléculas que se expresan de forma transitoria en determinados estadios de diferenciación y receptores relacionados con la activación celular.

Las inmunodeficiencias pueden ser primarias o secundarias. Las primarias se deben a defectos hereditarios del sistema inmunológico. Una de las primeras aplicaciones de los estudios de las subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo fue identificar, caracterizar y clasificar las inmunodeficiencias primarias. Sin embargo, una de las aplicaciones clínicas más extendidas de la citometría de flujo es el seguimiento de los pacientes con inmunodeficiencias secundarias, principalmente de los afectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), causante del sida. En estos pacientes desciende el número de linfocitos T, y concretamente los T CD4+. En estos pacientes infectados con el VIH, cuantificar el número absoluto de linfocitos T CD4 tiene un valor diagnóstico y pronóstico. El porcentaje de linfocitos CD4+ puede obtenerse en un solo tubo con tinción para CD45/CD3/CD4. Se utiliza un citogra-

ma de dispersión lateral frente a CD45 para identificar los linfocitos y un citograma de CD4 frente a CD3 para enumerar las células CD4+.

En los pacientes trasplantados, la determinación de las subpoblaciones de los linfocitos se emplea para controlar el sistema inmunitario.

INMUNOFENOTIPADO DE CÁNCERES HEMATOLÓGICOS

Para el inmunofenotipado de los cánceres hematológicos se emplean diversos anticuerpos monoclonales contra antígenos celulares. Para establecer la clonalidad de célula B o célula T se utilizan diversos paneles de anticuerpos. El panel celular para células B incluye CD19, CD20 y CD22, y el panel celular para células T comprende CD2, CD3, CD4 y/o CD7. Para establecer la presencia de un trastorno linfoproliferativo específico puede ser necesaria la utilización de otros paneles específicos.

El diagnóstico, la clasificación y el seguimiento tras el tratamiento de las neoplasias hematopoyéticas han avanzado de forma significativa durante los últimos años con la aplicación de los estudios de inmunofenotipado empleando citometría de flujo.

DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA

La citometría de flujo se emplea como un método rápido y simple de detectar la enfermedad residual mínima (ERM), la persistencia de células malignas en la médula ósea u otros tejidos de los pacientes con cánceres hematológicos tras la remisión a niveles por debajo del límite de detección de los métodos morfológicos convencionales. Las células residuales tumorales se detectan utilizando inmunofluorescencia de los marcadores de superficie. Se emplea un panel de al menos tres anticuerpos y estos se seleccionan de acuerdo con el inmunofenotipo de la leucemia original.

CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Una de las principales aplicaciones clínicas de la citometría de flujo es cuantificar los ácidos nucleicos mediante fluorocromos que se unen a estas moléculas de forma estequiométrica. El contenido de ADN se mide por citometría de flujo de las células teñidas con colorantes fluorescentes como el naranja de acridina, el 4',6-diamidino-2 fenilindol (DAPI), la mitramicina, el yoduro de propidio y el bromuro de etidio, que se intercalan en el ADN.

La cuantificación de ADN se utiliza para detectar aneuploidías de ADN, estudiar el ciclo celular y detectar apoptosis. Se llama aneuploidías de ADN a las cantidades diferentes a las de las células normales en la misma fase del ciclo celular. Cuando hay más ADN de lo normal se habla de hiperploidía de ADN, y cuando hay menos, de hipoploidía de ADN. El índice de ADN es el cociente entre la cantidad de fluorescencia de la moda de las células problema en las fases G0/G1 del ciclo celular y la cantidad de fluorescencia de la moda de las células normales diploides en las mismas fases. Las hiperploidías presentan cocientes mayores de 1 y las hipoploidías, menores de 1. El análisis de las aneuploidías de ADN se utiliza desde el punto de vista clínico para estudiar los tumores sólidos y las neoplasias hematológicas.

Estudio de las alteraciones eritrocitarias

INTRODUCCIÓN

Los trastornos que afectan a los eritrocitos pueden dividirse en dos clases principales: la eritrocitosis o policitemia, que es el aumento cuantitativo de los eritrocitos circulantes, y la anemia o defecto cuantitativo o cualitativo de dichos eritrocitos. En este capítulo se presentan las principales técnicas y métodos para el estudio de estas alteraciones de los eritrocitos.

ERITROCITOS

Los eritrocitos son células de forma bicóncava presentes en la sangre, que carecen de núcleo, mitocondrias y ribosomas. Su función principal es transportar el oxígeno hasta los tejidos, para lo cual poseen una cantidad muy grande de hemoglobina, que es la proteína transportadora. Los eritrocitos se producen en la médula ósea a partir de las células madre hematopoyéticas pluripotenciales y su vida media en la circulación sanguínea es de unos 120 días. La producción de eritrocitos aumenta cuando se afecta el transporte de oxígeno a los tejidos; la hipoxia de estos incrementa la formación por el riñón de la hormona eritropoyetina que, en la médula ósea, estimula la formación de eritrocitos.

Al carecer del ciclo del ácido cítrico, los eritrocitos, cubren sus demandas energéticas, principalmente, por medio de la glucólisis anaerobia. Los eritrocitos de los mamíferos, en contraste con otras células, poseen el ciclo de Rapoport-Luebering, que regula la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno mediante el ácido 2,3-bisfosfoglicérico. A lo largo de sus 120 días de vida, el eritrocito experimenta diversos cambios metabólicos. Cuando la célula envejece, se elimina de la circulación. Cada segundo se eliminan alrededor de 3 millones de eritrocitos.

ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE LOS ERITROCITOS

Con la tinción panóptica, los eritrocitos presentan una coloración rosada, con la parte central más clara debido a su menor grosor y, por consiguiente, a su menor contenido de hemoglobina. Las alteraciones morfológicas principales de los eritrocitos se producen en su tamaño, su forma y su grado de hemoglobinización. Las alteraciones del tamaño y del grado de hemoglobinización se reflejan en los índices eritrocitarios (v. el capítulo 20). En lo referente a la forma, el método de valoración es la observación microscópica de una extensión sanguínea por una persona experimentada.

Por su tamaño, los eritrocitos pueden ser normales (volumen corpuscular medio [VCM] normal), pequeños o microcíticos (VCM disminuido), grandes o macrocíticos (VCM aumentado), o presentar variaciones anormales (anisocitosis). De acuerdo con la cantidad de hemoglobina que tengan, pueden ser normocrómicos (hemoglobina corpuscular media [HCM] y concentración de

hemoglobina corpuscular media [CHCM] normales), hipocrómicos (HCM y CHCM disminuidas), hipercrómicos (HCM aumentada y CHCM normal) y anisocrómicos (presencia conjunta de células hipocrómicas e hipercrómicas).

Las formas anómalas de los eritrocitos presentan muchas variantes. En general, se las denomina *poiquilocitosis*. Eritrocitos con formas anómalas son los *esferocitos*, células redondas que han perdido la forma bicóncava discoidal; los *ovalocitos*, que son eritrocitos de forma oval; y los *acantocitos*, o eritrocitos con espículas.

Los esferocitos se observan en la esferocitosis hereditaria y en algunos casos de anemia hemolítica autoinmunitaria; los ovalocitos, en la anemia megaloblástica; y los acantocitos, en algunas enfermedades hepáticas y en la abetalipoproteinemia.

ERITROCITOSIS

La *eritrocitosis*, que también se llama policitemia o eritrocitemia, se define por un aumento de los eritrocitos circulantes, que producen un hematocrito por encima del 54% en los varones y del 47% en las mujeres. Este aumento del hematocrito puede deberse a una eritrocitosis absoluta o relativa. Se presenta *eritrocitosis absoluta* cuando aumenta la masa de eritrocitos y el hematocrito se eleva por encima de los límites. Las causas de eritrocitosis absoluta pueden ser primarias, cuando hay un problema intrínseco de la médula ósea, y secundarias, cuando hay un acontecimiento fuera de la eritropoyesis de la médula ósea.

La causa principal de eritrocitosis primaria es la policitemia vera (PV), donde la médula ósea produce demasiados glóbulos rojos y frecuentemente también demasiados glóbulos blancos y plaquetas. Hay un clon anómalo en la médula ósea que produce la enfermedad. En la mayoría de los pacientes con PV se presenta la mutación *JAK2 V617F*.

La eritrocitosis secundaria puede dividirse en congénita y adquirida. Las causas congénitas de eritrocitosis son aquellas en las que se ha identificado una anomalía genética. Los pacientes que parecen tener una causa congénita se dividen en dos grupos, los que tienen concentraciones de eritropoyetina (EPO) por debajo del intervalo normal, que puede suponerse que tienen defectos de la ruta de señalización de la EPO, y aquellos con concentraciones normales o elevadas de EPO que pueden tener defectos de la ruta de detección del oxígeno. Entre las causas congénitas de eritrocitosis están las mutaciones del receptor de EPO, las hemoglobinas con elevada afinidad por el oxígeno, la deficiencia de bisfosfoglicerato mutasa y las mutaciones de los genes de la ruta de detección del oxígeno.

Existen diferentes formas por las que una eritrocitosis puede ser consecuencia de un proceso adquirido mediado por EPO. Estas pueden dividirse en procesos hipóxicos renales centrales o locales, exceso de producción de EPO debida a un proceso patológico o administración exógena.

Finalmente, hay un grupo de pacientes en los que no se ha identificado la causa de la eritrocitosis. Este grupo se denomina eritrocitosis idiopática. Estos pacientes pueden dividirse de acuerdo con su concentración de EPO.

La *eritrocitosis relativa* se define por la disminución del volumen de sangre, un volumen eritrocitario normal y una disminución del volumen plasmático.

La pérdida de este puede producirse por una pérdida de líquidos, como en las quemaduras, la diarrea o el tratamiento con diuréticos, o por un descenso de la ingestión de líquidos.

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

La investigación del paciente con eritrocitosis comienza con la anamnesis y el examen. Tras la confirmación del aumento de la hemoglobina y el hematocrito, en los que no tienen una causa secundaria obvia, es razonable el análisis de la mutación *JAK2* para demostrar una PV *JAK2* positiva. Cuando este no sea el diagnóstico, a continuación debe determinarse la concentración sanguínea de EPO, lo cual proporcionará los pasos siguientes, hacia la ruta de señalización de EPO en los que tengan concentraciones bajas de EPO o hacia causas secundarias, como la ruta de detección del oxígeno, en los que tengan valores normales o aumentados de EPO.

El análisis de la mutación *JAK2* se realiza mediante técnicas moleculares, mientras que la determinación de eritropoyetina se realiza normalmente por enzimoimmunoanálisis. Los valores de referencia de la EPO son de 5-35 UI/l.

ANEMIA

Se considera que existe anemia cuando la concentración de hemoglobina en sangre está por debajo del límite inferior del intervalo de referencia del 95% para la edad, el sexo y la situación geográfica (altitud) de la persona. En general, suele corresponder a un valor de 13 g/dl en los varones y de 12 g/dl en las mujeres. El descenso de la concentración de hemoglobina suele ir acompañado de una caída del número de eritrocitos. La anemia puede clasificarse atendiendo a diversos criterios. De acuerdo a los morfológicos, puede ser normocítica, macrocítica o microcítica. Según su etiología, puede ser regenerativa o arregenerativa. En la anemia regenerativa hay un aumento de los precursores eritroides de la médula ósea para compensar la pérdida de hemoglobina. Puede deberse a una hemorragia o a hemólisis.

La anemia arregenerativa se caracteriza porque la médula ósea no puede compensar el descenso de la concentración de hemoglobina mediante el incremento de la eritropoyesis. Sus causas son variadas; las principales anemias arregenerativas son la anemia megaloblástica y la anemia por deficiencia de hierro.

ANEMIA POSTHEMORRÁGICA

La pérdida de sangre, ya sea externa o interna, en cantidad importante y en un corto período de tiempo conduce a una anemia posthemorrágica aguda. En cambio, si se pierden pequeñas cantidades de sangre de forma reiterada se produce una anemia posthemorrágica crónica. El diagnóstico de la hemorragia es evidente, excepto en el caso de que se produzca en una cavidad cerrada o en el tubo digestivo. Hay un descenso del número de eritrocitos, del hematocrito y de la concentración de hemoglobina. En cualquier caso, debe localizarse el origen y la causa de la pérdida de sangre para tratarlos.

ANEMIAS HEMOLÍTICAS

La característica principal de las anemias hemolíticas es que aumentan la destrucción o el acortamiento de la supervivencia de los eritrocitos en sangre. Las anemias hemolíticas pueden ser hereditarias o adquiridas. Las hereditarias pueden deberse a alteraciones de la membrana de los eritrocitos, defectos enzimáticos o alteraciones de la hemoglobina. Las anemias hemolíticas adquiridas pueden deberse a sustancias tóxicas, reacciones inmunitarias o mecanismos complejos.

Las anemias hemolíticas se caracterizan por un aumento de la actividad de la médula ósea, policromasia, eritrocitos nucleados y un incremento del recuento de reticulocitos. Las principales anemias hemolíticas hereditarias son la esferocitosis hereditaria, la eliptocitosis hereditaria, la estomatocitosis hereditaria, la piropoiquilocitosis hereditaria, la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) y la deficiencia de piruvato cinasa. Las cuatro primeras se deben a defectos de la membrana de los eritrocitos, mientras que las otras dos son alteraciones de su metabolismo.

Las principales anemias hemolíticas adquiridas son la anemia hemolítica autoinmunitaria, la hemólisis infecciosa (infección por diversos microorganismos, como *Clostridium perfringens*, *Bartonella bacilliformis* y parásitos de la malaria), la anemia hemolítica microangiopática, la hemoglobinuria paroxística nocturna, la hemoglobinuria paroxística al frío y la anemia hemolítica tóxica.

ANEMIA POR DEFICIENCIA DE HIERRO

Es un tipo de anemia en el que se constata una disminución de la producción de eritrocitos. El hierro es un componente fundamental de varias proteínas y enzimas del organismo. En el grupo hemo de la hemoglobina es donde se encuentra en mayor cantidad. La anemia por deficiencia de hierro puede deberse a estas circunstancias, en relación con el hierro: ingestión inadecuada; absorción insuficiente o defectuosa; transporte, almacenamiento o utilización ineficaz; o pérdidas elevadas.

Los datos de laboratorio útiles para estudiar los estados de anemia por deficiencia de hierro son las determinaciones en sangre de parámetros hematológicos y las determinaciones bioquímicas en suero. En lo referente a los datos sanguíneos, se observa un descenso de la HCM y la CHCM.

Los datos fundamentales en suero son la determinación de la concentración de hierro, de la capacidad total de fijación de hierro (CTFH) y de la ferritina. El hierro se determina con métodos espectroscópicos. El más utilizado es el de la ferrocina sin desproteinización, adaptado a analizadores automáticos. El fundamento de este método es el siguiente. Se libera el hierro de la transferrina disminuyendo el pH del suero; se reduce del estado férrico (III) al ferroso (II), y luego se acompleja con un cromógeno que contenga el grupo reactivo $-N = C - C = N-$. Los cationes metálicos quedan quelados entre los dos nitrógenos. El complejo hierro-cromógeno tiene una absorbancia muy alta a 562 nm. Los valores de referencia en los adultos están entre 11,64 y 30,43 $\mu\text{mol/l}$ (65-170 $\mu\text{g/dl}$) en los varones, y entre 8,95 y 30,43 $\mu\text{mol/l}$ (50-170 $\mu\text{g/dl}$) en las mujeres. En la anemia por deficiencia de hierro la concentración sérica de hierro es inferior a 50 $\mu\text{g/dl}$.

La capacidad total de fijación de hierro es la cantidad de este presente en el suero después de saturar la transferrina con hierro. Se determina añadiendo suficiente Fe^{3+} para saturar los lugares de unión de la transferrina; el exceso de hierro se elimina añadiendo MgCO_3 para precipitar el Fe^{3+} que quede en la solución. Tras centrifugar para eliminar el Fe^{3+} precipitado, se analiza el contenido de hierro en el sobrenadante. La CTFH puede también calcularse a partir de la medida de transferrina en suero mediante la fórmula CTFH ($\mu\text{g}/\text{dl}$) = transferrina sérica (mg/dl) \times 1,25. Los valores de referencia de la CTFH están comprendidos entre 300 y 400 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (55-80 $\mu\text{mol}/\text{l}$).

La ferritina se utiliza para determinar las reservas de hierro del organismo, y se determina por inmunoanálisis. Sus valores de referencia están por encima de 12 $\mu\text{g}/\text{l}$. Los valores inferiores a esta cantidad suponen un diagnóstico de anemia por deficiencia de hierro.

ANEMIA MEGALOBLÁSTICA

Las anemias megaloblásticas son un grupo heterogéneo de trastornos con características morfológicas comunes. Los eritrocitos son más grandes y tienen unos cocientes núcleo/citoplasma mayores que las células normoblásticas. Las causas más comunes de anemia megaloblástica son las deficiencias de vitamina B_{12} (cobalamina) y ácido fólico, sustancias que participan en las reacciones de formación de los nucleótidos. Estas son las moléculas a partir de las cuales se sintetiza el ADN, necesario para formar los eritrocitos y, en general, cualquier célula. La causa más habitual de deficiencia de vitamina B_{12} es la anemia perniciosa, mientras que la deficiencia de ácido fólico se debe principalmente a una baja ingestión de esta vitamina.

El diagnóstico de anemia megaloblástica se realiza con estudios en sangre y en médula ósea. En sangre, se observa anemia macrocítica con trombocitopenia y disminución del recuento de reticulocitos. El volumen corpuscular medio varía entre 100-150 fl o incluso puede ser mayor. Los macrocitos son ovales y reciben el nombre de macroovalocitos. En los pacientes con anemia grave aparecen en sangre periférica macrocitos con restos nucleares y eritrocitos con núcleos megaloblásticos.

En suero, la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se encuentra muy elevada con incrementos de las isoenzimas LDH-1 y LDH-2; la LDH-1 por encima de la LDH-2. La bilirrubina indirecta se encuentra también elevada.

El diagnóstico definitivo se realiza determinando la vitamina B_{12} y el ácido fólico en suero por inmunoanálisis. Para la vitamina B_{12} , los valores de referencia están comprendidos entre 200 y 600 nm/l (148 a 443 mol/l) y, para el ácido fólico, entre 3 y 20 $\mu\text{g}/\text{l}$ (7 y 47 mol/l). Los enfermos con anemia megaloblástica debida a una deficiencia de vitamina B_{12} tienen concentraciones de esta en suero menores de 100 nm/l. Las mujeres con deficiencia de ácido fólico y una deficiencia leve de vitamina B_{12} que estén embarazadas tendrán valores en el límite entre 100 y 200 nm/l. En la anemia megaloblástica causada por una deficiencia de ácido fólico, el valor de ácido fólico sérico está por debajo de 3 $\mu\text{g}/\text{l}$, y es normal, o incluso aumenta, cuando hay una deficiencia de vitamina B_{12} .

Las medidas de ácido fólico en suero proporcionan un índice de su estado. Sin embargo, debido a que este ácido está mucho más concentrado en los eritrocitos que en el suero, la medida del ácido fólico eritrocitario refleja mejor los

almacenes tisulares y se considera el indicador más fiable del estado del ácido fólico. Los valores de referencia del ácido fólico eritrocitario se encuentran entre 145 y 500 $\mu\text{g}/\text{l}$ (328 y 1.132 mmol/l). Este tipo de ácido disminuye en la anemia megaloblástica debida a una deficiencia de ácido fólico, y también suele hacerlo cuando hay una deficiencia de vitamina B12.

Los resultados de la aspiración y biopsia de la médula ósea ayudan a confirmar el resultado. Se observa hiperplasia eritroide, son abundantes los precursores megaloblásticos de los eritrocitos y se encuentran presentes metamielocitos gigantes.

PRUEBAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ANEMIA

El paso inicial es realizar un hemograma que incluya el recuento de reticulocitos y un estudio de la morfología de los eritrocitos. Cuando se observe un VCM por debajo del valor de referencia (anemia microcítica), deben determinarse el hierro sérico, la transferrina y la ferritina para descartar una anemia por deficiencia de hierro, tal como se ha indicado antes. La electroforesis de las hemoglobinas detecta la presencia de una talasemia.

Con un VCM por encima del intervalo de referencia (anemia macrocítica), el valor del recuento de reticulocitos puede indicarnos la causa. Cuando están aumentados señalan una anemia regenerativa (hemorragia, hemólisis), mientras que cuando presentan valores normales o disminuidos indican una anemia arregenerativa (anemia megaloblástica).

Con valores normales del VCM, un recuento de reticulocitos aumentado indica hemorragia o hemólisis y un valor del VCM normal o disminuido señala la anemia arregenerativa (aplasia medular, hemopatía maligna).

PRUEBAS DE HEMÓLISIS PARA ESTUDIAR LAS ALTERACIONES DE LA MEMBRANA DE LOS ERITROCITOS

Existen varias pruebas de hemólisis que se utilizan para estudiar los defectos de la membrana de los eritrocitos que reducen su supervivencia. Las principales son la prueba de fragilidad osmótica, la de autohemólisis y la del suero acidificado (prueba de Ham).

FRAGILIDAD OSMÓTICA DE LOS ERITROCITOS

Cuando se colocan los eritrocitos en una disolución hipertónica pierden parte de su líquido y se arrugan, hasta que se alcanza el equilibrio con el medio. Por el contrario, cuando se colocan en una disolución hipotónica, el líquido del exterior penetra en ellos, hasta que se alcanza el equilibrio o hasta que estallen. Hay unos valores de la tonicidad de las disoluciones en los que se mantienen los eritrocitos sin alterarse sustancialmente.

En la esferocitosis hereditaria y la anemia hemolítica adquirida disminuye la resistencia de los eritrocitos a las disoluciones hipotónicas. Asimismo, en algunos trastornos, como la talasemia, la anemia drepanocítica y la anemia hipocrómica, aumenta la resistencia de los eritrocitos a la lisis por disoluciones hipotónicas.

La fragilidad osmótica de los eritrocitos se mide por espectroscopia. Para ello, se colocan los eritrocitos en una serie de disoluciones de cloruro sódico cuyas concentraciones estén comprendidas entre el 0,1 y el 0,8%. Se mide la absorbancia a 540 nm y se indica a qué concentración de cloruro sódico empieza la hemólisis, cuál produce un 50% de hemólisis y cuál la hemólisis completa. Existen métodos automáticos para determinar la fragilidad osmótica de los eritrocitos.

En las personas normales se produce un 50% de hemólisis (fragilidad corpuscular media) a concentraciones de cloruro sódico entre el 0,40 y el 0,44%. Se producen aumentos de la fragilidad osmótica de los eritrocitos en la esferocitosis hereditaria, la anemia hemolítica autoinmunitaria y la anemia hemolítica microangiopática. La fragilidad osmótica de los eritrocitos disminuye en la anemia por deficiencia de hierro, las talasemias y la presencia de hemoglobinas C y S.

PRUEBA DE AUTOHEMÓLISIS

Otra de las pruebas para estudiar la integridad de la membrana de los eritrocitos es la prueba de autohemólisis, que se realiza incubando a 37 °C sangre en condiciones estériles durante 48 h. Tras este período se diluye el suero y se mide la absorbancia a 520 nm. Se utiliza como blanco el suero sin incubar, y como patrón, una dilución 1/200 de sangre total en hidróxido amónico al 0,04%, que se toma como 100%. En la sangre normal, apenas se produce hemólisis en estas condiciones, mientras que en algunos estados patológicos, como la esferocitosis hereditaria y adquirida y la hemólisis debida a productos químicos, se genera un aumento de la autohemólisis.

PRUEBA DEL SUERO ACIDIFICADO (PRUEBA DE HAM)

La prueba del suero acidificado se utiliza para diagnosticar la hemoglobinuria paroxística nocturna, defecto intrínseco adquirido de los eritrocitos que los hace muy sensibles al complemento. Cuando se acidifica el suero, el complemento se activa por la vía alternativa, se une a los eritrocitos y lisa los anómalos que son muy susceptibles al complemento. Los eritrocitos lavados del paciente se mezclan con un suero normal ABO compatible y ácido. Se incuba a 37 °C durante 1 h, período en el que se lisan las células anómalas, aproximadamente, en un 10-50%.

PRUEBAS PARA ESTUDIAR LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS POR DEFICIENCIA DE ENZIMAS ERITROCITARIAS

Varios estados patológicos se caracterizan por presentar anemias de tipo hemolítico a causa de la deficiencia de alguna enzima de las rutas metabólicas de obtención de energía de los eritrocitos. Las principales anemias de este tipo se deben a la deficiencia de G-6-PD y de piruvato cinasa.

DEFICIENCIA DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA

La deficiencia enzimática eritrocitaria más frecuente es la de la G-6-PD, que produce una anemia hemolítica no esferocítica. Esta enzima es la primera de

la ruta de las pentosas fosfato, cuyo bloqueo hace que no se regenere la nicotinamida adeninucleótido fosfato reducido (NADPH). Las variantes de la G-6-PD difieren en el grado de actividad residual, que va desde grave a leve. La deficiencia grave disminuye la vida de los eritrocitos hasta el extremo de producir una anemia hemolítica crónica con ictericia. La deficiencia de G-6-PD puede estudiarse por medio de diversas pruebas de detección sistemática, como la de reducción del colorante azul de cresil brillante y la de la mancha fluorescente. La confirmación se realiza midiendo la actividad de la enzima en los eritrocitos.

La prueba de reducción del colorante azul de cresil brillante consiste en incubar un hemolizado con glucosa-6-fosfato, nicotinamida adeninucleótido fosfato (NADP) y azul de cresil brillante. La presencia de G-6-PD reduce el NADP a NADPH que, a su vez, reduce ese azul a su forma incolora. El tiempo que tarda en desaparecer el color azul es inversamente proporcional a la cantidad de G-6-PD. Se compara el tiempo del hemolizado cuya deficiencia se sospecha con el de personas normales.

La prueba de la mancha fluorescente consiste en observar la fluorescencia del NADPH. Para ello se incuba glucosa-6-fosfato, NADP y el hemolizado. Se deposita una gota de esta mezcla sobre un papel de filtro y se ilumina con luz ultravioleta para observar la fluorescencia. La ausencia de esta indica una deficiencia de G-6-PD.

Como se ha señalado antes, la confirmación de una deficiencia de esta enzima se realiza midiendo su actividad eritrocitaria. La mayoría de los métodos para medir la actividad de G-6-PD determinan la reducción del NADP a NADPH por un hemolizado midiendo el aumento de la absorbancia a 340 nm. La actividad se expresa en U/g de hemoglobina. Las personas normales tienen unos valores de 8 a 18 U/g Hb.

DEFICIENCIA DE PIRUVATO CINASA

La deficiencia de piruvato cinasa es la más frecuente de la glucólisis. Se hereda de forma autosómica recesiva. La deficiencia de piruvato cinasa se estudia con la prueba de detección sistemática de la mancha fluorescente o midiendo la actividad de esta enzima en los eritrocitos. Para la prueba de la mancha fluorescente se incuba fosfoenolpiruvato, difosfato de adenosina (ADP) y nicotinamida adeninucleótido fosfato reducido (NADH) con el hemolizado. La piruvato cinasa cataliza la fosforilación del ADP a trifosfato de adenosina (ATP) por el fosfoenolpiruvato, que se transforma en piruvato. Este, a continuación, se reduce a lactato por acción de la enzima lactato deshidrogenasa. Se deposita una gota de la mezcla sobre un papel de filtro, se ilumina con luz ultravioleta y se observa la desaparición de la fluorescencia por el paso de NADH a NAD, que señala la presencia de piruvato cinasa. Si persiste la fluorescencia hay una deficiencia de la enzima.

Para medir la actividad enzimática eritrocitaria, se utiliza el mismo principio que para la prueba de la mancha fluorescente, y se mide la disminución de la absorbancia a 340 nm. Las pruebas se realizan con concentraciones elevadas y bajas de sustrato y añadiendo fructosa 1,6-bisfosfato, debido a que algunas variantes de la piruvato cinasa asociadas con la hemólisis tienen cinéticas de reacción atípicas y muestran actividades normales a grandes concentraciones

de sustrato e inferiores a lo normal a concentraciones de sustrato bajas, o pueden revelar una ausencia de aumento por la fructosa 1,6-bisfosfato, que es un activador alostérico de la piruvato cinasa. Los valores de referencia de esta enzima están comprendidos entre 11 y 19 U/g Hb para grandes concentraciones de sustrato; entre 1,4 y 3 U/g Hb para concentraciones de sustrato bajas; y entre 4,7 y 7,3 U/g Hb para pequeñas concentraciones en presencia de fructosa 1,6-bisfosfato.

OTRAS DEFICIENCIAS DE ENZIMAS ERITROCITARIAS

Se han descrito otras deficiencias enzimáticas eritrocitarias mucho menos frecuentes; entre ellas, las de hexocinasa, glucosa-fosfato isomerasa, fosfofructocinasa, triosafosfato isomerasa y fosfoglicerato cinasa.

ANEMIAS HEMOLÍTICAS POR HEMOGLOBINOPATÍAS Y TALASEMIAS

La hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$), la más importante de las hemoglobinas del ser humano, constituye alrededor del 96% de la hemoglobina total de los adultos. El 4% restante está formado por hemoglobina A2 ($\alpha_2\delta_2$) y hemoglobina F ($\alpha_2\gamma_2$). Aunque las hemoglobinopatías y las talasemias son dos grupos de enfermedades genéticamente diferentes, la manifestación clínica de ambas es una anemia de fisiopatología y gravedad variables.

HEMOGLOBINOPATÍAS

Las hemoglobinopatías, o variantes estructurales anómalas de la hemoglobina, se deben a mutaciones puntuales de esta, en cuyo ADN se produce la sustitución de una base nitrogenada por otra, lo que conduce a sustituir un aminoácido por otro en la cadena de la proteína. Hasta la fecha se han descrito alrededor de 1.000 hemoglobinopatías, la mayoría de las cuales afortunadamente son benignas y se han descubierto por casualidad. Las que tienen significación clínica se deben a sustituciones de aminoácidos, principalmente en las cadenas distintas de la α , que producen cambios de las estructuras secundaria y terciaria del tetrámero de hemoglobina. Estas sustituciones son más frecuentes en las posiciones cercanas a los lugares de unión del grupo hemo o de la cadena de globina.

La nomenclatura de las hemoglobinopatías comprende letras (HbS, C y D), nombres que señalan el lugar del primer descubrimiento o residencia del enfermo (Hb-Madrid, Hb-Zurich) y nombres familiares del caso (Hb-Lepore). Una nomenclatura sistemática identifica la cadena, el lugar y la sustitución. Por ejemplo, Hb $\alpha_2^{47\text{Gly}}\beta_2$ es una sustitución por el aminoácido glicina en la posición 47 de la cadena α .

TALASEMIAS

Las talasemias son producidas por la ausencia o la disminución de la síntesis de alguna cadena de la hemoglobina. Cada tipo de talasemia se transmite por un gen autosómico. Hay tres grandes grupos de talasemias: α -talasemia, β -ta-

lasemia y $\delta\beta$ -talasemia. En España, la forma más frecuente es la β -talasemia. La forma más grave de esta es el estado homocigoto, que recibe el nombre de talasemia mayor. La más leve es el estado heterocigoto, llamada talasemia menor o rasgo talasémico. La α -talasemia parece menos frecuente. Como la β -talasemia, tiene diversas formas clínicas, según sea su estado heterocigoto u homocigoto.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

Cuando se sospecha la presencia de hemoglobinas anormales, se recogen alrededor de 10 ml de sangre con un anticoagulante. Las pruebas iniciales son un recuento sanguíneo completo, electroforesis a pH 8,6, pruebas de solubilidad y falciformación, y la cuantificación de HbA₂ y HbF. Si en las pruebas preliminares se identifica una hemoglobina anómala, deben realizarse otras pruebas para identificar las variantes. Entre estas pruebas están la electroforesis a pH 6-6,2, la separación de cadenas de globina y el enfoque isoeléctrico. Otras, como las de estabilidad al calor y al isopropanol, deben hacerse para detectar las hemoglobinas inestables o con una afinidad alterada por el oxígeno.

HEMOGLOBINA S

La hemoglobina S se confirma con una prueba de turbidez. Cuando se desoxigena esta hemoglobina se hace insoluble, lo que da lugar a una turbidez. Para desoxigenar la sangre se utiliza ditionito sódico; y para lisar los eritrocitos, saponina. La presencia de turbidez en un hemolizado tratado con ditionito sódico indica que hay hemoglobina S.

HEMOGLOBINAS INESTABLES

Las hemoglobinas inestables pueden detectarse por medio de una prueba de calentamiento. Se han descrito más de 100 variantes de estas hemoglobinas asociadas con anemias hemolíticas. Cuando se calientan hemolizados que contienen hemoglobinas inestables se produce una turbidez y a veces un precipitado, mientras que cuando se calientan los hemolizados de hemoglobina normal permanecen transparentes.

HEMOGLOBINA F

La hemoglobina F puede detectarse por su resistencia a la desnaturalización por un álcali. La mayoría de las hemoglobinas se desnaturalizan con facilidad a pH alcalino y precipitan por la adición de sulfato amónico al 40% de saturación. En cambio, en estas condiciones, la hemoglobina F sigue soluble.

SEPARACIÓN DE HEMOGLOBINAS

Cada hemoglobina tiene su propia carga neta por molécula. A un pH 8,6, la HbS tiene dos cargas positivas más que la hemoglobina normal HbA, y la HbC, cuatro más. Estas diferencias de carga permiten separar las hemoglobinas con dos técnicas: la electroforesis y la cromatografía de cambio de ión.

La electroforesis (v. el capítulo 15) separa las moléculas de acuerdo con su carga, por lo que a un pH 8,6, la HbC migrará hacia el ánodo más lenta que la HbS, y esta, más que la HbA. Por el contrario, las hemoglobinas H, I y J, que a pH 8,6 tienen cargas negativas adicionales, migrarán hacia el ánodo más rápido que la HbA. La figura 22-1 presenta de forma esquemática la separación de estas hemoglobinas en una electroforesis a pH 8,6.

Los soportes más utilizados para separar hemoglobinas anómalas por electroforesis son el acetato de celulosa y los geles de almidón y poliacrilamida. Las hemoglobinas A₂, C, O y E no pueden separarse por electroforesis en acetato de celulosa y se separan por electroforesis en gel.

Como se ha señalado, las hemoglobinas anómalas también pueden separarse por cromatografía de cambio de ión (v. el capítulo 14), que proporciona resultados semejantes a los de la electroforesis.

MÉTODOS AUTOMÁTICOS PARA CUANTIFICAR HbA₂ Y HbF

Se han comercializado sistemas de cromatografía líquida de alta resolución (v. el capítulo 14) para separar y cuantificar de forma automática las hemoglobinas normales HbA₂ y HbF, y hemoglobinas anómalas como la HbS y la HbC. Algunos sistemas tienen varios programas que permiten detectar β -talasemias, HbS y α -talasemias.

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Tras identificar una hemoglobinopatía o un síndrome talasémico, puede hacer falta determinar la mutación o la pérdida. Generalmente, las pérdidas que producen síndromes α -talasémicos y algunas β -talasemias raras se diagnostican utilizando la transferencia Southern de digeridos con determinadas enzimas de restricción (v. el capítulo 17).

Para mutaciones/deleciones definidas, incluidas las de HbS, HbE, HbD y HbO, y varias β -talasemias, se usan técnicas de amplificación con la PCR con sondas específicas de alelo, cebadores específicos de alelo o amplificaciones

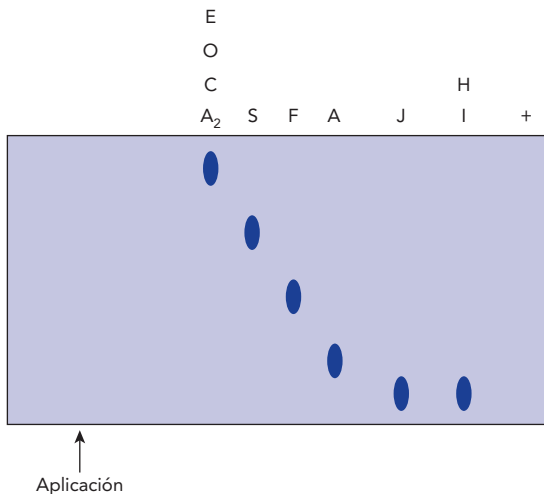


FIGURA 22-1

Separación de hemoglobinas por electroforesis a pH 8,6.

dependientes de la pérdida con cebadores de flanqueo. Para mutaciones desconocidas, se emplean métodos de amplificación con la PCR, la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante y análisis de polimorfismos de conformación de cadena sencilla.

Estudio de las alteraciones leucocitarias

INTRODUCCIÓN

En un gran número de enfermedades, tanto de carácter hereditario como adquirido, se altera el número o la morfología de los leucocitos. En este capítulo se presentan las principales alteraciones, cuantitativas y cualitativas, de los leucocitos y las técnicas y métodos que se emplean para su análisis.

LEUCOCITOS

Los *leucocitos* se dividen en clases, según su función, su lugar de origen y su morfología. Las clases principales son: granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos y linfocitos.

Los *granulocitos* son células que contienen gránulos visibles, que se dividen de acuerdo con el tipo de gránulos. Los neutrófilos protegen al organismo de las infecciones, al fagocitar las bacterias y otros microorganismos; asimismo, se encargan de eliminar las células dañadas o muertas y los restos celulares. En cuanto a los eosinófilos, protegen al organismo frente a los parásitos y limitan las reacciones alérgicas. Finalmente, los basófilos participan en las reacciones de hipersensibilidad inmediata, liberando histamina y heparina por los gránulos basófilos.

Los *monocitos* fagocitan las células dañadas o muertas, bacterias, hongos y virus. En este sentido, colaboran con los neutrófilos. También procesan antígenos específicos que presentan a los linfocitos para su reconocimiento y eliminación.

Los *linfocitos* participan en las respuestas inmunitarias. Su función principal es reconocer y eliminar las sustancias ajenas al organismo. Los linfocitos se dividen en dos grupos: B y T. Los linfocitos B son los encargados de la inmunidad humoral y de sintetizar los anticuerpos como respuesta a los antígenos. Los linfocitos T son los responsables de la inmunidad celular y de regular las reacciones de inmunidad humoral, al ayudar o suprimir los linfocitos B, y de regular la hematopoyesis produciendo factores estimuladores.

ALTERACIONES LEUCOCITARIAS

Un gran número de circunstancias modifican la concentración de leucocitos en sangre y la fórmula leucocitaria, así como la morfología de los leucocitos. Por un lado, las alteraciones leucocitarias pueden clasificarse en cuantitativas y cualitativas. De otra forma, también pueden diferenciarse en aneoplásicas y neoplásicas. Finalmente, pueden ser congénitas o adquiridas. Las anomalías leucocitarias congénitas son, en su mayor parte, alteraciones cualitativas, con características morfológicas nucleares y citoplasmáticas anómalas. Por el con-

trario, las alteraciones adquiridas son mayoritariamente cuantitativas, con aumentos o descensos del número de leucocitos, pero con morfologías y funciones normales.

ALTERACIONES ANEOPLÁSICAS

Se trata de alteraciones de la cantidad o morfología de los leucocitos que no originan una enfermedad neoplásica.

ALTERACIONES DE LOS NEUTRÓFILOS

El aumento de la concentración de *neutrófilos* por encima de $7,5 \times 10^9/l$ recibe el nombre de neutrofilia. Se produce en las infecciones (bacterianas, fúngicas y víricas) y los síndromes inflamatorios agudos y crónicos (infarto agudo de miocardio, quemaduras, operaciones quirúrgicas y fracturas). El descenso de los neutrófilos por debajo de $2,5 \times 10^9/l$ se llama neutropenia. Las principales causas de esta son algunas infecciones, sobre todo víricas e inducidas por fármacos.

Las principales alteraciones morfológicas de los neutrófilos son la granulación tóxica, las vacuolas citoplásmicas, los cuerpos de inclusión de Döhle, la anomalía de May-Hegglin, la anomalía de Alder-Reilly, la anomalía de Pelger-Huët y el síndrome de Chédiak-Higashi. Algunas son adquiridas, como los gránulos tóxicos o las vacuolas citoplásmicas y dejan de observarse tras la desaparición del estímulo que las provocó. Otras son hereditarias y persisten a lo largo de la vida, algunas con alteraciones funcionales y otras sin ellas. Estas alteraciones morfológicas se detectan mediante la observación de extensiones teñidas con Wright o Giemsa.

Las alteraciones hereditarias como la de May-Hegglin, la de Alder-Reilly y la de Pelger-Huët presentan alteraciones morfológicas, pero parecen tener una función granulocítica normal. Sin embargo, otras enfermedades hereditarias como el síndrome de Chédiak-Higashi, la enfermedad granulomatosa crónica, la deficiencia de mieloperoxidasa y la deficiencia de adhesión leucocitaria muestran alteraciones funcionales con una morfología prácticamente normal.

ALTERACIONES DE LOS MONOCITOS O MACRÓFAGOS

El aumento del número de *monocitos* por encima de $0,8 \times 10^9/l$ se denomina monocitosis y se presenta en las infecciones granulomatosas (tuberculosis, brucelosis y endocarditis), algunas parasitosis, la recuperación de las infecciones agudas y algunas enfermedades hematológicas. La monocitopenia es el descenso del número de monocitos por debajo de $0,2 \times 10^9/l$ y se produce en la anemia aplásica y el tratamiento con corticoides.

ALTERACIONES DE LOS EOSINÓFILOS

El aumento de los *eosinófilos* por encima de $0,5 \times 10^9/l$ se denomina eosinofilia. Se observa en los procesos alérgicos, las parasitosis con ciclo sanguíneo y la hipersensibilidad medicamentosa. El descenso de los eosinófilos por debajo de

$0,04 \times 10^9/l$ se llama eosinopenia y se produce en la fase aguda de algunas infecciones, las intoxicaciones y los tratamientos con corticoides.

ALTERACIONES DE LOS BASÓFILOS

La basofilia es el incremento de los *basófilos* por encima de $0,2 \times 10^9/l$ y se produce en los síndromes proliferativos crónicos, algunas infecciones víricas y ciertas reacciones de hipersensibilidad. La basopenia es el descenso del número de basófilos por debajo de $0,01 \times 10^9/l$, y se da en los tratamientos mantenidos con corticoides, las infecciones agudas y el estrés.

ALTERACIONES DE LOS LINFOCITOS

El aumento de la concentración de *linfocitos* por encima de $4,5 \times 10^9/l$ se denomina linfocitosis. Además de la linfocitosis fisiológica de la infancia, se produce linfocitosis en varias situaciones, como las infecciones (mononucleosis, hepatitis, citomegalovirus, gripe, varicela, rubéola, neumonía atípica y tuberculosis) y la hipersensibilidad a los fármacos (fenitoína). La disminución de la concentración de linfocitos por debajo de $1,5 \times 10^9/l$ se denomina linfopenia. En general, esta se produce en todos los casos de leucopenia grave, con independencia de su origen. Otras causas de linfopenia son las inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, como el sida y los tratamientos inmunodepresores.

TRASTORNOS NEOPLÁSICOS

Cuando se producen mutaciones en las células madre hematopoyéticas, se altera la proliferación y diferenciación, lo cual puede ocasionar la producción descontrolada de algunas células. Los trastornos de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea se dividen en cuatro clases principales: las enfermedades mieloproliferativas crónicas, las enfermedades mielodisplásicas, las leucemias agudas y las enfermedades linfoproliferativas.

ENFERMEDADES MIELOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS

Las enfermedades mieloproliferativas crónicas son consecuencia de la proliferación clonal de una célula madre pluripotente que puede diferenciarse en las líneas granulocítica, eritroide y megacariocítica. En sangre periférica se observa un incremento de eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Entre estos trastornos se encuentran la leucemia mieloide crónica, la leucemia neutrófila crónica, la leucemia eosinófila crónica, la policitemia vera, la mielofibrosis idiopática crónica y la trombocitopenia esencial.

ENFERMEDADES MIELODISPLÁSICAS

Las enfermedades mielodisplásicas son aquellas en las que hay una maduración anómala con predominio de la apoptosis. En sangre periférica se observa citopenia y anomalías morfológicas de las células. Las principales enfermedades mielodisplásicas son la leucemia mielomonocítica crónica, la leucemia mieloide crónica atípica y la leucemia mielomonocítica juvenil.

LEUCEMIAS AGUDAS

Las leucemias agudas son un grupo de trastornos de las células madre con desregulación de la proliferación y la acumulación de células inmaduras. La enfermedad aparece de forma repentina. En el hemograma hay un descenso significativo de los eritrocitos con una concentración variable de leucocitos y casi siempre un descenso significativo de las plaquetas. Las principales leucemias agudas son las leucemias mieloides agudas y las leucemias linfoides agudas.

ENFERMEDADES LINFOPROLIFERATIVAS

Las enfermedades linfoproliferativas se producen por expansiones clonales de células B o de células T. Dentro de los síndromes linfoproliferativos B se encuentran los de las células B precursoras (leucemia/linfoma B, leucemia linfoblástica aguda) y las de células B maduras (leucemia linfática crónica, linfomas B, entre otras). En los síndromes linfoproliferativos T se encuentran los de las células T precursoras (leucemia/linfoma T, leucemia linfoblástica aguda T) y los de las células T periféricas maduras (leucemia prolinfocítica T, leucemia linfática crónica T granular, linfomas T, entre otras).

TÉCNICAS DE ESTUDIO

Las principales técnicas de estudio de las alteraciones leucocitarias cualitativas son la citoquímica celular, la citogenética y la citometría de flujo.

CITOQUÍMICA CELULAR

Han sido las técnicas más utilizadas hasta hace unos años. Las técnicas citoquímicas aplicadas a las alteraciones leucocitarias pueden ser químicas, como las reacciones del azul de toluidina, el negro Sudán B y el ácido peryódico de Schiff (PAS), o enzimáticas, como las de la mieloperoxidasa, las esterasas, las fosfatasas ácida y alcalina y la de la desoxinucleotidil transferasa.

REACCIÓN DEL AZUL DE TOLUIDINA

El azul de toluidina es un colorante que se une con mucopolisacáridos ácidos de las células sanguíneas. Su reacción es específica de los granulocitos basófilos, que aparecen de color violeta intenso sobre un fondo azul verdoso. Para realizar la prueba se fija una extensión con metanol durante 1,5 min, se lava y se tiñe con una solución de azul de toluidina durante 30 min. Luego se vuelve a lavar, se seca y queda lista para observarla con el microscopio.

REACCIÓN DE LA MIELOPEROXIDASA (MPO)

La actividad de la mieloperoxidasa se observa en todas las fases del desarrollo de los neutrófilos, donde se localiza en los gránulos azurófilos. Los eosinófilos muestran a la misma una reacción intensa. La reacción de la mieloperoxidasa se basa en la transformación de la bencidina de una forma incolora

a otra coloreada en presencia de agua oxigenada y peroxidasa. Para realizar la prueba, se fijan las extensiones durante 15 s con formol al 10% en etanol, se lavan, se secan y se incuban durante 10 min con el reactivo de las peroxidasas que contiene bencidina y H_2O_2 . Tras un segundo lavado y otro secado, se contrastan con colorantes de Giemsa durante 20 min. La actividad de la peroxidasa se manifiesta a través de un precipitado amarillo u ocre. Las tinciones de esta enzima se deterioran, por lo que la tinción debe hacerse con especímenes recientes.

En la actualidad se dispone de un anticuerpo antimieloperoxidasa para el análisis por citometría de flujo y la tinción inmunohistoquímica de tejidos fijados. Esta reacción se utiliza para diferenciar los blastos (células inmaduras) de estirpe mielóide que dan la reacción positiva de los de estirpe linfóide que la dan negativa.

REACCIÓN DEL NEGRO SUDÁN

El negro Sudán B es un marcador de los fosfolípidos. En esta reacción se forman gránulos de color morado oscuro-negro en los precursores de los neutrófilos, mientras que los linfoblastos no reaccionan. Su interpretación es análoga a la de la reacción de la mieloperoxidasa.

REACCIÓN DEL ÁCIDO PERYÓDICO DE SCHIFF (PAS)

El ácido peryódico es un oxidante que convierte los grupos hidroxilo de átomos de carbono adyacentes en aldehídos. Los dialdehídos resultantes se combinan con el reactivo de Schiff para dar un producto de color rojo. Presentan reacciones positivas los polisacáridos y las glucoproteínas. En las células sanguíneas dan reacciones del PAS positivas los leucocitos polinucleares neutrófilos, algunos linfocitos y las plaquetas, que muestran un precipitado de color morado intenso.

La prueba se realiza de la forma siguiente. Se fijan las extensiones con metanol-formol durante 5 min, se lavan, se secan y se ponen en contacto durante 7 min con la solución de ácido peryódico. Lavadas y secadas de nuevo, se tratan con una mezcla de ácido clorhídrico y metabisulfito sódico. Se lavan, se secan y se incuban durante 45 min con el reactivo de Schiff en la oscuridad. Se lavan y se secan una vez más y, finalmente, se contrastan con hematoxilina durante 30 min.

La reacción del PAS se utiliza para diagnosticar las leucemias linfoblásticas agudas, en las que se observa la reacción en los blastos, y la eritroleucemia, en que se constata la reacción en los eritroblastos. El principal problema de la reacción del PAS es que no es muy específica.

REACCIÓN DE LAS ESTERASAS

La mayoría de las células hematopoyéticas revelan actividad esterasa inespecífica, cuyo máximo corresponde a los monocitos y a las plaquetas. La reacción de las esterasas se basa en la hidrólisis de un éster derivado del naftaleno, que se acopla a una sal de diazonio, lo que da lugar a un precipitado verdoso puntiforme.

Para realizar la prueba se fijan las extensiones con vapores de formol durante 15 min y luego se incuban 70 min a temperatura ambiente con el reactivo que contiene el sustrato. Se lava y se seca la extensión y se contrasta con hematoxilina.

La determinación de las esterasas inespecíficas es útil para diferenciar los precursores de los neutrófilos de los precursores de los monocitos, y estos, en la leucemia aguda. Además, puede observarse una reacción positiva en las células leucémicas megacariocíticas, eosinofílicas y basofílicas, y en los eritroblastos de la eritroleucemia.

REACCIÓN DE LA FOSFATASA ÁCIDA

La fosfatasa ácida da resultados positivos en los polinucleares neutrófilos, los eosinófilos, los monocitos, los linfocitos (44% de la población normal), las células plasmáticas y las linfoides reactivas (mononucleosis infecciosa).

La reacción de la fosfatasa ácida se basa en la hidrólisis de un éster fosfórico del naftaleno a pH ácido. Para realizar la prueba se fijan las extensiones en soluciones de acetona-citrato a 4 °C durante 30 s. Las extensiones se incuban durante 1 h a 37 °C con el reactivo que contiene el sustrato de la enzima (α -naftilfosfato) a pH ácido. Y se lava y se tiñe con hematoxilina durante 30 min. La actividad fosfatasa ácida se manifiesta con un color rojo brillante. Esta reacción se utiliza para el diagnóstico diferencial de los síndromes linfoproliferativos.

La fosfatasa ácida resistente al tartrato se usa como marcador de células peludas. Su actividad es indicada por gránulos morados o rojos oscuro en el citoplasma. Es un marcador excelente de la leucemia de células peludas.

REACCIÓN DE LA FOSFATASA ALCALINA GRANULOCÍTICA

La fosfatasa alcalina granulocítica se emplea para el diagnóstico diferencial de ciertos síndromes linfoproliferativos crónicos. Se usa fundamentalmente para diferenciar la leucemia mieloide crónica de una reacción leucemoide, ya que en la leucemia mieloide crónica disminuye la actividad o desaparece.

A los 3 días de realizadas las extensiones, se fijan con metanol y formol durante 30 s. Se lavan, se secan y se incuban 10 min con la mezcla de reacción que contiene el sustrato de la enzima (α -naftilfosfato) a pH alcalino durante 1 h y 45 min a 4 °C. Se lavan y secan de nuevo, y se contrastan durante 30 min con rojo nuclear. La actividad fosfatasa alcalina se presentan en forma de precipitado pardo marrón en el citoplasma de los polinucleares neutrófilos.

DESOXINUCLEOTIDIL TRANSFERASA TERMINAL

Esta enzima es una ADN polimerasa que se encuentra normalmente en el núcleo de los timocitos y las células linfoides inmaduras de la médula ósea y no se encuentra en los linfocitos maduros. Es un marcador útil para identificar las leucemias linfoblásticas agudas y los linfomas.

TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

Las técnicas citogenéticas han adquirido en los últimos años una importancia fundamental en el estudio de las alteraciones leucocitarias, principalmente en

las de origen neoplásico. En el capítulo 27 se presentan las principales técnicas citogenéticas y se señala la aplicación de estas técnicas para el estudio de las hemopatías malignas.

APLICACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO A LAS NEOPLASIAS HEMATOPOYÉTICAS

Los avances producidos en la citometría de flujo durante los últimos años han permitido los estudios inmunofenotípicos de las neoplasias hematopoyéticas y ayudado a su diagnóstico, clasificación y seguimiento del tratamiento.

Las células hematopoyéticas se caracterizan por una ganancia y pérdida reproducibles de la expresión de antígenos con la maduración. Las neoplasias hematopoyéticas se desvían de los patrones normales de expresión de antígenos, lo cual permite su diagnóstico y clasificación. En el capítulo 21 se presenta la aplicación de la citometría de flujo para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias, el inmunofenotipado de los cánceres hematológicos y la detección de la enfermedad residual mínima.

TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS

Se denominan células fagocíticas a las que son capaces de ingerir partículas. Las principales son los granulocitos neutrófilos y las células del sistema mononuclear fagocítico (monocitos y macrófagos). La función de los granulocitos neutrófilos se estudia analizando principalmente su quimiotactismo y su fagocitosis.

AISLAMIENTO DE LOS GRANULOCITOS NEUTRÓFILOS

Los granulocitos neutrófilos se aíslan a partir de sangre periférica obtenida con EDTA empleando Histopaque. Se deposita un volumen de sangre igual sobre Histopaque en una jeringa procurando que no se mezclen. A las 2 h se han formado tres fracciones: la inferior contiene los eritrocitos, la intermedia del Histopaque y la inferior con los leucocitos, las plaquetas y el plasma. Se transfiere la fracción superior a varios tubos y se añaden 3 volúmenes de cloruro amónico (8,7 g/l). Se mezcla y agita bien y se deja que se complete la hemólisis de los eritrocitos que hayan quedado en la fase superior. Se centrifuga y en el sedimento quedan los leucocitos. Se resuspenden en suero fisiológico amortiguado a pH 7,40 y se lavan dos veces con el suero fisiológico amortiguado.

ANÁLISIS DEL QUIMIOTACTISMO

Las células fagocíticas tienen capacidad de moverse; movimiento que puede ser aleatorio o quimiotáctico. Este segundo movimiento se produce como respuesta del fagocito a un atrayente químico. Los principales factores quimiotácticos de los fagocitos son los componentes de los complementos C3 y C5 y el complejo C6,7, y las linfocinas factor quimiotáctico de macrófagos (MCF) y factor quimiotáctico de eosinófilos (ECF).

El quimiotactismo puede medirse por la técnica de Boyden, que emplea una cámara dividida en dos compartimentos por un filtro. Las células se colocan

en el compartimento superior, y el inferior se llena con el factor quimiotáctico. Se incuba la cámara durante 60 min y se cuentan las células que hayan atravesado el filtro.

ANÁLISIS DE LA FAGOCITOSIS

La fagocitosis es el proceso final de incorporación de la sustancia extraña a la célula fagocítica. Inicialmente, se produce la adherencia de dicha sustancia al fagocito y, luego, tiene lugar la invaginación de la membrana del fagocito, que incluye a la sustancia. Una vez fagocitado el material extraño, se producen los procesos de digestión que tienden a destruirlo. Se han descrito varios trastornos de la fagocitosis, que pueden ser intrínsecos o extrínsecos. Los defectos intrínsecos pueden, a su vez, ser congénitos o adquiridos.

La fagocitosis de los granulocitos puede estudiarse con la prueba del nitroazul de tetrazolio (NAT). Se incuba la suspensión de leucocitos con partículas de látex y NAT. Las partículas de látex actúan como sustancia extraña y es ingerida por los fagocitos. La reducción del NAT depende de la cantidad de anión superóxido formado a partir de oxígeno durante la fagocitosis. Tras la incubación se observa una extensión de leucocitos con el microscopio óptico. La presencia de las partículas de látex dentro de los fagocitos señala su capacidad fagocítica, mientras que la reducción del NAT a un formazán entre azul-oscuro y negro indica la capacidad oxidativa.

El análisis de la fagocitosis puede realizarse mediante citometría de flujo incubando los granulocitos con microorganismos marcados con compuestos fluorescentes. Se lava la muestra para eliminar los microorganismos marcados no fagocitados y se cuentan las células con los microorganismos marcados fagocitados.

INTRODUCCIÓN

La inmunohematología estudia las reacciones inmunológicas de los antígenos de la membrana de las células sanguíneas. Las pruebas inmunohematológicas se utilizan en los laboratorios clínicos para tipificar los grupos sanguíneos y estudiar las compatibilidades sanguíneas para las transfusiones. En este capítulo se presentan las principales características de los grupos sanguíneos y las principales técnicas que se emplean en los bancos de sangre para tipificar los grupos sanguíneos.

GRUPOS SANGUÍNEOS

La membrana de los eritrocitos tiene moléculas de carácter antigénico, de las que se conocen cerca de 700. Estos antígenos no se encuentran sólo en los eritrocitos, ya que se han observado también en todas las células del organismo, con excepción de las del sistema nervioso central, y, en forma soluble, en líquidos biológicos como el suero, la saliva y la orina. Se han estudiado principalmente en los eritrocitos debido a su importancia en las transfusiones de sangre. Estos antígenos y sus anticuerpos reciben el nombre de grupos sanguíneos. En la actualidad, se conocen 30 sistemas de estos grupos (tabla 24-1).

Los antígenos de los grupos sanguíneos son glucoproteínas o glucolípidos. La disposición de los azúcares y, particularmente, la del azúcar terminal de la cadena del hidrato de carbono, especifica la identidad del antígeno.

Los anticuerpos frente a los antígenos de los grupos sanguíneos son de las clases IgG e IgM y, muy pocas veces, de la clase IgA. Los anticuerpos de los grupos sanguíneos pueden ser aloanticuerpos, que reaccionan con un antígeno ajeno no presente en los eritrocitos propios, y autoanticuerpos, que reaccionan con un antígeno de las células propias y con el mismo antígeno de las células de otras personas. Algunos aloanticuerpos contra los antígenos eritrocitarios se denominan naturales, esto es, se desconoce el estímulo antigénico. Los anticuerpos naturales aparecen en el plasma de las personas que carecen del correspondiente antígeno, como en el sistema ABO.

El conjunto de genes que codifica los antígenos de los grupos sanguíneos que hereda una persona, independientemente de que se expresen o no, forman el genotipo, mientras que los antígenos que se expresan constituyen el fenotipo, por lo que este sólo puede reflejar parte del genotipo. El fenotipo se puede determinar estudiando los eritrocitos de la persona mediante anticuerpos adecuados, mientras que el genotipo sólo puede determinarse con estudios genéticos o con estudios familiares. A continuación se describen los principales sistemas de grupos sanguíneos.

SISTEMA ABO

El sistema ABO es el más importante por lo que se refiere a las transfusiones y a los trasplantes de órganos, y fue el primero descrito por Landsteiner en 1900.

TABLA 24-1 *Sistemas de grupos sanguíneos*

| N.º ISBT | Grupo sanguíneo | Nombre del producto del gen |
|----------|--------------------|--|
| 01 | ABO | N-acetilgalactosaminil transferasa |
| 02 | MNS | Glucoforina A, Glucoforina B |
| 03 | P | Antígeno PI |
| 04 | Rh | Proteína RhD, proteína RhCE |
| 05 | Lutheran | Glucoproteína Lutheran |
| 06 | Kell | Glucoproteína Kell |
| 07 | Lewis | α -3,4-L-fucosil transferasa |
| 08 | Duffy | Glucoproteína Fy |
| 09 | Kidd | Transportador de urea |
| 10 | Diego | Intercambiador aniónico I |
| 11 | Yt | Acetilcolinesterasa |
| 12 | Xg | Glucoproteína Xg |
| 13 | Scianna | Glucoproteína Sc |
| 14 | Dombrock | ADP-ribosil transferasa |
| 15 | Colton | Acuaporina I |
| 16 | Landsteiner-Wiener | Glucoproteína LW |
| 17 | Chido/Rodgers | Glucoproteína del complemento |
| 18 | Hh | α -2-L-fucosil transferasa |
| 19 | Kx | Glucoproteína Kx |
| 20 | Gerbich | Glucoforina C y glucoforina D |
| 21 | Cromer | CD55 |
| 22 | Knops | CD35 |
| 23 | Indian | CD44 |
| 24 | Ok | CD147 |
| 25 | Raph | Glucoproteína transmembrana |
| 26 | John Milton Hagan | Semaforina CD 108 |
| 27 | I | β , 1-6-N-acetilglucosaminil transferasa |
| 28 | Globósido | Antígeno P |
| 29 | GIL | Acuaporina 3 |
| 30 | RHAG | Rh-glucoproteína |

Está formado por dos antígenos, llamados A y B, que dan lugar a cuatro grupos sanguíneos: A, B, AB y O. El grupo sanguíneo ABO es determinado genéticamente por la herencia de un gen o genes que codifican la producción de glicosil transferasas, concretamente la N-acetilgalactosaminil transferasa y la D-galactosil transferasa. Estas enzimas añaden hexosas específicas a cadenas de oligosacáridos presentes en la membrana de los eritrocitos.

Los antígenos ABO se forman en una serie de reacciones enzimáticas. La primera reacción es la adición de fucosa a las cadenas de oligosacáridos sobre la membrana de los eritrocitos por acción de la fucosil transferasa producida por el gen H, lo cual crea la estructura del antígeno H. La transferasa del grupo A (N-acetilgalactosaminil transferasa) añade N-acetilgalactosamina y se forma el antígeno A, y la transferasa del grupo B (D-galactosil transferasa) añade D-galactosa y produce el antígeno B. La acción de ambas enzimas produce los

dos antígenos y se crea el grupo AB. El fenotipo A puede dividirse en dos subgrupos: aproximadamente el 80% de las personas del grupo A tienen el fenotipo A₁, y el 20%, el fenotipo A₂.

Los anticuerpos del sistema ABO son potentes y se producen de forma natural en las personas inmunocompetentes. La estructura de los antígenos A y B sobre la membrana de los eritrocitos es semejante a las estructuras de los antígenos bacterianos, y parece que son estos los que estimulan la producción de los anticuerpos naturales del sistema ABO. Además, se producen tras la exposición a los eritrocitos ajenos. Las personas que carecen del antígeno A producen anti-A, y las que carecen del antígeno B, anti-B. Por su parte, las personas del grupo O que carecen de los antígenos A y B producen anti-A y anti-B, y las del grupo AB no producen ninguno.

SISTEMA RHESUS

El sistema Rhesus (Rh) es el sistema de grupos sanguíneos más importante después del ABO. Está compuesto por unos 50 antígenos diferentes, cinco de los cuales (D, C, E, c y e) tienen una importancia especial. De cada progenitor se heredan tres genes situados muy próximos. Los alelos más comunes son D y d, C y c, y E y e. La presencia o la ausencia del antígeno D es la que determina si una persona tiene Rh positivo o negativo. El 85% de las personas de raza blanca expresan el antígeno D y se les denomina Rh positivos.

A diferencia de los antígenos del sistema ABO, no existen anticuerpos naturales frente a los antígenos del sistema Rh. Los anticuerpos anti-Rh surgen por la inmunización de las personas Rh negativas, bien inyectando sangre Rh positiva o bien por el traumatismo del parto.

OTROS SISTEMAS

Los otros sistemas de grupos sanguíneos y sus antígenos tienen importancia cuando aparecen anticuerpos y se necesita una transfusión, o cuando se presenta una enfermedad hemolítica del recién nacido.

ESPECÍMENES PARA LAS PRUEBAS INMUNOHEMATOLÓGICAS

Los especímenes que se utilizan para las pruebas inmunohematológicas son los eritrocitos y el suero. Los eritrocitos se obtienen de sangre reciente extraída usando oxalato o citrato como anticoagulante. Los eritrocitos se utilizan directamente, o bien se preparan suspensiones de células al 3-5% en suero salino o en albúmina, según las pruebas a realizar. El suero que se utiliza para determinar anticuerpos ha de obtenerse, como mucho, 24 h antes, y almacenarse a 4 °C para que no se degraden los componentes del sistema del complemento.

REACCIONES DE AGLUTINACIÓN EN INMUNOHEMATOLOGÍA

Las técnicas inmunohematológicas utilizadas en los laboratorios de los bancos de sangre se basan en reacciones de aglutinación. Esta se produce cuando el

anticuerpo se une a varios eritrocitos. Para que tenga lugar la aglutinación, deben vencerse las fuerzas de repulsión que mantienen separados los eritrocitos. La ausencia de aglutinación de estos en condiciones normales se ha explicado por el potencial zeta. La superficie de los eritrocitos tiene carga negativa debido a las moléculas de ácido siálico de la membrana. En suspensión en soluciones iónicas, los eritrocitos están rodeados de cationes que forman una nube que produce la repulsión entre las células. Las circunstancias que favorecen la reducción del potencial zeta hacen que se acerquen los eritrocitos y se facilite su aglutinación.

Los principales factores que favorecen la aglutinación son el potencial iónico del medio, la presencia de albúmina, el tratamiento enzimático de los eritrocitos, la temperatura, la densidad del antígeno y la agrupación y la movilidad de estos.

Las reacciones de aglutinación inmunohematológicas pueden realizarse en placa o en tubo. Las pruebas en placa poseen la ventaja de que puede observarse la velocidad a que se produce la reacción de aglutinación, lo que proporciona una indicación de la avidez de los reaccionantes; por otro lado, tienen el inconveniente de que no permiten apreciar bien la aparición de la hemólisis. En cambio, en las pruebas en tubo se aprecian más fácilmente esta y la aglutinación, pero no permiten observar bien la avidez de la reacción.

Las pruebas de aglutinación pueden hacerse en un medio salino o en un medio albuminoso. En uno salino la aglutinación se realiza a temperatura ambiente, y en uno albuminoso, a 37 °C. La elección de un tipo u otro dependerá de la determinación y de los laboratorios. La concentración de albúmina suele ser del 20 al 30%.

TIPIFICACIÓN DEL GRUPO ABO

El grupo sanguíneo ABO puede determinarse a través de pruebas directas o hemáticas, e inversas o séricas. En las directas se enfrentan los eritrocitos objeto de tipificación con antisueros o anticuerpos monoclonales de especificidad conocida, mientras que en las inversas se enfrenta el suero con eritrocitos de los grupos A, B y O conocidos. Los eritrocitos O se utilizan como control de anticuerpos irregulares.

Hoy en día, la mayoría de las casas comerciales venden anticuerpos monoclonales de ratón o humanos. Los reactivos monoclonales poseen varias ventajas sobre los antisueros, ya que son más fáciles de fabricar y más baratos, más potentes y específicos, y contienen menos anticuerpos contaminantes que puedan interferir.

MÉTODOS TRADICIONALES

La determinación del grupo ABO con las *pruebas directas* se ha realizado tradicionalmente en placa o en tubo. En la técnica en placa, se coloca sobre ella una gota de anticuerpo anti-A y otra de anticuerpo anti-B. A cada gota se le añade otra de los eritrocitos en una suspensión al 3-5% en suero salino y se mezclan con un palillo de madera. Se hace rotar la placa durante unos segundos y se observa la aparición de aglutinación. El grupo corresponderá al del anticuerpo con el que se obtenga aglutinación, y cuando esta se produzca con ambos anti-

cuerpos, el grupo será AB. Si no se obtiene la aglutinación con los dos anticuerpos, se realiza una prueba con un anticuerpo anti-AB, para detectar las variantes débiles de A y B.

En la técnica en tubo, se colocan unas gotas de los sueros anti-A y anti-B en dos tubos y se añade la suspensión de los eritrocitos en suero salino al 5%. Se agita bien, se centrifuga a 1.000 rpm durante 2 min, se desprenden suavemente los eritrocitos concentrados y se observa la presencia de aglutinación y hemólisis. La interpretación de los resultados es similar a la de la prueba en placa.

Las *pruebas inversas* para tipificar el grupo ABO se realizan en tubo. Para ello se colocan dos gotas del suero que se quiera tipificar en dos tubos, a los que se añaden dos gotas de eritrocitos A al 5% en suero salino y dos de eritrocitos B al 5% también en suero salino. Se mezcla bien, se centrifuga 2 min a 1.000 rpm, se desprenden suavemente los eritrocitos concentrados y se observa la aparición de aglutinación y hemólisis, que se produce por la actuación del complemento.

DISCREPANCIAS

Cuando se obtengan resultados discrepantes entre las pruebas hemáticas y las séricas, habrá que averiguar la causa. Las más frecuentes se deben a la presencia de anticuerpos irregulares, de autoanticuerpos, variantes débiles de A o B, y a la hipogammaglobulinemia. En los niños menores de 6 meses, sólo deben utilizarse las pruebas hemáticas, ya que a esas edades aún no están del todo desarrollados los anticuerpos anti-A y anti-B.

Los extractos de las semillas de *Dolichos biflorus* reaccionan enérgicamente con los eritrocitos A_1 y A_1B y, en cambio, o no reaccionan o lo hacen débilmente con los eritrocitos de los subgrupos A_2 , A_2B , B y O. Estos extractos, debidamente estabilizados, son útiles como reactivos para clasificar los subgrupos A y AB.

Por otro lado, hay extractos derivados de las semillas de *Ulex europaeus* que aglutinan los eritrocitos humanos que contienen la sustancia H. Los eritrocitos del grupo O y los de los subgrupos A_2 y A_2B son aglutinados con mayor energía que los eritrocitos A_1 , A_1B y B. Incluso, algunos de estos últimos no se aglutina. Por otra parte, la aglutinación de los eritrocitos del grupo O se inhibe por la adición de saliva humana de una persona del grupo O que sea secretora. El extracto de *Ulex* es útil para demostrar que hay sustancia H en la saliva y la condición de secretor.

TIPIFICACIÓN DEL GRUPO RH

A todos los donantes de sangre debe hacerseles el antígeno D (Rh_0). Y a los negativos, debe hacerseles el fenotipo D débil (D^u). Si cualquiera de los dos es positivo, la sangre es Rh positiva.

Se dispone de varios tipos de antisueros para detectar los antígenos Rh. Entre ellos, hay algunos que contienen aditivos proteínicos de gran peso molecular, suero IgG modificado químicamente en que las moléculas de anticuerpo se han tratado con un reactivo reductor, antisueros salinos reactivos preparados a partir de anticuerpos IgM humanos y, desde hace menos tiempo, reactivos monoclonales o monoclonales/policlonales.

La tipificación del antígeno D se lleva a cabo a temperatura ambiente utilizando una gota de una suspensión de eritrocitos al 3-5% y una gota del anti-D. La prueba puede hacerse en placa o en tubo. Si se hace en placa, se mezclan bien las dos gotas con un palillo y se observa la presencia de aglutinación. Cuando se haga en tubo, se centrifugará 1 min a 1.000 rpm y se observará la aglutinación. Si se necesita la prueba del D débil, los eritrocitos se analizarán mediante la técnica de antiglobulina indirecta, con un anti-D que deberá contener un componente IgG.

MÉTODOS EN GEL Y EN MICROPLACA

Para los métodos en gel se emplean casetes o tarjetas con sistemas de filtración, bien en gel o en esferas de vidrio. El método se basa en la capacidad del gel o de las esferas de vidrio para retener los eritrocitos aglutinados y permitir el paso de los que no hayan aglutinado. Las tarjetas o casetes suelen tener seis columnas, cada una con un antisuero o anticuerpo monoclonal específico. Existen diversas tarjetas con diferentes combinaciones. Hay tarjetas o casetes que determinan el grupo hemático y otras que determinan el sérico.

Para realizar la *prueba directa* se añade una suspensión de eritrocitos al 0,8% sobre las columnas del casete o tarjeta. Esta se lleva a una centrifuga especialmente diseñada y se centrifuga entre 5 y 10 min. Tras centrifugar se observan las columnas. Si la suspensión de eritrocitos ha atravesado la columna, la prueba es negativa; si existe aglutinación, los eritrocitos aglutinados quedarán atrapados en el gel y no pasarán la columna.

La *técnica en microplaca* puede emplearse para determinar el grupo hemático y el sérico. Se usan microplacas de 96 pocillos con un volumen de 200 a 300 μ l, en ocho filas horizontales y 12 verticales. Suelen utilizarse microplacas rígidas con fondo en forma de U, lo que permite leer tanto de forma visual como con lectores automáticos. Para cada tipado se emplea una fila horizontal de la placa con ocho pocillos (A-H). Para el grupo hemático se depositan 30 μ l de solución salina en los pocillos A-E y 1 μ l del concentrado de eritrocitos. A continuación se añaden los anticuerpos correspondientes a cada pocillo: anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D y control anti-D. Para el grupo sérico se añaden 50 μ l de suero en los pocillos F-H y 30 μ l de una suspensión de eritrocitos A en el pocillo F, así como 30 μ l de una suspensión de eritrocitos B en el pocillo G y una suspensión de eritrocitos O en el pocillo H. Se centrifuga durante 30 s a 400 g. Luego se agita hasta resuspender el botón de eritrocitos de los controles (control anti-D y eritrocitos O) y se leen las placas de forma visual o con lectores automáticos.

PRUEBAS DE ANTIGLOBULINA

Las pruebas de antiglobulina o pruebas de Coombs se emplean para detectar las inmunoglobulinas o los componentes del complemento que se han unido a la membrana de los eritrocitos. Estas pruebas utilizan un suero antiglobulina humana policlonal y poliespecífico, que producen animales hiperinmunizados con inmunoglobulina o complemento purificados para producir anticuerpos IgG de gran avidéz y concentración.

Existen dos tipos de pruebas de antiglobulina: las directas y las indirectas. Las pruebas directas se emplean para detectar los anticuerpos o los componentes del complemento que, *in vivo*, se han unido a la membrana de los eritrocitos, mientras que las pruebas indirectas se emplean para detectar los anticuerpos o los componentes del complemento que se han unido *in vitro* a la membrana de los eritrocitos.

Las *pruebas de antiglobulina directas* pueden realizarse en tubo o en placa. Para la prueba en tubo se prepara una suspensión de eritrocitos bien lavados, aproximadamente al 2% en suero salino. Se coloca una gota de suero antiglobulina humana en un tubo pequeño y se añade la suspensión de eritrocitos lavados al 2%. Después se centrifuga 1 min a 1.000 rpm, se agita el tubo suavemente para suspender el concentrado celular y se observa la presencia de aglutinación, que indicará la existencia de anticuerpos IgG fijados a los eritrocitos. Para la prueba en placa se coloca una pequeña gota de suero antiglobulina humana en un portaobjetos y, próxima, otra gota de una suspensión al 40-50% de eritrocitos lavados. Se mezclan las dos gotas con un palillo y se extiende sobre un área de unos 2 cm de diámetro. A continuación se deposita el portaobjetos sobre una luz y se observa unos 2 min mientras se hace oscilar suavemente sin aplicar calor. La aglutinación señalará una prueba positiva.

Las *pruebas de antiglobulina indirectas* se realizan en tubo, de la forma que se describe ahora. Se incuba el suero y una suspensión de eritrocitos al 55% a 37 °C durante 60 min, se centrifuga y se obtienen los eritrocitos. Acto seguido, se coloca en un tubo una gota de suero antiglobulina humana y se añade una gota de los eritrocitos incubados al 2%. A continuación, se agita el tubo para mezclar el contenido y se centrifuga durante 1 min a 1.000 rpm. Tras centrifugar, se agita suavemente el tubo y se observa si hay aglutinación, que indicará la existencia en el suero de anticuerpos que se habrán unido a los eritrocitos durante la incubación.

Hay tarjetas y casetes comercializados para realizar la determinación de las pruebas de antiglobulina o de Coombs.

Las pruebas de antiglobulina directas se utilizan para diagnosticar la enfermedad hemolítica en el recién nacido y las anemias hemolíticas autoinmunitarias, y para investigar las reacciones hemolíticas postransfusionales. Las pruebas indirectas se emplean para detectar anticuerpos irregulares y las incompatibilidades en las pruebas cruzadas.

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES

Los anticuerpos irregulares son los que se dirigen frente a los antígenos de los eritrocitos diferentes a los del grupo sanguíneo ABO. Para detectar estos anticuerpos se utilizan eritrocitos del grupo O, cuya composición antigénica se conoce y que se han seleccionado cuidadosamente para conseguir el mayor número posible de antígenos eritrocitarios. Para realizar estas pruebas pueden adquirirse eritrocitos con su correspondiente composición antigénica.

TITULACIÓN DE ANTICUERPOS

A veces hace falta conocer la fuerza de un anticuerpo en un suero, y para ello hay que titularlo. La titulación se realiza con diluciones progresivas del sue-

ro, que se hacen reaccionar frente a una cantidad constante de eritrocitos portadores del antígeno que corresponda al anticuerpo que quiere titularse. El título es la inversa de la dilución máxima a la que se produce la aglutinación por lo que, cuanto mayor sea el título, mayor será la concentración del anticuerpo.

PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD

La compatibilidad o análisis previo a la transfusión implica el cruce de un donante de sangre seleccionado con un grupo ABO y Rh determinado con un paciente que necesita una transfusión. El donante de sangre seleccionado se considera compatible si no hay una reacción observable en las pruebas de compatibilidad entre la sangre del donante y la sangre del paciente. Puede hacerse la suposición de que cuando se transfunda la sangre sobrevivirá normalmente en el receptor.

Las pruebas cruzadas son un proceso relativamente sencillo, pero si no se hacen correctamente pueden conducir a la transfusión de sangre errónea con posibles consecuencias desastrosas. Se realizan una prueba cruzada mayor para detectar la presencia de anticuerpos en el suero del receptor que reaccionen frente a los eritrocitos del donante y una prueba cruzada menor para determinar la presencia en el suero del donante de anticuerpos dirigidos frente a los eritrocitos del receptor.

PRUEBA CRUZADA MAYOR

Implica el análisis del suero/plasma del posible receptor con los eritrocitos de cada unidad de sangre seleccionada para la transfusión. Si la prueba cruzada es positiva, lo que significa la reacción entre los eritrocitos del donante y los anticuerpos del receptor, la donación es incompatible.

Se realiza una prueba en medio salino y una prueba de antiglobulina indirecta. Para realizar la prueba en medio salino se colocan dos gotas del suero del paciente en un tubo y se añade una gota de una suspensión al 2% en solución salina de los eritrocitos del donante. Se agita muy bien y se deja en reposo a temperatura ambiente entre 3 y 5 min. Después se centrifuga durante 1 min a 1.000 rpm y se observa la presencia de aglutinación o hemólisis.

PRUEBA CRUZADA MENOR

Implica el análisis de los eritrocitos del posible receptor con el plasma de cada unidad seleccionada para la transfusión. No suele realizarse a no ser que se investigue una reacción adversa a la transfusión de sangre entera o productos plasmáticos o determinar si el plasma del donante contiene anticuerpos dirigidos frente a un antígeno de los eritrocitos del paciente.

PRUEBA CRUZADA ELECTRÓNICA

Se emplea un programa de ordenador para guiar el proceso de análisis de los aspectos críticos de las pruebas de compatibilidad, incluidos la identificación

del paciente, la compatibilidad de los grupos sanguíneos del receptor con las unidades seleccionadas para la transfusión y la historia de transfusión.

SISTEMAS AUTOMÁTICOS PARA EL BANCO DE SANGRE

La automatización ha entrado más lentamente en los bancos de sangre que en otras áreas del laboratorio clínico. La automatización de los laboratorios de los bancos de sangre incrementa la seguridad de sus procesos analíticos al eliminar la variabilidad típica de los métodos manuales realizados por diferentes personas. Otra razón importante es la mejora de la eficacia del proceso de análisis. Para esto, el analizador debe tener la capacidad de procesar las muestras, tanto de forma individual como en grandes cantidades de especímenes, sin que se afecte de forma significativa el tiempo de proceso. Finalmente, la automatización puede reducir los costes del laboratorio. En la actualidad existen en el mercado varias plataformas totalmente automáticas que utilizan los métodos en gel o las microplacas. Los instrumentos actualmente disponibles realizan el tipado ABO y Rh, el cribado de anticuerpos, la identificación de anticuerpos, el tipado de antígenos, la reconfirmación ABO/D de donantes y las pruebas directas de antiglobulina.

DiaMed tiene el sistema Classic Plus ID-GelStation, que utiliza la prueba en gel para la tipificación del grupo sanguíneo y la prueba de detección de anticuerpos, y el sistema Techno TwinStation, que emplea una combinación de automatización total para las tarjetas ID-Gel y la semiautomatización para las microplacas.

Los sistemas Galileo y Galileo Echo de Immucor utilizan una combinación de la tecnología clásica en microplaca para tipificar el grupo sanguíneo y la tecnología en fase sólida para las pruebas de detección de anticuerpos.

La compañía Biotest tiene el sistema Tango Optimo que utiliza microplacas recubiertas con antisuero monoclonal seco para el grupo sanguíneo. Las pruebas de detección de anticuerpos se realizan en pocillos recubiertos de la proteína A que captura los eritrocitos sensibilizados por adherencia tras la adición de antiglobulina humana.

El sistema QWalys de Diagast emplea la tecnología de eritrocitos magnetizados que elimina la necesidad de centrifugación. Se utiliza tanto para el grupo sanguíneo como para la prueba de detección de anticuerpos.

El sistema AutoVue de Ortho emplea la aglutinación en columna con una matriz de bolas de vidrio para el grupo sanguíneo y la detección de anticuerpos. Este sistema permite acortar los tiempos de centrifugación.

TIPIFICACIÓN DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS POR MÉTODOS MOLECULARES

La asociación de la mayoría de los antígenos de los eritrocitos con polimorfismos de un único nucleótido proporciona la base para determinar la expresión de los antígenos de los grupos sanguíneos a nivel del ADN. La inmunohematología molecular no sólo reduce la necesidad de reactivos serológicos cada vez más raros, sino que también permite la determinación fiable de un genotipo y, por lo tanto, del fenotipo del antígeno en situaciones que son difíciles de resolver mediante métodos serológicos, especialmente cuando los anticuerpos

de que se dispone reaccionan débilmente. Estas aplicaciones del análisis de ADN incluyen la determinación de antígenos que se expresan débilmente o están alterados, el análisis de los pacientes en diversas situaciones, como con tratamientos de quimioterapia, la anemia hemolítica autoinmunitaria y la transfusión, y la identificación de fetos con riesgo de enfermedad hemolítica del recién nacido.

INTRODUCCIÓN

Los bancos de sangre y los biobancos son estructuras dedicadas a la recogida, el almacenamiento, el procesamiento y la distribución de sangre o componentes sanguíneos u otros especímenes biológicos humanos, junto con los datos asociados con estos materiales. En este capítulo se presenta la organización y el funcionamiento de estas estructuras.

BANCOS DE SANGRE

La principal función de los bancos de sangre es la recogida de sangre de los donantes y la elaboración y distribución de los componentes sanguíneos. La implantación de los sistemas de almacenamiento ha permitido separar temporalmente la donación y la transfusión. Esta separación ha hecho que puedan regionalizarse los servicios de donación con la consiguiente economía de escala y las mejoras de la calidad y disponibilidad de los productos sanguíneos.

DONACIÓN DE SANGRE

La donación de sangre es un proceso voluntario que se realiza de forma gratuita. Los donantes deben firmar un consentimiento informado. El donante debe estar informado de los riesgos relacionados con el procedimiento. Se deberá garantizar el anonimato entre donante y receptor, salvo en situaciones especiales, y se deberá garantizar la confidencialidad de la información del donante.

REQUISITOS DE LOS DONANTES

La selección del donante debe tener en cuenta dos aspectos importantes. Por un lado, hay que garantizar la seguridad del donante y, por otro, obtener un componente sanguíneo de alta calidad, lo más seguro posible para el receptor.

Los principales requisitos para ser donante es tener una edad comprendida entre los 18 y los 65 años, un peso superior a los 50 kg, tener un buen estado de salud, no tomar medicación que pueda afectar ni al donante ni al receptor y tener una concentración de hemoglobina superior a 12,5 g/dl. Todos los donantes deben rellenar un cuestionario de salud y de seguridad de la sangre durante la entrevista confidencial que debe realizarse en el centro de hemodonación antes de que se produzca la donación.

OBTENCIÓN DE LA SANGRE

La recogida de la sangre debe hacerse bajo la responsabilidad general de un médico debidamente cualificado y certificado. La sangre completa se recoge en bolsas de plástico flexible esterilizadas que contienen unos 70 ml de una solu-

ción formada por citrato, fosfato, dextrosa y adenina (CPDA). Esta combinación evita la coagulación de la sangre y la conserva durante su almacenamiento.

La sangre se obtiene por punción venosa, que generalmente se realiza en la vena antecubital. Se limpia la piel sobre el vaso sanguíneo con un antiséptico para evitar la contaminación por las bacterias cutáneas. Se inserta la aguja que se va a utilizar para obtener la sangre venosa y esta va llenando la bolsa por gravedad. Al comienzo de la obtención de la sangre se derivan unos 30 ml a un pequeño reservorio de la bolsa. Este reservorio debe tener un medio de acceso justo en el lugar opuesto a la línea de entrada de la sangre para poder obtener una muestra para análisis hematológicos o serológicos, sin comprometer la integridad de la sangre de la bolsa principal. La cantidad de sangre que suele recogerse se encuentra entre 200 y 500 ml; lo más habitual son 450 ml.

DONACIONES AUTÓLOGAS

Son aquellas en las que una persona dona su sangre para su utilización personal. Suelen hacerse antes de una intervención quirúrgica programada en la que se prevea que va a ser necesario un aporte de sangre. La transfusión autóloga evita la posible transmisión de patógenos sanguíneos de los donantes alogénicos, por lo que algunos pacientes suelen solicitarla.

ANÁLISIS QUE SE REALIZAN A LA SANGRE DONADA

Antes de que la sangre o los productos sanguíneos puedan transfundirse deben realizarse diversas pruebas de laboratorio: determinación del grupo sanguíneo, detección de anticuerpos que puedan producir efectos adversos, detección de agentes infecciosos (sífilis, VIH, hepatitis B y C). Cuando todas estas pruebas sean negativas, la sangre puede almacenarse en el banco.

ELABORACIÓN DE COMPONENTES SANGUÍNEOS

La sangre completa de los donantes puede almacenarse como tal en la solución anticoagulante CPDA, pero lo más habitual es eliminar casi todo el plasma anticoagulado y resuspender las células en una solución que proporcione una conservación óptima de los eritrocitos. Asimismo, la sangre puede fraccionarse en sus componentes. Las principales fracciones que se obtienen son: eritrocitos, plasma, plaquetas y componentes leucocitarios.

PREPARACIONES DE ERITROCITOS

Como se ha señalado, la sangre completa puede almacenarse como tal con todo el plasma presente o, con mayor frecuencia, como concentrado de eritrocitos en donde se ha eliminado el 70% del plasma, lo cual se obtiene por una centrifugación a bajas revoluciones. También se preparan eritrocitos con un bajo contenido de leucocitos; esto se consigue haciendo pasar la sangre completa o el concentrado de eritrocitos a través de filtros específicos. En los pacientes con hipersensibilidad al plasma se preparan eritrocitos lavados, que se obtienen bien a partir de sangre completa o de concentrado de eritrocitos mediante su tratamiento con solución salina y centrifugación.

PLASMA

El plasma puede centrifugarse a más revoluciones para separar un plasma rico en plaquetas. El plasma sobrenadante se lleva a una bolsa y puede almacenarse como plasma fresco congelado. La congelación debe hacerse durante las primeras 6-8 h para preservar los factores de la coagulación.

El plasma puede fraccionarse en diversos componentes que se utilizan para reemplazar las deficiencias heredadas o adquiridas de los factores de la coagulación o para reemplazar el plasma eliminado durante el tratamiento de la púrpura trombocitopénica trombótica. Las diversas fracciones de plasma se obtienen mediante procesos que incluyen la adición de alcohol, variaciones de pH y temperatura y diversos pasos de centrifugación.

CONCENTRADOS DE PLAQUETAS

Los concentrados de plaquetas se preparan a partir de la centrifugación del plasma rico en plaquetas. Los concentrados de plaquetas deben tener al menos $5,5 \times 10^{10}$ plaquetas por unidad.

CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO

La sangre completa y el concentrado de eritrocitos se almacenan a 1-6 °C hasta 42 días. En la sangre completa, durante este almacenamiento van perdiendo su función a las pocas horas las plaquetas y los leucocitos y se va produciendo una reducción gradual de la viabilidad de los eritrocitos.

Tras la fecha de caducidad, las unidades de sangre rara o valiosa pueden rejuvenecerse con una solución bioquímica que restablece la mayor parte del ambiente bioquímico original de los eritrocitos. Las unidades rejuvenecidas se lavan con solución salina isotónica en un dispositivo automático y pueden transfundirse en forma de suspensión de eritrocitos en solución salina hasta pasadas 2-4 h o pueden almacenarse con glicerol o congelarse hasta 10 años.

La crioconservación de los eritrocitos se hace para almacenar los eritrocitos poco habituales hasta 10 años. Primero se incuban con una solución de glicerol al 40% que actúa como anticongelante dentro de las células. Las unidades se colocan en contenedores estériles especiales a temperaturas inferiores a -60 °C. Cuando vayan a utilizarse las unidades crioconservadas, se descongelan y se lavan para eliminar el glicerol y tener eritrocitos suspendidos en solución salina. Estas unidades deben emplearse antes de 2-4 h para evitar la posible contaminación bacteriana. Las unidades lavadas no contienen plasma o leucocitos.

Los concentrados de plaquetas se almacenan a temperatura ambiente, debido a que las plaquetas a baja temperatura tienen una menor supervivencia.

El plasma fresco congelado puede almacenarse a -30 °C durante 12 meses. Pasado este tiempo, el factor VIII puede haber disminuido. Cuando después de 12 meses no se haya utilizado, debe etiquetarse como plasma y con esta denominación puede utilizarse durante 4 años más conservado a -18 °C o menos.

SELECCIÓN DE LOS COMPONENTES SANGUÍNEOS

Los componentes sanguíneos deben ser serológicamente compatibles con el receptor. La consideración primera es la compatibilidad ABO. Los eritrocitos que van a transfundirse deben ser compatibles con los anticuerpos del receptor y el plasma transfundido debe ser compatible con los eritrocitos del receptor.

CONSIDERACIONES Y ANÁLISIS ANTES DE LA TRANSFUSIÓN

Los pacientes que vayan a recibir una transfusión deberán estar informados de los riesgos y beneficios conocidos del procedimiento y de otros tratamientos alternativos, y tendrán el derecho de aceptar o rechazar el procedimiento. En caso de que el paciente no pueda dar su consentimiento informado previo por escrito, el tratamiento mediante transfusión se realizará teniendo en cuenta los mejores intereses del paciente.

El paso más importante en los análisis previos a la transfusión es la recogida y la identificación adecuadas de la muestra de sangre del receptor. La causa más frecuente de reacción hemolítica postransfusional es la identificación errónea de la muestra o del paciente.

Los análisis de rutina previos a la transfusión son el tipado ABO y Rh y la detección sistemática de anticuerpos inesperados contra los eritrocitos (v. capítulo 24). Si esta detección es positiva, debe realizarse tras su identificación.

El último paso en el análisis antes de la transfusión son las pruebas cruzadas (v. capítulo 24).

AFÉRESIS

La aféresis es una tecnología médica en la que la sangre de un donante o paciente se hace pasar a través de un aparato que separa un determinado constituyente normal o anormal y devuelve el resto a la circulación sanguínea. Se habla de *plasmaféresis* cuando se separa el plasma y de *citoféresis* cuando se separan componentes celulares; si estos son plaquetas es *plaquetoféresis* y cuando son leucocitos, *leucoféresis*.

MÉTODOS

La aféresis se realiza utilizando diversos procesos dependiendo del componente o la sustancia que se desee separar. El método más empleado es la centrifugación; otros métodos son la absorción sobre lechos recubiertos con un material absorbente y la filtración. La centrifugación puede aplicarse en flujo continuo o en flujo intermitente. Cuando se utiliza el flujo continuo se realizan dos punciones venosas y la sangre del donante atraviesa el separador para entrar de nuevo en la circulación venosa. En el caso intermitente se emplea una única punción venosa. La centrifugación y la filtración pueden combinarse.

BIOBANCOS

Las colecciones de muestras biológicas son una herramienta esencial para el desarrollo de la investigación biomédica, tanto básica como aplicada. Los

biobancos o bancos de muestras biológicas son los lugares donde se recogen, almacenan, procesan y distribuyen materiales biológicos humanos y sus datos asociados. Su principal utilización es la investigación básica y clínica, aunque también hay biobancos para trasplantes. Además, con el incremento de la demanda de una medicina personalizada, ha aumentado la necesidad de almacenar en biobancos material biológico de pacientes individuales.

Los principales materiales biológicos humanos que se almacenan son los especímenes de tejidos, las células, los líquidos biológicos y el ADN y ARN.

ORGANIZACIÓN

El biobanco debe disponer de un sistema informático de gestión del trabajo y de almacenamiento de datos. Los componentes organizativos de un biobanco son: la recogida de las muestras, el almacenamiento de las muestras, la recogida de los datos, el almacenamiento de los datos y la gestión de la calidad. El biobanco debe contar con el personal adecuado, tanto titulados superiores como técnicos de laboratorio.

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

A continuación se señalan los procedimientos de obtención de los diferentes tipos de muestras que pueden almacenarse en un biobanco.

TEJIDOS

Las muestras de tejido las recogen los profesionales médicos mediante biopsia o durante una intervención quirúrgica. La biopsia tras el consentimiento informado del paciente puede proporcionar una porción de tejido adicional. Este tejido adicional se envía al biobanco sólo si las muestras principales de la biopsia han proporcionado un diagnóstico inequívoco. El material de biopsia normalmente es una cantidad muy pequeña de tejido que se obtiene durante un procedimiento mínimamente invasivo, como una punción con aspirado.

Durante una intervención quirúrgica, el tejido se elimina formando parte del tratamiento, como la eliminación de un tumor, la resección de parte de un órgano con una enfermedad inflamatoria o incluso la reparación de un traumatismo. Normalmente, tras revisar la patología para el cuidado del paciente, que es el proceso prioritario, queda una cantidad significativa de tejido que puede recogerse para el biobanco.

LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

Los principales líquidos que pueden almacenarse son el suero o plasma, la orina, el líquido cefalorraquídeo, los líquidos de cavidades y la saliva. En el capítulo 5 se han descrito los métodos de obtención y procesamiento de estos líquidos. Una vez procesados se reparten en alícuotas con diferentes volúmenes de acuerdo a su posterior utilización.

CÉLULAS

Las células pueden obtenerse a partir de tejidos o a partir de los líquidos biológicos. A partir de los tejidos, los principales pasos son la fragmentación del tejido, la digestión con las enzimas específicas, el filtrado de la suspensión celular, el lavado de las células y la formación de la suspensión celular adecuada.

Con relación a los líquidos biológicos, estos han de recogerse en tubos estériles y con el anticoagulante adecuado. La obtención de las células se realiza por centrifugación.

ADN/ARN

El ADN/ARN puede obtenerse de sangre periférica, biopsias de tejidos u otro tipo de material biológico. En el capítulo 17 dedicado a los métodos moleculares se han expuesto los métodos de extracción de ADN y ARN.

ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras llegan al biobanco en muchos formatos y con diversos requerimientos de almacenamiento.

TEJIDOS

El formato más habitual para las muestras de tejidos sólidos es el que emplean los servicios de anatomía patológica, en donde la muestra se ha fijado en formol y luego se ha incrustado en parafina. El trocito de parafina se introduce en una cajita de plástico que es útil para su manipulación, como el corte de secciones finas para colocar en portas de microscopio. Estas muestras en parafina se almacenan a temperatura ambiente.

Otro formato común es el tejido que no se ha fijado en formol y que se ha congelado rápidamente. Este tejido puede también incrustarse en un material especial que permite cortarlo congelado. Este material congelado, igual que las líneas celulares vivas, puede almacenarse a $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ en congeladores o a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido.

LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

La forma habitual de almacenamiento de los líquidos biológicos es a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ADN/ARN

La forma más habitual de almacenamiento de los ácidos nucleicos es en solución acuosa a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

RECOGIDA DE LOS DATOS

La recogida de los datos se hace de forma paralela a la recogida de la muestra y puede comenzar una vez que el donante ha dado su consentimiento infor-

mado. La recogida de datos es tan importante como la del propio espécimen biológico, ya que sin esa información el espécimen no es útil para la investigación.

Los datos que acompañan a la muestra pueden recogerse de muchos lugares, todos ellos con autorización del donante durante el proceso de consentimiento informado. La historia clínica de la institución donde se produce el proceso de donación suele ser el lugar principal de información.

ALMACENAMIENTO DE LOS DATOS

Los datos se almacenan en el archivo correspondiente del sistema de gestión del biobanco. De acuerdo con la Ley Orgánica de Protección de Datos (LOPD), los datos de salud son datos personales especialmente protegidos que requieren medidas de seguridad alta, tanto en los archivos informáticos como físicos. Las muestras deben identificarse con un sistema de doble codificación, utilizándose un tercer código cuando la muestra sea distribuida a los investigadores. Únicamente el responsable del fichero de datos del biobanco debe conocer la ligazón que une los códigos de las muestras. La identidad del donante debe quedar oculta en todo momento a los investigadores.

GESTIÓN DE LA CALIDAD

El biobanco debe implantar un sistema de gestión de la calidad que tiene como objetivo inmediato proporcionar un servicio con la máxima fiabilidad. El sistema de gestión de la calidad debe cubrir todas las actividades del biobanco, entre ellas la manipulación de las muestras, la seguridad, el registro, el almacenamiento y la distribución de las muestras.

BIOBANCOS DE TEJIDOS PARA TRASPLANTE

Dentro del conjunto de biobancos hay instalaciones dedicadas al almacenamiento de tejidos para trasplantes. Los principales tejidos que se almacenan son: piel, hueso, válvulas cardíacas, córneas, tejidos reproductores y tejidos hematopoyéticos. Los tejidos para los trasplantes tienen dos orígenes principales: los donantes vivos y los donantes fallecidos. La gran mayoría de los huesos, la piel y las válvulas cardíacas que se utilizan para trasplante, así como el tejido ocular procede de donantes fallecidos. A diferencia de la donación de órganos sólidos, cuya extracción debe hacerse mientras se mantiene la circulación sanguínea, el tejido del donante fallecido puede obtenerse varias horas tras el fallecimiento y hasta 24 h después si se refrigera el cuerpo.

La piel suele obtenerse de las personas fallecidas y suele emplearse la de la espalda, las piernas o los brazos. Para ello, se desinfecta antes de recogerse y se introduce en medio de cultivo que contiene un antibiótico hasta que se utiliza o hasta que se congela. La piel puede almacenarse a 2-8 °C durante varios días o criopreservarse y almacenarse durante varios años. El hueso se lava para eliminar la sangre, los elementos de la médula y otros tejidos y se introduce en soluciones de antibióticos. Se congela a una temperatura entre -60 °C y -150 °C. Las válvulas aórtica y pulmonar se obtienen a partir de los donantes de órganos fallecidos cuando el corazón no puede utilizarse para el trasplante

debido a acontecimientos como una parada cardíaca. Se obtienen por disección en el quirófano. Se crioconservan y se almacenan en nitrógeno líquido. Las córneas se obtienen en medio estéril y se colocan en un medio de cultivo asimismo estéril. Las córneas se almacenan a 4 °C y deben trasplantarse en 48-72 h.

Los tejidos reproductores (espermatozoides, embriones) se obtienen de los donantes, se crioconservan y se almacenan a -196 °C en nitrógeno líquido. Finalmente, las células progenitoras hematopoyéticas pueden obtenerse de la médula ósea, la sangre periférica o la sangre de cordón umbilical.

CRIOCONSERVACIÓN

Los tejidos que necesiten células viables o las células viables que quieran almacenarse necesitan crioconservarse. El objetivo de las técnicas de crioconservación es alargar el tiempo de almacenamiento reduciendo las demandas metabólicas de las células a bajas temperaturas sin que se pierda su viabilidad debido a la congelación y descongelación. Para la crioconservación se utilizan agentes crioprotectores como el dimetilsulfóxido (DMS) o el glicerol, un medio de cultivo equilibrado y un complemento proteínico.

La congelación se hace de forma controlada, disminuyendo la temperatura a una velocidad de -1 °C/min hasta alcanzar -80 °C. Los crioprotectores evitan la formación de cristales de hielo intracelulares durante la congelación y equilibran la presión osmótica y la concentración de agua intracelular y extracelular durante la descongelación.

Los tejidos crioconservados, una vez congelados, se almacenan a -80 °C en un congelador o a -196 °C en nitrógeno líquido.

INTRODUCCIÓN

La *hemostasia* es el nombre que se da a los mecanismos por los que se previene la pérdida de sangre. Es el resultado de dos procesos contrapuestos: la coagulación y la fibrinólisis. La coagulación es el proceso de formación del coágulo de fibrina, que evita la pérdida de sangre mientras se repara el epitelio vascular dañado. La fibrinólisis es el proceso por medio del cual se disuelve lentamente el coágulo sanguíneo de fibrina. En este capítulo se presentan los mecanismos de la coagulación y la fibrinólisis, así como las técnicas de laboratorio para evaluar estos procesos que constituyen la hemostasia.

VISIÓN GENERAL DE LA COAGULACIÓN Y LA FIBRINÓLISIS

Cuando las plaquetas y los factores de la coagulación circulan de forma inactiva, la sangre fluye libremente por el sistema vascular. Sin embargo, cuando se produce una lesión vascular, esta y la rotura resultante del endotelio dan lugar a la compleja respuesta hemostática. Tanto el proceso de la coagulación como su contrapuesto, la fibrinólisis, incluyen diversas reacciones enzimáticas interrelacionadas y secuenciales. Ambos procesos deben estar perfectamente regulados en el tiempo para asegurar que se forma el coágulo cuando sea necesario y que se destruye antes de que sea peligroso. La hemostasia puede clasificarse de forma general en hemostasia primaria y hemostasia secundaria. En la hemostasia primaria participan fundamentalmente las plaquetas, mientras que en la hemostasia secundaria participan diversas reacciones proteínicas en la sangre.

HEMOSTASIA PRIMARIA

En la hemostasia primaria participan la pared vascular, las plaquetas y algunas proteínas plasmáticas. Cuando se produce la lesión de un vaso se desencadenan de forma inmediata los procesos siguientes: 1) vasoconstricción; 2) rotura del endotelio y exposición del colágeno subendotelial, con adhesión de las plaquetas por intermediación del factor de Von Willebrand; y 3) activación y agregación de las plaquetas con formación del tapón plaquetario.

Tras lesionarse un vaso, se produce una reacción de vasoconstricción que tiende a cerrarlo. Al mismo tiempo se expone el colágeno del subendotelio. Las plaquetas se adhieren al colágeno a través del factor de Von Willebrand (FvW). Una vez adheridas, se activan las plaquetas y liberan el contenido de sus gránulos. El difosfato de adenosina (ADP) liberado y el colágeno expuestos atraen más plaquetas al lugar de la lesión. Como respuesta a los cambios químicos, se produce la agregación plaquetaria, en la que las plaquetas se pegan unas con otras. Los primeros agregados son inestables y la fibrina los estabiliza, lo que da lugar al tapón hemostático.

La hemostasia secundaria es el proceso mediante el cual el fibrinógeno, que es una proteína plasmática soluble, se transforma en un coágulo insoluble de fibrina. La cascada de la coagulación puede desencadenarse por dos vías, denominadas intrínseca y extrínseca. En la figura 26-1 se describen las reacciones químicas de estas vías, que terminan con la formación de fibrina, y en la tabla 26-1 se da la nomenclatura actual de los factores de la coagulación. Estos factores son glucoproteínas que, de acuerdo con su función, son de tres tipos: zimógenos, cofactores y sustratos. Siete factores son zimógenos, estos es, proteínas que pueden convertirse en enzimas. Presentan dos clases de actividades enzimáticas: las serina proteasas (factores XII, XI, IX, X, VII y II) y la transglutaminasa (factor XIII). En cambio, son cofactores los factores V y VIII, y es sustrato el fibrinógeno. La interdependencia ordenada y controlada de las reacciones de la cascada de la coagulación se produce por el alto grado de especificidad de las enzimas de la coagulación y por varios mecanismos de retroacción positiva y negativa. Como se ha señalado, la mayoría de los factores de la coagulación son serina proteasas, cuya actividad puede regularse.

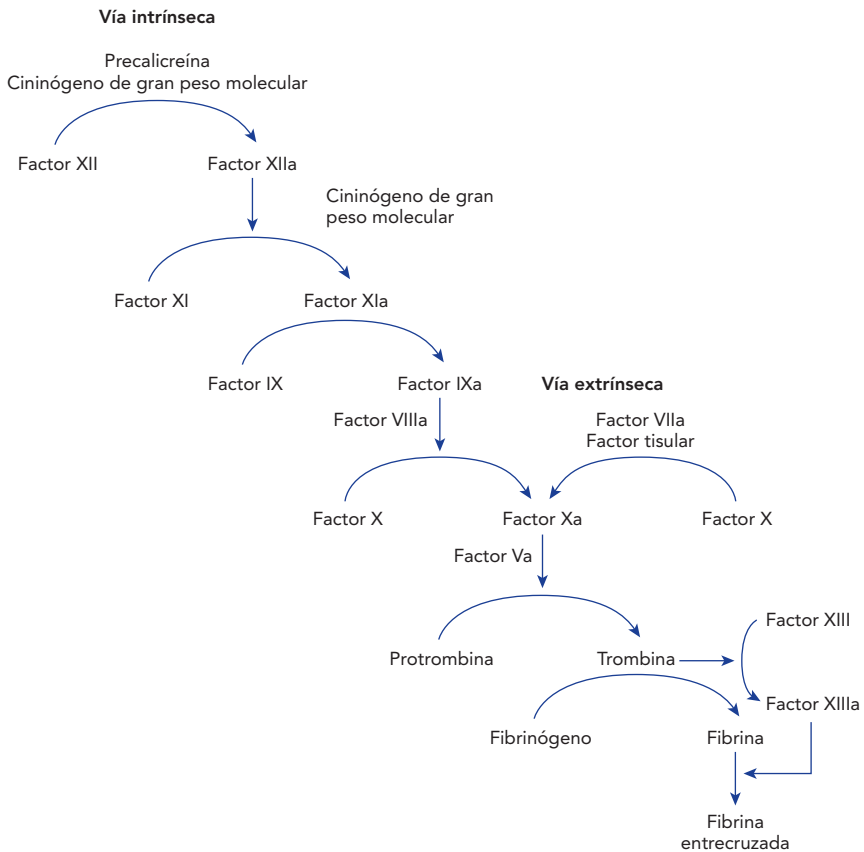


FIGURA 26-1 Vías de la coagulación.

TABLA 26-1 Factores de la coagulación

| Factor | Nombre común |
|--------|--|
| I | Fibrinógeno |
| II | Protrombina |
| III | Tromboplastina |
| IV | Calcio |
| V | Proacelerina (globulina Ac; factor lábil) |
| VII | Proconvertina (SCPA; factor estable) |
| VIII | Factor de Von Willebrand (factor antihemofílico A) |
| IX | Factor de Christmas (factor antihemofílico B) |
| X | Factor de Stuart-Prower |
| XI | Factor antihemofílico C (PTA) |
| XII | Factor de Hageman |
| XIII | Factor estabilizante de la fibrina |

La vía intrínseca es relativamente lenta y se activa por las lesiones vasculares que exponen el subendotelio al contacto con la sangre. La vía extrínseca es un proceso mucho más rápido que se activa por los daños titulares, que introducen en la circulación una proteína denominada *factor tisular*. Fisiológicamente, la vía extrínseca es la más importante en el inicio de la respuesta hemostática.

La concepción clásica de dos vías que se unen en el paso de activación del factor X: una vía intrínseca de coagulación, que se dispara por la exposición de la sangre a las superficies no endoteliales, y una vía extrínseca de coagulación, que se inicia por la interacción del factor VII con la tromboplastina tisular, es una simplificación, ya que se ha comprobado que las reacciones iniciadoras de ambas vías están íntimamente ligadas.

La activación del factor X es crucial para la coagulación de la sangre. Una vez que se ha activado el factor X a Xa a través de cualquiera de las dos vías, la coagulación entra en una vía común. En presencia de Va, el factor Xa activa la protrombina (II) a trombina (IIa). La protrombina circula normalmente en la sangre como una forma inactiva. Su activación se produce sobre la superficie de las plaquetas, las células endoteliales y las del músculo liso, y es acelerada por el factor V y el Ca^{2+} .

La formación de fibrina se produce en tres fases. En primer lugar, la trombina, que es una enzima proteolítica, fracciona el fibrinógeno en monómeros de fibrina. En una segunda fase se produce la polimerización espontánea de los monómeros de fibrina, extremo con extremo, mediante enlaces de hidrógeno. La tercera fase es la de estabilización de los monómeros de fibrina, al unirse de forma covalente mediante el factor XIIIa en polímeros de fibrina y formar un coágulo insoluble de esta proteína.

FIBRINÓLISIS

Se denomina fibrinólisis al proceso de destrucción enzimática de los coágulos de fibrina cuando ya no se necesitan. Presenta dos etapas: la primera es la

activación del plasminógeno a plasmina; la segunda, la rotura de la fibrina por la plasmina, que da lugar a los productos de degradación de la fibrina. Como la coagulación, la fibrinólisis tiene unos inhibidores intrínsecos que permiten controlarla. El más potente es la antiplasmina, que neutraliza con gran eficacia el efecto de la plasmina.

Los activadores del plasminógeno pueden clasificarse en tres tipos: intrínsecos, extrínsecos y exógenos. Los intrínsecos son los que surgen de la misma sangre, y se relacionan con la fase de contacto del mecanismo intrínseco de la coagulación. Parece que se requieren el factor XII, la precalicreína y el cininógeno de gran peso molecular. No se sabe cuál es, *in vivo*, el responsable de convertir el plasminógeno en plasmina. *In vitro*, tanto el factor XII como la calicreína tienen esta propiedad.

Los activadores extrínsecos surgen del exterior de la sangre y son conducidos a la circulación en determinadas condiciones. El más importante activador fisiológico del plasminógeno es el activador tisular del plasminógeno (tPA). Finalmente, entre los activadores exógenos están la urocinasa y la estreptocinasa.

CONTROL DE LA COAGULACIÓN

La coagulación posee varios sistemas de control interno, que modulan la formación de los coágulos, entre los que se incluyen varios anticoagulantes naturales que bloquean la cascada antes de que se forme fibrina. El inhibidor natural mejor conocido es la antitrombina (AT), que se cree que es el principal inhibidor de la coagulación sanguínea. La antitrombina se une de forma irreversible a la trombina y destruye totalmente su actividad.

La fibrina es también un anticoagulante, pues adsorbe la trombina. La proteína C es una glucoproteína dependiente de la vitamina K, que se activa a la serina proteasa proteína Ca por acción de la trombina. Esta conversión se acelera porque en la trombomodulina unida al endotelio hay un receptor para la trombina. Por su parte, la proteína C inhibe la proteólisis de los factores V/Va y VII/VIIa. Otra proteína dependiente de la vitamina K que se requiere para que la actividad de la proteína C sea óptima es la proteína S.

PRUEBAS PARA EL ESTUDIO DE LA HEMOSTASIA PRIMARIA

Las pruebas principales para estudiar la hemostasia primaria, en la que intervienen fundamentalmente el tejido endotelial y las plaquetas, son: el recuento de las plaquetas, el tiempo de hemorragia, la observación de la médula ósea y los estudios de agregación plaquetaria.

RECUESTO DE LAS PLAQUETAS

En el capítulo 20 se han descrito las técnicas para contar plaquetas. Los analizadores hematológicos proporcionan, además, el volumen plaquetario medio (VPM), la amplitud de distribución de las plaquetas (PDW) y el plaquetocrito (PCT), que son índices muy útiles para diagnosticar algunos estados patológicos.

La evaluación inicial del recuento de las plaquetas ha de considerar cualquier pseudotrombocitopenia, que puede deberse a aglutininas plaquetarias

que reaccionen en frío o a la unión de las plaquetas a los neutrófilos. Este estado puede diagnosticarse observando una extensión de sangre periférica en la que aparezcan agregados grandes de plaquetas, con frecuencia alrededor de los bordes. Las plaquetas gigantes de los síndromes macrotrombocitopénicos pueden dar recuentos bajos debido a que muchas plaquetas grandes se cuentan como leucocitos en los analizadores automáticos.

La disminución del recuento de las plaquetas se denomina *trombocitopenia*. Este trastorno plaquetario es el que se produce con mayor frecuencia. El número de plaquetas está reducido, aunque su función es normal. El tiempo de hemorragia puede estar alargado, con una retracción mala del coágulo. Las trombocitopenias pueden producirse por factores inmunológicos, infecciones víricas o por fármacos, especialmente la aspirina.

Las *trombocitopatías* son trastornos con recuentos plaquetarios normales, pero con una mala función. El tiempo de hemorragia está alargado, hay una mala retracción del coágulo y disminuye la protrombina sérica. El trastorno puede ser congénito o adquirido.

Las *trombocitosis* son aumentos de los recuentos plaquetarios, en que la función de las plaquetas es normal. Se observan en las hemorragias agudas, la hemólisis y después de eliminar el bazo.

En las *trombocitemias* aumenta el número de plaquetas y hay células grandes y anómalas. El tiempo de hemorragia está prolongado, hay una mala retracción del coágulo y una adhesión defectuosa. Se observan en las enfermedades mieloproliferativas.

TIEMPO DE HEMORRAGIA

El tiempo de hemorragia proporciona un cálculo global de la integridad del tapón hemostático primario al medir la interacción entre los capilares y las plaquetas. Para determinar el tiempo de hemorragia se utiliza el método de Ivy, en el que se hace una incisión estandarizada en la superficie del antebrazo con un dispositivo cargado con un resorte, utilizando una presión venostática aplicada sobre la parte superior del brazo con un esfigmomanómetro. Los tiempos normales se encuentran entre 2 y 10 min, mientras que los defectos graves de las plaquetas pueden producir tiempos de sangría superiores a los 30 min.

El tiempo de hemorragia no depende solamente del número y la función de las plaquetas, sino también de la concentración de fibrinógeno. Esto, junto con la variabilidad del procedimiento, hace difícil conseguir un tiempo de hemorragia exacto. Muchos laboratorios ya no realizan este tiempo debido a su variabilidad, su poca reproducibilidad y su falta de correlación con el sangrado intraoperatorio.

OBSERVACIÓN DE LA MÉDULA ÓSEA

Observar la médula ósea puede ser útil para evaluar la trombocitopenia o la trombocitosis. Ayuda a averiguar si esta se debe a trastornos reactivos o mieloproliferativos. En cambio, en el paciente trombocitopénico, la observación sirve para determinar la presencia o la ausencia de megacariocitos; esta señala una médula que no funciona, mientras que los aumentos sugieren una destrucción periférica de las plaquetas.

ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA

El colágeno y la adrenalina son agregantes plaquetarios muy potentes, que hacen que las plaquetas segreguen los depósitos de ADP endógenos, que promueven una mayor agregación. La agregación de las plaquetas inducida por varias sustancias químicas puede medirse espectroscópicamente, y su mecanismo puede registrarse en un gráfico. La adición de los agregantes a un plasma con abundantes plaquetas hace que este sea más transparente al irse produciendo la agregación. Para los estudios de agregación plaquetaria se obtiene ese plasma por centrifugación a poca velocidad ($400 \times g$, 8 min), y se coloca en la cubeta de un espectrofotómetro y se ajusta a cero. Se añade el agente agregante (colágeno, ADP o adrenalina) y se registra la reacción con agitación constante. Al agregarse, las plaquetas producen un descenso de la absorbancia del plasma con plaquetas abundantes.

Cada sustancia agregante produce una curva de agregación característica, que se utiliza para evaluar la funcionalidad de las plaquetas. Los parámetros cuantitativos que pueden medirse en la gráfica de agregación son la fase de latencia, que es el tiempo que transcurre desde que se añade el agregante hasta que empieza la agregación, la pendiente de la curva de agregación y el porcentaje de agregación. Existen aparatos diseñados especialmente para medir la agregación plaquetaria, llamados *agregómetros*.

Otro reactivo importante que se utiliza para evaluar la función plaquetaria mediante agregación es el antibiótico ristocetina, que ayuda a unir el FvW al complejo glucoproteínico Ib/IX/V. La agregación plaquetaria inducida por la ristocetina es una prueba que puede detectar la enfermedad de Von Willebrand (EvW) y algunas disfunciones plaquetarias, como el síndrome de Bernard-Soulier (SBS).

NUEVOS MÉTODOS PARA EVALUAR LA FUNCIÓN DE LAS PLAQUETAS

Se han comercializado tres sistemas de análisis para valorar la función plaquetaria: el PFA-100 (Siemens), el Ultegra (Accumetrics) y el Plateletworks (Helena). El *PFA-100* mide la hemostasia primaria relacionada con las plaquetas en un espécimen de sangre total tratada. Emplea dos cartuchos desechables que contienen una membrana con una apertura central ($147 \mu\text{m}$) cubierta con agonistas de la agregación (colágeno y adrenalina, y colágeno y ADP), a través de la cual pasan las plaquetas a tasas elevadas de corte (de 5.000 a 6.000/s). El aparato mide el tiempo de oclusión que se requiere para que las plaquetas se adhieran a la membrana, se agreguen y obstruyan la apertura. El cartucho de colágeno-adrenalina detecta la disfunción de las plaquetas inducida por defectos intrínsecos, la EvW o agentes inhibidores de las plaquetas. Por su parte, el cartucho de colágeno-ADP normalmente produce resultados anómalos con trastornos de las plaquetas y la EvW, pero, debido a sus grandes concentraciones de ADP, produce un tiempo de oclusión normal con fármacos como la aspirina.

El *Ultegra* es un sistema turbidimétrico automático para sangre total que valora la agregación plaquetaria a partir de la capacidad de las plaquetas activadas para unirse al fibrinógeno. Las micropartículas de poliestireno recubier-

tas de fibrinógeno se aglutinan en la sangre total en proporción al número de receptores plaquetarios disponibles de glucoproteína IIb/IIIa. El Ultegra está diseñado para medir el efecto de fármacos antagonistas de esta glucoproteína, como el abciximab, tirofiban o eptifibatida. No es sensible a fármacos como la aspirina, el clopidogrel y la ticlopidina, y no está diseñado para detectar trastornos de la función plaquetaria o la EvW.

El agregómetro rápido de plaquetas *Plateletworks* está diseñado para determinar el porcentaje de agregación plaquetaria en especímenes recientes de sangre total obtenidos durante intervenciones cardíacas. Mide el cambio del recuento plaquetario debido a la agregación de las plaquetas funcionales en el espécimen sanguíneo.

PRUEBAS DE COAGULACIÓN

Tradicionalmente, tanto la coagulación como la fibrinólisis se han medido con *pruebas funcionales*. Los análisis funcionales se comprenden con facilidad y proporcionan información valiosa. Sin embargo, estos análisis presentan algunos problemas; los más importantes son su inespecificidad y su precisión relativamente baja.

Varios de los precursores de la coagulación y la fibrinólisis pueden medirse utilizando *métodos inmunológicos*. Con todo, estos métodos no están muy extendidos en los laboratorios clínicos. Las determinaciones más empleadas son las de los productos de degradación del fibrinógeno y la fibrina.

La introducción de los *sustratos sintéticos* ha permitido delimitar mejor los mecanismos de la coagulación y la fibrinólisis. Como se ha señalado, varios de los factores de la coagulación son glucoproteínas con actividad de serina proteasa. Para valorar esta actividad enzimática se acoplan los sustratos peptídicos correspondientes a los factores a diversas sustancias cromogénicas o fluorogénicas. La acción serina proteasa libera los cromógenos o los fluorógenos, que pueden detectarse con medidas espectroscópicas de absorbancia o de fluorescencia.

Los *métodos fotométricos* utilizan p-nitroanilina acoplada a los sustratos peptídicos en el grupo carboxilo terminal. En cambio, los métodos fluorométricos se basan en sustratos que contienen ácido 5-aminoisoftálico dimetil éter (AIE), β -naftilamida (β -NA) y metilcumarinamida (MCA).

Existen diferencias significativas entre estos métodos y las pruebas clásicas de coagulación, como el tiempo de protrombina (TP) o el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA). En comparación con la especificidad de los sustratos sintéticos, estas pruebas son globales. Sin embargo, a pesar de sus ventajas aparentes, estos sustratos no se utilizan mucho en los laboratorios clínicos.

TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LAS PARTES DE LA COAGULACIÓN

Las principales técnicas para estudiar las partes que comprende el proceso completo de la coagulación son el tiempo de protrombina, la dosificación de los factores extrínsecos (II, V, VII y X), el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) y la dosificación de los factores intrínsecos (VIII, IX, XI y XII).

TIEMPO DE PROTROMBINA

El método más utilizado para medir el tiempo de protrombina es el de Quick, que mide el tiempo que tarda en aparecer la primera hebra de fibrina cuando se añade al plasma tromboplastina y calcio. Mide la deficiencia de alguno de los factores II, V, VII y X. El tiempo de protrombina con la técnica de Quick se utiliza como control de la coagulación y del tratamiento anticoagulante. Los valores normales están comprendidos entre 12 y 15 s. Los resultados se expresan en tiempo absoluto, y también en porcentaje con relación al valor de un plasma control al que se asigna el 100%.

En la actualidad, se recomienda emplear el INR (*international normalized ratio*: cociente normalizado internacional). Su valor es:

$$\text{INR} = (\text{TP del paciente} / \text{TP del intervalo normal [media]})^{\text{ISI}}$$

El fabricante adjudica a los reactivos un índice de sensibilidad internacional (ISI). Este se obtiene comparando el valor del TP obtenido mediante el reactivo Manchester, una preparación de tromboplastina del cerebro humano y su reactivo. Se representa en abscisas el valor del TP con el reactivo de análisis, frente al TP obtenido con el reactivo Manchester en ordenadas. Luego se calcula la pendiente y se asigna un valor ISI. Cuando más cerca de 1 esté el ISI, más sensible será el reactivo; y cuanto mayor sea de 1, menos sensible. El objetivo de esta estandarización es poder seguir una dosis estable del anticoagulante, con independencia del reactivo, instrumento o lugar de obtención del espécimen. El intervalo de referencia del INR está entre 2 y 3.

DOSIFICACIÓN DE LOS FACTORES II, V, VII Y X

La dosificación de los factores II, V, VII y X utiliza la técnica de Quick. Se añade a nueve volúmenes del plasma del paciente uno de un plasma normal. Si el tiempo de protrombina se corrige, deberá sospecharse el déficit de un factor. Para identificar este se utilizan plasmas controles que carezcan de algún factor. La adición de uno de ellos que no corrija el tiempo de protrombina identificará el factor deficiente.

TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA

El tiempo de tromboplastina parcial activada mide el lapso que tarda en formarse la fibrina cuando se añade cefalina y calcio a un plasma sin plaquetas. En estas condiciones se miden los factores VIII, IX, XI y XII. Los valores de referencia van de 80 a 100 s. Una variante empleada a menudo es el tiempo de cefalina-caolín. En esta, los valores de referencia están comprendidos entre 40 y 60 s. El TTPA se utiliza para controlar los tratamientos con heparina y para evaluar a los pacientes con antecedentes de sangrado o de trombosis.

DOSIFICACIÓN DE LOS FACTORES VIII, IX, XI Y XII

La dosificación de los factores VIII, IX, XI y XII utiliza la técnica del tiempo de tromboplastina parcial activada. Se añade a nueve volúmenes del plasma del

paciente un volumen de un plasma normal. Si el TTPA es entonces normal, se confirma la ausencia de algún factor y, para identificarlo, se usan plasmas con deficiencia de cada factor.

TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE FIBRINA

Las principales técnicas para estudiar la formación de fibrina son el tiempo de trombina, el de reptilasa y la determinación de fibrinógeno.

TIEMPO DE TROMBINA

El tiempo de trombina estudia la parte final del proceso de coagulación, esto es, la formación de fibrina, exceptuado el factor XIII. Se determina midiendo el tiempo que tarda en coagular un plasma pobre en plaquetas tras la adición de trombina y cloruro cálcico. El tiempo de trombina es directamente proporcional a la concentración de fibrinógeno. Los resultados se expresan en segundos y en el tanto por ciento de un plasma control. Los valores de referencia están comprendidos entre 18 y 25 s.

TIEMPO DE REPTILASA

La reptilasa es una enzima análoga a la trombina que se aísla del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* y que no tiene actividad tromboplástica. Se diferencia de la trombina en que no es sensible a la heparina. La reptilasa es capaz de producir la interacción trombina-fibrinógeno cuando la trombina propia es neutralizada por la heparina. El tiempo de reptilasa se obtiene determinando el que tarda en coagular el plasma cuando se añade esta enzima. Los valores de referencia del tiempo de reptilasa son de 18 a 20 s, y los resultados se expresan, generalmente, con referencia al valor de los controles. El tiempo de reptilasa aumenta en presencia de complejos solubles de monómeros de fibrina, si disminuye la concentración de fibrinógeno o si hay fibrinógenos anormales.

DETERMINACIÓN DE FIBRINÓGENO

Existen varios métodos para determinar el fibrinógeno de forma cuantitativa. En uno de ellos se utiliza la medida del tiempo de coagulación en presencia de grandes concentraciones de trombina. El fibrinógeno puede determinarse también por métodos espectroscópicos o inmunológicos. Los valores de referencia se hallan comprendidos entre 160 y 340 mg/dl.

ESTUDIO DE LOS INHIBIDORES DE LA COAGULACIÓN

Como se ha señalado, los principales inhibidores fisiológicos de la coagulación son la AT, la proteína C y la proteína S.

DETERMINACIÓN DE LA ANTITROMBINA

La AT puede determinarse mediante un método inmunológico, que detecta a los pacientes con deficiencias cuantitativas de esta sustancia, y mediante un

método enzimático, que detecta anomalías cuantitativas o cualitativas de la AT. La actividad de AT se mide utilizando un sustrato cromogénico. Se añade un exceso de heparina y trombina y el sustrato cromogénico. La cantidad de AT está relacionada con la de enzima remanente:

TROMBINA

AT + heparina + AT-heparina → AT-heparina-trombina + trombina (residual)

Sustrato + trombina residual + péptido → color

Los valores de referencia están entre 80 y 120 U/dl. El descenso de los mismos produce trombosis, y puede deberse a trastornos hereditarios o adquiridos. Estos se producen en las enfermedades hepáticas, la coagulación intravascular diseminada, el tratamiento con heparina y el síndrome nefrótico.

DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA C

La proteína C puede determinarse con un método funcional o un método inmunológico. En el funcional se utiliza veneno de la serpiente *Agkistrodon contortrix* para activar la proteína C. Este activador se une al reactivo para determinar el tiempo parcial de tromboplastina activada (TPTA). La prolongación del tiempo de coagulación es proporcional a la cantidad de proteína C presente en el plasma que se analice. También puede usarse un sustrato cromogénico. Con el método inmunológico se mide la cantidad total de proteína C, tanto la funcional como la no funcional.

Los valores de referencia se encuentran comprendidos entre 70 y 140 U/dl. Las deficiencias genéticas producen en los heterocigotos valores entre 40 y 50 U/dl. La proteína C se encuentra disminuida en las hepatopatías parenquimatosas, la coagulación intravascular diseminada y en el tratamiento con anti-coagulantes orales.

DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA S

De forma análoga a la proteína C, la proteína S puede determinarse mediante un método funcional o un método inmunológico. En el primero se añade el plasma del paciente a un reactivo que contiene un exceso del factor Va (el sustrato fisiológico de la proteína C activada). La adición de la proteína S del paciente potencia la actividad anticoagulante de la proteína C activada y alarga el tiempo de coagulación. Con el método inmunológico se determina la cantidad total de proteína S.

Los valores de referencia se encuentran entre 55 y 110 U/dl en las mujeres y entre 70 y 125 U/dl en los varones. Las gestantes tienen valores menores. Los descensos se producen en las mismas situaciones que la proteína C.

TÉCNICAS PARA ESTUDIAR LA FIBRINÓLISIS

Las principales técnicas para estudiar la fibrinólisis son la determinación del tiempo de lisis del coágulo en sangre total, el tiempo de lisis de las euglobuli-

nas, el análisis de las placas de fibrina del plasma y de las euglobulinas y la determinación de los productos de degradación del fibrinógeno/fibrina.

Las euglobulinas son las proteínas que precipitan cuando se diluye el plasma con agua. Son euglobulinas los activadores del plasminógeno, el plasminógeno, la plasmina y el fibrinógeno. El tiempo de lisis de las euglobulinas valora de forma inespecífica los activadores de la fibrinólisis. Para determinar este tiempo de lisis, se diluye el plasma y se acidifica con ácido acético hasta conseguir un pH de 5,9, que hace precipitar las euglobulinas, que luego se separan por centrifugación. Se resuspende el precipitado en un amortiguador y se le añade trombina y calcio para que coagule. El tiempo de lisis de las euglobulinas es el lapso que tardará en lisarse el coágulo de fibrina formado. Son normales los valores que superan los 120 min.

La determinación de los productos de degradación del fibrinógeno/fibrina (PDF/pdf) puede realizarse con pruebas de aglutinación con partículas de látex y pruebas de inhibición de la hemaglutinación. Los resultados normales son inferiores a los 10 mg/ml.

Los *dímeros D* son unos PDF específicos que se forman sólo mediante la degradación por la plasmina de la fibrina, y no mediante la degradación por la plasmina del fibrinógeno intacto. Los dímeros D son un marcador específico de la fibrinólisis, y su presencia indica la degradación de la fibrina entrecruzada por la plasmina. Para determinarlos se emplean anticuerpos monoclonales específicos que no puedan ser digeridos por el plasma y que no reaccionen de forma cruzada con el fibrinógeno. Se encuentran dímeros D en la coagulación intravascular diseminada, la trombosis de la vena profunda y la trombosis arterial.

TRASTORNOS DE LA HEMOSTASIA PRIMARIA

Como ya se ha dicho, los factores principales que participan en la hemostasia primaria son el endotelio vascular, las plaquetas y algunas proteínas plasmáticas. Así pues, los trastornos de la hemostasia primaria pueden ser producidos por la alteración de alguno de estos factores. Los defectos pueden ser hereditarios o adquiridos.

TRASTORNOS VASCULARES

Los trastornos vasculares que producen alteraciones de la hemostasia primaria pueden deberse a mecanismos autoinmunitarios (púrpura de Schönlein-Henoch); infecciones bacterianas, víricas o por protozoos; alteraciones estructurales hereditarias (enfermedad de Rendu-Osler-Weber, enfermedad de Ehlers-Danlos y osteogénesis imperfecta) o adquiridas (escorbuto y síndrome de Cushing); u otros mecanismos.

TRASTORNOS DE LAS PLAQUETAS

Las alteraciones de las plaquetas pueden ser cuantitativas (trombopenias) o cualitativas (trombocitopatías). Entre las primeras, unas se deben a descensos de la producción y otras a aumentos de la destrucción.

Las *alteraciones cualitativas* de las plaquetas pueden ser hereditarias o adquiridas. Entre las hereditarias las principales son el síndrome de Bernard-Soulier y

la tromboastenia de Glanzmann. Entre las adquiridas están la uremia, las enfermedades hepáticas, los síndromes linfoproliferativos, los mielodisplásicos, las disproteinemias y la acción de determinados fármacos, como los antiinflamatorios no esteroideos, los antibióticos y las tienopiridinas, entre los principales.

El *síndrome de Bernard-Soulier* es un trastorno hemorrágico congénito que se transmite de forma autosómica recesiva. Se caracteriza por la ausencia o la disfunción del complejo glucoproteínico Ib/IX/V, cuyas funciones son constituir el receptor principal del FvW y unir trombina con gran afinidad. El diagnóstico de laboratorio del síndrome de Bernard-Soulier se realiza determinando el tiempo de hemorragia y el tamaño de las plaquetas, y analizando la expresión de glucoproteínas de membrana mediante citometría de flujo. Se produce una agregación plaquetaria normal con ADP, colágeno, adrenalina y ácido araquidónico, pero con ristocetina no se produce agregación.

La *tromboastenia de Glanzmann* es también una enfermedad hemorrágica congénita que se transmite de forma autosómica recesiva. Se produce a causa de la deficiencia, cuantitativa o cualitativa, del receptor glucoproteínico de membrana IIb/IIIa. Los pacientes con tromboastenia de Glanzmann muestran recuentos y una morfología de las plaquetas normales, tiempos de hemorragia prolongados, un descenso de la retracción del coágulo o ausencia de ella, y respuestas anómalas de la agregación plaquetaria a los estímulos fisiológicos. No se observa agregación en respuesta a la adición de ADP, colágeno, adrenalina y ácido araquidónico, mientras que es normal la agregación inducida por ristocetina. Asimismo, no se advierte o está reducida la adherencia a los vidrios.

ALTERACIONES PLASMÁTICAS

El trastorno principal de la hemostasia primaria debido a alteraciones de origen plasmático es la enfermedad de Von Willebrand. Es una enfermedad autosómica dominante que afecta por igual a varones y mujeres. Se produce por una deficiencia cualitativa o cuantitativa del FvW. Las pruebas de laboratorio que se emplean para diagnosticar esta enfermedad son el tiempo de hemorragia, el estudio de la respuesta plaquetaria a la ristocetina, la medida del cofactor plasmático de este antibiótico, la medición del antígeno del FvW plasmático o plaquetario, el análisis multimérico de la proteína y la valoración de la capacidad de unión de ese factor al FVIII. Dada la complejidad estructural del FvW, la caracterización molecular de la enfermedad de Von Willebrand es complicada.

TRASTORNOS DE LA COAGULACIÓN

Los trastornos de la coagulación se producen por defectos de algunos factores de la coagulación. Estas alteraciones pueden ser congénitas o adquiridas. Los principales trastornos congénitos son las hemofilias (deficiencias de los factores VIII y IX) y las deficiencias de otros factores.

Las *hemofilias* son enfermedades de la coagulación con una herencia ligada al cromosoma X, por lo que, con raras excepciones, sólo afecta a los varones y las mujeres son portadoras. La hemofilia A es producida por el déficit del factor VIII, y la hemofilia B, por el del factor IX. Como la gravedad clínica de las

hemofilia depende de la cantidad de factor residual, cuando es menor del 1% se produce una hemofilia grave con sangrado espontáneo; entre el 1 y el 5% tiene lugar un sangrado moderado; y si supera el 5%, se produce una hemofilia leve en la que sólo se da el sangrado con traumatismos o intervenciones quirúrgicas.

El análisis de la hemofilia debe hacerse en los varones con sangrado inexplicado, especialmente si el tiempo parcial de protrombina (TPT) está alargado con un TP y un recuento de plaquetas normales. Las pruebas principales de laboratorio para diagnosticar las hemofilias son las de coagulación y la determinación específica del factor. Puede hacerse un estudio molecular de la alteración genética.

Las deficiencias hereditarias de los factores I, II, V, VII, X y XIII, la precalcicreína y el cininógeno de gran peso molecular son raras. Los principales trastornos adquiridos se deben a enfermedades hepáticas y a la deficiencia de vitamina K.

TROMBOFILIAS HEREDITARIAS

Las trombofilias hereditarias son trastornos genéticos que causan un aumento de la trombosis. Los tres defectos más comunes son la resistencia de la proteína C activada debido a una mutación del gen del factor V (factor V Leiden); un polimorfismo de la trombina (G20210A) que produce grandes concentraciones plasmáticas de protrombina; y la hiperhomocisteinemia. Otras anomalías genéticas son los defectos de los factores anticoagulantes proteína C y proteína S, o de la antitrombina. En la actualidad, se dispone de pruebas de laboratorio para identificar a la gran mayoría de los pacientes con trombofilia.

MÉTODOS DE COAGULACIÓN. ANALIZADORES AUTOMÁTICOS

Durante los primeros años sesenta, prácticamente todas las pruebas de coagulación se realizaban con técnicas manuales. Una década después, alrededor del 40% de los tiempos de protrombina se determinaban con un aparato. En la actualidad, prácticamente todas las pruebas de coagulación se efectúan con sistemas semiautomáticos o automáticos.

Los aparatos se denominan semiautomáticos cuando el detector del punto final es automático, pero el operador debe añadir el espécimen. Los aparatos automáticos son aquellos que realizan todas las operaciones. Estos instrumentos incluyen la refrigeración de los especímenes hasta el análisis, los pasos de activación e incubación —medidos y regulados con gran precisión—, y la impresión y la transmisión directa de los datos al ordenador central del laboratorio. Los aparatos automáticos han mejorado significativamente la precisión de las pruebas de coagulación.

Los primeros dispositivos para detectar la coagulación eran sensibles a la formación de la hebra de fibrina y registraban el punto final. Se introducía una sonda que giraba en la mezcla de reacción introducida en un bloque metálico termostatzado. Cuando la hebra puenteaba el espacio entre las dos sondas, se establecía una electroconductividad y se medía el tiempo transcurrido. Las sondas tenían que lavarse entre las muestras.

Posteriormente, aparecieron los aparatos con detección fotoóptica del punto final. Una célula fotosensible detecta la tasa de incremento de la densidad óptica y, en un punto de aumento máximo de la densidad óptica previamente determinado, se detecta el punto final. También puede detectarse la coagulación empleando partículas ferromagnéticas.

COMPONENTES

Los analizadores automáticos de la coagulación constan de estos componentes:

- Dispositivo de carga de especímenes.
- Zona de reactivos.
- Dispositivos de toma y dispensación de especímenes y reactivos.
- Dispositivo de mezcla de los especímenes y reactivos.
- Cubetas de reacción.
- Sistema de detección.
- Ordenador.

TABLA 26-2 *Analizadores comerciales para coagulación*

| | Año |
|---------------------------|------|
| Diagnostica Stago | |
| STA Satellite | 2009 |
| STA-R Evolution | 2005 |
| STA Compact CT | 2001 |
| Start 4 | 1998 |
| STA Compact | 1996 |
| IL/Beckman Coulter | |
| ACL TOP 500/CTS | 2008 |
| ACL Elite | 2006 |
| ACL TOP | 2004 |
| ACL Classic | 1997 |
| Siemens | |
| BFT II | 1999 |
| Sysmex CA-530 | 2006 |
| Sysmex CA-560 | 2003 |
| Sysmex CA-1500 | 1999 |
| Sysmex CA-7000 | 2002 |
| BSC XP | 2006 |
| Trinity Biotech | |
| KCIΔ | 2001 |
| KC4Δ | 2001 |
| Coag-A-Mate XM | 1998 |
| Coag-A-Mate MTX | 1999 |
| Destiny Plus | 2005 |
| Destiny Max | 2009 |
| MDA II | 1999 |

El dispositivo de carga de especímenes es la parte del analizador donde se colocan los plasmas que van a analizarse. Los contenedores tienen una capacidad de tubos que varía de un instrumento a otro. En cada posición del contenedor de los especímenes, algunos analizadores tienen un detector de presencia y un piloto luminoso que se enciende de forma intermitente en las posiciones de los plasmas cuyo análisis haya finalizado. En la mayoría de los analizadores de coagulación, la identificación de los especímenes se hace mediante código de barras.

Los reactivos se colocan en contenedores con diferentes tamaños y suelen estar identificados mediante un código de barras. Acostumbran estar termostatzados a unos 15 °C. En algunos analizadores, determinadas posiciones están equipadas con sistemas de agitación para producir una homogeneización permanente de los reactivos que lo requieran. Además, algunos analizadores utilizan puntas de pipetas desechables para evitar la contaminación entre especímenes.

Con relación al sistema de detección, los analizadores de coagulación actuales suelen combinar determinaciones de coagulación con métodos cromogénicos e inmunológicos. Estos últimos pueden ser técnicas turbidimétricas, nefelométricas o de enzimoanálisis. En la tabla 26-2 se ofrece una relación de los principales analizadores para la coagulación que se comercializan en la actualidad.

Técnicas citogenéticas

INTRODUCCIÓN

La citogenética combina la citología y la genética. Estudia fundamentalmente los aspectos celulares de la herencia, especialmente la descripción de la estructura de los cromosomas y la identificación de las aberraciones genómicas que dan lugar a enfermedades. En este capítulo se presentan de forma simple las técnicas y los métodos que utiliza la citogenética, sus principales aplicaciones clínicas y sus resultados.

CROMOSOMAS

Los cromosomas son estructuras muy ordenadas formadas por ADN y proteínas que transportan la información genética. A excepción de los gametos (espermatozoides y óvulos), las células del ser humano contienen 46 cromosomas en 23 pares. Se hereda del padre un miembro de cada par y de la madre el otro miembro del par. Veintidós pares se denominan autosomas y son homólogos, esto es, no se diferencian el uno del otro. El par 23 corresponde a los cromosomas sexuales, que en las mujeres son homólogos, dos cromosomas X, mientras que en los varones son distintos, un cromosoma X y otro Y.

Durante el ciclo celular cambia la longitud absoluta de los cromosomas, cuya forma más condensada se produce en la metafase. En este momento es cuando mejor se observan. Debido a esta circunstancia, la mayoría de los estudios citogenéticos utilizan cromosomas en metafase.

El centrómero divide a los cromosomas en dos regiones diferentes, denominadas brazos. El brazo más corto se llama p y el más largo, q. Uno de los criterios que se emplean para describir los cromosomas es la posición del centrómero. Cuando el centrómero equidista aproximadamente de los dos extremos y los brazos son de longitud semejante, el cromosoma se denomina metacéntrico. Cuando el centrómero se encuentra desplazado hacia un lado y los brazos son de longitud diferente, el cromosoma se denomina submetacéntrico, y finalmente cuando el centrómero está cerca del extremo, el cromosoma se denomina acrocéntrico.

Los extremos de los cromosomas se llaman telómeros. Estas regiones están formadas por repeticiones en tándem de la secuencia $(TTAGGG)_n$, que estabilizan el cromosoma.

CULTIVO CELULAR

Dado que el análisis cromosómico requiere células en metafase, estas deben cultivarse *in vitro*.

ESPECÍMENES

Los estudios citogenéticos corrientes utilizan sangre periférica que se obtiene usando heparina como anticoagulante. El espécimen más frecuente para los

análisis prenatales es el líquido amniótico, que se extrae mediante amniocentesis. También puede obtenerse un espécimen de las vellosidades coriónicas.

Todos los especímenes clínicos para los análisis citogenéticos deben recogerse de forma estéril siempre que sea posible. Para conseguir el mayor número de células viables, hay que llevar los especímenes al laboratorio tan pronto como se pueda. La sangre, la médula ósea, el líquido amniótico y las vellosidades coriónicas deben mantenerse a temperatura ambiente, mientras que los tejidos sólidos han de transportarse en hielo seco.

TÉCNICAS DE CULTIVO

Dependiendo del tipo celular, se emplean técnicas de cultivo de suspensiones o monocapas. Las células sanguíneas y las de la médula ósea crecen en suspensión y se añaden al medio de cultivo. La médula se cultiva de 24 a 48 h, y los linfocitos requieren de 3 a 4 días. Además, como estas células normalmente no se dividen en cultivo, debe inducirse su división con mitógenos como la fitohemaglutinina, y las células en metafase se recogen con un inhibidor de la mitosis como la colchicina.

Las células de líquido amniótico, de las vellosidades coriónicas y los tejidos sólidos crecen en monocapas. Los tejidos y las vellosidades coriónicas deben desagregarse antes tratándolos suavemente con colagenasa. El líquido amniótico ha de centrifugarse, y las células sembrarse en placas para formar colonias. Se cultivan entre 5 y 10 días.

Una vez obtenido el crecimiento máximo, se recogen las células y se hinchan hipotónicamente, sin que se llegue a romper la membrana, y luego se fijan. Un soplado suave sobre el cubreobjetos que contiene las células fijadas de los cultivos produce la rotura de la membrana celular y la diseminación de los cromosomas metafásicos. En los cultivos en suspensión, las células fijadas deben colocarse sobre un porta, que mecánicamente rompe las membranas y separa los cromosomas ligeramente entre sí, pero en una región pequeña ocupada por una sola célula. Tras el secado, las extensiones pueden teñirse.

TINCIÓN

Los cromosomas se tiñen habitualmente con Giemsa, un colorante con cargas positivas que se une a las negativas del ADN. La tripsinización suave de los cromosomas antes de teñirlos debilita las interacciones ADN-proteína y proporciona un patrón definido de regiones claras y oscuras que se llama patrón de bandas. Cada par de cromosomas posee un patrón de bandas característico que se utiliza para identificar el cromosoma y las subregiones cromosómicas. Los cromosomas metafásicos producen, por conjunto haploide, aproximadamente entre 350 y 550 bandas; los cromosomas prometafásicos, aproximadamente 850 bandas; y los cromosomas metafásicos estirados de forma mecánica, hasta 1.400 bandas.

CARIOTIPO

Los análisis citogenéticos identifican cada cromosoma y determinan las anomalías presentes. El primer paso es contar el número de cromosomas que hay en

la célula. Como el cultivo *in vitro* puede dar lugar a artefactos, deben contarse los cromosomas de unas 20 células para llegar a un resultado concluyente.

Los cromosomas individuales se identifican de acuerdo con el tamaño, la posición del centrómero y el patrón de bandas. En este punto, debe detectarse cualquier alteración de la estructura del cromosoma. En la mayoría de los casos, el patrón de bandas G habitual de los cromosomas en metafase es suficiente para los fines clínicos. Sin embargo, algunos trastornos producen pequeñas pérdidas de material cromosómico que no pueden apreciarse a este nivel. De ser así, se utiliza un análisis de gran resolución. Las células se cultivan de forma que puedan recogerse en una fase ligeramente más temprana de la división celular, la prometáfase. En este momento de la división celular, los cromosomas están menos condensados y es más fácil detectar anomalías pequeñas.

A continuación se observan los cromosomas con el microscopio y se determina si el juego es normal o anormal. Para documentarlo se toma una fotografía, se cortan los cromosomas y se pegan en una hoja de papel. Los cromosomas homólogos se ordenan de mayor a menor en siete grupos, de la A a la G, más el par de cromosomas sexuales. Por convención, el brazo corto (p) se coloca hacia arriba y el largo (q), hacia abajo. El producto final se denomina *cariotipo*.

Los cromosomas se ordenan en grupos, en orden decreciente de tamaño y posición del centrómero (fig. 27-1):

- Grupo A (1-3): cromosomas grandes metacéntricos. Se diferencian entre sí por el tamaño y la posición del centrómero.
- Grupo B (4-5): cromosomas grandes submetacéntricos. Son difíciles de distinguir entre sí.
- Grupo C (6-12, X): cromosomas medios metacéntricos. El X es el más grande del grupo. Son los más difíciles de diferenciar.
- Grupo D (13-15): cromosomas medios acrocéntricos. Pueden tener satélites.
- Grupo E (16-18): cromosomas medios metacéntricos (16) y submetacéntricos (17-18).
- Grupo F (19-20): cromosomas pequeños metacéntricos.
- Grupo G (21, 22 e Y): cromosomas muy pequeños acrocéntricos. Pueden tener satélites.

NOMENCLATURA DE LAS BANDAS

Las bandas se numeran consecutivamente desde el centrómero hasta los extremos del cromosoma (fig. 27-2). Cada brazo se divide en cuatro regiones (de la 1 a la 4). Las regiones se subdividen de acuerdo con las bandas. De esta forma, la zona correspondiente a la banda 1 de la región segunda del brazo largo del cromosoma 5 se define como 5q21.

CARIOTIPO MEDIANTE ORDENADOR

Actualmente, suele realizarse el cariotipo mediante ordenador. Para ello, en lugar de la cámara fotográfica se emplea una cámara de vídeo. Utilizando un programa de ordenador adecuado, se digitalizan las imágenes y se genera el cariotipo.

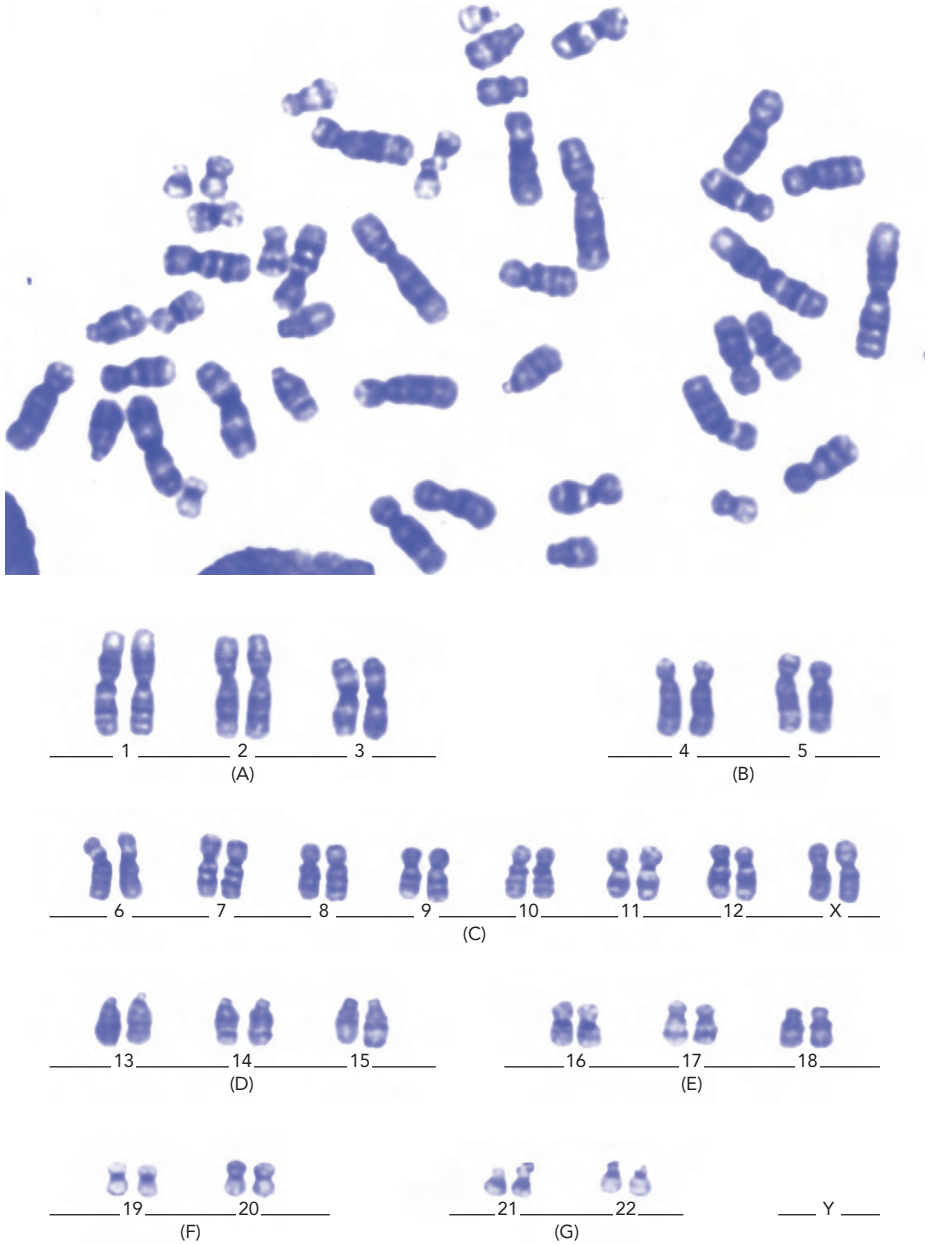


FIGURA 27-1 Ordenación de los cromosomas en el cariotipo.

MOSAICISMO CROMOSÓMICO

El mosaicismo cromosómico es la presencia de dos o más líneas celulares con distintos cariotipos en el espécimen. Este mosaicismo es una característica común en los tejidos neoplásicos y detectarlo es lo más problemático en el análisis cromosómico de las células del líquido amniótico.

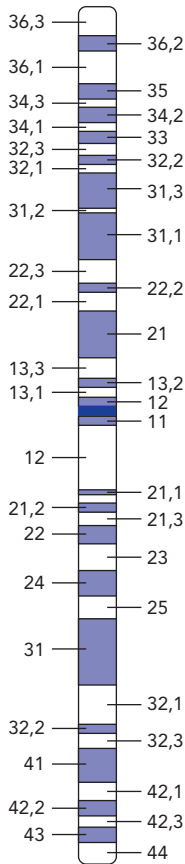


FIGURA 27-2

Numeración de bandas en los cromosomas.

HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE *IN SITU*

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) combina la biología molecular y la genética en lo que se denomina citogenética molecular. En lugar de un colorante, se usa una sonda molecular, esto es, un fragmento de ADN, marcado con un compuesto fluorescente. La sonda marcada hibrida con dianas citológicas como cromosomas metafásicos, núcleos en interfase, fibras de cromatina extendidas o micromatrices de ADN.

Hay tres clases básicas de sondas: las de secuencia única, las de «decorado» cromosómico y las de secuencia repetida. Las sondas de secuencia única se emplean para detectar pérdidas cromosómicas o reagrupamientos que no se puedan detectar por medio de las técnicas convencionales de obtención de bandas cromosómicas. Las sondas de decorado cromosómico son un conjunto de muchos trozos de ADN de un cromosoma, que tras la hibridación producen la fluorescencia de este. Son útiles para identificar reagrupamientos complejos. Finalmente, las sondas de secuencia repetida se aíslan de regiones teloméricas o centroméricas y se usan para detectar la ganancia o la pérdida de cromosomas y reagrupamientos crípticos (ocultos).

FISH CONVENCIONAL

Para realizar la técnica FISH se cultivan las células que se recogen preparando extensiones de modo análogo a las de los estudios citogenéticos clásicos. Se desnaturaliza el ADN de las extensiones y se añade la sonda marcada con el compuesto fluorescente. Se deja que hibride utilizando una temperatura de alineamiento que favorezca la hibridación de regiones de ADN homólogas. Tras un tiempo adecuado de hibridación, se elimina por medio de un lavado la sonda en exceso que no ha hibridado. Luego se observa la preparación con un microscopio de fluorescencia y se analiza esta mediante programas de ordenador.

La selección de las sondas adecuadas es fundamental en la técnica FISH. Es muy útil para detectar las microdeleciones, esto es, las pequeñas pérdidas de material genético. En estos casos la ausencia de la señal fluorescente indica que no se ha producido la hibridación y que, por tanto, hay una deleción.

FISH MULTICOLOR

La FISH puede utilizar distintas sondas marcadas con diferentes compuestos fluorescentes. Utilizando un marcaje combinatorio con cinco o más fluorocromos, pueden asignarse combinaciones de estos específicas a cada cromosoma humano, que después puede tener una presentación de un solo color. Con la aplicación del marcaje combinatorio es posible detectar a la vez los 24 cromosomas de cada célula. La FISH multicolor tiene al menos tres versiones: M-FISH, SKY (*spectral karyotyping*, cariotipado espectral) y Rx-FISH.

La FISH multicolor no sólo es capaz de identificar la eucromatina, esto es, los segmentos de los cromosomas que expresan genes, sino también translocaciones, inserciones y anomalías cromosómicas crípticas, que son los reagrupamientos cromosómicos invisibles con el microscopio óptico. El refinamiento de esta tecnología ha producido un código de barras multicolor de gran resolución que permite diferenciar regiones específicas de los cromosomas.

HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA

Es una técnica que permite detectar cambios numéricos de secuencias de ADN (pérdidas, ganancias o amplificaciones) en un tejido tumoral. Se basa en la hibridación *in situ* del ADN tumoral y de un ADN control marcados con fluorocromos de distinto color sobre metafases normales. Tras la hibridación, se cuantifican las variaciones numéricas del ADN mediante el coeficiente de intensidad de la fluorescencia entre ambos tipos de ADN. La hibridación genómica comparada tiene un interés especial para analizar los cambios numéricos de las secuencias de ADN en los tumores sólidos y las neoplasias hematológicas de índice proliferativo bajo. Asimismo, es útil en los casos de cariotipos complejos con muchos cromosomas marcadores, dobles diminutos y regiones de tinción homogénea. Esta técnica sólo detecta los cambios presentes en una gran proporción de células tumorales. Como requiere un programa informático complejo y caro, no se suele utilizar.

CITOGÉNÉTICA DE INTERFASE

En esta técnica se visualizan los cromosomas o las subregiones cromosómicas en el núcleo, lo cual permite el análisis del genoma de las células individuales en un contexto más natural que en las dispersiones metafásicas y permite el estudio de la organización tridimensional del genoma. Además, como la cromatina del núcleo en interfase está condensada una décima parte menos que la de los cromosomas metafásicos, la citogenética de interfase ha permitido ordenar las sondas en distancias menores. Con la selección adecuada de las sondas pueden verse hasta reagrupamientos estructurales, como las translocaciones y las inversiones.

MICRODISECCIÓN CROMOSÓMICA

Técnica en la que se aísla un cromosoma completo o una región de un cromosoma (por ejemplo, el brazo de un cromosoma o una banda cromosómica) utilizando una aguja de vidrio micromanipulada o un rayo láser muy enfocado. La muestra se transfiere a un tubo para su posterior amplificación y análisis con una sonda.

APLICACIONES DE LA FISH

La FISH se emplea para evaluar las anomalías siguientes:

- Translocaciones en leucemias.
- Aneusomía clonal en la leucemia.
- Síndromes de microdeleción.
- Detección de una enfermedad mínima residual.

Una de las aplicaciones clínicas más habitual de la FISH es la detección de microdeleciones, demasiado pequeñas para poder verse con la citogenética clásica. Para ello, se emplea una sonda que hibride con el gen de forma que, cuando este se ha perdido, no se observa fluorescencia. Una persona normal presenta dos señales por célula (una en cada cromosoma homólogo), mientras que una persona afectada con la microdeleción sólo tiene una señal por célula.

ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS

INDICACIONES DEL ANÁLISIS CROMOSÓMICO

El análisis cromosómico en especímenes de sangre periférica puede realizarse por diversas indicaciones. Entre las más frecuentes están:

- Anomalías congénitas múltiples en un paciente.
- Parejas sin hijos o con muchos abortos espontáneos.
- Personas con genitales ambiguos, infértiles o con amenorrea.
- Pacientes con antecedentes de un reagrupamiento cromosómico.
- Pacientes con retraso mental o del desarrollo.

- Personas en las que se sospeche un síndrome cromosómico.
- Familias con un patrón de retraso mental ligado al cromosoma X.

Las anomalías cromosómicas pueden ser de dos clases: numéricas y estructurales.

ANOMALÍAS NUMÉRICAS

Se denomina *euploidía* a los múltiplos exactos del conjunto haploide de cromosomas. La ganancia o pérdida de uno o varios cromosomas recibe el nombre de *aneuploidía*. La *diploidía*, que es el estado normal de las células humanas, es una forma de euploidía. Entre las euploidías anómalas se encuentran la *triploidía* ($3N = 69$ cromosomas) y la *tetraploidía* ($4N = 92$ cromosomas), que no son compatibles con la vida y se detectan principalmente en las células de los abortos espontáneos.

La aneuploidía se produce cuando un par de cromosomas no se separa adecuadamente durante la división y se produce un cromosoma extra o se pierde un cromosoma por célula. La *trisomía* o *monosomía* pueden tener lugar en cualquier cromosoma, aunque la mayoría son incompatibles con la vida y acaban de forma espontánea. Se han encontrado trisomías de los cromosomas 13, 18 y 21 en nacidos vivos. Las trisomías de los cromosomas sexuales son viables. La única monosomía viable es la del cromosoma X (45X).

La trisomía 21, que ocasiona el síndrome de Down, es la causa más frecuente de retraso mental, con una incidencia de 1 de cada 700 nacimientos. Las otras dos trisomías con nacidos vivos son la del 13 y la del 18. La trisomía del 13 (síndrome de Patau) tiene una incidencia de 1 de cada 4.000 a 10.000 nacimientos. La trisomía del 18 (síndrome de Edwards) se presenta en 1 de cada 8.000 nacimientos.

Las aneuploidías de los cromosomas sexuales son relativamente frecuentes, con una frecuencia global de 1 de cada 500 nacimientos. Las principales son la trisomía XXX, la trisomía YYY, la trisomía XXY (síndrome de Klinefelter) y la monosomía XO (síndrome de Turner).

ANOMALÍAS ESTRUCTURALES

Los cromosomas durante los procesos de mitosis y meiosis experimentan el fenómeno de la *recombinación*. A veces se producen errores que dan lugar a reagrupamientos que modifican la estructura de uno o varios cromosomas. Los reagrupamientos pueden ser *equilibrados*, cuando está presente todo el material cromosómico y es funcional, y sólo se encuentra distribuido de forma diferente; o *desequilibrados*, si hay una pérdida o duplicación de parte del material cromosómico. Los reagrupamientos equilibrados suelen ser benignos, mientras que los desequilibrados producen anomalías.

Los términos habituales para describir las anomalías cromosómicas estructurales son:

- *Translocación* (t): intercambio de material entre dos o más cromosomas.
- *Deleción* (d): pérdida de ADN de un cromosoma.
- *Inversión* (inv): rotura de un cromosoma en dos bandas, después de lo cual se invierte la porción central.

- *Isocromosoma* (i): duplicación de un brazo entero de un cromosoma con pérdida del otro brazo.
- *Duplicación* (dup): duplicación de un segmento dentro de un cromosoma.
- *Cromosoma dicéntrico* (dic): cromosoma con dos centrómeros que sustituye a uno o dos cromosomas normales, lo cual suele producir una pérdida de ADN.
- *Cromosoma derivativo* (der): cromosoma con una reorganización cromosómica generada por más de una reorganización en un solo cromosoma o por reorganizaciones de dos o más cromosomas.
- *Cromosoma marcador* (mar): cromosoma anómalo cuya procedencia se puede identificar.

Se han descrito diversos síndromes relacionados directamente con una anomalía cromosómica estructural. Entre ellos el síndrome de Wolf-Hirschhorn, en el que hay una pérdida terminal del brazo corto del cromosoma 4 [del(4)(p16)] y el síndrome *Cri-du-chat* [del(5)(p15)].

Las microdeleciones son pérdidas muy pequeñas del material genético. En algunos casos hay deleciones de porciones de varios genes adyacentes no relacionados, lo que se conoce como *síndromes de genes contiguos*. Entre los síndromes de microdeleción más conocidos se encuentran el síndrome de Prader-Willi y el síndrome de Angelman. Ambos comparten la misma deleción del brazo largo del cromosoma 15 [del(15)(p11.2q11.2)], pero tienen presentaciones clínicas diferentes.

APLICACIONES CLÍNICAS DE LA CITOGÉNÉTICA

Los análisis citogenéticos se emplean prácticamente en todas las especialidades de la medicina. Hay dos campos especialmente significativos, que son la citogenética prenatal y la genética del cáncer, principalmente en las hemopatías malignas.

CITOGÉNÉTICA PRENATAL

El análisis cromosómico en líquido amniótico para el diagnóstico prenatal se realiza entre las semanas decimosexta y decimoctava de gestación con las indicaciones siguientes:

- Edad materna avanzada.
- Resultados elevados de alfa fetoproteína en el suero de la madre.
- Detección de una anomalía fetal por ecografía.
- Antecedentes familiares de anomalías cromosómicas o trastornos genéticos.

HEMOPATÍAS MALIGNAS

Se han observado diversas anomalías citogenéticas en leucemias y linfomas. La detección de estas anomalías se emplea para establecer el diagnóstico correcto, proporcionar el tratamiento adecuado y disponer de un pronóstico.

El análisis citogenético de las enfermedades oncológicas se realiza en las propias células tumorales. En las leucemias se utiliza médula ósea y cuando esta no pueda obtenerse se emplea una muestra de sangre en los pacientes con células mieloides o linfoides inmaduras. A continuación se señalan algunas de las anomalías citogenéticas más importantes en las hemopatías malignas.

Leucemia mieloide crónica

La principal alteración citogenética es una translocación entre el cromosoma 9 y el 22 [t(9;22)(q34;q11)] que recibe el nombre de cromosoma Filadelfia.

Síndromes mielodisplásicos

Las alteraciones más frecuentes son la delección del brazo largo del cromosoma 5 [del(5)(q13q33)], la monosomía del 7 (-7) y la trisomía del 8 (+8).

Leucemia aguda no linfoblástica

Se han detectado diversas alteraciones citogenéticas que han permitido establecer diversos subgrupos.

Leucemia linfoblástica aguda

Se han detectado también diversas alteraciones citogenéticas; entre ellas las translocaciones t(1;19), t(4;11), t(8;14) y t(8;22).

Leucemia linfática crónica

Las delecciones o translocaciones de la región 13q14 son las alteraciones citogenéticas más frecuentes. También se observan alteraciones de 11q22-q23 y la trisomía del cromosoma 12 (+12).

Linfomas

En los linfomas de células B se observan translocaciones t(14;18). La banda 14q32, donde se encuentra el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas está implicada frecuentemente en las translocaciones de las neoplasias de células B. Por otro lado, una gran proporción de las neoplasias de células T tienen reagrupamientos de 14q11, 7q34-35 o 7p15, lugares donde se encuentran los genes del receptor de células T.

Técnicas de análisis del sistema inmunitario celular

28

INTRODUCCIÓN

El sistema inmunitario posee componentes celulares y humorales para la defensa del cuerpo frente a la invasión. En este contexto, los linfocitos ocupan una posición central entre las células responsables de la defensa en los vertebrados. Los estudios del sistema inmunitario celular se emplean fundamentalmente para los estados de inmunodeficiencia, ya sean primarios o adquiridos. En este capítulo se presentan las principales técnicas que se utilizan para el análisis del sistema inmunitario celular y su aplicación a los estados de inmunodeficiencia.

LINFOCITOS

Los linfocitos se producen en la médula ósea a partir de las células madre hematopoyéticas multipotenciales. El ser humano posee alrededor de un billón (10^{12}) de linfocitos, que pesan cerca de un kilogramo. Los linfocitos circulan por la linfa y la sangre, por donde llegan a todos los tejidos. La mayoría de los linfocitos (95%) se encuentran en los ganglios linfáticos, el bazo y el timo.

Según su función, los linfocitos pueden dividirse en T y B, que no se distinguen con el microscopio óptico. Los linfocitos T actúan directamente contra los antígenos ajenos, y los linfocitos B sintetizan las inmunoglobulinas que se combinan con los antígenos ajenos. Los linfocitos T son los encargados de las reacciones de respuesta inmunitaria celular, y los linfocitos B son los mediadores de la respuesta inmunitaria humoral. En la tabla 28-1 se presentan los porcentajes de ambas clases de linfocitos en la sangre periférica y los órganos linfoides.

LINFOCITOS T

Los linfocitos T se diferencian en el timo. Tras formarse en la médula ósea, viajan hasta el timo y aquí pasan desde la corteza hasta la médula y durante

TABLA 28-1 Porcentajes de los tipos de linfocitos en la sangre periférica y los órganos linfoides

| | Linfocitos B (%) | Linfocitos T (%) |
|---------------------|------------------|------------------|
| Sangre | 18 | 80* |
| Médula ósea | 10 | 3* |
| Timo | 0 | 100 |
| Ganglios linfáticos | 15 | 75* |
| Bazo | 40 | 50* |
| Canal torácico | 12 | 85* |

*Hasta 100, formado por otros tipos de linfocitos.

este recorrido maduran. La maduración implica el reagrupamiento de los genes del receptor antigénico de célula T (RCT).

La mayoría de los linfocitos T poseen receptores para el antígeno formados por subunidades α y β que se asocian en la parte externa de la membrana con el complejo CD3. Un pequeño porcentaje tienen subunidades γ y δ , igualmente unidas a CD3. Las proteínas CD3 participan en la transducción de la señal al interior de la célula cuando se une un antígeno al RCT. El complejo CD3 es un marcador de los linfocitos T.

Cerca del 60% de las células CD3+ tienen CD4, y estas células son colaboradoras/inductoras. Hay dos subpoblaciones de células colaboradoras CD4+: Th1 y Th2. El marcador CD8 está en aproximadamente el 30% de los linfocitos T. Estas células son citotóxicas/supresoras. El cociente normal CD4+/CD8+ es de 2/1.

LINFOCITOS B

Los linfocitos B constituyen entre el 10 y el 15% de los linfocitos circulantes. Como todos los linfocitos, se forman en la médula ósea, donde también son procesados. La estimulación antigénica de los linfocitos B conduce a la formación de las células plasmáticas que segregan inmunoglobulinas, que son la base de la especificidad de la inmunidad humoral.

INMUNODEFICIENCIAS

Las inmunodeficiencias son enfermedades que se caracterizan por una disminución de la capacidad del organismo para montar una defensa inmunitaria frente a los antígenos ajenos. Las inmunodeficiencias se clasifican en primarias y secundarias. Las primarias son aquellas inherentes al propio sistema inmunitario y suelen deberse a defectos congénitos, aunque también pueden ser adquiridas a cualquier edad. Las secundarias se deben a otras enfermedades como infecciones, cáncer y autoinmunidad, entre otras.

Los principales síndromes de inmunodeficiencia celular son la ataxia-telangiectasia hereditaria, el síndrome de Wiskott-Aldrich, el síndrome de DiGeorge y la inmunodeficiencia combinada con expresión defectuosa de los genes HLA de clase II.

ANÁLISIS DE LA INMUNIDAD CELULAR

La evaluación por el laboratorio de la inmunidad celular debe comenzar con la determinación del recuento de linfocitos. Los recuentos por debajo de 1.200/ μ l pueden indicar una deficiencia de los linfocitos T, ya que la mayoría de los linfocitos de la sangre periférica son de esta clase. Las inmunodeficiencias de los linfocitos T casi siempre afectan de forma secundaria al sistema inmunitario humoral, debido a que los linfocitos B dependen de los linfocitos T reguladores para montar una respuesta de anticuerpos adecuada.

SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T

Debe también realizarse una determinación de las subpoblaciones de linfocitos T. Esta se realiza habitualmente mediante citometría de flujo. Se emplean

anticuerpos monoclonales marcados con compuestos fluorescentes. En la actualidad, la mayoría de los laboratorios utilizan el análisis inmunofenotípico de tres o cuatro colores para el recuento de subpoblaciones de linfocitos. La dispersión lateral de CD45 se emplea para identificar la población de linfocitos y eliminar del análisis las células muertas, los restos y los granulocitos degranulados. El análisis de tres colores se realiza con dos especímenes marcados (CD45-CD3-CD4 y CD45-CD3-CD8), mientras que el análisis con cuatro colores se realiza con un único espécimen marcado (CD45-CD3-CD4-CD8). Anteriormente, el recuento absoluto de linfocitos se determinaba en un contador hematológico y luego, junto con los datos del citómetro de flujo, se obtenían los recuentos absolutos de CD4+ y CD8+. Ahora, se puede obtener el recuento absoluto de las subpoblaciones de linfocitos directamente con el citómetro de flujo.

ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN LINFOCITARIAS

La mayoría de los linfocitos de la sangre periférica son células en reposo, por lo que para evaluar la respuesta inmunológica celular, deben activarse *in vitro*. Así, el parámetro de medida de la función inmunitaria celular más utilizado es la proliferación linfocitaria. Cuando se estimulan los linfocitos, proliferan y maduran convirtiéndose en células efectoras. La proliferación de los linfocitos T por antígenos o mitógenos produce cambios intracelulares y la transformación en linfoblastos.

La estimulación por mitógenos policlonales utiliza las lectinas vegetales fitohemaglutinina (FHG), concanavalina A (ConA), fitolaca y lipopolisacáridos. Estas sustancias se denominan mitógenos policlonales porque inducen la mitosis en los linfocitos de muchas especificidades u orígenes clonales distintos. Los mitógenos policlonales parecen desencadenar esencialmente los mismos mecanismos de respuesta proliferativa que los antígenos. Normalmente, los linfocitos están en reposo en la fase G₀ del ciclo celular. Cuando se estimulan con los mitógenos policlonales, entran rápidamente en la fase G₁ y avanzan a lo largo del ciclo celular. La estimulación con mitógenos activa una porción significativa de los linfocitos T normales y puede valorarse tras 3 días de cultivo.

La estimulación con un antígeno está limitada a los linfocitos T con un receptor específico para el antígeno y requiere cultivos más prolongados, de entre 6 y 7 días.

PRUEBA DE INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA

Hasta hace unos años, la proliferación de los linfocitos se ha medido mediante la incorporación de timidina tritiada al ADN con un pulso de 4-24 h tras una incubación prolongada de cultivos de células mononucleares de sangre periférica con mitógenos o antígenos.

ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

En la actualidad, la citometría de flujo se ha convertido en la técnica más adecuada para valorar la inmunología celular. Se han producido colorantes que se

integran de forma estable en las membranas de los linfocitos. Tras eliminar el colorante que no se ha integrado en la membrana, se estimula la proliferación linfocitaria. Con cada división sucesiva se reduce a la mitad la cantidad de colorante de cada célula. Si se mide la fluorescencia emitida por la célula puede calcularse el número de divisiones celulares. Los mejores colorantes para estos estudios son el PKH26 y el éster de succinimidilacetato de carboxifluoresceína (CFSE).

ANÁLISIS DE LA CITOTOXICIDAD LINFOCITARIA

Los análisis de citotoxicidad miden la capacidad de los linfocitos para destruir células diana en reacciones donde no está presente el complemento. Se estudian tres tipos de procesos de linfocitotoxicidad: la linfólisis mediada por células (CML), la linfólisis dependiente de un anticuerpo (AML) y la citotoxicidad mediada por productos linfocitarios.

En la *linfólisis mediada por células* se incuban los linfocitos T citotóxicos con células diana marcadas con cromo radiactivo en forma de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$. Los linfocitos T citotóxicos interactúan con las células diana, que se rompen y causan la liberación al medio del ^{51}Cr . Asimismo, en una prueba semejante, pueden marcarse las células proliferantes, como las células tumorales, con ^3H -timidina, que se incorpora al ADN en replicación. Tras el ataque por la célula T citotóxica, el ADN de las células se fragmenta y se libera rápidamente al sobrenadante, y se puede medir bien la liberación de estos fragmentos o la retención de ^3H -timidina en el ADN cromosómico. Estas pruebas proporcionan una medida rápida, sensible y específica de la actividad de los linfocitos T citotóxicos.

En la *linfólisis dependiente de un anticuerpo* se incuban las células K (asesinas) con células diana con antígenos en su superficie, y un anticuerpo IgG dirigido contra el antígeno de la célula diana. Las células K con receptores de afinidad elevada para la porción Fc de la molécula de IgG reconocen y reaccionan con el anticuerpo que recubre la célula diana. Se produce entonces la destrucción de esta.

PRODUCCIÓN DE CITOCINAS

Las citocinas desempeñan una función importante en las respuestas linfocitarias. La producción de citocinas por las células del sistema inmunitario puede medirse mediante citometría de flujo; esta puede emplearse para evaluar la respuesta inmunitaria celular. Las células se estimulan durante 4-6 h en presencia de reactivos que bloqueen el transporte de membranas, como la brefeldina A o la monensina, para evitar la secreción de las citocinas. Posteriormente, se marcan las células con anticuerpos monoclonales específicos de la subpoblación, se fijan, se permeabilizan y se marcan con anticuerpos monoclonales específicos de la citosina marcados con fluorescencia. Se mide la fluorescencia que señala la respuesta.

Técnicas inmunoquímicas e inmunoanálisis

INTRODUCCIÓN

Las técnicas inmunoquímicas y los inmunoanálisis utilizan las reacciones inmunológicas antígeno-anticuerpo. Estas reacciones pueden detectarse muchas veces por los efectos que producen, como la precipitación o la aglutinación. En los inmunoanálisis con reactivos marcados se emplean átomos o moléculas llamados indicadores o trazadores que, unidos al reactivo antígeno o anticuerpo, muestran que ha tenido lugar la reacción antígeno-anticuerpo. Los principales marcajes son los isótopos radiactivos, las enzimas, los compuestos fluorescentes y los compuestos luminiscentes. En este capítulo se presentan las técnicas inmunoquímicas y los inmunoanálisis y sus aplicaciones en los laboratorios clínicos.

ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS. REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO

Los *antígenos* son sustancias, generalmente de gran tamaño, capaces de estimular el sistema inmunitario de un animal y originar una respuesta dirigida específicamente contra ellas. Se denomina *epítipo* al determinante antigénico, esto es, al lugar del antígeno que reconoce y al que se une el anticuerpo. Está formado por unos pocos aminoácidos que no tienen que ser de estructura continua. Se denominan *haptenos* a las moléculas de bajo peso molecular que, sin ser inmunógenas de por sí, cuando se unen a una macromolécula portadora inducen la generación de anticuerpos contra ellas.

Los *anticuerpos* pertenecen a un grupo de proteínas llamadas inmunoglobulinas, que son glucoproteínas producidas por los linfocitos B y su progenie las células plasmáticas, que se combinan específicamente con los antígenos. Cuando se ponen en contacto un antígeno y un anticuerpo específico contra él, reaccionan entre sí para dar un complejo antígeno-anticuerpo. La unión entre el antígeno y el anticuerpo es un proceso reversible que tiene una constante de equilibrio característica.

Para describir la fuerza o energía de la interacción entre un anticuerpo y un antígeno se emplean dos términos. La *afinidad* es la magnitud termodinámica que señala la energía de interacción de un lugar de combinación del anticuerpo y su epítipo correspondiente del antígeno. Por su parte, la *avidez* es la fuerza global de la unión entre el antígeno y el anticuerpo, y comprende la suma de las afinidades de unión de todos los lugares individuales de combinación del anticuerpo. Las inmunoglobulinas G (IgG) tienen dos lugares de unión en cada molécula de anticuerpo, mientras que las IgM tienen diez lugares de unión en cada molécula. La afinidad es una propiedad del antígeno, mientras que la avidez lo es del anticuerpo.

La reacción de unión entre un antígeno de peso molecular elevado, como una proteína, y un anticuerpo contra él se produce en dos fases. La primera

fase, de unión, tiene lugar muy rápido, mientras que la segunda fase, de crecimiento de los complejos, es más lenta. Una vez se alcance un tamaño crítico precipitarán los complejos. Cuando los determinantes antigénicos están en la superficie de una partícula se produce la aglutinación. Esta y la precipitación son, fundamentalmente, el mismo fenómeno, esto es, la agregación del antígeno y el anticuerpo.

La reacción de precipitina entre un antígeno y una gran cantidad fija de un anticuerpo dirigido contra él presenta tres partes, según la cantidad de antígeno de la mezcla de reacción (fig. 29-1). Cuando la concentración de antígeno es pequeña, mucho menor que la del anticuerpo, el precipitado es escaso y en el sobrenadante hay gran cantidad del anticuerpo libre. En cambio, cuando la concentración de antígeno y anticuerpo es semejante, el precipitado es máximo y no se detecta ni antígeno ni anticuerpo libres en el sobrenadante. Por último, cuando la concentración de antígeno es elevada, mucho mayor que la del anticuerpo, el precipitado es también escaso y en el sobrenadante existe antígeno libre. Así pues, los precipitados más abundantes se forman cuando las cantidades de antígeno y de anticuerpo son equivalentes. En las zonas de exceso de anticuerpo o de antígeno, la reacción de precipitina está inhibida, situación que se conoce como fenómeno zona o prozona.

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

La mayoría de las técnicas inmunoquímicas y los inmunoanálisis se utilizan para la determinación de antígenos, por lo que los anticuerpos son el reactivo fundamental. Los primeros reactivos empleados fueron los anticuerpos policlonales. Cuando se inyecta un antígeno con varios epítomos se generan anticuerpos frente a cada epítomo y se tiene un antisuero policlonal. La producción de anticuerpos requiere inyectar varias dosis del antígeno a un animal (conejo, cabra, oveja o caballo) a intervalos regulares. Tras un período de varias semanas se sacrifica el animal, se extrae su sangre, se deja que coagule y se obtiene

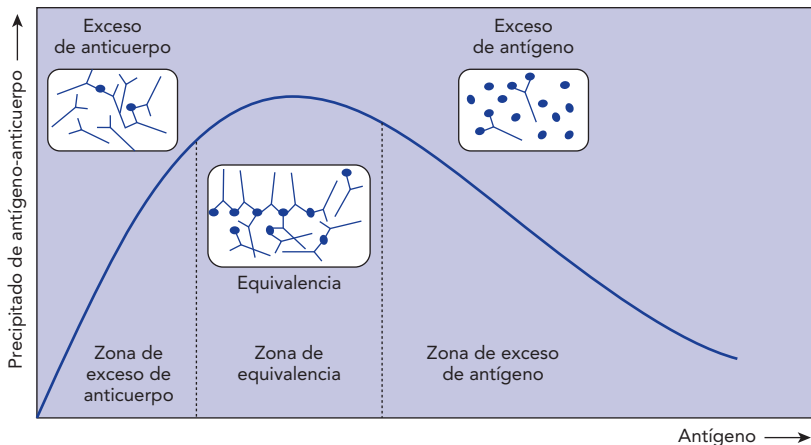


FIGURA 29-1 Curva de inmunoprecipitación que representa la cantidad de anticuerpo precipitado según la concentración de antígeno para una concentración fija de anticuerpo.

el suero por centrifugación. A continuación se inactivan las proteasas y el complemento, incubando el suero a 56 °C durante 45 min. De esta manera se obtiene un antisuero que puede emplearse para un inmunoanálisis específico. Los antisueros policlonales pueden purificarse, para eliminar las sustancias que interfieren, mediante diversas técnicas: principalmente la precipitación fraccionada y la cromatografía.

La producción de anticuerpos monoclonales fue un hallazgo muy importante para la inmunología y ha sido fundamental en el campo de los inmunoanálisis. Para producir un anticuerpo monoclonal se inmuniza al animal con el antígeno mediante dosis sucesivas de este durante varias semanas, se sacrifica el animal y se le extrae el bazo o los ganglios linfáticos, a partir de los cuales se obtienen los linfocitos B sensibilizados. Posteriormente, se incuban durante unos minutos estos linfocitos con células de mieloma de ratón con deficiencia de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT), y en presencia de polietilenglicol, para producir la fusión celular y obtener un hibridoma. La mezcla de fusión se siembra en recipientes de cultivo que tienen un medio HTA (hipoxantina, aminopterina y timidina), de modo que sólo crezcan las células fusionadas y no puedan hacerlo los linfocitos B ni las células de mieloma. Tras un período de 10 a 14 días de cultivo, sólo sobreviven los hibridomas. En este momento se tiene un conjunto de células híbridas que producen diferentes tipos de anticuerpos específicos contra el antígeno. Para aislar los clones adecuados, se diluye el cultivo y se distribuye en los pocillos de una placa de microtitulación, de forma que cada uno contenga un hibridoma diferente. Se cultivan los clones y, cuando han crecido suficientemente, se analiza el tipo de inmunoglobulina que producen y se aísla el anticuerpo monoclonal más adecuado a los fines para los que se vaya a usar.

TÉCNICAS DE AGLUTINACIÓN

Cuando el antígeno está unido a un corpúsculo, como las bacterias, las células sanguíneas o las partículas inertes, la reacción antígeno-anticuerpo produce directamente aglutinación. El título de una prueba de aglutinación es la dilución máxima del suero que produce la reacción, de forma que, cuanto más elevado sea el título, mayor será la concentración de la sustancia que se determina en el suero. Las técnicas de aglutinación que se emplean en los laboratorios clínicos son la aglutinación directa, la aglutinación indirecta, las pruebas de antiglobulina y las técnicas de inhibición de la aglutinación. Aunque estas técnicas ya casi no se utilizan en los laboratorios clínicos, salvo en los bancos de sangre, se describen aquí con fines didácticos.

REACCIONES DE AGLUTINACIÓN DIRECTA

Las reacciones de aglutinación directa son aquellas en las que el antígeno se halla sobre la superficie de corpúsculos naturales, como los microorganismos y los eritrocitos. Este tipo de pruebas se utiliza para detectar anticuerpos en suero contra los antígenos de las membranas de las células y pueden realizarse en tubo o en placa; en las pruebas en placa se mezcla una suspensión de las células, se hace oscilar la placa durante unos minutos y se observa la aparición de aglutinación.

Las pruebas de aglutinación directa se han usado para diagnosticar infecciones bacterianas. Se detectan anticuerpos frente a *Brucella*, *Salmonella* (fiebre tifoidea) y *Proteus*. Los anticuerpos bacterianos pueden generar diferentes formas de aglutinación. Los anticuerpos frente a los antígenos del cuerpo bacteriano forman un entrecruzamiento de los microorganismos, que resulta en un precipitado granular compacto que se forma lentamente, mientras que los anticuerpos frente a los flagelos producen un entrecruzamiento con ellos, que origina un aglutinado ligero y rápido.

Las reacciones de aglutinación directa se emplean también en los bancos de sangre para determinar los grupos sanguíneos. Existen diferentes métodos para detectar los anticuerpos que aglutinan los eritrocitos (v. el capítulo 24).

REACCIONES DE AGLUTINACIÓN INDIRECTA

Las reacciones de aglutinación indirecta utilizan células tratadas o partículas inertes recubiertas de antígeno que actúan como portadores pasivos, como los eritrocitos humanos, los de oveja o los de pavo, y las partículas inertes de látex o bentonita. Los antígenos se adsorben o acoplan de forma covalente a la superficie. Los polisacáridos y algunos antígenos proteínicos, como la albúmina y los derivados de proteína purificada (PPD), se adsorben con facilidad sobre la superficie de las partículas, mientras que otros antígenos requieren para poder adsorberse el tratamiento previo de las partículas. Las células se tratan incubándolas con ácido tánico o cloruro crómico, que modifican la superficie celular.

Las pruebas de aglutinación indirecta se realizan generalmente en placa. Este tipo de aglutinación se ha utilizado en los laboratorios clínicos para determinar el factor reumatoide y las pruebas reagínicas de serología luética (VDRL) para diagnosticar la sífilis.

PRUEBAS DE ANTIGLOBULINA

Las pruebas de antiglobulina o pruebas de Coombs (v. el capítulo 24) son reacciones de aglutinación que permiten detectar anticuerpos incompletos de la clase IgG, incapaces de producir aglutinación, ni siquiera después de unirse a superficies particuladas. En las pruebas de antiglobulina, la aglutinación se consigue añadiendo un suero contraimmunoglobulina (reactivo de Coombs), que produce la formación de puentes entre las partículas que llevan el antígeno y el anticuerpo. Hay varios tipos de reactivo de Coombs, que se obtienen inyectando suero humano o alguna de sus fracciones purificadas en animales. La inyección del suero humano completo produce un suero de Coombs, denominado de amplio espectro, mientras que la inyección de fracciones purificadas produce sueros de Coombs de especificidad limitada (anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA, anti-C3, anti-C3b, etc.).

INHIBICIÓN DE LA AGLUTINACIÓN

Las pruebas de inhibición de la aglutinación son adaptaciones de las reacciones de aglutinación que permiten detectar y cuantificar antígenos solubles.

Puede inhibirse la aglutinación de eritrocitos (hemaglutinación) o la de partículas de látex. Cuando se incuba el anticuerpo con la disolución que contiene el antígeno, este se liga a los lugares de unión del anticuerpo. A continuación, se añaden las partículas recubiertas de antígeno. Si no hay aglutinación, será porque los lugares de combinación del anticuerpo están saturados y no será posible unir los antígenos particulados y la aglutinación.

REACCIONES DE PRECIPITACIÓN

La reacción de precipitación antígeno-anticuerpo puede realizarse en un medio líquido o en uno sólido, como un gel de agarosa, que impedirá la mezcla convectiva del antígeno y el anticuerpo y asegurará el establecimiento de gradientes de concentración entre los dos reactantes. Diversas técnicas inmunológicas utilizan la precipitación para caracterizar y cuantificar antígenos y anticuerpos. La inmunodifusión doble, la inmunodifusión radial, la inmunoelectroforesis, la inmunoelectroforesis bidimensional, la inmunoelectroforesis en contracorriente, la inmunofijación, la transferencia Western y la transferencia puntual utilizan la precipitación en geles. La inmunonefelmometría y la inmunoturbidimetría emplean la precipitación en un medio líquido.

INMUNODIFUSIÓN DOBLE

La inmunodifusión doble es una técnica cualitativa para detectar proteínas. Para realizar la prueba se colocan el antígeno y el anticuerpo en dos pequeños pocillos hechos sobre un soporte, como una placa de agar. Ambos se difunden de forma radial en el gel, uno hacia el otro, y se produce un gradiente de concentración (fig. 29-2). Cuando se ponen en contacto, aparece una línea de precipitación en el punto de equivalencia antígeno-anticuerpo. La forma de la línea de precipitación y su posición dependen de la concentración y del tamaño del antígeno y del anticuerpo. Un espécimen que contenga varios antígenos dará lugar a muchas líneas de precipitación.

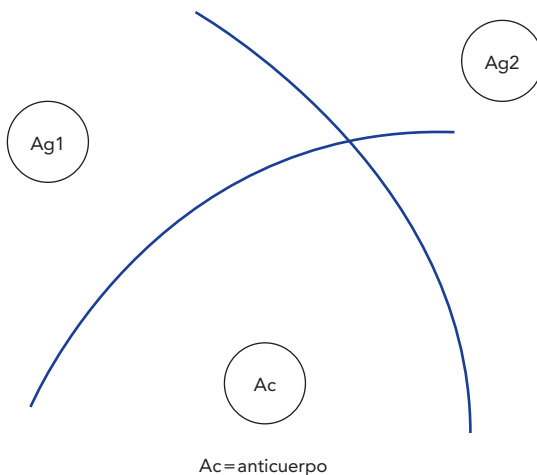


FIGURA 29-2

Arcos de precipitación obtenidos en un sistema de inmunodifusión doble en el que se utilizan dos antígenos, Ag1 y Ag2. Ac, anticuerpo.

La técnica de Ouchterlony permite analizar las relaciones entre dos antígenos según las formas de las líneas de precipitación (fig. 29-3). Se producen tres tipos de patrones: de identidad, de semiidentidad y de disparidad. El patrón de identidad se obtiene con antígenos que contienen determinantes antigénicos idénticos y las líneas de precipitación se fusionan y se hacen continuas. El patrón de semiidentidad se forma cuando los antígenos están relacionados, aunque no son idénticos, de forma que las líneas de precipitación se fusionan en un punto de corte, formando una especie de espolón. Finalmente, si los antígenos son diferentes y el pocillo de los anticuerpos contiene un anticuerpo para ambos antígenos, se obtendrá el patrón de disparidad, en que las líneas de precipitación se entrecruzan. La posición relativa de la línea de precipitación proporciona una estimación de la concentración del antígeno; cuanto más concentrada está la solución de este, más lejos del pocillo del antígeno se formará dicha línea.

La forma de la línea de precipitación puede dar una estimación grosera de la masa molecular relativa de una proteína globular antigénica. Los antígenos con masas moleculares relativas semejantes a las de las IgG (150.000 Da) dan líneas de precipitación rectas, mientras que los antígenos que tienen masas moleculares superiores a 150.000 Da dan líneas que se dirigen hacia el pocillo del antígeno, y los antígenos con masas moleculares menores de 150.000 Da dan líneas de precipitación hacia el pocillo del anticuerpo.

INMUNODIFUSIÓN RADIAL

La inmunodifusión radial es un método de difusión pasiva en el que se establece un gradiente de concentración para el antígeno, y el anticuerpo está disperso de forma uniforme en la matriz del gel. Para realizarla, se deja que el antígeno se difunda desde un pocillo dentro del gel hasta que se alcance un exceso de antígeno y tenga lugar la precipitación. La interacción antígeno-anticuerpo se manifiesta por un anillo bien definido de precipitación alrededor del pocillo del antígeno. El diámetro del anillo de precipitación es directamente proporcional a la concentración de antígeno del espécimen. Utilizando patrones de una concentración de antígeno conocida se obtendrá una curva de calibración que permitirá cuantificar los especímenes problema. La inmunodifusión radial se utilizó mucho durante los años setenta y primeros de los ochenta para cuantificar proteínas específicas. En la actualidad, su uso ha descendido y se emplea fundamentalmente en laboratorios pequeños con un número de muestras bajo.

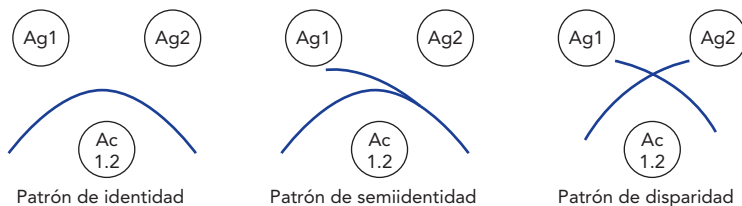


FIGURA 29-3 Patrones de inmunodifusión doble.

INMUNOELECTROFORESIS

La inmunolectroforesis es una técnica que combina la especificidad de las reacciones de inmunoprecipitación con la separación de moléculas por electroforesis en un medio de cribado molecular. Como en la inmunodifusión radial, se establece un solo gradiente de concentración, pero aquí se aplica un campo eléctrico para llevar el antígeno desde el pocillo de aplicación en una suspensión homogénea del anticuerpo en el gel. En cambio, de forma opuesta a la inmunodifusión radial, este procedimiento produce una migración unidireccional del antígeno, lo que proporciona una sensibilidad mayor. Otra ventaja añadida sobre la inmunodifusión es su mayor rapidez, ya que, mientras que en las técnicas que usan esta el antígeno y el anticuerpo se ponen en contacto y precipitan mediante procesos de difusión pasiva, en la inmunolectroforesis se acelera la puesta en contacto merced a la migración electroforética.

Esta técnica se utiliza como procedimiento cualitativo para identificar proteínas, principalmente los incrementos monoclonales de las inmunoglobulinas en los líquidos biológicos. La inmunolectroforesis se realiza en dos fases. En la primera se separan por electroforesis, de acuerdo con su carga, las sustancias antigénicas presentes en el medio que se analiza. La segunda fase consiste en la caracterización inmunológica de cada una de las proteínas separadas. Para ello, se deja que se difunda un antisuero, general o específico, para la proteína que quiera identificarse. Al difundirse el antisuero por el gel, se produce la reacción antígeno-anticuerpo, que se visualiza por la precipitación de los complejos inmunitarios (fig. 29-4). Los arcos de precipitación pueden comprobarse directamente o bien teñirse con colorantes de proteínas. El número de arcos y su disposición se usan para determinar los antígenos de la mezcla. Comparando los resultados del espécimen problema con un patrón conocido, pueden identificarse las sustancias antigénicas del problema. La inmunolectroforesis se realiza utilizando como soporte acetato de celulosa o geles de poliacrilamida, almidón, agar o agarosa. Mediante esta técnica se han identificado muchas proteínas del suero sanguíneo y otros líquidos biológicos.

INMUNOELECTROFORESIS EN CONTRACORRIENTE

La inmunolectroforesis en contracorriente se realiza en gel de agar a un pH al que los anticuerpos tengan carga negativa y los antígenos, carga positiva. Estos migran en el gel hacia el polo negativo, mientras que aquellos lo hacen

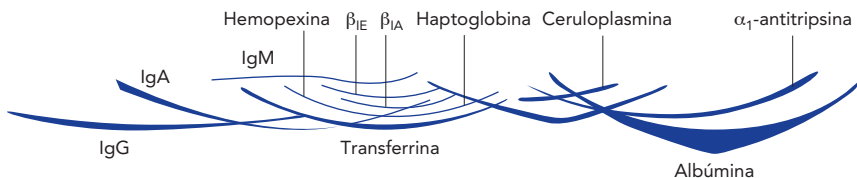


FIGURA 29-4 Arcos de precipitación obtenidos por inmunolectroforesis de un suero humano y un antisuero general.

hacia el polo positivo. La inmunolectroforesis en contracorriente se utiliza para detectar antígenos bacterianos en la sangre, la orina o el líquido cefalorraquídeo, y para detectar autoanticuerpos.

ELECTROINMUNODIFUSIÓN

En la electroinmunodifusión se somete los antígenos a una electroforesis en un gel que contiene el anticuerpo. Los antígenos se colocan en pocillos en el gel de agar del anticuerpo. El pH del gel es tal que los anticuerpos permanecen inmóviles mientras que los antígenos tienen carga negativa. Se forman precipitados en forma de cohetes (*rockets*) cuya altura es proporcional a la concentración de antígeno (fig. 29-5).

INMUNOFIJACIÓN

La inmunofijación es una técnica inmunoquímica para identificar proteínas. En su desarrollo se realiza, en primer lugar, una electroforesis en gel de agarosa en una dimensión para separar las proteínas de la mezcla. Luego, se dispersa el anticuerpo directamente sobre el gel, lo que hace que precipite la proteína que quiere detectarse. El precipitado inmunitario queda atrapado en la matriz del gel y las demás proteínas que no han precipitado pueden eliminarse lavando el gel. Este puede teñirse para identificar las proteínas. La inmunofijación se utiliza mucho hoy en día para identificar proteínas de mieloma.

TRANSFERENCIA WESTERN

En la transferencia Western, las proteínas se separan mediante electroforesis en gel de almidón o gel de poliacrilamida, y posteriormente se transfieren a

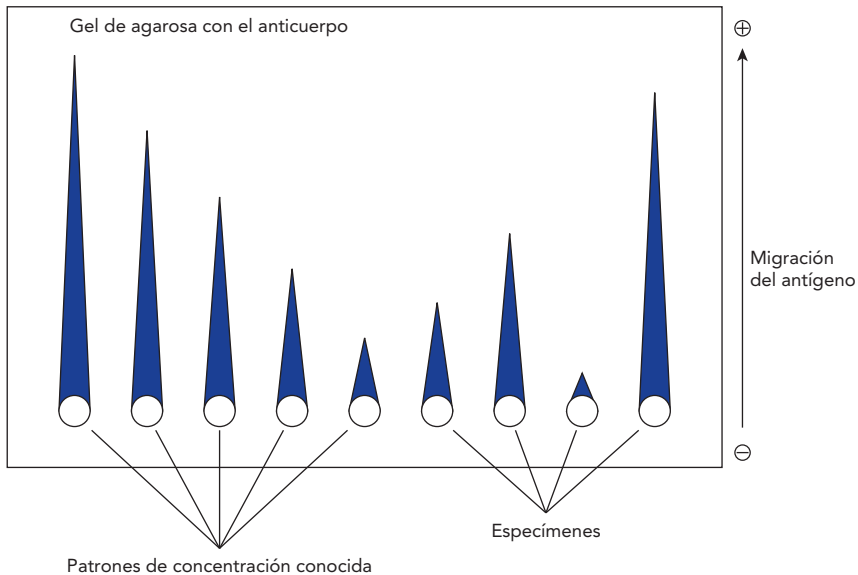


FIGURA 29-5 Electroinmunodifusión.

una membrana de nailon donde se fijan por adsorción. Luego, se incuban con sondas de anticuerpo marcadas con isótopos radiactivos, enzimas o compuestos fluorescentes. La transferencia Western se utiliza para detectar autoanticuerpos.

TRANSFERENCIA PUNTUAL

Es semejante a la transferencia Western, pero sin el paso de electroforesis. Las proteínas se fijan en la membrana en forma de punto. La membrana se incuba con un anticuerpo marcado específico del antígeno.

INMUNOTURBIDIMETRÍA E INMUNONEFELOMETRÍA

La inmunoturbidimetría y la inmunonefelometría son técnicas muy adecuadas para medir la tasa de formación *in vitro* de complejos inmunitarios. Cuando un antígeno y un anticuerpo dirigido contra él se unen en solución forman rápidamente pequeños agregados que confieren a la solución un aspecto turbio. Los agregados se asocian después lentamente y forman una matriz mayor que, finalmente, dará lugar a un precipitado. La reacción inicial entre el antígeno y el anticuerpo es rápida, mientras que la formación de los pequeños complejos capaces de dispersar la luz es lenta. La agregación puede acelerarse añadiendo al medio un polímero insoluble como el polietilenglicol 6.000. El polímero produce un aumento de la dispersión de la luz y un descenso del tiempo de reacción diez veces superior.

La cantidad de luz dispersada depende del tamaño, la cantidad y el índice de refracción de las especies dispersantes, por lo que un aumento de cualquiera de estos parámetros debe producir mayor sensibilidad. Una posibilidad es unir partículas de látex a los antígenos o a los anticuerpos, lo que daría lugar a los llamados inmunoanálisis potenciados. El tamaño de las partículas de látex usadas en los inmunoanálisis potenciados es de entre 100 y 300 nm. De esta manera, los agregados que se forman adquieren grandes tamaños y la dispersión se hace muy asimétrica y es máxima a pequeños ángulos de medida. Con los inmunoanálisis potenciados se obtienen aumentos de la sensibilidad de entre 50 y 1.000 veces. Sin embargo, las interferencias de los especímenes limitan la sensibilidad al tener que realizar diluciones.

Los métodos de dispersión de luz para cuantificar las reacciones antígeno-anticuerpo deben proporcionar formas para detectar el exceso de antígeno. La cinética de la formación de complejos inmunitarios medida por nefelometría o turbidimetría es lo bastante diferente en las tres fases (exceso de anticuerpo, equivalencia y exceso de antígeno) como para que puedan desarrollarse algoritmos de ordenador para detectar automáticamente el exceso de antígeno.

Las técnicas nefelométricas y turbidimétricas se usan sobre todo para determinar proteínas específicas. Se han aplicado para la determinación de inmunoglobulinas, proteínas del complemento, apolipoproteínas, proteínas de fase aguda, proteínas de la coagulación y marcadores tumorales. La nefelometría y la turbidimetría se han aplicado también para determinar fármacos y hormonas.

Los inmunoanálisis con reactivos marcados utilizan moléculas llamadas indicadores o trazadoras que, unidas al reactivo antígeno o anticuerpo, muestran que ha tenido lugar una reacción inmunitaria antígeno-anticuerpo. Este tipo de inmunoanálisis consta de dos fases: una en que se produce la reacción inmunológica entre el antígeno y su anticuerpo específico, y otra en que se determina el marcaje. Los principales marcajes son los isótopos radiactivos, las enzimas, los compuestos fluorescentes y los compuestos luminiscentes.

Los principales factores que determinan la adecuación de un compuesto marcador son su actividad específica, la facilidad de marcaje, la facilidad de determinar el punto final, los posibles peligros de su uso y la posibilidad de diseñar pruebas homogéneas.

La *actividad específica* es la actividad del marcador por unidad de masa. Que la actividad específica sea elevada es esencial para desarrollar pruebas con límites de detección bajos. La actividad específica de un marcador de inmunoanálisis está relacionada con la fracción disponible para su determinación, el grado de amplificación y la eficacia de la determinación.

Los *radioinmunoanálisis* son técnicas muy sensibles, ya que la emisión radiactiva se detecta con gran eficacia, a pesar de que durante el recuento sólo se emite una pequeña fracción del isótopo radiactivo y no puede amplificarse la señal.

Respecto a los *enzimoinmunoanálisis*, son técnicas muy versátiles en muchos aspectos, aunque la detección de las enzimas, o mejor dicho, de sus productos, es muchas veces poco eficaz.

En los *fluoroimunoanálisis*, todas las moléculas fluorescentes marcadoras se excitan y además pueden hacerlo repetidamente, por lo que se produce una amplificación. Por este motivo, estas técnicas son muy sensibles, si bien puede haber interferencias por la fluorescencia propia del espécimen.

En los *luminoimunoanálisis*, las moléculas luminiscentes emiten sólo una vez y se detectan con menor eficacia que los isótopos radiactivos; no obstante, todas las moléculas emiten y se detectan. Por esta causa, los luminoimunoanálisis son muy sensibles.

INMUNOANÁLISIS HOMOGÉNEOS Y HETEROGÉNEOS

De acuerdo con la necesidad de separar las fracciones ligada y libre, los *inmunoanálisis* con reactivos marcados se clasifican en homogéneos y heterogéneos. Los inmunoanálisis homogéneos son aquellos en los que el compuesto marcado se comporta de forma diferente según esté o no unido a su contrapuesto inmunitario, por lo que no requieren la separación física de las sustancias reaccionantes en dos fracciones, la ligada y la libre. Los inmunoanálisis homogéneos ideales necesitan que la unión entre el antígeno y el anticuerpo afecte la modulación de la señal de marcaje al 100%. En la práctica, esto es difícil de conseguir y el resultado es que los análisis que no requieren la separación son generalmente menos sensibles que los inmunoanálisis con separación.

Los inmunoanálisis heterogéneos son aquellos en los que el compuesto marcado se comporta de forma análoga, esté o no unido a su parte contraria

en la reacción inmunológica, y por tanto exigen la separación de las fracciones ligada y libre.

Los principales métodos para separar estas fracciones son la adsorción, la precipitación, el uso de dos anticuerpos y los soportes sólidos. Los primeros inmunoanálisis con reactivos marcados utilizaban a este efecto la adsorción sobre materiales insolubles, como el carbón activo, el silicato magnésico y las resinas de intercambio iónico, a los que se une la fracción libre. Posteriormente, se emplearon las técnicas de precipitación, que utilizaban precipitantes de proteínas, como el sulfato amónico, el etanol y el ácido perclórico, que precipitaban la fracción ligada. Asimismo, durante años se usó otro anticuerpo para precipitar la fracción unida. En la actualidad, para separar las fracciones ligada y libre, la mayoría de los inmunoanálisis heterogéneos utilizan soportes sólidos, como las bolas, las placas de microtitulación, los tubos o las micropartículas magnéticas.

INMOVILIZACIÓN DE LOS REACTIVOS SOBRE LAS FASES SÓLIDAS

Los reactivos pueden inmovilizarse sobre la fase sólida por medio de cuatro procedimientos generales: *a)* adsorción pasiva; *b)* enganche covalente a las fases sólidas funcionalizadas; *c)* inmovilización inmunológica, y *d)* otros métodos de enganche no covalentes ni adsorbentes. Entre estos últimos se incluyen la inmovilización a través de uniones de estreptavidina-biotina y el uso de proteínas de unión de inmunoglobulinas de bacterias, como la proteína A.

ADSORCIÓN

La adsorción pasiva es la más empleada para los inmunoanálisis en placas de microtitulación, mientras que para los lechos hidrófilos o los de poliestireno funcionalizados se usa el enganche covalente. La adsorción de proteína sobre superficies sintéticas fue utilizada por vez primera para un inmunoanálisis en 1967. Se produce la saturación cuando se adsorbe una capa de proteína. La saturación con anticuerpos de tipo IgG se produce añadiendo alrededor de 1.000 ng/200 µl en una placa de microtitulación. La mayoría de los anticuerpos de captura también alcanzan su mejor funcionamiento cuando se adsorben a esta concentración.

SISTEMA AVIDINA-BIOTINA

El sistema avidina-biotina se emplea para mediar entre uno de los miembros del sistema primario de reconocimiento (el anticuerpo o el antígeno) y otro componente del sistema de inmunoanálisis (el soporte sólido o el grupo reportero). De esta manera, se aumentan las prestaciones del sistema de inmunoanálisis.

El uso del sistema avidina-biotina en los inmunoanálisis puede dividirse en dos categorías principales. Por una parte, la avidina puede insertarse en el protocolo de inmunoanálisis para mediar entre el grupo reportero o la sonda y el anticuerpo primario o el antígeno. Y por otra, puede inmovilizarse sobre la fase sólida para mejorar las características del sistema de captura.

La aplicación del sistema avidina-biotina se debe a su elevada constante de afinidad. Además, la avidina se presenta en disolución principalmente como tetrámero, por lo que tiene cuatro lugares de unión de biotina por molécula. Por otro lado, pueden unirse muchas moléculas de biotina a cualquier proteína. De este modo, se tienen muchas moléculas de biotina sobre el anticuerpo o proteína que pueden interactuar de forma no covalente, aunque muy fuerte, con los cuatro lugares de unión de la avidina. Este fuerte entrecruzamiento no covalente entre los componentes da lugar a la potenciación de la interacción primaria.

Otro posible uso del sistema avidina-biotina es como sistema universal de captura a través de un anticuerpo biotinilado unido a la proteína A de anclaje o a un segundo anticuerpo, inmovilizados sobre una matriz que contenga avidina.

La estreptavidina, que tiene una afinidad por la biotina comparable a la de la avidina, está sustituyendo a esta, que tiene un gran número de cargas positivas. La estreptavidina es menos básica y no posee residuos de hidratos de carbono, por lo que disminuyen las reacciones no específicas con grupos ácidos o con lectinas.

El sistema avidina-biotina se ha aplicado como un sistema de detección mejorado en todos los principales tipos de inmunoanálisis, tanto competitivos como de dos lugares. Asimismo, puede emplearse en formatos homogéneos y heterogéneos. En los inmunoanálisis, los anticuerpos biotinilados reaccionan con el antígeno y luego se añade la avidina ligada al sistema reportero (isótopo radiactivo, enzima, compuesto fluorescente o compuesto luminiscente). En los últimos años se ha trabajado más en el sistema avidina-biotina como mecanismo de captura que de detección.

CLASES DE INMUNOANÁLISIS SEGÚN LA DISPONIBILIDAD DEL REACTIVO

De acuerdo con la disponibilidad del reactivo, los inmunoanálisis pueden ser de reactivo limitado (inmunoanálisis competitivos) o de reactivo en exceso (inmunoanálisis no competitivos).

INMUNOANÁLISIS CON EL REACTIVO LIMITADO

En los inmunoanálisis cuyo reactivo está limitado se utiliza una cantidad limitada de anticuerpo, insuficiente para unir todo el antígeno, a fin de determinar qué cantidad de este está presente. En este tipo de pruebas, una cantidad fija de antígeno marcado compite con el antígeno sin marcar del espécimen por el número limitado de lugares de unión del anticuerpo. La concentración del antígeno sin marcar puede determinarse a partir de la proporción del antígeno marcado que está unido al anticuerpo o del que permanece libre. Es fundamental que las cantidades de antígeno marcado y de anticuerpo se mantengan constantes, de forma que la cantidad de antígeno marcado unido (o libre) pueda compararse con una serie de calibradores para obtener un resultado cuantitativo. En la figura 29-6 se presentan diversas configuraciones de dos inmunoanálisis competitivos, uno simultáneo y otro secuencial.

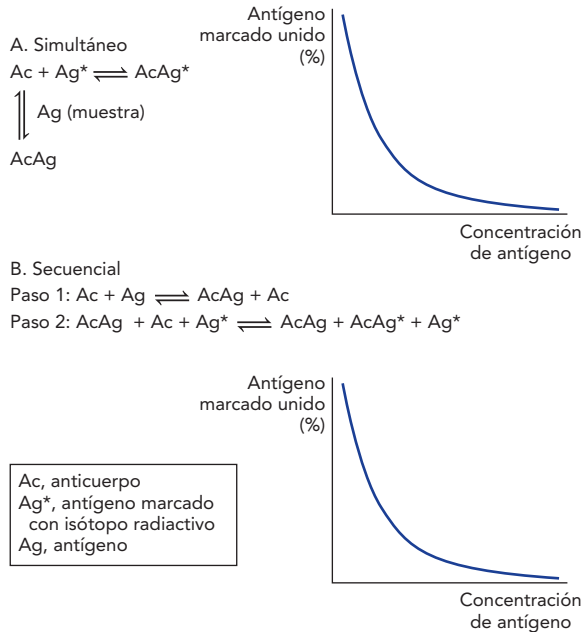


FIGURA 29-6 Inmunoanálisis de tipo competitivo.

INMUNOANÁLISIS CON EL REACTIVO EN EXCESO

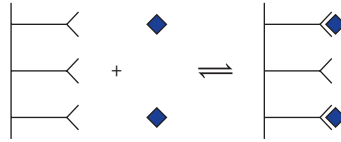
En los inmunoanálisis que tienen un exceso de reactivo, también llamados inmunoanálisis de dos lugares o «sándwich», el antígeno se une a un exceso de anticuerpo, que está ligado a una fase sólida. A continuación, se añade un segundo anticuerpo marcado que se une al antígeno a través de un segundo epítipo diferente. Posteriormente, se determina el marcaje unido, cuya concentración o actividad es directamente proporcional a la concentración del antígeno. En la figura 29-7 se presenta la configuración de un inmunoanálisis no competitivo con el reactivo en exceso.

SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y REACCIONES CRUZADAS

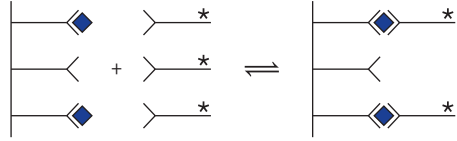
La sensibilidad analítica de los inmunoanálisis es muy variable. En general, los inmunoanálisis con reactivos marcados son más sensibles que los que utilizan reactivos sin marcar. Además, los de tipo heterogéneo son más sensibles que los de tipo homogéneo. Los inmunoanálisis con reactivos marcados de tipo heterogéneo son una de las técnicas analíticas más sensibles de las que disponen los laboratorios clínicos. En la tabla 29-1 se presentan los límites de detección de los principales tipos de inmunoanálisis.

Una de las características más importantes de las reacciones antígeno-anticuerpo es la especificidad. Sin embargo, un determinado antisuero específico puede reaccionar con un antígeno o antígenos diferentes del utilizado originalmente para la inmunización, fenómeno que se conoce como reacción cruzada. Estas reacciones normalmente son más débiles que la reacción homóloga correspondiente, y el antígeno homólogo muestra siempre mayor afinidad. La

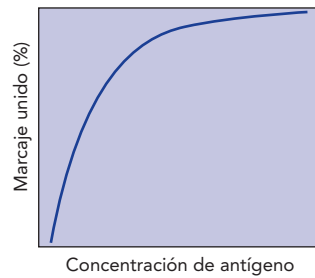
1ª inmunorreacción



2ª inmunorreacción



Medida del marcaje

**FIGURA 29-7**

Inmunoanálisis de tipo no competitivo.

reactividad cruzada puede variar a veces aun cuando se administre repetidamente un inmunógeno idéntico a un animal idéntico. Este tipo de reacciones tienden a producirse más fuertemente con los antisueros que muestren una afinidad mayor por los antígenos homólogos.

TABLA 29-1 Límites de detección de los principales inmunoanálisis

| Inmunoanálisis | Límite de detección |
|--|-------------------------------|
| Enzimoimmunoanálisis | 10^{-10} - 10^{-11} mol/l |
| Fluoroimmunoanálisis | 10^{-9} - 10^{-10} mol/l |
| Quimioluminoimmunoanálisis | |
| Luminol | 10^{-9} - 10^{-10} mol/l |
| Acridinio | 10^{-11} - 10^{-12} mol/l |
| Dioxetano | 10^{-21} - 10^{-23} mol/l |
| Fluorescencia de resolución de tiempo | |
| Enzimoimmunoanálisis con sustratos fluorescentes o quimioluminiscentes | 10^{-12} - 10^{-13} mol/l |
| Sistema de reciclado de enzimas | |
| Radioimmunoanálisis | |

INTERFERENCIAS

Existen numerosos factores que pueden afectar a los inmunoanálisis (tabla 29-2). La extensión del uso de estos ha hecho que se observen resultados anormales en los especímenes de determinados pacientes con ciertas características. Las *proteínas del plasma* son una fuente importante de interferencias que pueden producir uniones no específicas con los anticuerpos. No obstante, usar detergentes en los amortiguadores de dilución puede evitar estas uniones.

Los *anticuerpos heterófilos* son anticuerpos endógenos que se encuentran en los especímenes de suero o plasma de los pacientes y que pueden unir inmunoglobulinas de otras especies, incluidas las especies utilizadas para generar los anticuerpos como reactivos para los inmunoanálisis. La utilización de anticuerpos monoclonales de ratón como agentes en las técnicas de imagen y en la terapia del cáncer lleva a inducir en muchos pacientes anticuerpos humanos antirratón (HAMA). Se han señalado muchas interferencias por anticuerpos heterófilos, tanto en los inmunoanálisis competitivos como en los no competitivos.

Otras sustancias que pueden interferir son el complemento, los factores reumatoideos y las enzimas, que son contaminantes potenciales de las preparaciones de antígenos.

PROCEDIMIENTOS PARA TRATAR LOS DATOS DE LOS INMUNOANÁLISIS

En los inmunoanálisis no hay una relación simple entre la respuesta física del sistema analítico (señal) y la concentración del compuesto que hay que dosificar en el espécimen. Los inmunoanálisis presentan, en general, curvas de calibración no lineales. La representación gráfica de este tipo de curvas es engorrosa y se cometen muchos errores. Problema que se ha solucionado diseñando programas de ordenador basados en ajustes de curvas adecuados que permiten calcular rápida y fiablemente los resultados.

AJUSTE DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN

Los datos obtenidos pueden transformarse para ajustar mejor las curvas de calibración. A continuación se señalan las principales transformaciones que se realizan en el eje de respuesta (eje y) y en el eje de concentración (eje x):

TABLA 29-2 Factores que afectan a los inmunoanálisis

| |
|------------------------------|
| Endógenos |
| Turbidez |
| Lipemia |
| Anticuerpos heterófilos |
| Factores reumatoideos y C Iq |
| Autoanticuerpos |
| Exógenos |
| Fármacos |
| Anticoagulantes |

1. En el eje y (eje de respuesta):
 - a. Señal (cpm, absorbancia, etc.).
 - b. Unido = señal-blanco.
 - c. $B/B_0 = (\text{señal-blanco})/(\text{referencia-blanco})$.
 - d. $\text{LOGIT} = \ln [B/B_0/(1-B/B_0)]$.
Esta transformación se usa para linealizar la respuesta frente a la relación \ln (concentración). Todos los valores B/B_0 deben ser mayores de cero y menores de uno.
 - e. $\text{LOG } B$.
 - f. $B/T = (\text{señal-blanco})/(\text{TL-blanco})$.
 - g. B_0/B .
 - h. T/B .
 - i. $B/F = (\text{señal-blanco})/[\text{TL} - (\text{señal-blanco})]$.
 - j. F/B .
2. En el eje x (eje de concentración):
 - a. LIN. Concentración lineal, que significa que el valor no se ha transformado.
 - b. LIN/LOG. Ajuste lineal y expresión logarítmica.
 - c. LOGA. Concentración logarítmica.

MÉTODOS PARA AJUSTAR LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN

Los principales métodos para ajustar las curvas de calibración en los inmunoanálisis son estos:

Interpolación lineal punto a punto. Este método une puntos consecutivos con segmentos rectos. Se ha usado, sobre todo, cuando los sistemas de procesado de datos eran menos potentes. Aunque es simple y rápido, no es recomendable, ya que introduce grandes errores sistemáticos, sobre todo en las áreas curvadas.

Interpolación curvilínea. Es un método semejante al anterior, pero con la ventaja de representar la curva utilizando múltiples segmentos entre los puntos de calibración, que se colocan de forma que modifiquen progresivamente la pendiente de segmento a segmento. El número óptimo de segmentos entre dos puntos es cinco. Las ordenadas de estos puntos intermedios se obtienen mediando las pendientes. Alternativamente, se calculan a la derecha y a la izquierda aproximándose al centro, excepto para los segmentos extremos, que se calculan yendo hacia los extremos de la curva. Este método de cálculo es rápido y, generalmente, proporciona una buena gráfica.

Interpolación spline. En este método, la curva se construye con una sucesión de polinomios de tercer orden, cada uno de los cuales describe un segmento. La interpolación *spline* es un método ideal cuando se conocen exactamente los puntos. Se utiliza mucho en los inmunoanálisis.

DISEÑO DE LOS INMUNOANÁLISIS

Cuando se diseña y optimiza un inmunoanálisis se efectúan variaciones de los diferentes reactivos que se emplean con objeto de conseguir la mayor especificidad y una cinética adecuada, o para potenciar la estabilidad y luego adaptar el formato de análisis deseado a las condiciones de la prueba.

Está claro que muchas veces pueden alterarse las características de la interacción molecular para beneficiar al análisis. Y al contrario, también es posible afectar de forma adversa las características de un análisis si no se tiene cuidado con los efectos potenciales de la modificación del reactivo. En la tabla 29-3 se señalan los posibles efectos de la modificación del antígeno o del anticuerpo que se usan como reactivos en el funcionamiento de los inmunoanálisis.

Cuando se utilizan anticuerpos policlonales, los anticuerpos más afines son los que más contribuyen a la reacción observada. Las constantes de afinidad de los anticuerpos monoclonales están entre 10^6 y 10^{10} l/mol, que corresponden a constantes de velocidad de asociación de $k_a = 10^4$ - 10^6 l/mol·s, y de disociación de $k_d = 10^{-2}$ - 10^{-4} l/mol·s. Si en una prueba se emplean mezclas de anticuerpos monoclonales, tenderán a formarse complejos circulares de dos moléculas de anticuerpo y dos de antígeno, y esto conducirá a que aumente considerablemente la afinidad aparente de la reacción global.

Por lo que respecta a los *haptenos*, debe tenerse en cuenta que, al no ser inmunógenos, los anticuerpos contra el hapteno se obtienen siempre inmunizando a los animales con conjugados hapteno-portador. Además de reconocer al hapteno, los anticuerpos obtenidos así a menudo se dirigen también contra unos pocos residuos de la proteína portadora, o quizá contra el reactivo de acoplamiento empleado para preparar el conjugado.

Para controlar la actividad de los anticuerpos en los inmunoanálisis, es importante tener en cuenta las propiedades fisicoquímicas que estabilizan la estructura proteínica. Deben estudiarse bien parámetros como el pH, la fuerza iónica, la temperatura y la adición de agentes deshidratantes o disolventes orgánicos para favorecer la asociación o la disociación de los complejos antígeno-anticuerpo.

También hay que valorar los efectos de la adsorción de los antígenos proteínicos sobre los soportes de plástico, ya que tienden a desnaturalizarse parcialmente y pueden, por tanto, desaparecer epítomos específicos. En algunos casos se producen efectos beneficiosos, pues se ha visto que algunos anticuerpos reaccionan mejor con la proteína inmovilizada sobre una fase sólida que con la proteína nativa en disolución.

ESTANDARIZACIÓN DE LOS INMUNOANÁLISIS

Con frecuencia, los resultados obtenidos para una misma sustancia con distintos métodos de inmunoanálisis son muy diferentes. Esto se debe, básicamente,

TABLA 29-3 Efectos potenciales de la modificación del antígeno o del anticuerpo que se utiliza como reactivo en los inmunoanálisis

| | | |
|---|---|--|
| Purificación del antígeno | → | Destrucción del epítomo |
| Inmovilización del antígeno | → | Potenciación de la especificidad Destrucción de la especificidad |
| Inmovilización del anticuerpo | → | Potenciación de la cinética de reacción Destrucción del paratopo |
| Generación del fragmento del anticuerpo | → | Aumento de la unión inespecífica Aceleración de la cinética de reacción Destrucción de la unión del antígeno |

a que los inmunoanálisis no están estandarizados. El objetivo de estandarizar los métodos analíticos en los laboratorios clínicos es mejorar la comparabilidad de los resultados de los distintos laboratorios. La estandarización de los inmunoanálisis presenta problemas especiales.

REQUISITOS DE UN INMUNOANÁLISIS IDEAL

Un inmunoanálisis ideal requiere:

1. Un anticuerpo mono-específico de especificidad conocida. Como se ha señalado antes, una sustancia antigénica tiene, en general, muchos anticuerpos diferentes contra los distintos epítomos que posee. Cada uno de esos anticuerpos posee una constante de afinidad distinta para el antígeno. Con fines comparativos, lo ideal sería disponer de un solo anticuerpo específico contra esa sustancia. A pesar del enorme paso que supone la introducción de los anticuerpos monoclonales, cada fabricante de inmunoanálisis emplea su propio anticuerpo monoclonal.
2. Una especie molecular homogénea única, tanto en el espécimen como en el estándar, que se comporte de forma idéntica.
3. Un método analítico de medida sin interferencias.

REQUISITOS PARA LA TRANSFERIBILIDAD DE LOS RESULTADOS

Como consecuencia de lo indicado antes, para que se puedan transferir los resultados de los inmunoanálisis hace falta:

1. *Conseguir materiales de referencia adecuados.* Las proteínas plantean problemas para caracterizar la entidad química específica, lo que se debe a las siguientes circunstancias: heterogeneidad molecular, modificaciones de la molécula (oxidaciones, glucosilaciones e hidrólisis parciales) y alteraciones del estado físico de la molécula inducidas por la matriz.
2. *Lograr un procedimiento analítico adecuado.* Los inmunoanálisis tienen dos componentes fundamentales: el antígeno y el anticuerpo. Acto seguido, se señalan las principales dificultades que se encuentran en el diseño de los procedimientos analíticos:
 - Antígeno:
 - Entidad molecular no definida.
 - Compartición de determinantes antigénicos con otras moléculas.
 - Existencia de varios determinantes antigénicos.
 - Anticuerpo:
 - Policlonal.
 - Monoclonal.
3. *Calibración.* La calibración es una parte fundamental de los métodos analíticos, ya que en ella se produce la transferencia del valor de los estándares a las lecturas instrumentales. Por ello es fundamental la identidad del estándar y de la sustancia que se analiza en el espécimen. Con relación a las sustancias de bajo peso molecular, como las

hormonas tiroideas, los esteroides y los fármacos, los estándares para la calibración han de prepararse a partir de la sustancia químicamente pura (>99%) y la asignación del valor se hará por gravimetría o fotometría.

Para los polipéptidos y las proteínas de estructura conocida, los estándares se prepararán a partir de la molécula más pura de que se disponga y se asignará el valor por pesada o fotometría. Y en el caso de las proteínas cuya estructura se desconozca, se realizarán a partir de extractos purificados.

RADIOINMUNOANÁLISIS

Los inmunoanálisis que utilizan isótopos radiactivos pueden ser de dos tipos. El radioinmunoanálisis (RIA) es un inmunoanálisis heterogéneo con el reactivo limitado, mientras que el análisis inmunoradiométrico (IRMA) es un inmunoanálisis heterogéneo con reactivo en exceso o de tipo sándwich. En el RIA (fig. 29-8), se mezcla la sustancia que quiere medirse (antígeno, Ag) con una cantidad fija de la misma marcada con un isótopo radiactivo (Ag*) y con una cantidad limitada de un anticuerpo específico dirigido contra la sustancia que quiere medirse (Ac), unido a la fase sólida. Se produce la competencia entre el Ag y el Ag* por unirse al anticuerpo. Tras la incubación, se separan los antígenos unidos al anticuerpo (Ag-Ac y Ag*-Ac) de los libres (Ag y Ag*). Una vez separados, se mide la radiactividad de las fracciones unida y libre. Si se cuenta la radiactividad unida al anticuerpo, después del paso de separación, la curva de actividad frente a la concentración presenta una pendiente negativa, mientras que si se mide la radiactividad del ligando no unido, la curva presenta, por el contrario, una pendiente positiva.

En el IRMA (fig. 29-9), se une a una fase sólida un anticuerpo contra la sustancia que quiere medirse. Se añade el espécimen con el antígeno que se va a determinar y, tras el lavado, se añade un segundo anticuerpo marcado. Se incuba, y luego se lava y se cuenta la radiactividad.

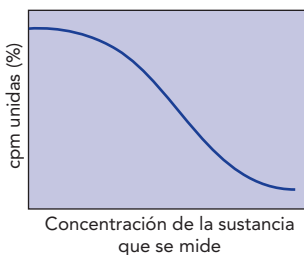
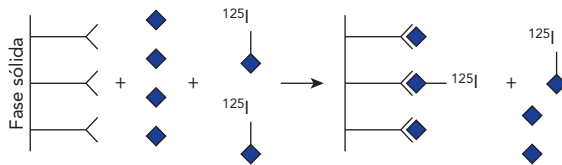


FIGURA 29-8

Radioinmunoanálisis de tipo competitivo que utiliza una fase sólida para la separación.

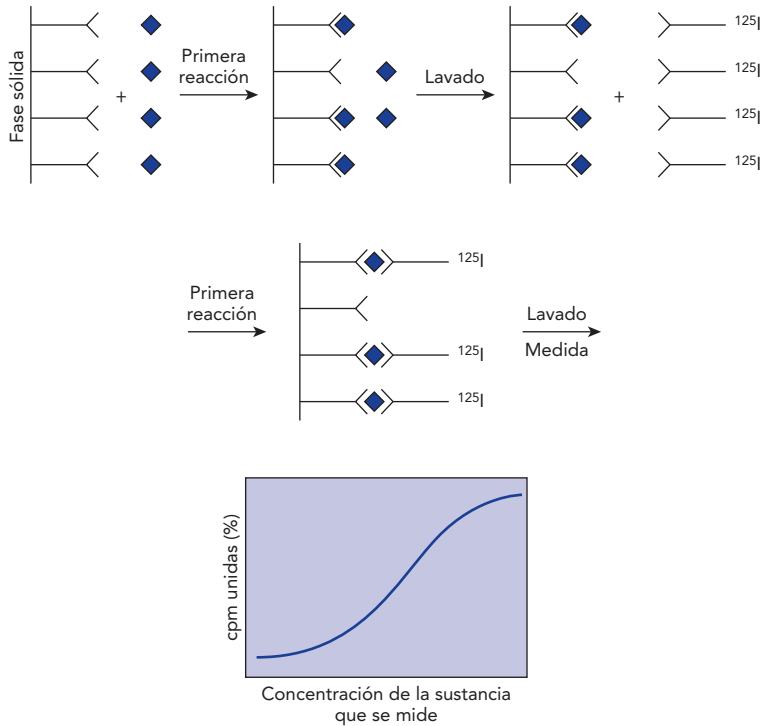


FIGURA 29-9 Análisis inmunoradiométrico (IRMA) de tipo sándwich.

CARACTERÍSTICAS DE LOS ISÓTOPOS COMO MARCADORES

Los isótopos utilizados para los radioinmunoanálisis deben tener una actividad específica elevada, una gran producción de energía, vidas medias adecuadas, ser fáciles de obtener y que no se acomplejen durante su acoplamiento a la molécula de ligando. Todos los emisores utilizados para el radioinmunoanálisis son de los tipos β o γ . Los isótopos más utilizados para esta clase de inmunoanálisis son el carbono 14 (^{14}C), el tritio (^3H) y el yodo 125 (^{125}I). Los dos primeros se emplean, fundamentalmente, cuando se pueden introducir al sintetizar la molécula (esteroides, fármacos y péptidos pequeños), mientras que el ^{125}I , que ha de fijarse luego a la molécula, se utiliza para moléculas grandes, como las proteínas, en las que se une a los restos de tirosina.

El ^{125}I tiene la ventaja de que con él pueden obtenerse actividades específicas mayores que con el ^3H o el ^{14}C . Sin embargo, una actividad específica muy elevada puede requerir unas concentraciones de yoduro tan grandes que afecten al antígeno o al anticuerpo y produzcan, por ende, cambios de la inmunoreactividad, como pérdidas de precisión, sensibilidad y especificidad.

MÉTODOS DE MARCAJE CON ISÓTOPOS RADIATIVOS

El método más habitual para marcar péptidos y proteínas con yodo radiactivo es la yodación de las moléculas de tirosina utilizando yodo libre producido por la oxidación suave del yoduro. Se incubaba la molécula que quiere marcarse con

yoduro sódico marcado (Na^{125}I) y a continuación se añade un oxidante, como la cloramina T o la lactoperoxidasa, para que se produzca el yodo libre. Transcurridos de 15 a 60 s, se detiene la reacción añadiendo metabisulfito sódico.

Las moléculas que no tienen tirosinas no pueden marcarse con yodo radiactivo directamente. En estos casos se utiliza un marcaje de conjugación, en el que se marca con el yodo radiactivo una molécula que contenga un grupo Adecuado y se conjuga con la molécula trazadora. Se emplea N-succinimidil-3-(4-hidroxifenil) propionato marcado con yodo radiactivo (fig. 29-10). Este compuesto reacciona con grupos amino primarios de la molécula trazadora formando un conjugado marcado radiactivamente. El marcaje de conjugación se emplea para moléculas pequeñas y permite incorporar un átomo de yodo radiactivo sin interferir con la unión del anticuerpo.

La característica fundamental de una sustancia marcada es su actividad específica. Cuanto mayor sea la sensibilidad requerida, mayor habrá de ser la actividad específica del compuesto marcado; sin embargo, un exceso de marcaje puede hacer que disminuya la actividad inmunológica del compuesto marcado. Suele considerarse óptimo un marcaje que incorpore como promedio un átomo de isótopo por molécula, sobre todo para el ^{125}I .

LÍMITES DE DETECCIÓN

La sensibilidad de todos los radioinmunoanálisis está restringida, principalmente, por la constante de equilibrio de la reacción antígeno-anticuerpo y por los errores técnicos del manejo de los reactivos (pipeteo y separación). El límite de detección de los RIA que utilizan ^{125}I es de 10^{-12} mol/l, y el de los que utilizan ^3H , de 10^{-10} mol/l. Con relación a los IRMA, su sensibilidad está limitada por la unión inespecífica y la afinidad del anticuerpo marcado, y la precisión de la separación. Para los IRMA que utilizan ^{125}I la sensibilidad es de 10^{-14} mol/l.

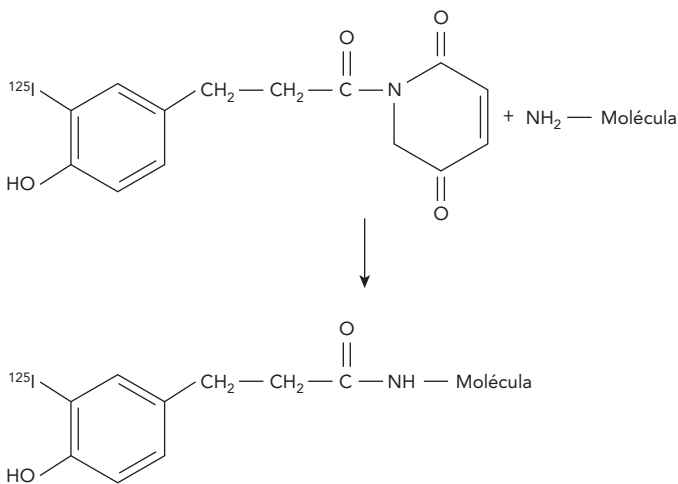


FIGURA 29-10 Marcaje de conjugación utilizando N-succinimidil-3-(4-hidroxi-5[^{125}I]yodofenil) propionato, que reacciona con el grupo amino libre de la molécula que quiere marcarse.

Los enzimoanálisis (EIA) utilizan las propiedades catalíticas de las enzimas para detectar y cuantificar las reacciones inmunológicas. Una sola molécula de enzima puede catalizar la conversión de millones de moléculas de sustrato en millones de moléculas de producto. Esta capacidad de amplificación hace posible detectar la presencia de una pequeña cantidad de enzima y, como consecuencia, de pequeñas cantidades de los complejos marcados formados.

CARACTERÍSTICAS DE LAS ENZIMAS PARA USARLAS COMO MARCADORES

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores de las reacciones que tienen lugar en las células. Como catalizadores, incrementan la velocidad a la que una reacción química se aproxima hacia el equilibrio, sin alterarse tras la reacción. La señal generada por una enzima puede ser la aparición de un producto o la desaparición de un sustrato de la reacción catalizada. Como una sola molécula de catalizador puede transformar muchas moléculas de sustrato en producto, repitiendo la acción catalítica una y otra vez, el catalizador actúa como un amplificador. Por ejemplo, las enzimas pueden catalizar la conversión de entre mil y un millón de moléculas de sustrato en producto/mol de enzima/min. Por esto, las enzimas pueden detectarse fácilmente en concentraciones muy pequeñas.

Las enzimas deben tener las siguientes características para que puedan utilizarse como marcadores en los inmunoanálisis:

1. Ser fáciles de obtener con un elevado grado de pureza y a bajo coste.
2. Poseer un alto recambio enzimático (moléculas de sustrato transformadas por unidad de tiempo).
3. Ser solubles.
4. Poseer una actividad específica elevada.
5. Ser estables en las condiciones de la prueba.
6. Ser de medición sencilla, sensible y rápida.
7. No encontrarse en el medio en que se van a medir, ni ser inhibidas por sustancias presentes en los líquidos biológicos.
8. No perder actividad con la conjugación.
9. Conservar la actividad en las condiciones de la prueba.

Las principales enzimas utilizadas en los EIA son la fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la β -galactosidasa.

UNIÓN DE LAS ENZIMAS MARCADORAS

Las enzimas se conjugan (acoplan) con el antígeno o el anticuerpo utilizando reactivos bifuncionales como el glutaraldehído. Este requiere que haya grupos amino de restos de lisinas reactivos en la enzima y en el anticuerpo. Los principales problemas que pueden surgir son la formación de dímeros de la enzima o del anticuerpo, y la pérdida de actividad enzimática e inmunológica.

Otro reactivo de acoplamiento es el peryodato. La oxidación con peryodato de los hidratos de carbono de algunas enzimas produce grupos aldehído que se combinan con los grupos amino de las inmunoglobulinas para dar bases de Schiff conjugadas, que pueden estabilizarse mediante reducción con borohidruro de sodio.

También se ha utilizado la *N,N'*-o-fenilendimaleimida para acoplar las enzimas a los anticuerpos por reacción con sus grupos sulfhidrilo. En cualquier caso, al acoplar la enzima debe tenerse especial cuidado para no destruirla o hacer que pierda actividad. Se aconseja elegir un lugar separado del lugar inmunógeno para el marcaje.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para determinar la actividad de la enzima marcadora pueden utilizarse diversos sustratos. Inicialmente, se utilizaron sustratos de las enzimas que producían compuestos medibles por espectroscopia de absorción molecular. Sin embargo, en los últimos años se están utilizando sustratos que dan compuestos fluorescentes o luminiscentes, lo que ha incrementado la sensibilidad de las pruebas.

En los enzimoanálisis, la actividad enzimática puede determinarse por métodos de punto final o por métodos cinéticos. En los primeros, una vez producida la inmunorreacción se añade el sustrato y se realiza una incubación durante un tiempo constante. Se detiene entonces la reacción y se mide la absorbancia, que señala la cantidad de producto formado. Estos métodos suponen que se genera una cantidad constante de producto durante el período de incubación y que, por tanto, dicha cantidad es directamente proporcional a la de enzima. En los métodos cinéticos, una vez producida la inmunorreacción, se añade el sustrato y se va determinando la variación de la absorbancia con el tiempo, que está relacionada con la cantidad de enzima presente.

La sensibilidad de los enzimoanálisis puede aumentarse mucho amplificando la actividad enzimática. En su forma más simple, el producto de la enzima marcadora es el sustrato de una segunda enzima que genera gran cantidad de producto. Así, el producto de la primera enzima actúa catalíticamente con la segunda enzima. Ejemplo de un sistema de amplificación enzimática que se emplea es el formado por la fosfatasa alcalina y la lactato deshidrogenasa (LDH). Como sustrato de la primera se utiliza nicotinamida adenindinucleótido fosfato oxidado (NADP^+), que se transforma en NAD^+ . La cantidad de NAD^+ producida en la reacción de la fosfatasa alcalina determina la actividad de LDH añadida en exceso. Debido a que cada molécula de fosfatasa alcalina produce muchos cientos de moléculas de NAD^+ , y a que cada NAD^+ puede ser responsable de la conversión de muchos cientos de moléculas secundarias de sustrato por la LDH, la actividad de fosfatasa original se amplifica mucho.

ENZIMOINMUNOANÁLISIS HOMOGÉNEOS

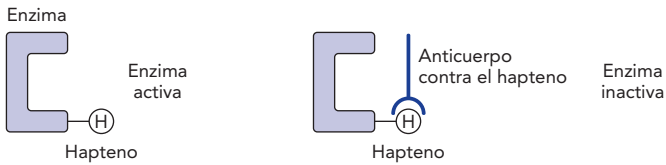
Los EIA homogéneos no requieren la separación de las fracciones ligada y libre. En este tipo de inmunoanálisis, el antígeno (hapteno) se acopla a la enzima y se utiliza la interacción anticuerpo-antígeno (hapteno) para inhibir o aumentar la actividad enzimática, por lo que no es necesario separar las fracciones ligada y

libre. Se han propuesto muchas clases de enzoinmunoanálisis homogéneos; los más empleados son la técnica de inmunoanálisis mediado por la enzima (EMIT) y el inmunoanálisis donador con una enzima clonada (CEDIA).

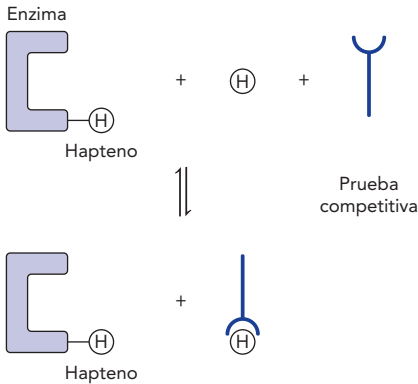
Técnica de inmunoanálisis mediado por la enzima

La EMIT sólo puede utilizarse para determinar moléculas de bajo peso molecular, y se ha aplicado para fármacos y hormonas de bajo peso molecular como la tiroxina. Es una técnica competitiva o de reactivo limitado (fig. 29-11). En ella, se marca con una enzima la sustancia que se desea determinar. Cuando la

A. Enzima activa e inactiva



B. Realización de la prueba



C. La actividad enzimática es directamente proporcional a la concentración del hapteno

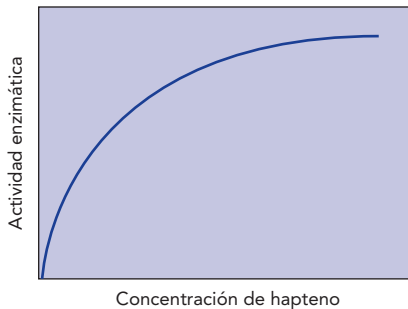


FIGURA 29-11 Técnica EMIT. La actividad de una enzima como marcador se inhibe por la unión del anticuerpo al hapteno (antígeno) conjugado con la enzima.

sustancia marcada se une a un anticuerpo específico contra ella, se produce la inhibición de la actividad de la enzima al impedirse que el sustrato acceda al centro activo. Para realizar la prueba, se mezcla el espécimen que contiene la sustancia que quiere medirse con una cantidad fija de la sustancia marcada con la enzima y una cantidad limitante de un anticuerpo específico contra la sustancia. Se produce la competencia entre la sustancia del espécimen y la marcada con la enzima por el anticuerpo, de forma que, cuanto mayor sea la cantidad de sustancia presente en el espécimen, menos cantidad de la marcada con la enzima se unirá al anticuerpo y la actividad enzimática será mayor. De esta manera, esta actividad es directamente proporcional a la concentración de la sustancia que se analice en el espécimen. La concentración de la sustancia que quiere medirse se calcula con una curva de calibración obtenida al analizar calibradores que contienen cantidades conocidas de la sustancia en cuestión.

Inmunoanálisis donador con una enzima clonada

La técnica CEDIA (fig. 29-12) se basa en el uso de la enzima β -galactosidasa, que se ha fraccionado mediante técnicas de ADN recombinante en dos fragmentos inactivos: uno aceptor grande y un polipéptido donador más pequeño. Aunque estos fragmentos son inactivos, pueden combinarse de modo espontáneo para dar la enzima activa.

La sustancia que quiere determinarse se liga covalentemente al polipéptido donador, de forma que no interfiera con la asociación espontánea con el fragmento aceptor para formar la enzima activa. La sustancia se sitúa en una posición del péptido donador en que su unión con anticuerpos específicos inhibe la reasociación de los fragmentos de la enzima. La sustancia presente en el espécimen compite por un número limitado de lugares de unión del anticuerpo, haciendo más disponible para la complementación el conjugado sustancia-donador. Así, la cantidad de enzima formada, que se mide por la tasa de hidrólisis del sustrato cromogénico, es directamente proporcional a la cantidad de sustancia presente en el espécimen.

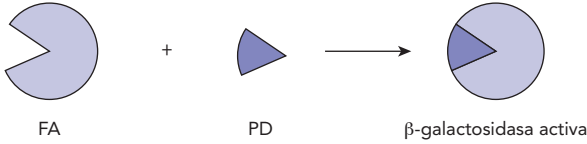
Un CEDIA característico se realiza en dos pasos. En el primero se añaden a la cubeta de reacción el espécimen y el reactivo 1 que contiene el aceptor enzimático y el anticuerpo. Se mezcla y se incuba a 37 °C. Durante la incubación, el ligando del espécimen se une a una cantidad limitada del anticuerpo presente. El aceptor enzimático no participa en la reacción.

En el segundo paso se añade el reactivo 2, que contiene el conjugado donador enzimático-ligando y el sustrato de la enzima. Se mezcla y se sigue la incubación. La cantidad de conjugado es aproximadamente igual al número de lugares de unión del anticuerpo. El conjugado puede unirse a los lugares de unión no ocupados del anticuerpo o reaccionar con un aceptor enzimático para formar la β -galactosidasa activa, según la cantidad de sustancia presente en la muestra. La cantidad de enzima formada se mide por la tasa de hidrólisis de sustrato, medida espectrofotométricamente al final del período de incubación.

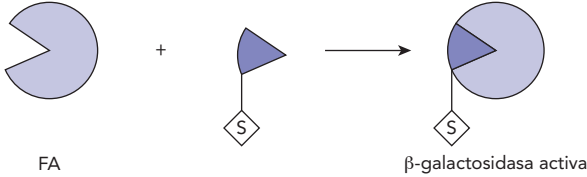
ENZIMOINMUNOANÁLISIS HETEROGÉNEOS

Los enzimoimmunoanálisis heterogéneos requieren separar las fracciones ligada y libre tras la reacción inmunológica antes de determinar la actividad

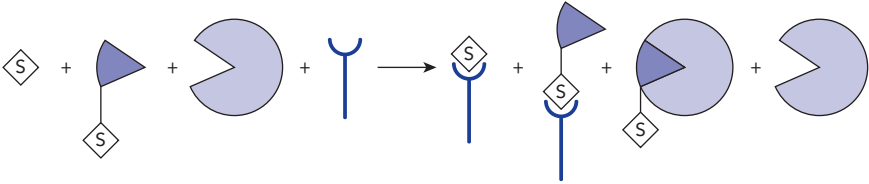
A. El fragmento aceptor (FA) se une con el polipéptido donador (PD) para dar la enzima activa



B. El FA se une al PD que lleva unido la sustancia que quiere medirse para dar la enzima activa



C. Realización de la prueba. La sustancia de la muestra y la sustancia unida al PD compiten por unirse a una cantidad limitada de anticuerpo



D. La actividad enzimática es directamente proporcional a la sustancia que se mide

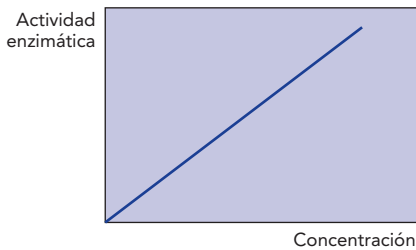


FIGURA 29-12 Técnica CEDIA.

enzimática, ya que la enzima se comporta de forma análoga en ambas fracciones. Los EIA heterogéneos son adecuados tanto para compuestos de bajo peso molecular como para sustancias de gran peso molecular, como las proteínas.

Las principales técnicas utilizadas para separar las fracciones ligada y libre en este tipo de EIA son la precipitación de la fracción unida por la adición de un exceso de un segundo anticuerpo, y los sistemas de fase sólida, en los que el anticuerpo se liga a una matriz insoluble, como la pared de un tubo, una

bola o una partícula magnética. El anticuerpo se une a la fase sólida por adsorción pasiva o por acoplamiento covalente con bromuro de cianógeno. A continuación se describen los principales EIA heterogéneos.

Análisis inmunosorbente con la enzima ligada

La técnica de enzimoimmunoanálisis llamada ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*: análisis inmunosorbente con la enzima ligada) se utiliza mucho en los laboratorios clínicos. En este tipo de pruebas, uno de los componentes de la reacción se adsorbe de forma inespecífica sobre la superficie de una fase sólida, como una placa de microtitulación, una partícula magnética o una bola de plástico. Esta forma de unión facilita la separación de las fracciones ligada y libre.

Los ELISA pueden ser competitivos o de tipo sándwich. En los competitivos, los anticuerpos contra la sustancia a analizar ligados a la fase sólida pueden unir tanto el antígeno de la muestra como el marcado con la enzima del reactivo. Como la concentración de anticuerpo anclado es pequeña, el antígeno del espécimen puede competir por los lugares de unión con el antígeno marcado del reactivo. Cuanto menor sea la concentración de la sustancia a analizar en el espécimen, mayor será la cantidad de antígeno marcado con la enzima que se une. Tras la incubación, las sustancias no unidas se separan mediante un lavado. La actividad enzimática es inversamente proporcional a la concentración de la sustancia que hay que analizar en el espécimen.

El ELISA sándwich puede realizarse en un solo paso o en dos. En el sistema de un solo paso, se incuban juntos el espécimen con el segundo anticuerpo marcado con la enzima, mientras que en el de dos, en el primer paso se une la cantidad total de la sustancia en el espécimen al anticuerpo que está en exceso y, en el segundo, se añade el segundo anticuerpo marcado con la enzima que se une a un segundo determinante antigénico en la sustancia a analizar unida al primer anticuerpo. En ambos casos, se forma un sándwich, y la actividad enzimática unida en el complejo antígeno-anticuerpo es directamente proporcional a la concentración de la sustancia que se cuantifica.

FLUOROINMUNOANÁLISIS

Los fluoroinmunoanálisis (FIA) utilizan para el marcaje los compuestos fluorescentes. Las características principales que deben tener estos compuestos para su uso en los FIA son:

1. Poseer una intensidad de fluorescencia elevada.
2. Que sea posible diferenciar su fluorescencia de la de fondo que producen las muestras biológicas.
3. Que su unión al antígeno o al anticuerpo no afecte de forma adversa sus propiedades.

Los compuestos fluorescentes más utilizados como marcadores en este tipo de inmunoanálisis son los derivados de la fluoresceína, la rodamina y la umbeliferona.

FLUOROINMUNOANÁLISIS HOMOGÉNEOS

Los fluoroinmunoanálisis homogéneos son los análisis en los que la reacción antígeno-anticuerpo altera significativamente las propiedades fluorescentes del marcador, de forma que es posible determinar la cuantía de la reacción de unión en cualquier momento a partir de la mezcla homogénea de reacción. Las principales desventajas de los FIA homogéneos respecto a los heterogéneos son su menor sensibilidad y los problemas relacionados con la presencia de compuestos fluorescentes endógenos y otras sustancias que extinguen la fluorescencia de la sonda marcada. Entre los compuestos séricos que contribuyen a que la fluorescencia de fondo sea significativa están las proteínas, el nicotinamida adeninucleótido reducido (NADH), las porfirinas y los fármacos. También es importante la elevada absortividad de los especímenes hemolizados y de los ictericos. Otro factor de interferencia es la unión de la sonda fluorescente a las proteínas del suero, que causa efectos significativos de extinción de la fluorescencia.

Los FIA homogéneos no requieren separar las fracciones ligada y libre, una vez producida la reacción inmunológica. Se han propuesto varias técnicas de FIA homogéneo; la mayoría son competitivas y se han desarrollado para medir compuestos de bajo peso molecular, como los fármacos y las hormonas derivadas de aminoácidos.

Inmunoanálisis de polarización de fluorescencia (FPIA)

Esta técnica se ha utilizado mucho en los laboratorios clínicos, principalmente en su forma automatizada, limitada a la determinación de moléculas de bajo peso molecular. Se basa en la cantidad de luz fluorescente polarizada que se detecta cuando el trazador, esto es, la sustancia unida a un compuesto fluorescente (fluoroporo), se ilumina con luz polarizada plana. El grado de polarización de la fluorescencia depende del giro del complejo fluoroporo-ligando en solución. Las moléculas pequeñas giran libremente y, en consecuencia, la luz fluorescente que emiten cuando se iluminan está polarizada. Por otro lado, las moléculas grandes, como las proteínas, giran más lentamente, lo que origina un mayor grado de polarización de la fluorescencia emitida al iluminarse. Cuando el trazador se une al anticuerpo, el giro del complejo es lento y la polarización de la fluorescencia, grande.

Como prueba competitiva, en el FPIA, la sustancia que quiere medirse, presente en la muestra, compete con la sustancia marcada con el compuesto fluorescente (trazador) por un número limitado de lugares de unión en el anticuerpo. Cuanto mayor sea la cantidad de la sustancia en el espécimen, menor será la cantidad de trazador unido al anticuerpo, y el valor de la polarización de la fluorescencia será bajo. La relación precisa entre la polarización de la fluorescencia y la concentración de la sustancia se establece midiendo un conjunto de calibradores de concentración conocida.

Para evitar el problema de las propiedades de unión con poca afinidad de la albúmina y otras proteínas que aumentan la polarización de forma inespecífica, se diluye el espécimen o se trata previamente con iones caotrópicos, enzimas proteolíticas, precipitantes de proteínas o disolventes. El FPIA se utiliza para medir fármacos de seguimiento terapéutico, rastrear drogas de abu-

so, medir algunas hormonas, como la tiroxina y el cortisol, e incluso algunas proteínas como la proteína C reactiva (PCR) y la creatina cinasa.

FLUOROINMUNOANÁLISIS HETEROGÉNEOS

El fluoroinmunoanálisis heterogéneo requiere separar las fracciones ligada y libre de la reacción inmunológica antes de medir la fluorescencia. Se ha propuesto un gran número de modalidades para determinar muchas sustancias que utilizan diversos soportes sólidos para la separación.

Fluoroinmunoanálisis de disociación aumentada por un lantánido

El fluoroinmunoanálisis de disociación aumentada por un lantánido (DELFA) utiliza un anticuerpo marcado con el quelato de un lantánido como el europio. En este quelato, el ión de europio es poco fluorescente, por lo que ha de utilizarse un reactivo especial para intensificar la fluorescencia. Al añadir la solución de intensificación, el ión de europio se disocia del quelato y pasa a la disolución, en la que forma un nuevo quelato, muy fluorescente, con los compuestos de la solución de intensificación de la fluorescencia. Esta solución sirve también para proteger el quelato de los efectos de apagado de las moléculas de agua.

Los quelatos de lantánido poseen tiempos de decaimiento largos (10-1.000 ms) tras la excitación, lo que permite medir la fluorescencia del lantánido después de que hayan desaparecido la interferencia de la luz dispersada y la fluorescencia natural de los materiales biológicos de vida corta (1-20 ns). Normalmente, la fluorescencia emitida por el quelato de lantánido se mide entre 400 y 500 ms, después de haber sido irradiado durante 1 μ s a 340 nm con una lámpara de xenón.

Otras ventajas de usar estos quelatos son:

1. Una desviación de Stokes grande (de 340 a 613 nm) y un pico de emisión muy estrecho, con un ancho de banda a la mitad de la intensidad de unos 10 nm. Estas características permiten que la prueba tenga una gran selectividad espectral.
2. Una región de excitación amplia, con un ancho de banda a la mitad de la intensidad de unos 50 nm, que proporciona una gran sensibilidad a la prueba, y una gran estabilidad e inercia biológica.

LUMINOINMUNOANÁLISIS

Los luminoimunoanálisis son inmunoanálisis que utilizan la luminiscencia para detectar la reacción antígeno-anticuerpo. La luciferasa se ha utilizado como enzima marcadora en algunos luminoimunoanálisis. Sin embargo, con frecuencia, la luciferasa se inactiva al preparar los conjugados.

Otra aplicación de la bioluminiscencia en el campo de los inmunoanálisis son los enzimoimunoanálisis. En estos, la reacción indicadora emplea un sustrato bioluminiscente. La enzima más utilizada es la fosfatasa alcalina y el sustrato, la luciferina-O-fosfato. La fosfatasa alcalina hidroliza este sustrato, y la luciferina resultante, en presencia de luciferasa, ATP y Mg^{2+} , da lugar a la luminiscencia.

La *quimioluminiscencia* se genera en algunas reacciones químicas de oxidación. Hay muchos tipos de moléculas, con características estructurales muy diversas, que producen quimioluminiscencia. Los más utilizados en los inmunoanálisis son el luminol, los ésteres de acridinio, las piridopiridacinas y los dioxetanos. El acoplamiento de las moléculas luminiscentes al ligando requerido dependerá de la naturaleza de las dos especies. Cuando ambas especies sean moléculas pequeñas, se emplearán métodos de síntesis de la química orgánica. Cuando haya que unir el compuesto luminiscente a una molécula grande, como una proteína, se usarán reactivos bifuncionales. Con las sales de acridinio es posible acoplar la molécula quimioluminiscente de forma que la especie que emite la N-metil acridona se disocie del resto de la molécula marcada antes de la emisión. Por su parte, con los dioxetanos se consigue una señal amplificada que permite alcanzar inmunoanálisis muy sensibles.

Como los demás inmunoanálisis con reactivos marcados, los luminoinmunoanálisis pueden ser homogéneos y heterogéneos. El límite teórico de detección de la luminiscencia es menor que el del marcaje isotópico. Asimismo, la luminiscencia es más sensible que las medidas convencionales de fluorescencia, ya que no hay una absorción inicial de luz y, por tanto, pueden realizarse las medidas frente a un fondo menor.

Un tipo especial de inmunoanálisis de luminiscencia es el de la *electroquimioluminiscencia*, en el que la luminiscencia se genera por la oxidación de un compuesto marcador de tris(bipiridil) de rutenio (II) en la superficie de un electrodo, en presencia de tripropilamina, para formar especies de rutenio (II) excitadas, que vuelven a su estado basal emitiendo luz a 620 nm. Los formatos de inmunoanálisis homogéneos explotan la diferente accesibilidad de los marcajes libre y unido a la superficie del electrodo, o el aumento de la señal electroquimioluminiscente del conjugado unido a un inmunoadsorbente micro-particulado.

ANALIZADORES AUTOMÁTICOS PARA INMUNOANÁLISIS

En la actualidad hay en el mercado un número elevado de analizadores automáticos para inmunoanálisis.

INMUNOANÁLISIS HOMOGÉNEOS

Los inmunoanálisis homogéneos se han automatizado con facilidad, ya que, al no requerir la separación de las fracciones ligada y libre resultantes de la reacción inmunológica, la incubación y la medida pueden tener lugar en la misma cubeta de reacción. Con relación a los enzimoimmunoanálisis homogéneos, la sencillez de su adaptación a los analizadores automáticos de química clínica ha hecho que prácticamente no se hayan producido analizadores automáticos específicos para estas técnicas. La EMIT se ha adaptado a la mayoría de los analizadores del mercado que permiten calibraciones no lineales con varios puntos, necesarias en esta técnica. El CEDIA se ha adaptado a varios analizadores automáticos para una gran diversidad de pruebas, entre ellas de fármacos, hormonas y proteínas específicas. Una ventaja del CEDIA, que hace muy fácil adaptarlo a los analizadores automáticos de bioquímica clínica, es que las calibraciones son lineales, por lo que sólo hacen falta dos estándares de cali-

bración. Además, esas calibraciones eliminan la inexactitud debida al ajuste de los perfiles dosis/respuesta por el ordenador, así como las imprecisiones producidas por las regiones planas de las curvas de calibración a concentraciones bajas y altas de la sustancia.

Los fluoroinmunoanálisis requieren que el analizador tenga un sistema específico de detección, por lo que, en la mayoría de los sistemas automáticos de bioquímica clínica, no es posible realizar los fluoroinmunoanálisis homogéneos. El principal sistema automático comercializado que utiliza un fluoroinmunoanálisis de este tipo es el TDX de Abbott, introducido en el mercado en 1981 y que se basa en la polarización de fluorescencia. Es un analizador de sobremesa que procesa las muestras por lotes. Como se ha señalado, el inmunoanálisis de polarización de fluorescencia sólo permite determinar moléculas de bajo peso molecular. El TDX es un sistema muy adecuado para determinar fármacos y hormonas derivadas de aminoácidos (tiroxina) y esteroideas (cortisol). A pesar de que han transcurrido muchos años desde su introducción, el sistema TDX todavía está en funcionamiento en muchos laboratorios.

Los reactivos para el TDX son estables durante largo tiempo siempre que se mantengan en las condiciones adecuadas. Asimismo, las curvas de calibración son muy estables. Un modelo de aparición posterior, el TDXFlex, permite realizar pruebas analíticas diferentes en un mismo carrusel durante la misma serie analítica. El analizador de bioquímica clínica Integra (de Roche) también puede realizar pruebas de polarización de fluorescencia.

INMUNOANÁLISIS HETEROGÉNEOS

Los principales requerimientos para la automatización de los inmunoanálisis heterogéneos son un analizador compacto con elevada velocidad de proceso, un panel de pruebas grande, la posibilidad de utilizar un tubo primario, una calibración duradera, acceso aleatorio y una gran seguridad desde el punto de vista de la contaminación biológica.

Los principales componentes de un analizador para inmunoanálisis heterogéneos son:

1. Dispositivo de carga de muestras.
2. Sistema de identificación de las muestras.
3. Dispositivo de toma y dispensación de las muestras.
4. Sistema de dispensación de reactivos.
5. Dispositivo de mezcla de muestras y reactivos.
6. Fase sólida.
7. Cubetas de reacción.
8. Baño de incubación.
9. Sistema de separación de las fracciones ligada y libre.
10. Sistema detector.
11. Amplificador y convertidor analógico/digital.
12. Procesador de datos, pantalla e impresora.

De todos estos componentes, los más característicos de los analizadores para inmunoanálisis heterogéneos son el tipo de fase sólida que emplea, el sistema lavador y el sistema de separación de las fracciones ligada y libre. Con

Tabla 29-4 *Analizadores automáticos para inmunoanálisis*

| |
|---|
| Abbott: AxSym Plus (1994); Architect i2000 (1998), i2000SR (2003), ci8200 (2003), i4000SR (2007), ci16200 (2007), i1000SR (2008) |
| Beckman Coulter: Access/Access 2 (2001); UniCel Dxl 300 Access (2003), 600 Access (2007) |
| BioMérieux: VIDAS (1989) |
| BIO-RAD: BioPlex 2200 (2006) |
| DiaSorin: LIAISON (1997); ETI-MAX 3000 (2007) |
| Grifols: Triturus (1999) |
| Olympus: AU3000i (2007) |
| Ortho: VITROS ECi (1997); VITROS 3600 (2009) |
| Roche: Elecsys 2010 (1996); Cobas e411 (2006); Cobas e601 (2006) |

relación a la fase sólida, las más empleadas son las placas de microtitulación, los tubos, las bolas, las partículas magnéticas y los materiales fibrosos. Por lo que hace al sistema de lavado, depende fundamentalmente del tipo de fase sólida empleada. El método para separar las fracciones ligada y libre puede ser mediante lavado de las placas o los tubos, la centrifugación axial, la filtración, la inmunocaptura, el empleo de imanes o la difusión y la capilaridad. Entre los sistemas de detección están los de absorbancia, reflexión, fluorescencia y luminiscencia. Debe mencionarse también que los analizadores para inmunoanálisis han de disponer de procesadores para ajustar los datos.

Un componente fundamental de los analizadores automáticos para inmunoanálisis es el sistema de gestión del aparato, que debe controlar la mayoría de los pasos del proceso total de análisis. El sistema debe ser fácil de manejar y permitir al técnico que lo use realizar de forma eficiente todas las funciones diarias cruciales.

La identificación de los especímenes debe realizarse mediante código de barras. Asimismo, el analizador debe estar conectado de forma bidireccional con el sistema informático del laboratorio; ha de disponer de un sistema de diagnóstico del mal funcionamiento que permita al operador resolver los problemas; y debe disponer de un sistema de comunicación mediante un módem que lo conecte con el fabricante.

El tiempo de incubación es fundamental, ya que es la etapa limitante que disminuye la cadencia de trabajo de los analizadores automáticos para inmunoanálisis. Algunos analizadores tienen tiempos de incubación fijos para todas las técnicas, mientras que en otros el tiempo de incubación varía según la técnica. En cualquier caso, los analizadores deben optimizar los tiempos de incubación para conseguir una gran cadencia de trabajo.

En la tabla 29-4 se proporciona una relación de los principales analizadores automáticos para inmunoanálisis que hay en el mercado.

Técnicas y métodos en autoinmunidad

INTRODUCCIÓN

El laboratorio de inmunología desempeña un papel importante en el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades autoinmunitarias. La determinación de autoanticuerpos ha aumentado de forma significativa en los últimos años. En este capítulo se presentan las principales técnicas y métodos que utilizan los laboratorios clínicos para el análisis de autoanticuerpos en las enfermedades autoinmunitarias.

ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS Y AUTOANTICUERPOS

Las enfermedades autoinmunitarias son un grupo heterogéneo de procesos que se caracterizan por la presencia de anticuerpos dirigidos contra componentes del propio organismo. Estas enfermedades pueden ser generalizadas o específicas de un órgano, y estar causadas por diferentes tipos de antígenos y distintas alteraciones inmunológicas. En la tabla 30-1 se señalan las principales enfermedades autoinmunitarias. Las *generalizadas* presentan autoanti-

TABLA 30-1 Principales enfermedades autoinmunitarias

Generalizadas

Enfermedades reumáticas

Lupus eritematoso sistémico

Síndrome de Sjögren

Esclerodermia

Artritis reumatoide

Polimiositis y dermatomiositis

Síndromes de solapamiento

Vasculitis

De vasos grandes: arteritis de células gigantes y arteritis de Takayasu

De vasos medianos: poliarteritis nudosa clásica y enfermedad de Kawasaki

De vasos pequeños: granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg-Strauss, poliangiitis microscópica, púrpura de Henoch-Schönlein, crioglobulinemia y vasculitis leucocitoclástica

Específicas de un órgano

Tiroides: tiroiditis autoinmunitaria y enfermedad de Graves

Suprarrenales: enfermedad de Addison

Páncreas: diabetes mellitus dependiente de insulina

Tubo digestivo: enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, gastritis atrófica, anemia perniciosa y colitis ulcerosa

Hígado: hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria y colangitis esclerosante primaria

Sistema nervioso: miastenia grave y esclerosis múltiple

Riñón: enfermedad de Goodpasture

Piel: pénfigo y dermatitis herpetiforme

cuerpos dirigidos contra moléculas nucleares o citoplasmáticas que participan en la replicación y la transcripción del ADN y la traducción del ARN mensajero. Algunas de las manifestaciones de estas enfermedades autoinmunitarias se deben a los efectos directos de esos autoanticuerpos, mientras que otras se deben a la acumulación de complejos autoinmunitarios antígeno-anticuerpo.

Las *enfermedades autoinmunitarias específicas de un órgano* presentan anticuerpos dirigidos contra componentes de un solo órgano o de órganos relacionados. A diferencia de las generalizadas, en las enfermedades específicas los autoanticuerpos normalmente son patogénicos. Los hallazgos clínicos en estas enfermedades varían de forma significativa, según el órgano afectado. Los principales autoanticuerpos que se determinan en el laboratorio clínico están señalados en la tabla 30-2.

LABORATORIO DE AUTOINMUNIDAD

El laboratorio constituye una ayuda muy importante para diagnosticar las enfermedades autoinmunitarias. En varias de las autoinmunitarias generalizadas, la presencia de ciertos autoanticuerpos en la sangre es uno de los criterios diagnósticos. En las enfermedades autoinmunitarias específicas de un órgano, detectar los autoanticuerpos es un dato fundamental para diagnosticar la enfermedad como autoinmunitaria. Algunos autoanticuerpos, además de su utilidad para el diagnóstico, son importantes para establecer el pronóstico.

En la actualidad, el laboratorio de autoinmunidad presenta un gran dinamismo debido al aumento constante de las pruebas diferentes que realiza a consecuencia del descubrimiento de nuevos autoanticuerpos y de la comprobación de su utilidad clínica. Asimismo, hay que atribuir directamente la evo-

TABLA 30-2 Principales autoanticuerpos en las enfermedades autoinmunitarias

Enfermedades reumáticas

Anticuerpos antinucleares (ANA): contra el ADN de cadena doble (ADNds), contra las histonas, contra el Sm (Smith), contra las UI RNP (antirribonucleoproteínas), contra Ro, contra La, contra el centrómero y contra Scl70

Vasculitis

Anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos (ANCA): contra la proteinasa-3 (PR3) y contra la mieloperoxidasa (MPO)

Específicas de órgano

Tiroides: anticuerpos contra la peroxidasa tiroidea (TPO), contra la tiroglobulina (TG), contra el receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSH)

Suprarrenales: anticuerpos contra las suprarrenales

Páncreas: anticuerpos contra la glutamato descarboxilasa 65 (GAD65) y contra IA2

Tubo digestivo: anticuerpos contra la gliadina, contra la transglutaminasa tisular, contra las células parietales gástricas y contra el factor intrínseco

Hígado: anticuerpos contra las mitocondrias (AMA), contra el músculo liso (ASMA) y contra los microsomas hepáticos y renales (LKM)

Sistema nervioso: anticuerpos contra el receptor de la acetilcolina, contra la proteína básica de la mielina y contra el gangliósido neuronal

Riñón: anticuerpos contra la membrana basal glomerular

Piel: anticuerpos contra los desmosomas y contra la membrana basal epidérmica

lución espectacular de los análisis serológicos de autoanticuerpos en las dos últimas décadas al crecimiento explosivo de la biología molecular.

El laboratorio de autoinmunidad presenta una característica que lo diferencia de los demás laboratorios que emplean como técnicas básicas los inmunoanálisis: determina anticuerpos, y no antígenos como los otros laboratorios de inmunoanálisis. En estos, cuando se mide una hormona, un marcador tumoral, una proteína específica o un fármaco, se determina un antígeno y para ello se emplean como reactivos los anticuerpos. Por el contrario, en los estudios de autoinmunidad se determinan anticuerpos, por lo que deben emplearse antígenos como reactivos.

ESPECÍMENES

Los análisis de autoanticuerpos se realizan en suero. Los especímenes deben almacenarse a 4 °C hasta su valoración, y congelarse a -20 °C cuando se vayan a guardar durante períodos prolongados de tiempo. La mayoría de los autoanticuerpos son muy estables, siempre que los especímenes no estén contaminados con bacterias.

TÉCNICAS ANALÍTICAS

Las principales técnicas analíticas que se emplean en los laboratorios de autoinmunidad son:

- Aglutinación.
- Inmunoprecipitación.
- Inmunodifusión doble.
- Contrainmunolectroforesis.
- Inmunotransferencia.
- Inmunofluorescencia.
- Inmunoanálisis con indicadores marcados.

Durante los últimos años, la tendencia más significativa en el laboratorio de autoinmunidad es sustituir gradualmente la inmunofluorescencia indirecta, y otros métodos como la aglutinación, la inmunodifusión doble y la contrainmunolectroforesis, por los inmunoanálisis con reactivos marcados y, esencialmente, por los enzimoanálisis, que requieren menor destreza de los operadores, son más objetivos y fácilmente automatizables.

AGLUTINACIÓN

La aglutinación fue la primera técnica utilizada en los estudios de autoinmunidad. Su fundamento se ha expuesto en el capítulo 29. Las reacciones de aglutinación se han empleado en los estudios de autoinmunidad para determinar el factor reumatoide, los anticuerpos antinucleares y algunos autoanticuerpos específicos de un órgano. En la actualidad, la aglutinación casi no se emplea. Las principales ventajas de las técnicas de aglutinación son su fácil realización y que no requieren equipamiento. Por el contrario, sus desventajas principales son su poca sensibilidad, la dificultad de cuantificarlas y que no es posible estandarizarlas.

INMUNOPRECIPITACIÓN

La inmunoprecipitación cuantificada por turbidimetría o nefelometría se emplea hoy en los laboratorios de autoinmunidad para determinar el factor reumatoide. Se utilizan partículas de látex recubiertas con IgG. Existen muchos equipos comerciales para analizadores automáticos de bioquímica o nefelómetros automáticos, y sus métodos están estandarizados con calibradores que se basan en preparaciones de referencia.

INMUNOPRECIPITACIÓN EN GELES

Las principales técnicas de inmunoprecipitación en geles son la inmunodifusión doble, la inmunodifusión radial, la inmunoelectroforesis, la contrainmunoelectroforesis y la inmunofijación. Todas estas técnicas se han utilizado en los estudios de autoinmunidad. Sin embargo, son técnicas fundamentalmente de investigación y no son habituales en los laboratorios clínicos de autoinmunidad.

INMUNOTRANSFERENCIA

La inmunotransferencia o transferencia Western es una herramienta esencial para caracterizar muchos autoanticuerpos. Las proteínas de un extracto de células en cultivo se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con dodecil sulfato sódico (SDS). Las proteínas separadas en el gel se pasan a una membrana de nailon mediante electrotransferencia y la membrana se incuba con el suero. Para detectar la reacción antígeno-anticuerpo específica se emplean varios métodos: sondas marcadas radiactivamente, enzimas como la peroxidasa o una reacción de quimioluminiscencia y autorradiografía. En cada análisis, deben realizarse marcadores de peso molecular y controles positivos y negativos.

En la transferencia puntual (*dot blot*), no se practica la electroforesis y los antígenos purificados se inmovilizan aplicándolos directamente sobre la membrana. Esta técnica requiere pequeñas cantidades del inmunorreagente, la capacidad de unión es de más o menos el 100%, y es muy estable y pueden puntearse varios antígenos separados, lo que permite detectar a la vez muchos anticuerpos específicos en una pequeña muestra de suero y en el mismo análisis. Para su realización, se añade el suero sobre la membrana y se detecta la reacción antígeno-anticuerpo con los mismos métodos que en la transferencia Western.

La inmunotransferencia se ha empleado para caracterizar las especificidades de los anticuerpos antinucleares (ANA). Asimismo, con esta técnica se han determinado los anticuerpos antimitocondriales. La transferencia puntual ha sido comercializada por varias compañías de diagnóstico para determinar diversos autoanticuerpos.

INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia (IF) ha sido y sigue siendo aún una técnica fundamental en el laboratorio clínico de autoinmunidad. La IF emplea anticuerpos que

llevan unidos compuestos fluorescentes o fluorocromos. Los principales fluorocromos que se utilizan en las técnicas de inmunofluorescencia son el isotiocianato de fluoresceína (FITC), cuya longitud de onda de excitación es de 488 nm y cuya longitud de emisión es de 530 nm, y la rodamina B, con longitudes de onda de excitación y de emisión de 545 nm y 585 nm, respectivamente. Los conjugados de FITC emiten una fluorescencia verde manzana, y los de rodamina B, naranja brillante. La fluorescencia emitida por los cortes de tejido o por las células en cultivo se observa con un microscopio de fluorescencia. En el caso de las células, la fluorescencia también puede medirse con un citómetro de flujo.

Las pruebas de inmunofluorescencia pueden ser directas o indirectas. En la *inmunofluorescencia directa* (IFD) se aplican los anticuerpos marcados sobre el corte de tejido o se incuba con la preparación celular. Esta técnica se emplea para localizar morfológicamente los antígenos, y en los laboratorios de autoinmunidad se usa fundamentalmente en dermatología.

La *inmunofluorescencia indirecta* (IFI) ha sido la técnica más empleada para detectar la mayoría de los autoanticuerpos. En ella, se aplica el suero sobre un corte de tejido o un cultivo celular, y los autoanticuerpos presentes en el suero se unen a sus correspondientes antígenos celulares. Luego se lava para eliminar lo que no haya reaccionado. A continuación, se añade un antisuero contra inmunoglobulina marcado con el compuesto fluorescente que se une a los autoanticuerpos formando un sándwich (fig. 30-1). El exceso que no haya reaccionado se elimina mediante un lavado. Luego se observa la preparación al microscopio y la aparición de fluorescencia señala la presencia de los autoanticuerpos. Se valora el patrón de fluorescencia y la intensidad de esta. Los especímenes positivos deben tener un patrón de fluorescencia identificable y una intensidad de fluorescencia mayor que un valor umbral. Además, cuanto mayor sea la intensidad de la fluorescencia, mayor será la posibilidad de que la prueba positiva tenga significación clínica. La intensidad de la fluorescencia se suele expresar en forma de título, que es la dilución mayor a la que se observe fluorescencia.

SUSTRATOS

En las pruebas de IFI, se emplean como sustratos cortes de tejidos, bien de animales o de seres humanos. La mayoría de los cortes que se utilizan en los laboratorios clínicos se adquieren en casas comerciales. Cuando se preparan en el propio laboratorio, ha de procurarse en todo momento mantener íntegra la estructura del tejido. Tras su obtención, este debe congelarse lo más rápido que se pueda, y para ello se utiliza nitrógeno líquido o, en su defecto, nieve carbónica. Una vez congelado el tejido, se realizan los cortes con un criostato. Deben

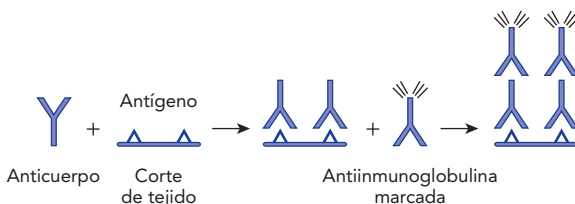


FIGURA 30-1
Inmunofluorescencia indirecta.

tener un grosor de unos 4 μm , ya que los cortes más gruesos hacen que aumente la fluorescencia inespecífica debido a la autofluorescencia de los tejidos.

PATRONES DE FLUORESCENCIA

Los autoanticuerpos producen imágenes fluorescentes características que se denominan patrones de fluorescencia. Con ellos es posible orientar y, a veces, caracterizar el autoanticuerpo.

Una de las principales dificultades para interpretar los resultados de la IFI es la *fluorescencia de fondo*. Para la mayoría de las pruebas con esta técnica, los laboratorios deben elegir una dilución inicial, ya que el suero sin diluir da lugar a una fluorescencia de fondo debido a la unión inespecífica de concentraciones sin significación clínica de anticuerpos circulantes. La elección de la dilución inicial depende de varios factores, entre los que están las recomendaciones del fabricante de los reactivos, el funcionamiento real del laboratorio, la población que se analiza y las necesidades de los peticionarios. Además, la dilución inicial desempeña una función crítica en la determinación de la sensibilidad y la especificidad de la prueba. Al aumentar dicha dilución, la prueba se hace menos sensible y más específica.

APLICACIONES DE LA INMUNOFUORESCENCIA EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS

A continuación se relacionan las principales aplicaciones de la inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades autoinmunitarias.

ANTICUERPOS ANTINUCLEARES

Las pruebas de anticuerpos antinucleares (ANA) son una de las principales pruebas de escrutinio para detectar las enfermedades reumáticas. En la actualidad, las técnicas de IFI para ANA emplean células HEP-2. Son células humanas epiteliales que proceden de un carcinoma de laringe. La existencia de células en mitosis y diferentes fases del ciclo celular permite observar antígenos cuya expresión varía en las fases del ciclo. Se efectúa una permeabilización de las membranas con un disolvente lipídico, para asegurar que puedan penetrar los anticuerpos del suero. Los métodos de fijación más empleados son el tratamiento con metanol-acetona y paraformaldehído-tritón X-100.

Como conjugado contra la inmunoglobulina se emplea una IgG específica. Aunque pueden emplearse también conjugados polivalentes, estos pueden detectar anticuerpos sin significación clínica. El fluorocromo más utilizado es el isotiocianato de fluoresceína con una relación isotiocianato de fluoresceína/proteína de alrededor de 3, ya que las relaciones mayores pueden hacer que aumente la fluorescencia inespecífica. La relación anticuerpo/proteína debe ser mayor de 0,1, y el contenido del anticuerpo específico, entre 30 y 60 g/ml. Asimismo, la dilución de trabajo tiene que determinarse por titulación, utilizando diluciones seriadas de sueros control positivos con patrones conocidos.

Se dispone de sueros de referencia, con un contenido y una especificidad de ANA definidos, preparados por la Organización Mundial de la Salud (*WHO ANA International Reference Preparation 6/233*) y el Laboratorio de Referencia de ANA de los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de Estados Unidos (AF/CDC 1-10). Se dispone también de sueros de referencia para autoanticuerpos contra ADNds, Ro (SS-A), La (SS-B), nRNP, Sm, Scl-70 y Jo-1, y de patrones nucleolar, homogéneo, centromérico y moteado preparados por el Laboratorio de Referencia de ANA de los CDC.

Los patrones principales que se observan en la IFI de ANA son el homogéneo, el moteado, el nucleolar, el centromérico, el patrón en anillo y el del huso mitótico. En la tabla 30-3 se señalan los principales patrones de IFI y las asociaciones de los anticuerpos antinucleares.

Patrón homogéneo

Todo el núcleo presenta una fluorescencia difusa uniforme en las células en interfase. La intensidad de la fluorescencia es más pronunciada en la región cromosómica de las células mitóticas. El citoplasma en negativo. En algunas ocasiones, en las células en interfase se observa una intensidad de la fluorescencia mayor en la región externa del núcleo (refuerzo periférico). Este patrón lo dan los anticuerpos contra el ADNds y contra las histonas. Se presenta en el lupus eritematoso sistémico (LES) y en el lupus inducido por fármacos.

Patrón moteado

En las células en interfase aparecen numerosos puntos de fluorescencia diseminados por el núcleo. El moteado puede ser grueso o fino. Las células en metafase no muestran ningún teñido en la región cromosómica condensada. Este patrón lo producen, entre otros, los autoanticuerpos Sm, RNP, SS-A y SS-B. Se presenta en el LES, el síndrome de Sjögren y la enfermedad mixta del tejido conjuntivo.

TABLA 30-3 *Patrones de IFI y asociaciones clínicas de los anticuerpos antinucleares (ANA)*

| Patrón de IFI | Diana | Asociación clínica |
|---------------|---|--|
| Homogéneo | ADN, histonas | LES, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil |
| Moteado | Varias proteínas que unen ácidos nucleicos (Sm, SS-A, SS-B) | LES |
| Grueso | Ribonucleoproteínas | Enfermedad mixta del tejido conjuntivo |
| Fino | Varias proteínas que unen ácidos nucleicos | LES, síndrome de Sjögren |
| Nucleolar | Varios componentes y ribonucleoproteínas nucleolares (Scl-70, PM/Scl) | Esclerosis sistémica |
| Centromérico | Proteínas centroméricas | Esclerosis sistémica limitada |
| Anillo | Componentes de la membrana nuclear | Hepatopatías autoinmunitarias |

Patrón nucleolar

En este patrón se tiñen los nucléolos. La tinción puede ser homogénea o moteada. En el patrón nucleolar homogéneo las células en metafase presentan, generalmente, una tinción difusa débil del nucleoplasma. No hay fluorescencia de la región cromosómica condensada. En el patrón nucleolar moteado, los nucléolos de las células en interfase y metafase presentan entre 10 y 20 puntos pequeños de tamaño irregular. Este patrón se asocia con una tinción nuclear moteada/homogénea y con una tinción homogénea de los cromosomas de las células en metafase. Lo producen los anticuerpos Scl-70 y PM/Scl, las ARN polimerasas y la fibrilarina. Se presenta en el LES, la esclerosis sistémica y la dermatomiositis/polimiositis.

Patrón centromérico

Es un patrón moteado en las células en metafase. Se observa en la esclerosis sistémica limitada.

Patrón en anillo

Patrón homogéneo con concentración de la fluorescencia en los bordes del núcleo. Las células en metafase no muestran una tinción de la región cromosómica condensada. Se dirigen contra diversos componentes de la membrana nuclear y se asocian a menudo a enfermedades hepáticas autoinmunitarias.

Patrón en huso mitótico

Se caracteriza por la tinción fluorescente de los polos del huso en los núcleos en metafase y anafase, sin tinción de las fibras interpolares ni del ecuador celular en metafase. En las células en interfase se ve una tinción nuclear moteada fina con nucléolos negativos.

ANTICUERPOS CONTRA EL ADN

Los anticuerpos contra el ADN o anti-ADN pueden determinarse mediante IFI utilizando como sustrato el cinetoplasto de *Crithidia luciliae*. Se cultiva el microorganismo en contenedores que tienen portas de vidrio a los que se fija. Para realizar la prueba, se añade el suero de los pacientes sobre los portas. Tras la incubación, se considera que el resultado es positivo cuando se observa fluorescencia en el citoplasto y no en el núcleo o en el corpúsculo basal del flagelo, que pueden dar fluorescencia en ausencia de anticuerpos anti-ADNs. La IFI posee buenas sensibilidad y especificidad, aunque tiene el inconveniente de que su interpretación es subjetiva y de que es semicuantitativa.

Los anticuerpos anti-ADNs son muy específicos del lupus eritematoso sistémico, en los que el título puede descender con el tratamiento eficaz y aumentar en la recurrencia aguda de la enfermedad, por lo que es importante su cuantificación.

ANTICUERPOS ANTIMITOCONDRIALES

El autoantígeno principal de los anticuerpos antimitocondriales es el componente E2 del complejo piruvato deshidrogenasa de las mitocondrias. Los principales sustratos que se emplean para detectar los anticuerpos contra las mitocondrias son el tejido triple de rata (hígado, riñón y estómago) y las células HEP-2. En el tejido triple de rata, se observa una fluorescencia granular de las mitocondrias en el citoplasma celular de las células gástricas, las células de Kupfer, los hepatocitos y las células tubulares renales. Las células HEP-2 presentan los mismos moteados granulares gruesos en el citoplasma, pero los tejidos de roedor son más sensibles y fiables. La desventaja principal de la IFI es que no determina la especificidad de los antígenos. Asimismo, presenta problemas con la fluorescencia de fondo producida por la unión inespecífica, por lo que detectar exactamente los anticuerpos contra las mitocondrias por IFI requiere la dilución seriada del suero (normalmente, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 y 1:640) y también una dilución óptima de la inmunoglobulina contra la humana marcada con el isotiocianato de fluoresceína.

La detección de los anticuerpos antimitocondriales es útil para el diagnóstico de la cirrosis biliar primaria (CBP), una enfermedad crónica del hígado que afecta a las mujeres jóvenes y de mediana edad y en la que hay una destrucción progresiva de los conductos biliares intrahepáticos.

ANTICUERPOS CONTRA EL MÚSCULO LISO

Estos anticuerpos se presentan en las enfermedades hepáticas autoinmunitarias. Reaccionan con diversos antígenos del esqueleto celular, de los que la F-actina es el que se asocia con la hepatitis autoinmunitaria. El principal sustrato empleado en las pruebas de IFI para detectar anticuerpos contra el músculo liso es el tejido triple (hígado, riñón y estómago) de roedor. Debido a que los epítomos antigénicos de la F-actina son en su mayor parte conformacionales, los tejidos deben fijarse mínimamente durante su procesado y luego almacenarse con cuidado. La sensibilidad de la prueba puede aumentarse si se preparan las secciones de los tejidos con roedores a los que se les haya inyectado repetidamente faloidina, una sustancia que aumenta la producción de microfilamentos.

Para el cribado se emplea una dilución 1:20 y debe utilizarse un conjugado de fluoresceína polivalente para detectar los anticuerpos IgG e IgM. En el estómago se observa la tinción de las fibras de actina interglandulares, la mucosa muscular y las capas musculares de los vasos sanguíneos. En el riñón, se tiñen las células mesangiales de los glomérulos y las fibrillas intracelulares del túbulo renal y de las áreas peritubulares. Por último, en el hígado, se tiñe principalmente la actina submembranosa, lo cual da lugar a un patrón poligonal alrededor de los hepatocitos. También se tiñen los vasos sanguíneos.

ANTICUERPOS CONTRA LOS MICROSOMAS HEPÁTICOS Y RENALES

Son anticuerpos que se dirigen contra antígenos del retículo endoplásmico del hepatocito que se encuentran en diversos tipos de hepatitis y son útiles para

clasificar la enfermedad. Los LKM-1 (*liver kidney microsomal-1*) se encuentran en las hepatitis autoinmunitarias de tipo II y en las hepatitis por el virus C; los LKM-2, en las hepatitis inducidas por el ácido tienílico; y los LKM-3, en algunos pacientes con hepatitis autoinmunitaria de tipo II y en las hepatitis crónicas por el virus D. Para determinar los LKM-1 se emplean como sustratos secciones de hígado, riñón y estómago de roedor.

ANTICUERPOS CONTRA LA MEMBRANA BASAL GLOMERULAR

Los anticuerpos contra la membrana basal glomerular (anti-GBM) se presentan en la enfermedad de Goodpasture. Reconocen un epítipo específico que sólo se expresa en el dominio NC1 de la cadena $\alpha 3$ del colágeno IV. Los anticuerpos se detectan a lo largo de la membrana basal del glomérulo mediante inmunofluorescencia directa en un espécimen de biopsia renal. Puede determinarse en suero mediante IFI utilizando cortes de riñón humano o de mono, aunque los radioinmunoanálisis y los enzimoimmunoanálisis tienen una sensibilidad y una especificidad mayores.

ANTICUERPOS TIROIDEOS

Aunque se ha utilizado la IFI para detectar anticuerpos tiroideos, estas técnicas se han sustituido, primero, por las de aglutinación, y luego, por los enzimoimmunoanálisis. Para la IFI se empleaban secciones de tiroides humanos o de mono. Los anticuerpos contra la tiroglobulina tiñen todo el contenido del folículo, mientras que los anticuerpos contra la peroxidasa tiroidea sólo tiñen las células epiteliales tiroideas.

La detección de anticuerpos antitiroideos es útil para el diagnóstico de las tiroiditis autoinmunitarias, entre ellas, la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Graves y el hipotiroidismo autoinmunitario primario.

ANTICUERPOS CONTRA LAS CÉLULAS DE LOS ISLOTES

Los anticuerpos contra las células de los islotes (ICA) se observan en los estadios tempranos de la diabetes de tipo 1 y pueden desempeñar un papel patogénico. Se detectan mediante IFI utilizando secciones de páncreas humanos o de mono. A ser posible, deben emplearse las de páncreas humanos del grupo sanguíneo O congelados. La fijación del tejido afecta a la sensibilidad de la técnica, por lo que es preferible emplear los tejidos congelados y no fijados, ya que, al fijarlos, se puede alterar la reactividad frente a los anticuerpos. La calidad del páncreas puede variar de un donante a otro, lo que hace difícil estandarizar la técnica. Actualmente hay un patrón internacional y los resultados se expresan en unidades JDF (*Juvenile Diabetes Foundation*).

ANTICUERPOS CONTRA LAS CÉLULAS PRODUCTORAS DE ESTEROIDES

Existen varios anticuerpos dirigidos contra las células productoras de esteroides de las suprarrenales, los ovarios, los testículos y la placenta. Las principales dianas autoantigénicas son las enzimas citocromo P-450 (esteroide deshi-

drogenasa), responsables de la producción de testosterona, esteroides androgénicos, cortisol, androsterona y otros esteroides. Estos autoanticuerpos pueden medirse mediante IFI, aunque están siendo sustituidos por enzimoimmunoanálisis específicos. Para la IFI, se emplean tejidos humanos o de mono.

ANTICUERPOS CONTRA LA PIEL Y EL EPITELIO ESCAMOSO

Las pruebas de inmunofluorescencia desempeñan una función esencial en el diagnóstico de varias enfermedades autoinmunitarias de la piel. El sustrato preferido para estos estudios es el esófago de mono con un anticuerpo secundario contra inmunoglobulina humana específica de especie. Se emplea también la inmunofluorescencia directa, utilizando una tinción con inmunoperoxidasa en especímenes procedentes de biopsias. En la IFI se observan diversos patrones de inmunofluorescencia. En el pénfigo vulgar y sus variantes, los anticuerpos contra los desmosomas dan lugar a un patrón de tinción intercelular con forma de alambre característico sobre el esófago de mono. En el pénfigoide ampolloso se observa una tinción lineal de la zona de la membrana basal epidérmica. Y en la dermatitis herpetiforme se observan depósitos granulares de IgG mediante IFD.

ANTICUERPOS CONTRA EL CITOPLASMA DE LOS NEUTRÓFILOS (ANCA)

Son anticuerpos dirigidos contra componentes antigénicos presentes principalmente en gránulos primarios del citoplasma de los neutrófilos. Son marcadores serológicos de las vasculitis sistémicas necrosantes primarias, particularmente la granulomatosis de Wegener. Para realizar la prueba se utilizan preparaciones de neutrófilos que pueden hacerse en el laboratorio o adquirirse comercialmente. Cuando se preparan en el laboratorio debe hacerse de forma cuidadosa. Se parte de sangre total, de la que se aíslan los neutrófilos mediante centrifugación en gradiente de densidad. A continuación, se dispensan los neutrófilos sobre portas de vidrio y se deja que sedimenten durante algunos minutos. Luego se secan y se fijan con etanol y formol, con cuidado de que no se activen. La preparación resultante debe mostrar células uniformes y discretas con contornos circulares y un fondo mínimo de desechos celulares. Puede haber un pequeño porcentaje de otros leucocitos que darán una fluorescencia débil. Es importante que no se activen los neutrófilos, ya que esto puede conducir a patrones anormales o confusos.

Se observan tres tipos de *patrones de inmunofluorescencia*: el citoplasmático (C-ANCA), el perinuclear (P-ANCA) y el atípico (A-ANCA). El patrón C-ANCA en neutrófilos fijados en etanol muestra una tinción citoplasmática granular homogénea debido a la unión a las proteínas de la fracción de los gránulos primarios o azurófilos, con una tinción mínima de los lóbulos nucleares. El antígeno principal detectado en los C-ANCA es la proteinasa 3 (PR3).

El patrón P-ANCA en neutrófilos fijados en etanol muestra una tinción en la zona perinuclear de los lóbulos nucleares. La especificidad antigénica de este patrón es muy heterogénea, y aunque, mayoritariamente, los P-ANCA reaccionan con la mieloperoxidasa (MPO), pueden reconocer otras proteínas como la lactoferrina, la elastasa y la catepsina G.

Finalmente, el patrón A-ANCA es un patrón perinuclear en neutrófilos fijados en etanol que no da fluorescencia citoplasmática en los neutrófilos fijados en formol. Es una mezcla de los patrones citoplasmático y perinuclear. Sus antígenos diana son la lactoferrina, la elastasa, la catepsina G y la proteína de incremento de la permeabilidad bacteriana (BPI).

El patrón C-ANCA es un marcador sensible (>90% en la enfermedad activa) y específico (>95%) de la granulomatosis de Wegener, enfermedad que se caracteriza por la vasculitis y la destrucción de vasos de pequeño calibre en los riñones, los pulmones y las vías aéreas superiores. El patrón P-ANCA es menos específico y se asocia con la granulomatosis de Wegener, la poliangitis microscópica, otras formas de vasculitis, las enfermedades reumáticas autoinmunitarias, las intestinales inflamatorias y otras afecciones.

Las principales dificultades para interpretar los patrones de IFI de ANCA son la diferenciación de los C-ANCA poco positivos de los negativos; que tienen un grado elevado de unión inespecífica de inmunoglobulinas; la diferenciación de los P-ANCA de patrones de tinción de ANA; y la identificación de patrones atípicos que pueden semejar C-ANCA o P-ANCA. Existen diversas estrategias para obviar estos problemas, como utilizar más de un sustrato en la IFI. Debido a que los resultados de los ANCA mediante esta técnica son claves en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la granulomatosis de Wegener y la poliangitis microscópica, un grupo internacional de consenso ha recomendado que los ANCA positivos mediante IFI sean confirmados por enzimoanálisis para la proteinasa-3 y la mieloperoxidasa. Alternativamente, cuando se empleen las pruebas de enzimoanálisis para el cribado, los resultados positivos deberán confirmarse mediante IFI.

INMUNOANÁLISIS CON REACTIVOS MARCADOS

Los principales inmunoanálisis con reactivos marcados que se utilizan en los estudios de autoinmunidad son los radioinmunoanálisis en su modalidad de IRMA y los enzimoanálisis en la de ELISA sándwich. Estos últimos son los más empleados y se expondrán con detalle. Los principales componentes de un ELISA para autoanticuerpos son: la fase sólida, el antígeno, el sistema de lavado, el anticuerpo conjugado con la enzima y el sustrato de la enzima.

Las principales fases sólidas utilizadas en los ELISA son las microplacas, las bolas y las partículas magnéticas. Para determinar autoanticuerpos en los laboratorios de autoinmunidad se utilizan fundamentalmente las microplacas. Estos soportes son muy útiles para poner a punto las técnicas y funcionan bien con un número de especímenes no muy alto. Se han diseñado sistemas automáticos para los ELISA en microplacas. En la actualidad se están presentando sistemas que utilizan bolas o partículas magnéticas como fases sólidas.

Para estudios de autoinmunidad, en los ELISA se han empleado varios tipos de anticuerpos conjugados con la enzima. Los principales son:

- Anticuerpos contra inmunoglobulinas.
- Anticuerpos contra IgG. Se emplean porque la mayoría de los autoanticuerpos suelen ser de la clase IgG.
- Anticuerpos contra IgG/IgM. Algunos autoanticuerpos, como los dirigidos contra las mitocondrias, son de la clase IgM.

- Anticuerpos contra IgA. Se usan para determinar autoanticuerpos contra el endomisio y contra la transglutaminasa tisular del tipo IgA.

REQUERIMIENTOS DE LOS ANTÍGENOS EN LAS PRUEBAS DE ELISA

La especificidad de los ELISA depende en gran medida de la disponibilidad de un antígeno puro. En este tipo de análisis, para determinar autoanticuerpos es fundamental que el antígeno que se use tenga exactamente la misma configuración que el que está en el organismo que generó el autoanticuerpo. Los principales requerimientos de un antígeno para usarlos en las técnicas de ELISA son:

- La secuencia, la conformación y las modificaciones posteriores a la traducción, como las glucosilaciones, deben ser idénticas a las del antígeno humano.
- El antígeno ha de estar en la forma más pura posible, ya que un fondo protéico elevado del extracto puede conducir a resultados falsos positivos.
- El antígeno debe poder obtenerse en grandes cantidades.
- El proceso de purificación tiene que ser fácil y rápido.
- Los costes de producción deben ser relativamente bajos.
- Estabilidad elevada durante el proceso de recubrimiento.

FUENTES DE MATERIAL ANTIGÉNICO

Uno de los principales problemas de las técnicas de ELISA para detectar autoanticuerpos es la calidad del antígeno o los antígenos que se utilizan. En la tabla 30-4 se indican las principales fuentes de material antigénico. Uno de los pasos fundamentales para obtener los antígenos es su purificación. Suele hacerse por cromatografía de afinidad a partir de los tejidos humanos o animales. Durante el proceso de purificación, deben mantenerse todas las modificaciones posteriores a la traducción, así como las estructuras terciaria y cuaternaria de la proteína. Asimismo, hay que mantener los epítomos conformacionales. Si durante el proceso de purificación se arrastra algún antígeno acompañante, pueden darse reacciones cruzadas.

TEJIDOS HUMANOS

La principal característica de los antígenos obtenidos a partir de los tejidos humanos es que son los antígenos auténticos, con su conformación auténtica.

TABLA 30-4 Principales fuentes de material antigénico

Nativas

Tejidos humanos y productos sanguíneos
Tejidos animales

Recombinantes

Procariotas (*Escherichia coli*)
Eucariotas (células de mamíferos, levaduras y baculovirus/células de insectos)

Las principales desventajas de estos antígenos son:

- Dependencia del suministro externo.
- Obtención de cantidades pequeñas.
- La purificación es compleja y costosa.
- Suelen presentar un fondo proteínico elevado.
- Tienen grandes costes de producción.

TEJIDOS ANIMALES

La principal ventaja de usar los tejidos animales es que se dispone de un material de partida abundante y las modificaciones posteriores a la traducción de la proteína son análogas a las auténticas. Las principales desventajas son:

- La menor homología de secuencia, que puede conducir a características antigénicas diferentes.
- Se obtienen en cantidades pequeñas.
- La purificación es compleja y costosa.
- Suelen presentar un fondo proteínico elevado.
- Tienen grandes costes de producción.

ANTÍGENOS RECOMBINANTES

La tecnología del ADN recombinante ha permitido producir antígenos en cultivos de bacterias o células eucariotas. Para ello, primero debe obtenerse el ARNm humano de la proteína. A partir de este, se obtiene el ADN complementario (ADNc) mediante transcripción inversa. Luego, se incorporan las moléculas de este ácido a vehículos de transporte como los plásmidos y, mediante transfección, se introduce el material genético en la célula huésped. Se expresa la proteína en las células en cultivo y después se aísla y se analiza su antigenicidad.

Las principales ventajas de los antígenos recombinantes son:

- Se fabrican de forma selectiva los antígenos inmunodominantes.
- Estos antígenos se combinan de forma óptima en el recubrimiento de la fase sólida.
- Dan una excelente reproducibilidad, lo que proporciona una precisión y una cuantificación buenas.
- Aportan pruebas con una gran sensibilidad y especificidad.

SISTEMAS DE EXPRESIÓN PROCARIOTAS

El sistema más empleado en la biotecnología recombinante es la bacteria *Escherichia coli*. Las bacterias son una maquinaria de síntesis proteínica estable, continua y muy eficaz, ya que expresan la proteína deseada en grandes cantidades. Sin embargo, para analizar autoanticuerpos tienen varias limitaciones:

- Las bacterias sólo producen muy pocas modificaciones posteriores a la traducción, de modo que las fosforilaciones, acilaciones o glucosilaciones se producen en pequeña cuantía o en lugares erróneos.

- En las bacterias, sólo se sintetizan de forma óptima las proteínas con un tamaño entre 25 y 40 kDa.
- Cuando la bacteria expresa una proteína extraña en grandes cantidades, con frecuencia la encierra en los llamados cuerpos de inclusión. En consecuencia, estas proteínas recombinantes no son solubles en agua cuando se rompen las células, por lo que deben emplearse detergentes y desnaturizantes para el aislamiento. Muchas veces este tratamiento causa la destrucción de la conformación y la pérdida de función y antigenicidad de las proteínas sintetizadas.
- En muchas ocasiones, no puede impedirse que los antígenos recombinantes sintetizados se contaminen con trazas de las proteínas bacterianas. Muchas personas tienen anticuerpos contra *E. coli*, que vive como comensal en el intestino humano. Por lo tanto, es bastante grande el riesgo de un resultado falso positivo.

SISTEMAS DE EXPRESIÓN EUCARIOTAS

Cultivos de células de mamíferos

La expresión de antígenos en grandes cantidades en cultivos de células de mamíferos no es una buena alternativa, pues aunque el antígeno que se expresa es muy semejante al nativo correspondiente en cuanto a la conformación y las modificaciones posteriores a la traducción, la tasa de expresión de los cultivos celulares es muy baja y el cultivo difícil y caro.

Levaduras

Las levaduras son células eucariotas con un nivel de expresión medio, con promotores inducibles y capaces de expresar proteínas grandes. Sus principales desventajas son que requieren métodos de extracción enérgicos debido a la pared celular, producen una hiperglicosilación en las proteínas y tienen una tasa elevada de degradación.

Baculovirus/células de insectos

El sistema de producción de antígenos recombinantes que emplea baculovirus y células de insectos es un sistema eucariota con un nivel de expresión elevado, fácil purificación de los antígenos, modificaciones posteriores a la traducción análogas a las humanas y conformaciones y antigenicidad auténticas. Sus principales desventajas son su expresión transitoria y que los costes son mayores que los de *E. coli*.

ESTRATEGIAS PARA USAR LOS ANTÍGENOS EN LOS ELISA

Cuando se diseña un ELISA pueden desarrollarse varias estrategias con relación a los antígenos que se han de usar. Pueden utilizarse los antígenos siguientes:

- Extractos celulares.
- Antígenos purificados a partir de tejidos animales.

- Antígenos recombinantes.
- Mezclas de extractos celulares y antígenos purificados.
- Mezclas de extractos celulares y antígenos recombinantes.
- Mezclas de antígenos purificados y recombinantes.

APLICACIONES DE LOS ENZIMOINMUNOANÁLISIS EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS

A continuación se describen las principales aplicaciones de los enzimoimmunoenálisis con reactivos marcados en los estudios de autoinmunidad.

ANTICUERPOS ANTINUCLEARES

Se dispone de dos tipos de ELISA para ANA: las pruebas que valoran los ANA de amplia especificidad, denominadas pruebas genéricas de ANA, y las pruebas específicas de un antígeno, que detectan ANA y reaccionan con un solo autoantígeno. El primer tipo de análisis proporciona resultados similares a los de la IFI para ANA, sin informar sobre el patrón de fluorescencia. Los resultados son semicuantitativos y a menudo se expresan en unidades arbitrarias por comparación con una curva estándar o un calibrador de referencia. Esta clase de análisis se está haciendo cada vez más popular como alternativa a la IFI y como prueba inicial para identificar los sueros que luego han de analizarse para los autoanticuerpos específicos. Los ELISA para ANA emplean como antígenos homogeneizados nucleares o mezclas de estos con antígenos purificados o antígenos recombinantes.

En general, estos ELISA tienen una buena sensibilidad y un gran valor predictivo negativo, por lo que pueden utilizarse para eliminar los especímenes que no tienen ANA. No obstante, debido a su bajo valor predictivo positivo, los especímenes positivos deben analizarse mediante IFI para confirmar la presencia de ANA y determinar el resultado final. El otro tipo de ELISA corresponde a los ELISA para autoanticuerpos contra el núcleo de especificidad conocida.

ANTICUERPOS ANTINUCLEOSOMAS

Hoy en día, los nucleosomas se consideran un autoantígeno principal en el lupus y se han detectado autoanticuerpos contra ellos durante el comienzo de la enfermedad, precediendo a los anticuerpos contra el ADN.

En el mercado hay equipos de ELISA para determinar anticuerpos antinucleosomas. Para que el análisis funcione bien es fundamental mantener la integridad de la estructura del nucleosoma para permitir su presentación al anticuerpo en su configuración nativa. Se emplean nucleosomas nativos aislados de núcleos celulares.

ANTICUERPOS CONTRA EL ADN

Los ELISA para el ADN utilizan como antígeno ADNds purificado. Sin embargo, durante el proceso físico de unión del ADNds a la fase sólida se puede distorsionar su estructura de doble hélice, exponiéndose epítomos ocultos y

modificándose epítomos conformacionales, lo que puede contribuir a las discrepancias que se observan cuando se comparan diferentes ELISA comerciales para ADN. Estos ELISA tienen una sensibilidad diagnóstica muy buena, pero poca especificidad diagnóstica, ya que detectan anticuerpos de avidéz alta y baja, y estos últimos se consideran poco relevantes. Como los ELISA para ADN están valorados frente a estándares internacionales, sus resultados se dan de forma cuantitativa en unidades internacionales por mililitro (UI/ml). Cuando se utiliza el ELISA como método de selección para el diagnóstico del LES, debe emplearse también otra prueba que aumente su especificidad diagnóstica, como la IFI y la técnica de Farr, que detectan únicamente anticuerpos de gran avidéz.

ANTICUERPOS CONTRA LAS RIBONUCLEOPROTEÍNAS

Las técnicas de ELISA para determinar los anticuerpos contra las ribonucleoproteínas presentan, en general, buenas sensibilidad y especificidad diagnósticas para Ro/SSA. Se emplean antígenos Ro/SSA de 52 y 60 kDa naturales o recombinantes. Los antígenos purificados se obtienen del bazo o líneas celulares de procedencia humana. La determinación de La/SSB también puede realizarse por ELISA. Para UsnRNP, el uso de antígenos recombinantes incrementa su sensibilidad. Los anticuerpos anti Ro/SSA y La/SSB se presentan en el síndrome de Sjögren.

ANTICUERPOS CONTRA LA HISTIDIL-ARNT SINTETASA (Jo-1)

Se dispone de ELISA sensibles para determinar anticuerpos contra Jo-1 que proporcionan buenos resultados. Estos anticuerpos se encuentran presentes en la polimiositis.

ANTICUERPOS CONTRA EL CENTRÓMERO

Los ELISA para determinar los anticuerpos contra el centrómero son más sensibles que la IFI, aunque pueden presentar diferencias significativas entre sus resultados. Estos anticuerpos se observan frecuentemente en los pacientes con el fenómeno de Raynaud y el síndrome de CREST, una subclase de esclerosis sistémica.

ANTICUERPOS CONTRA EL CITOPLASMA DE LOS NEUTRÓFILOS (ANCA)

Se han descrito varios métodos de ELISA para detectar anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos que emplean antígenos purificados y recombinantes. Los intentos para obtener PR3 recombinante no han conseguido una proteína que sea reactiva con los anticuerpos humanos. La inmovilización de la PR3 nativa por recubrimiento de la placa de plástico puede producir la desnaturalización parcial, con una alteración de los epítomos conformacionales, lo que puede causar una pérdida de reactividad de los anticuerpos. Este problema se ha observado en algunos pacientes con anticuerpos contra PR3 en tratamiento, pero puede obviarse utilizando un anticuerpo monoclonal de captura

para inmovilizar la proteína PR3. Cuando se emplea un ELISA de captura existe el riesgo de que el anticuerpo de captura oculte alguno de los epítomos. Los anticuerpos contra PR3 de los pacientes con granulomatosis de Wegener reaccionan con diferentes epítomos y algunos de ellos pueden quedar marcados por el anticuerpo monoclonal. En la actualidad, los métodos de ELISA son más sensibles y específicos que la IFI.

ANTICUERPOS ANTIMITOCONDRIALES

Una vez detectados los antígenos mitocondriales frente a los que van dirigidos los anticuerpos antimitocondriales, se aislaron y secuenciaron. Con estos datos se han obtenido proteínas recombinantes que se han utilizado para diseñar métodos para determinar los AMA. Inicialmente, se emplearon los antígenos individuales y, después, una proteína híbrida que contiene los dominios lipoilo de cada subunidad E2 de los tres complejos (piruvato deshidrogenasa, 2-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa y 2-cetoglutarato deshidrogenasa). La técnica de ELISA con proteínas recombinantes para determinar anticuerpos contra las mitocondrias es versátil, específica y sensible, y puede utilizarse para estudiar un gran número de especímenes. Usar proteínas recombinantes fusionadas y moléculas híbridas de diseño proporciona un análisis rápido y fiable para cuantificar los AMA.

ANTICUERPOS CONTRA LOS MICROSOMAS HEPÁTICOS Y RENALES

Se han comercializado equipos de ELISA para los anticuerpos contra los LKM que emplean antígenos recombinantes y proporcionan buenos resultados.

ANTICUERPOS ANTITIROIDEOS

Se han descrito diversos ELISA para la determinación de anticuerpos contra los microsomas tiroideos, y contra la peroxidasa tiroidea y la tiroglobulina. Los ELISA son mucho más sensibles y específicos que la hemaglutinación para detectar autoanticuerpos tiroideos. Recientemente, se ha desarrollado una técnica de ELISA para medir anticuerpos contra el receptor de la hormona tiroestimulante (TSH). Se fijan receptores de la TSH porcinos solubilizados con detergente sobre placas de microtitulación, que previamente se han tratado con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el extremo C-terminal del receptor de la TSH porcina. Luego se añade el espécimen, de forma que los posibles anticuerpos contra el receptor de la TSH presentes se unan a este receptor. Se añade TSH bovina biotinilada y, tras la incubación, se mide la cantidad de TSH fijada con un sustrato de tetrametilbencidina (TMB). La presencia de anticuerpos contra el receptor de la TSH es inversamente proporcional a la señal medida.

ANTICUERPOS CONTRA LA GLUTAMATO DESCARBOXILASA (GAD)

Se han descrito ELISA que utilizan GAD nativa y recombinante para determinar anticuerpos contra la GAD. Para evitar la pérdida de la conformación nati-

va de esta, que puede producirse al cubrir la placa directamente con la GAD, se ha empleado GAD humana recombinante biotinilada para cubrir la placa tratada con estreptavidina. Con esta modificación se ha descrito una sensibilidad semejante a la del método de radioinmunoprecipitación.

Los anti-GAD se detectan en los pacientes con diabetes tipo 1; se relacionan con la progresión de la enfermedad y tienen, además, carácter predictivo.

ANTICUERPOS CONTRA LA TRANSGLUTAMINASA TISULAR

La transglutaminasa tisular es el principal y, posiblemente, el único antígeno que reconocen los anticuerpos contra el endomisio. Se han desarrollado diversos ELISA para la determinación de la transglutaminasa tisular. Estos anticuerpos son muy sensibles y específicos para el diagnóstico de la enfermedad celíaca.

FACTOR REUMATOIDE

Se han descrito varios enzimoanálisis para determinar factor reumatoide. Asimismo, existen equipos comerciales de diversas casas. La utilización de los ELISA para el factor reumatoide se aplica, principalmente, a la determinación del factor reumatoide de tipo IgA e IgG, ya que el de tipo IgM suele determinarse por turbidimetría o nefelometría.

El FR IgA es el primer isotipo que se eleva en la artritis reumatoide y posee capacidad predictora de la aparición de esta enfermedad, incluso varios años antes de la presencia de los síntomas clínicos. Se asocia, además, con un peor pronóstico y una peor evolución. Las concentraciones elevadas de FR IgG aparecen con exclusividad en la artritis reumatoide y no en otros tipos de artritis.

ANTICUERPOS ANTIPÉPTIDO CÍCLICO CITRULINADO

Los anticuerpos antipéptido cíclico citrulinado (anti-CCP) van dirigidos frente a diversas proteínas en las que los residuos de arginina se han convertido en citrulina por una modificación posterior a la traducción catalizada por las enzimas peptidil arginina deiminadas. Los anti-CCP son muy específicos de la artritis reumatoide, más que el FR, y además pueden predecir la enfermedad erosiva.

Se han comercializado diversos equipos de ELISA para determinar los anti-CCP. Los más recientes son los denominados de tercera generación, que emplean diversos péptidos sintéticos cíclicos citrulinados.

ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS

Todos los ELISA para determinar los anticuerpos antifosfolípidos (aPL) utilizan como antígeno para recubrir las placas de microtitulación cardiopina purificada o una mezcla de fosfolípidos cargados negativamente. El principal problema con los métodos de determinación de los anticuerpos anticardiopina (aCL) es la estandarización, cuya falta da lugar a una significativa variación entre los laboratorios. Los ELISA convencionales para aCL detectan los anticuerpos contra la β_2 -glucoproteína (β_2 -GPI) debido a que esta tiene dos orígenes

nes: la β_2 -GPI bovina del suero de bovino empleado, y la β_2 -GPI del suero humano. Se han desarrollado ELISA que utilizan β_2 -GPI humana como antígeno sin fosfolípidos. Para diagnosticar el síndrome antifosfolipídico, los inmunoanálisis que utilizan β_2 -GPI humana purificada como único antígeno poseen varias ventajas potenciales sobre los análisis de aCL clásicos; entre ellas, la detección de autoanticuerpos contra la β_2 -GPI específicos de especie, la falta de detección de los aCL de tipo infeccioso que se unen directamente a la cardiolipina, y la mejora del control de la calidad del antígeno relevante. La comparación de las pruebas de aCL con estos ELISA muestra una buena correlación en los pacientes con síndrome antifosfolípido SAP, aunque hay algunas discordancias que expresan la existencia de subconjuntos de anticuerpos.

Los sueros positivos en las pruebas para β_2 -GPI y los negativos en las pruebas para aCL pueden tener autoanticuerpos específicos para la β_2 -GPI humana, pero no para la β_2 -GPI bovina, o anticuerpos que reconocen epítomos sobre la β_2 -GPI que no están disponibles cuando la proteína está unida a la cardiolipina. Asimismo, los sueros positivos en los análisis para aCL y los negativos en los análisis para β_2 -GPI pueden contener anticuerpos contra la propia cardiolipina, contra epítomos sobre el complejo cardiolipina- β_2 -GPI o contra la β_2 -GPI bovina, pero no contra la β_2 -GPI humana. Debido probablemente a la detección de anticuerpos directamente reactivos con la cardiolipina, en estos estudios, las pruebas clásicas de aCL fueron significativamente menos específicas para las características clínicas del síndrome antifosfolipídico que las pruebas contra β_2 -GPI.

Los anticuerpos antifosfolípidos se presentan en el síndrome antifosfolípido, un trastorno en el que la sangre tiene tendencia a coagular rápidamente. Las manifestaciones clínicas son trombosis, dolor de cabeza, infartos y pérdidas recurrentes de embarazos.

ANTICUERPOS CONTRA LA MEMBRANA BASAL GLOMERULAR

El primer ELISA comercializado empleaba un antígeno purificado extraído de riñones humanos de cadáveres. Recientemente, se ha clonado el ADN del dominio NC1 de la cadena $\alpha 3$ del colágeno IV, que es el antígeno frente al que se dirigen los anticuerpos contra la membrana basal glomerular, y se ha obtenido la proteína recombinante para usarla en un ELISA.

PRUEBAS MÚLTIPLES

Los anticuerpos en las enfermedades autoinmunitarias no se presentan individualmente, de forma que se asocie un anticuerpo específico con una determinada enfermedad autoinmunitaria, sino que, en general, estas enfermedades se caracterizan por la presencia simultánea de varios autoanticuerpos diferentes. Este hecho ha llevado a utilizar la expresión *perfil de autoanticuerpos* para indicar un panel de marcadores específicos de la enfermedad que puede ayudar a establecer el diagnóstico y a valorar el pronóstico. El análisis de varios autoanticuerpos y el establecimiento de un perfil de autoanticuerpos pueden potenciar la utilidad clínica del análisis de autoanticuerpos, haciendo posible el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria en las fases más tempranas. Además, el perfil de autoanticuerpos puede proporcionar un medio para

identificar grupos de pacientes con subtipos clínicos de la enfermedad o con distintas evoluciones.

Se denominan pruebas múltiples a aquellas que se realizan de forma simultánea con la misma muestra. Las principales tecnologías para las medidas múltiples son las pruebas de transferencia en línea (*line-blot assays*), los inmunoanálisis con partículas con códigos de barras, las pruebas con microesferas y detección mediante citometría de flujo y las micromatrices de antígenos.

A continuación se presentan estas dos últimas pruebas. Las características de las pruebas de transferencia en línea ya se han descrito antes.

INMUNOANÁLISIS CON MICROESFERAS Y DETECCIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO

En este tipo de análisis se utilizan microesferas de poliestireno marcadas en su interior con diferentes proporciones de dos fluorocromos distintos. Cada fluorocromo puede tener hasta 10 posibles niveles de intensidad de fluorescencia, con lo que se crea de esta forma una familia de 100 conjuntos de microesferas. Cada uno de los 100 conjuntos de microesferas puede contener un antígeno específico para un anticuerpo. La técnica se conoce como Luminex por el nombre de la compañía que lo comercializa.

La prueba se realiza de la forma siguiente. Se incuba el suero con las microesferas durante 30 min a temperatura ambiente en una placa de microtitulación. Tras la incubación, se lavan las microesferas y se añade una solución de IgG antihumana conjugada con otro fluorocromo y se incuban de nuevo las microesferas durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación se analizan las reacciones con el citómetro de flujo que mide la fluorescencia de los fluorocromos internos lo que permite clasificar las microesferas en el conjunto de 100. De forma simultánea se mide la fluorescencia asociada con la unión de los autoanticuerpos.

Se han comercializado varios equipos de reactivos que permiten la medida simultánea de varios autoanticuerpos. Los principales son para especificidades de anticuerpos antinucleares, ANCA y perfil celíaco.

MICROMATRICES DE ANTÍGENOS PARA LOS ESTUDIOS DE AUTOANTICUERPOS

La tecnología de las micromatrices permite el análisis simultáneo de miles de parámetros moleculares. Para el análisis de autoanticuerpos, los antígenos (proteínas, fragmentos de ácidos nucleicos) se depositan en forma de puntos sobre el chip. Estas moléculas de captura, denominadas ligandos o sondas, se inmovilizan en filas y columnas sobre el soporte sólido. Los chips se exponen a las muestras que contienen los autoanticuerpos que se unen a sus correspondientes antígenos inmovilizados en la micromatriz. La concentración del autoanticuerpo en el suero puede determinarse añadiendo un antisuero marcado con un compuesto fluorescente. Esta tecnología aún no se ha comercializado.

Análisis del complejo principal de histocompatibilidad

INTRODUCCIÓN

La superficie de las células de los tejidos humanos contiene unas proteínas encargadas de presentar fragmentos peptídicos antigénicos a los linfocitos T; estas proteínas se denominan HLA (*human leukocyte antigens*, antígenos leucocitarios humanos), o antígenos de histocompatibilidad, y desempeñan un papel central en la regulación de las respuestas inmunitarias. La determinación de los antígenos HLA (tipado) se realiza fundamentalmente para los trasplantes de tejidos, los estudios genéticos de poblaciones y los estudios de asociaciones con enfermedades. En este capítulo se presentan las principales técnicas y métodos que se emplean para analizar los antígenos de histocompatibilidad.

CARACTERÍSTICAS DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Los antígenos de histocompatibilidad desempeñan una función crítica en casi todos los aspectos de la inmunidad celular y humoral. Los anticuerpos frente a los antígenos HLA pueden producir el rechazo agudo de los órganos trasplantados, resistencia a las transfusiones de plaquetas y reacciones transfusionales.

Los antígenos HLA están codificados por muchos genes, estrechamente ligados, situados en una pequeña región del brazo corto del cromosoma 6 (6p21), que constituyen el complejo principal de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*, MHC). Hay seis grupos principales de antígenos HLA: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Estos grupos se dividen en dos clases que se denominan clase I y clase II. Los antígenos de clase I son HLA-A, HLA-B y HLA-C, y los de clase II son HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP.

ESTRUCTURA DE LOS ANTÍGENOS HLA

Las moléculas de los antígenos de clase I, HLA-A, HLA-B y HLA-C, son glicoproteínas transmembrana con un peso molecular de 56 kDa. Se trata de heterodímeros formados por una cadena pesada α de peso molecular 45 kDa y una cadena ligera β (β_2 -microglobulina) de peso molecular 11 kDa. La cadena pesada α es la glicoproteína polimórfica codificada por los genes HLA.

La cadena α está formada por una región hidrófila extracelular con el extremo amino terminal, una región hidrófoba transmembrana y una región hidrófila intracelular con el extremo carboxilo terminal. La región extracelular de la cadena pesada α tiene tres dominios denominados α_1 , α_2 y α_3 , cada uno de ellos con unos 90 aminoácidos. La especificidad antigénica se encuentra en los dominios extracelulares α_1 y α_2 . Estos forman una cavidad donde se acomoda un péptido procesado de 8 a 10 residuos de aminoácido.

Los antígenos de clase II son también glucoproteínas transmembrana formadas por dos cadenas polipeptídicas α y β , con un peso molecular aproximado de 34 y 29 kDa, respectivamente. Ambas cadenas están codificadas por los genes HLA. Las moléculas HLA de clase II también tienen una región extracelular hidrófila con el amino terminal, una región transmembrana hidrófoba y una región intracelular hidrófila con el carboxilo terminal. Las regiones extracelulares de ambas cadenas tienen dos dominios denominados α_1 y α_2 , y β_1 y β_2 . Los polimorfismos de las moléculas de clase II se encuentran predominantemente en el dominio β_1 . Los dominios α_1 y β_1 forman una cavidad de unión para el antígeno. Los dos extremos de la cavidad de clase II son más abiertos que los de clase I, de forma que pueden acomodarse péptidos más grandes.

EXPRESIÓN DE LOS HLA

Las moléculas HLA de clase I se expresan sobre la superficie de casi todas las células nucleadas. Las moléculas HLA de clase II sólo se expresan en los linfocitos B, las células presentadoras de antígenos (*antigen presenting cells*, APC) (monocitos, macrófagos y células dendríticas) y los linfocitos T activados.

GENÉTICA DE LOS HLA

Las cadenas pesadas α de las moléculas de clase I están codificadas por tres genes diferentes, *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C*, que tienen una estructura semejante con 8 exones. Cada *locus* de la clase I (A, B y C) posee muchos alelos que determinan, en última instancia, las especificidades antigénicas de las membranas celulares.

Las cadenas α y β de las moléculas de clase II están codificadas por varios genes. La letra del *locus* va seguida por las letras A y B de acuerdo con las cadenas α y β , respectivamente. Después va un número cuando hay más de un gen de las cadenas α o β en un *locus*. La familia de genes *DR* consta de un solo gen *DRA* y hasta 9 genes *DRB* (*DRB1* a *DRB9*). El gen *DRA* codifica una cadena α invariable que se une a varias cadenas β codificadas por los genes *DRB*. Las especificidades antigénicas HLA-DR (*DR1* a *DR18*) están determinadas por las cadenas polimórficas *DRB1* codificadas por los alelos *DRB1*. Los haplotipos HLA de determinados alelos *DRB1* contienen ligados de forma específica *locus DRB3*, *DRB4* o *DRB5*. Las familias *DP* y *DQ* contienen cada una de ellas genes que se expresan para las cadenas α y β . Los productos génicos de *DQA1* y *DQB1* se asocian para formar las moléculas *DQ*, y los productos de *DPA1* y *DPB1* forman las moléculas *DP*. Los genes que codifican las cadenas α y β de clase II tienen una estructura semejante, aunque la cadena α tiene 5 exones y la cadena β 6 exones.

En la tabla 31-1 se muestran los alelos HLA aceptados con fecha de diciembre de 2009.

HERENCIA

Los genes del MHC, que se heredan de acuerdo con las leyes de Mendel, se encuentran estrechamente ligados, y la recombinación dentro del MHC es rara, por lo que se heredan en bloque. El complejo de genes ligados que se

TABLA 31-1 Alelos HLA aceptados en el momento actual (diciembre de 2009)

| | Locus | Número de alelos |
|-----------------|--------------|-------------------------|
| Clase I | | |
| HLA-A | A | 893 |
| HLA-B | B | 1.431 |
| HLA-C | C | 569 |
| Clase II | | |
| HLA-DR | DRA | 3 |
| | DRB | 814 |
| HLA-DQ | DQA1 | 35 |
| | DQB1 | 106 |
| HLA-DP | DPA1 | 28 |
| | DPB1 | 136 |

encuentra en cada uno del par de cromosomas homólogos y que se heredan en bloque se denomina *haplotipo*. Cada persona hereda un haplotipo de cada uno de sus padres y, por tanto, posee dos alelos de cada gen. Los genes MHC presentan desequilibrio de ligamiento, que señala que los alelos de diferentes *loci* genéticos se heredan juntos en el mismo haplotipo con una frecuencia significativamente mayor de la que cabría deducir del azar.

NOMENCLATURA HLA

La terminología HLA la designa el Comité de Nomenclatura HLA de la Organización Mundial de la Salud. Históricamente, las especificidades serológica y celular se asignaban de acuerdo con los resultados de los talleres de tipado. Estas asignaciones comprendían el nombre de la molécula HLA y una designación numérica, según el orden de la especificidad. En 1987 se presentó la nomenclatura de cuatro dígitos para distinguir a los alelos HLA que se diferenciaban en las proteínas que codificaban. Desde entonces se han añadido más dígitos, y en el momento actual el nombre de un alelo puede estar formado por cuatro, seis u ocho dígitos dependiendo de su secuencia.

Los dos primeros dígitos describen la familia del alelo, que suele corresponder con el antígeno serológico. El tercer y cuarto dígito se han asignado de acuerdo con el orden en el que se han determinado las secuencias. Los alelos cuyos números se diferencian en los cuatro primeros dígitos se diferencian en uno o varios nucleótidos de la proteína codificada. Los alelos que se diferencian sólo por sustituciones de nucleótidos sinónimas dentro de la secuencia codificante se distinguen por el uso del quinto y sexto dígito. Los alelos que sólo se diferencian por polimorfismos de secuencia de los intrones o de las regiones de flaqueo 5' y 3' que no se traducen se distinguen por el uso del séptimo y octavo dígito.

TÉCNICAS PARA EL TIPADO HLA

Se han utilizado una gran diversidad de técnicas para el tipado HLA. En los laboratorios, hasta hace unos años los procedimientos más usuales eran las

pruebas serológicas y las celulares. La determinación de las secuencias de nucleótidos de los alelos de clase I y II ha permitido aplicar los métodos moleculares de ADN para el tipado HLA.

TIPADO SEROLÓGICO

El tipado serológico identifica los antígenos de superficie utilizando antisueros de tipado de un modo análogo a como se hace con los grupos sanguíneos. Como no existen anticuerpos HLA naturales, los anticuerpos para las pruebas de tipado serológico de los antígenos HLA se obtienen a partir de personas aloinmunizadas, como quienes han recibido varias transfusiones, las mujeres multíparas y los receptores de trasplantes. Para este fin también se dispone de anticuerpos monoclonales.

La utilidad de las pruebas serológicas para el tipado HLA ha estado limitada por la biodisponibilidad de sueros específicos de alelo. Como los anticuerpos identifican diferencias estructurales sobre la superficie de las moléculas HLA, las diferencias de las estructuras proteínicas producidas por un único o un número limitado de polimorfismos de nucleótidos, especialmente dentro de la cavidad de unión del péptido de la cadena pesada del HLA, no es detectable por estas técnicas. Sin embargo, estas diferencias tienen significado funcional, ya que determinan la especificidad y afinidad de la unión del péptido y, por lo tanto, el reconocimiento de la célula T propia, así como las células diana alogénicas. Por esta razón, el tipado de alta resolución funcionalmente significativo sólo puede conseguirse mediante los métodos moleculares

TIPADO DE LOS ANTÍGENOS DE CLASE I

El tipado de los antígenos de clase I se realiza en los linfocitos. La prueba serológica más empleada para hacerlo es la de microcitotoxicidad. Se incuban los linfocitos aislados por centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque con un panel de antisueros bien caracterizados de especificidad conocida. La prueba se realiza en dos fases. Durante la fase de sensibilización, se incuban los linfocitos 30 min con los antisueros. A continuación, se añade el complemento y se vuelven a incubar 60 min. Si los linfocitos llevan una molécula en la superficie celular que reconozca los anticuerpos fijadores de complemento del aloantisuero, se unirán los anticuerpos a las células y estas se lisarán tras añadir el complemento. El daño celular puede determinarse por tinción con colorantes vitales o compuestos fluorescentes. Para la detección fluorescente se usan diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio, y para la detección por microscopía óptica se emplean azul Trypan y etilendiaminotetraacetato (EDTA) o eosina y formol. Se obtiene el porcentaje de células lisadas. Entonces se considera positiva la reacción cuando están dañados más del 10% de los linfocitos. En la actualidad, se venden bandejas de sueros para el tipado HLA de clase I.

TIPADO DE LOS ANTÍGENOS DE CLASE II

El tipado serológico casi no se utiliza para tipar los antígenos de clase II, ya que ha sido sustituido por el tipado molecular. Sin embargo, lo describiremos brevemente. Para el tipado serológico se emplean linfocitos B con pruebas de

microcitotoxicidad, análogas a las empleadas para los antígenos de clase I, teniendo en cuenta dos precauciones. En primer lugar, las células han de enriquecerse previamente en linfocitos B, ya que la sangre sólo contiene un 20% de este tipo de células. En segundo lugar, deben eliminarse los anticuerpos de clase I de los especímenes que van a analizarse.

La concentración de linfocitos B puede conseguirse haciendo pasar los linfocitos, aislados por un gradiente de centrifugación en Ficoll-Hypaque, por columnas que contienen lana de vidrio. Los linfocitos B no se adhieren a esta y se eluyen de la columna. Otra forma de enriquecer el espécimen en linfocitos B consiste en añadir eritrocitos de carnero, que formarán rosetas con los linfocitos T. La centrifugación a poca velocidad deja en el sobrenadante a los linfocitos B.

Los anticuerpos para tipar los antígenos de clase II se obtienen, fundamentalmente, del suero de las mujeres embarazadas. Este suero debe adsorberse sobre plaquetas para eliminar los antígenos de clase I.

TIPADO MOLECULAR

Los avances de las técnicas moleculares han permitido su utilización para el tipado de los antígenos HLA. El tipado molecular de HLA emplea la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se aplican tres métodos moleculares para el tipado HLA: hibridación con sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia (*sequence-specific oligonucleotide probe*, SSOP), cebado específico de secuencia (*sequence-specific priming*, SSP) y secuenciación.

Generalmente, se amplifican los exones 3 y 4 de los genes de clase I y el exón 2 de los genes de clase II. Estos exones son los fragmentos de los genes que codifican la mayoría de los polimorfismos de las moléculas de clase I y de clase II.

MÉTODO DE HIBRIDACIÓN CON SONDAS ESPECÍFICAS DE SECUENCIA

Se aísla el ADN genómico y se amplifica con pares de oligonucleótidos cebadores específicos para fragmentos de genes HLA. A continuación se analiza el ADN amplificado utilizando un panel de sondas de oligonucleótidos que hibridan con secuencias específicas presentes en el fragmento de gen amplificado. Las sondas de oligonucleótidos se marcan. El ADN amplificado se inmoviliza sobre un soporte sólido (membrana de nailon o disco de plástico) y se añaden las sondas marcadas para que se produzca la hibridación. Alternativamente, pueden ligarse al soporte sólido las sondas sin marcar y se añade el ADN amplificado que se marca durante el proceso de PCR para que se produzca la hibridación (hibridación inversa). La hibridación ocasiona un punto o una banda detectable.

MÉTODO DE CEBADO ESPECÍFICO DE SECUENCIA

El tipado mediante el método de cebado específico de secuencia (SSP) requiere múltiples reacciones PCR independientes. Se aísla el ADN genómico y se añade a un panel de pares de oligonucleótidos cebadores. Cada par de cebadores tiene especificidad por determinadas secuencias de nucleótidos dentro de los

exones seleccionados de los genes HLA. Se realiza la PCR y los productos amplificados resultantes se analizan mediante electroforesis en gel. La asignación del tipo HLA (genes y alelos) se basa en la presencia o ausencia de producto amplificado como una banda en cada reacción.

MÉTODO DE SECUENCIACIÓN

La secuenciación del ADN es el método final de identificación de los alelos *HLA*. En algunos procedimientos clínicos, como los trasplantes de médula ósea, es necesaria la información detallada del genotipo tanto del donante como del receptor. El tipado mediante secuenciación implica la amplificación por PCR de regiones codificantes específicas de los genes HLA y la secuenciación de los amplicones. La secuenciación se realiza con el método de Sanger automatizado (v. capítulo 17).

En los últimos años ha comenzado a utilizarse la pirosecuenciación. Se trata de un método en tiempo real de secuenciación por síntesis que emplea cuatro enzimas: ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa. Se diferencia fundamentalmente del método de secuenciación de Sanger por el orden de incorporación de los nucleótidos. Cada nucleótido se añade y analiza de forma individual su incorporación a un ADN molde nascente. Cada incorporación se acompaña de la liberación de pirofosfato (PPi) en cantidad equimolar a la cantidad de nucleótido incorporado. La ATP sulfurilasa convierte de forma cuantitativa el PPi en ATP en presencia de adenosina 5'-fosfosulfato. La ATP a continuación impulsa la conversión de luciferina en oxiluciferina catalizada por la luciferasa, que genera luz visible en cantidades proporcionales a la cantidad de ATP. La luz se detecta mediante un dispositivo CCD y se presenta en forma de pico en un pirograma. La altura de cada pico es proporcional al número de nucleótidos incorporados. Los dNTP no incorporados y el exceso de ATP se degradan de forma continua por la apirasa. Una vez completada la degradación se añade el siguiente dNTP y comienza un nuevo ciclo de pirosecuenciación.

RESOLUCIÓN DEL TIPADO MOLECULAR

Se denomina nivel de resolución en el tipado molecular a la capacidad para discriminar entre alelos. El tipado molecular se realiza generalmente a dos niveles de resolución. El primero utiliza reactivos (sondas o pares de cebadores) que detectan todos los alelos de un gen HLA (baja resolución). El segundo utiliza reactivos con especificidad para alelos seleccionados (alta resolución). El tipado de baja resolución identifica el gen HLA a nivel serológico o antigénico (p. ej., HLA-A*01, DRB1*03), mientras que el tipado de alta resolución identifica los alelos específicos (p. ej., HLA-A*0101, DRB1*0301). Hay un nivel de resolución intermedio en que puede ser correcto más de un alelo de un gen HLA (p. ej., DRB1*0302/0303/0304/0309).

ANÁLISIS DE ANTICUERPOS HLA Y PRUEBAS CRUZADAS DE LINFOCITOS

En los trasplantes es fundamental la detección en el receptor de anticuerpos HLA preformados. Asimismo, cuando se dispone de un donante potencial se

realiza una prueba cruzada final entre el suero del receptor y los linfocitos del donante para determinar la compatibilidad. Los resultados positivos de la prueba predicen el riesgo de rechazo del injerto.

Hasta hace poco tiempo, el análisis de microlinfocitotoxicidad dependiente del complemento era la prueba que se utilizaba para detectar los anticuerpos HLA en los pacientes que iban a recibir un trasplante. En esta prueba se incubaba el suero con células de tipo HLA conocido y luego se añade suero de conejo como fuente de complemento y colorantes celulares para valorar el grado de muerte celular. El análisis del suero frente a un panel de células con HLA conocido que cubran la mayoría de los antígenos HLA determina las especificidades de los anticuerpos y puede calcularse un porcentaje de anticuerpo reactivo (PAR). La misma técnica se ha utilizado para una prueba cruzada de los receptores y los potenciales donantes que señale la adecuación del injerto.

Se ha utilizado también la citometría de flujo para las pruebas cruzadas. Esta técnica puede detectar anticuerpos HLA específicos del donante que en algunos casos estén asociados con el rechazo en presencia de una prueba cruzada de microlinfocitotoxicidad negativa. En los últimos años han comenzado a emplearse para el análisis de los anticuerpos HLA las pruebas en fase sólida. Las principales son los ELISA y las que emplean micropartículas recubiertas de antígenos HLA con detección mediante citometría de flujo en la plataforma Luminex.

Los métodos de ELISA constan esencialmente de grupos de moléculas HLA individuales unidas a la superficie del pocillo de una microplaca. Se añade el suero al pocillo y el anticuerpo se une a la molécula adecuada. Posteriormente, se une un anticuerpo anti-IgG humana marcado con una enzima. Tras el lavado se añade el sustrato de la enzima y se mide espectrofotométricamente el color resultante.

La tecnología de análisis de anticuerpos HLA mediante la plataforma Luminex utiliza diversas microesferas con fluorocromos de diferente intensidad a las que se unen una o varias moléculas HLA. Existen tres niveles de análisis para ambas clases de HLA I y II, donde varía el número de moléculas HLA que se unen. En el primer nivel, las microesferas tienen un número elevado de moléculas de clase I o de clase II, y esencialmente proporciona un resultado positivo o negativo. En el segundo nivel, cada microesfera contiene dos alelos de cada *locus*; HLA-A, HLA-B y HLA-C en el caso de clase I y HLA-DR y HLA-DQ en el caso de clase II. En el tercer nivel hay una única molécula de antígeno unida a cada microesfera.

Para realizar la prueba se añade el suero a la mezcla de microesferas y los anticuerpos HLA se unen a la microesfera que lleva unida la molécula de HLA que lleva el antígeno correspondiente. A continuación se añade un anticuerpo anti-IgG humana marcado con otro compuesto fluorescente. Se pasa la muestra por el citómetro de flujo. La combinación de las dos señales fluorescentes define la especificidad del anticuerpo.

HLA Y TRASPLANTES

El trasplante de tejidos sólidos y el trasplante alogénico de células madre representan en la actualidad un tratamiento común para la insuficiencia orgánica en fase terminal y varios cánceres hematológicos y no hematológicos. La

TABLA 31-2 Ejemplos de asociaciones entre HLA y enfermedades

| Enfermedad | Raza | Antígeno HLA |
|----------------------|---------------------|--|
| Diabetes tipo I | | DQB1*0302 |
| Artritis reumatoide | Blanca Japoneses | DRB1*01, DRB1*0401, DRB1*0404 DRB1*0405 |
| Enfermedad celíaca | Blanca | DRB1*0301, DQB1*0201, DQA1*0501 |
| Enfermedad de Graves | Blanca | DR3, DQA1*0102 |

compatibilidad de las moléculas HLA del paciente y del donante no relacionado disminuye de forma significativa la probabilidad de rechazo del injerto, la enfermedad injerto contra huésped y la mortalidad relacionada con el trasplante. Los antígenos HLA-A, HLA-B y HLA-DR son los principales implicados en los trasplantes. También se ha observado que en los trasplantes de células madre hematopoyéticas la compatibilidad HLA-C afecta al resultado. Tanto las respuestas de linfocitos T como de linfocitos B son importantes en el rechazo del injerto.

El rechazo puede ser hiperagudo, agudo o crónico. Se produce rechazo hiperagudo en los pacientes que ya tienen anticuerpos específicos frente al injerto. Los anticuerpos naturales frente al grupo sanguíneo ABO y los anticuerpos HLA preformados inducen el rechazo hiperagudo. El rechazo agudo es principalmente el resultado de una respuesta mediada por linfocitos T. El rechazo crónico puede deberse a respuestas mediadas por anticuerpos o células. Mientras que los anticuerpos frente a ambos HLA, de clase I y II, están asociados con el rechazo temprano, los anticuerpos HLA de clase II están asociados con más fuerza con el rechazo crónico a largo plazo.

HLA Y ENFERMEDAD

Hay un gran número de enfermedades que muestran una asociación con HLA. Un problema de los genes *HLA* que proporcionan susceptibilidad a algunas enfermedades es que presentan una penetrancia incompleta. Además, muchas de las enfermedades asociadas con los HLA son poligénicas. En la tabla 31-2 se dan algunos ejemplos de asociación entre HLA y enfermedades.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades alérgicas son un grupo heterogéneo de enfermedades frecuentes, tanto en niños, como en adultos. Las manifestaciones clínicas de las enfermedades alérgicas pueden ser leves, como en la rinitis alérgica estacional, o graves con una morbilidad elevada, como el asma. El laboratorio desempeña un papel importante tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de las enfermedades alérgicas. En este capítulo se presentan las principales técnicas y métodos que utilizan los laboratorios clínicos en relación con las enfermedades alérgicas.

ALÉRGENOS

Los alérgenos son glucoproteínas, lipoproteínas o proteínas conjugadas con haptenos que desencadenan la formación de un anticuerpo IgE cuando se introducen en un hospedador inmunocompetente y genéticamente predispuesto. Se ha identificado un número elevado de alérgenos de importancia clínica en pólenes, hierbas, hongos, parásitos, venenos de insectos, alimentos, fármacos y sustancias ocupacionales.

MECANISMOS DE LA HIPERSENSIBILIDAD INMEDIATA

La alergia de tipo I se inicia por la generación de anticuerpos IgE tras la introducción de un alérgeno en el sistema inmunitario. En una segunda exposición al alérgeno, la unión de este a los anticuerpos IgE específicos ya preformados, unidos a la superficie de los mastocitos y los basófilos, produce la liberación de mediadores inflamatorios (histamina, leucotrienos, citocinas, proteasas), que dan lugar a las manifestaciones clínicas (rinitis, urticaria, anafilaxia).

DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS

El diagnóstico de las enfermedades alérgicas comienza con una anamnesis detallada y el reconocimiento físico. La anamnesis detallada sobre el patrón temporal de los síntomas puede indicar los alérgenos a los que es sensible el paciente. Una vez que el clínico ha llegado a la conclusión de que el paciente tiene, con una probabilidad elevada, una determinada enfermedad alérgica, el paso siguiente son las pruebas cutáneas de provocación *in vivo* y las determinaciones serológicas de IgE total e IgE específicas de determinados alérgenos.

PRUEBAS DE PROVOCACIÓN *IN VIVO*

Las pruebas de provocación *in vivo* son el segundo nivel de confirmación de una enfermedad alérgica. La prueba precisa depende de la naturaleza de la enfermedad. Las pruebas cutáneas implican la aplicación de un extracto del alérgeno en la piel, bien mediante una punción o bien mediante una inyección

intradérmica. En los alérgenos que se inhalan, las pruebas cutáneas son muy precisas. En cambio, en las alergias alimentarias, las alergias al látex, la sensibilidad a los fármacos y las alergias ocupacionales, las pruebas cutáneas son menos fiables.

MÉTODO DE PUNCIÓN

Se coloca una gota de la disolución que contiene el alérgeno sobre la parte anterior del antebrazo. El alérgeno se introduce en la epidermis mediante una punción a través de la gota empleando una aguja de 8 mm con el bisel hacia arriba. Tras la punción se elimina el exceso de líquido con una gasa o un papel suave. La reacción inmediata (roncha o eritema) se lee a los 15-20 min, cuando alcanza el diámetro máximo. Las pruebas individuales deben espaciarse una distancia suficiente para evitar el solapamiento de los eritemas. Deben aplicarse controles positivos (histamina) y negativos (suero fisiológico) en paralelo con los alérgenos.

MÉTODO INTRADÉRMICO

El alérgeno puede administrarse de forma intracutánea empleando una aguja de 8 mm con la que se inyecta la disolución. La inyección de 0,02 ml produce inicialmente una hinchazón de 2-3 mm de diámetro. La prueba se lee a los 15-20 min.

PRUEBAS DE LABORATORIO

Las principales pruebas de laboratorio en el estudio de las enfermedades alérgicas son la determinación de la IgE total, las IgE específicas y las pruebas de liberación de marcadores.

IgE TOTAL EN SUERO

En la actualidad, los principales métodos de determinación de la IgE total en suero son los inmunoanálisis no isotópicos. Se emplean los métodos en fase sólida, en los que se une un anticuerpo anti-IgE a la fase sólida. Tras la captura de la IgE del suero, la detección se realiza con un segundo anticuerpo anti-IgE marcado. Después de eliminar el anticuerpo marcado no unido, se cuantifica la señal. Esta es directamente proporcional a la cantidad de IgE en suero. Existen en el mercado una gran cantidad de métodos automatizados.

La medida de la IgE total en suero en los niños es de utilidad limitada y su principal valor parece ser alertar al médico sobre la posibilidad de una enfermedad alérgica, aunque un valor normal no excluye el diagnóstico de enfermedad alérgica. En los adultos, la medida de IgE total es de poca utilidad diagnóstica.

ANTICUERPOS IgE ESPECÍFICOS DEL ALÉRGENO

En 1967 se comercializó Phadebas-RAST, primera prueba para la detección de anticuerpos IgE específicos del alérgeno. Se trataba de un análisis inmunorra-

diométrico heterogéneo no competitivo en fase sólida. El alergosorbente se preparaba acoplando de forma covalente el alérgeno con celulosa activada por bromuro de cianógeno. Esta prueba de primera generación era semicuantitativa.

Las mejoras de esta primera prueba RAST han dado lugar a las denominadas de segunda generación, que incorporan una mayor calidad de los alérgenos y nuevas matrices. Se trata de pruebas cuantitativas comercializadas por Phadia (Phadia CAP System) y Siemens (DPC AlaSTAT).

La automatización total de las técnicas para cuantificar los IgE específicos ha conducido a las denominadas pruebas de tercera generación. Son Phadia UniCAP y Siemens Immulite System.

PRODUCCIÓN DE ALÉRGENOS PARA LAS PRUEBAS *IN VITRO*

Las técnicas diagnósticas *in vitro* de las enfermedades alérgicas dependen de la capacidad para demostrar la presencia de anticuerpos IgE específicos dirigidos frente a un alérgeno, lo que requiere el empleo de alérgenos en su forma nativa. La calidad de los antígenos que se utilizan en las pruebas *in vitro* influye sobre la especificidad de las medidas de anticuerpos IgE. Los primeros análisis empleaban extractos crudos o purificados de las fuentes de alérgenos. En los últimos años se ha mejorado mucho la calidad del material alergénico que se utiliza en las pruebas diagnósticas.

Con extractos de alérgenos sólo se puede determinar si un paciente se encuentra sensibilizado frente a alérgenos no identificados de una fuente alérgica dada, pero con estas pruebas no se pueden identificar los componentes que desencadenan la enfermedad. La mayoría de los pacientes forman anticuerpos IgE sólo frente a algunos componentes alergénicos.

El aumento de la disponibilidad de paneles de alérgenos derivados de varias fuentes diferentes permite un análisis detallado del perfil de sensibilidad de los pacientes. Este concepto se ha definido como diagnóstico de componentes resueltos (DCR). El fin del DCR es establecer asociaciones significativas entre subpoblaciones específicas de IgE específicas, medidas con componentes individuales del alérgeno y aspectos con relevancia clínica de la enfermedad alérgica.

La purificación y caracterización de un alérgeno específico es un procedimiento complejo que implica la combinación de métodos analíticos y preparativos, junto con procedimientos inmunoquímicos y biológicos. Los extractos acuosos se someten a diversos pasos cromatográficos preparativos para obtener una cantidad suficiente de material para unas separaciones analíticas más finas.

Una vez identificado el alérgeno, el paso siguiente es clonar el gen, secuenciarlo y luego producir alérgenos recombinantes en cantidades ilimitadas.

ANTÍGENOS RECOMBINANTES

La identificación de alérgenos específicos, junto con las técnicas de ADN recombinante, han permitido obtener grandes cantidades de alérgenos específicos para su uso en las pruebas *in vitro*. La producción de alérgenos recombinantes requiere sistemas de expresión, condiciones de cultivo y procesos de

purificación adecuados. El conocimiento del estado de glucosilación, la presencia de enlaces disulfuro y la estabilidad global de la proteína es una información útil para el establecimiento del sistema de expresión. *Escherichia coli* es un hospedador adecuado para proteínas no glucosiladas o en las que no es necesaria la glucosilación. En algunos casos, la reactividad de la IgE va dirigida frente al hidrato de carbono de la glucoproteína alergénica. Las proteínas glucosiladas pueden producirse en varios sistemas de expresión eucariotas, como la levadura *Pichia pastoris*, los baculovirus en células de insectos y varias plantas. Los alérgenos recombinantes deben investigarse minuciosamente con relación a sus propiedades bioquímicas, biofísicas e inmunológicas. Con fines diagnósticos, es esencial que las moléculas recombinantes muestren una reactividad IgE igual a las moléculas naturales.

MICROMATRICES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS

Las pruebas de IgE específicas se han diseñado como análisis de un solo alérgeno. Las tecnologías de micromatrices proteínicas permiten la medida simultánea de anticuerpos IgE con muchas especificidades con la misma muestra de suero. Con esta tecnología, se depositan de manera uniforme utilizando un robot pequeñas cantidades (~10 nl) de mezclas purificadas o crudas de proteínas alergénicas en chips de silicio activados. La matriz teóricamente permite unir miles de alérgenos. Como consecuencia, sólo se necesitan cantidades mínimas de suero para determinar las IgE de muchas especificidades alergénicas. Posteriormente, se emplea IgE antihumana marcada con biotina y estreptavidina conjugada con Cy3 para detectar los anticuerpos IgE humanos unidos al chip. La IgE unida se cuantifica mediante el escaneado del chip.

PRUEBAS DE LIBERACIÓN DE MARCADORES

Se han comercializado pruebas de liberación de marcadores como pruebas alternativas de confirmación de las enfermedades alérgicas dependientes de IgE. Las principales son los análisis de liberación de mediadores inducidos por el alérgeno, la liberación de histamina y la liberación de LTC₄ (cisteinil leucotrieno 4).

ANÁLISIS DE LIBERACIÓN DE MEDIADORES INDUCIDOS POR EL ALÉRGENO

Como ya se ha indicado, el entrecruzamiento del alérgeno con la IgE sobre la superficie de los basófilos induce la liberación de diversos mediadores, entre ellos la histamina y el cisteinil leucotrieno C₄. En ambas pruebas, se incubaba sangre total heparinizada con cantidades crecientes de anti-IgE o del alérgeno. La estimulación *in vitro* normalmente se realiza en presencia de IL-3 para aumentar la sensibilidad. Tras la incubación, se centrifugan las células y se recogen los sobrenadantes y se analiza el contenido de histamina o de leucotrieno C₂ mediante un inmunoanálisis. La cantidad neta de liberación del mediador se calcula por sustracción de la cantidad de liberación espontánea de la liberada por el mediador inducida por el alérgeno.

A pesar de su indiscutible valor como procedimientos de investigación, los análisis de liberación de histamina y leucotrieno C₄ no se usan en el diagnóstico rutinario de las enfermedades alérgicas humanas.

APLICACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN LAS PRUEBAS DE ACTIVACIÓN DE LOS BASÓFILOS

Las pruebas de activación de los basófilos empleando la citometría de flujo representan una nueva tecnología para la identificación de los pacientes sensibilizados. Sin embargo, su aplicación en los laboratorios clínicos aún es limitada. En estas pruebas la sangre total se preincuba con un amortiguador que contiene IL-3, que ceba los basófilos. Posteriormente, se incuban las células con concentraciones variables de extractos crudos del alérgeno o un alérgeno recombinante. Los basófilos sensibilizados expresan una alta densidad de CD63 sobre su superficie. Los basófilos con IgE unida a los receptores de superficie se identifican mediante citometría de flujo usando anti-IgE humana conjugada con isotiocianato de fluoresceína junto con anti-CD63 marcado con ficoeritrina. Esta prueba se emplea fundamentalmente en investigación más que en estudios clínicos.

INTRODUCCIÓN

El laboratorio de microbiología clínica tiene por fin proporcionar con rapidez y exactitud información sobre la presencia o la ausencia de microorganismos que causan infección. Además, debe informar sobre la sensibilidad de esos microorganismos a los antimicrobianos. Los principales métodos que se emplean son la observación directa, el cultivo, las pruebas bioquímicas, los métodos moleculares y, más recientemente, la espectrometría de masas MALDI-TOF. En este capítulo se presentan y describen las principales características del laboratorio de microbiología clínica y las técnicas básicas que emplea.

EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

El laboratorio de microbiología clínica debe estar integrado con el laboratorio clínico para garantizar la manipulación y el procesamiento adecuado de los especímenes, reducir los errores y aumentar la eficacia y la productividad. Debe disponer de un espacio amplio para la recepción y el procesamiento de los especímenes, que ha de estar situado a la entrada del laboratorio. Asimismo, dispondrá de zonas para la esterilización y la preparación de los medios.

La principal diferencia del laboratorio de microbiología clínica con los otros tipos de laboratorios clínicos es que maneja microorganismos patógenos, con el consecuente riesgo para el personal del laboratorio. Asimismo, la interpretación de las pruebas de identificación descansa en la capacidad de aislar los microorganismos patógenos, al tiempo que se hacen mínimos los contaminantes microbianos. Finalmente, el diseño del laboratorio de microbiología clínica incluye equipos específicos que sólo se emplean en ellos.

La mayoría de los laboratorios de microbiología clínica se dividen en secciones, de acuerdo con los especímenes que manejan, como hemocultivos, urinocultivos, etc., y/o por la materia, como bacteriología, micología, parasitología, etc.

ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN

Los conceptos de esterilización y desinfección se refieren sólo a los microorganismos. Se dice que un medio es estéril cuando la ausencia de microorganismos (protozoos, hongos, bacterias y virus) es completa. El término estéril es absoluto. El proceso de *esterilización* comprende los mecanismos que conducen a la inactivación total de cualquier tipo de microorganismo, incluida su capacidad de reproducción. Sin embargo, la esterilización no implica la destrucción de los constituyentes celulares, como las enzimas, los productos intermedios, las toxinas, etc.

Se denomina *desinfección* al proceso de reducción de los microorganismos de un medio, de los cuales se eliminan, fundamentalmente, los patógenos. En contraste con la esterilización, la desinfección no es un término absoluto, sino relativo. Un medio estéril está desinfectado, pero un medio desinfectado no tiene por qué ser estéril.

MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN

El calor, las radiaciones, los ultrasonidos y la filtración son los métodos principales de esterilización.

Esterilización por calor

El calor es el método más sencillo y seguro de esterilización al inactivar enzimas y componentes proteínicos esenciales para el funcionamiento celular. La incineración producida, por ejemplo, por la llama de un mechero de alcohol o de gas es un sistema sencillo de esterilización, muy eficaz, que se utiliza fundamentalmente para esterilizar las asas de platino que se emplean para sembrar los cultivos.

En la esterilización por el calor hay que diferenciar básicamente dos tipos de calor: el seco y el húmedo. Como método de esterilización, el calor seco utiliza una atmósfera de aire caliente, que se consigue con estufas u hornos. Se requieren temperaturas elevadas (160-180 °C) y exposiciones prolongadas (más de 2 h), y se suele emplear para la cristalería y el instrumental metálico. Por su parte, el calor húmedo emplea agua calentada o vapor de agua a presión. Sin embargo, el agua a 100 °C no basta para destruir las esporas de las bacterias, por lo que no se logra la esterilidad absoluta. Para la esterilización con calor húmedo se emplean autoclaves, que son sistemas que aprovechan el hecho de que, cuando disminuye la presión sobre el agua, esta alcanza la ebullición a temperaturas más elevadas. Generalmente, en las autoclaves se trabaja a una atmósfera, lo que produce vapor de agua a 120 °C. El tiempo de actuación suele ser de 10 a 30 min. La esterilización por calor húmedo en autoclave se utiliza principalmente para los aparatos con ajustes de goma y las jeringas que contengan piezas metálicas, y para esterilizar los medios de cultivo.

Esterilización por radiaciones y ultrasonidos

La esterilización por medio de radiaciones emplea dos tipos de radiación: las no ionizantes y las ionizantes. Entre las *radiaciones no ionizantes*, la luz ultravioleta de longitud de onda comprendida entre 240 y 280 nm es un método importante de esterilización. El mecanismo de acción de la luz ultravioleta se basa en la producción de mutaciones letales. Este tipo de esterilización se usa básicamente para vendas y paquetes quirúrgicos.

Las *radiaciones ionizantes*, como los rayos γ , producen cambios estructurales de los ácidos nucleicos y las proteínas. Estas radiaciones son muy eficaces para esterilizar y también inactivan los virus. Se aplican para productos farmacéuticos.

Los *ultrasonidos* destruyen las estructuras de los microorganismos, como la membrana plasmática, y esto conduce a su inactivación. Se suelen usar para esterilizar los medios líquidos.

Esterilización por filtración

Finalmente, la filtración es otro de los agentes físicos utilizados para esterilizar. En este caso, se eliminan los microorganismos y no se destruyen. Hay filtros de varios tipos, con tamaños de poro inferiores a las dimensiones de los micro-

organismos, que permiten separarlos selectivamente. Los más utilizados son los de porcelana, las membranas porosas y los de colodión. Debido al pequeño tamaño de los poros, deben hacerse pasar a presión a través del filtro los líquidos que quieren esterilizarse. Hay que tener en cuenta que la filtración tiene el inconveniente de no retener los virus más pequeños.

Los filtros de membrana se emplean para la producción comercial de varias soluciones farmacéuticas y de inyectables que se estropean con el calor. Asimismo, el suero para los medios de cultivo de bacterias y virus a menudo se esteriliza por filtración, y también algunos azúcares que son inestables cuando se calientan.

MÉTODOS DE DESINFECCIÓN

Generalmente, la desinfección utiliza sustancias químicas que afectan el funcionamiento celular por diversos métodos; por ejemplo, destruyendo la pared celular, la membrana plasmática, los ácidos nucleicos o las proteínas. Según el mecanismo de acción, los desinfectantes pueden ser bacteriostáticos o bactericidas. Los *bacteriostáticos* inhiben la multiplicación de los microorganismos pero no producen su muerte, mientras que los *bactericidas* destruyen el microorganismo. Sólo estos últimos son adecuados como desinfectantes. El efecto bacteriostático o bactericida de un desinfectante depende de diversos factores. A diferencia de los antibióticos, que son muy selectivos para determinadas especies bacterianas, los desinfectantes son muy tóxicos. La eficacia de los desinfectantes depende de diversas variables, entre las que cabe considerar su concentración, el tiempo de actuación, el pH, la temperatura y la presencia de otras sustancias.

La *concentración* que debe darse a las sustancias químicas para que actúen como desinfectantes es muy variable. Algunas sustancias son letales a concentraciones muy bajas, mientras que otras necesitan grandes concentraciones para ejercer su efecto. El tiempo es también un factor importante, ya que no todos los microorganismos mueren al mismo tiempo, sino que se produce un descenso gradual con el tiempo. Hay una relación estrecha entre la concentración del compuesto químico y el tiempo requerido para destruir una fracción dada de una población de microorganismos.

El *pH del medio*, que afecta tanto a la carga del microorganismo como a la del compuesto químico, la *temperatura*, que generalmente duplica la tasa de mortalidad por cada aumento de 10 °C, y la *presencia de otras sustancias* (materia orgánica) son otros factores importantes en la acción de los desinfectantes químicos.

El etanol, los fenoles y los cresoles causan la desnaturalización de las proteínas de los microorganismos. El etanol se utiliza como desinfectante cutáneo y, entre los cresoles, el lisol es el que más se utiliza en concentraciones al 3% para limpiar el instrumental. Los jabones y detergentes actúan como agentes tensoactivos, reaccionando con los ácidos grasos de las membranas de los microorganismos. Se usan para limpiar el material de vidrio.

OBSERVACIÓN DIRECTA DE LOS MICROORGANISMOS

El primer paso del análisis microbiológico suele ser la observación microscópica de los especímenes. La observación directa es, muchas veces, suficiente para establecer con rapidez un tratamiento inicial. Las preparaciones húmedas

con el material clínico en una gota de solución salina permiten la determinación de la composición celular, la morfología y la motilidad. Sin embargo, el material celular y los microorganismos normalmente son transparentes y deben emplearse colorantes para teñirlos.

Las preparaciones húmedas se emplean para determinar la morfología, la estructura, la actividad biológica y la motilidad de los microorganismos. Los especímenes se observan mediante microscopía de campo brillante, contraste de fase o campo oscuro. El empleo de métodos de tinción de colorante único, como el azul de metileno o el yoduro, mejora la visualización de los microorganismos al aumentar el contraste de las estructuras.

TINCIÓN CON COLORANTE ÚNICO

La principal tinción con colorante único es la tinción con azul de metileno. En esta tinción se introduce la extensión en una disolución acuosa de azul de metileno durante 5 min. Esta tinción es útil para la observación directa de leucocitos en heces, la detección de bacterias, especialmente los microorganismos gramnegativos que se tiñen poco, las espiroquetas y *Corynebacterium diphtheriae*.

TINCIÓN DIFERENCIAL

La *tinción diferencial* permite la clasificación de la mayoría de los patógenos. Las principales tinciones diferenciales son la de Gram y la de Ziehl-Neelsen. Las extensiones pueden realizarse directamente con el producto que se investiga, con los exudados o con el sedimento obtenido después de centrifugar el líquido cefalorraquídeo o la orina. También pueden efectuarse extensiones de colonias procedentes de los cultivos. La extensión se fija y se seca, generalmente por medio del calor, y posteriormente se tiñe.

En las preparaciones diferenciales fijadas se emplean cuatro componentes que se utilizan de forma progresiva: un colorante primario, un mordiente, un agente decolorante y un colorante secundario.

Tinción de Gram

Es la tinción diferencial más utilizada en microbiología. La reacción de Gram, la morfología y la disposición de los microorganismos proporcionan datos que permiten una identificación preliminar. En la tinción de Gram se introduce la extensión en una disolución acuosa de violeta de genciana (colorante primario) entre 1 y 2 min. Luego se diferencia con una disolución de lugol (yodo y yoduro potásico) (mordiente) durante 30 s. Se decolora con alcohol del 90% o alcohol-acetona y se lava con agua. Después se introduce la extensión en una disolución acuosa de fucsina diluida (colorante secundario) entre 30 y 60 s y se vuelve a lavar con agua. Los gérmenes grampositivos se tiñen de color morado, y los gramnegativos, de rojo.

Tinción de Ziehl-Neelsen

Se introduce la extensión en fucsina fenicada concentrada durante 10 min, y se calienta tres veces con un mechero, dejándose enfriar entre cada vez hasta que

se desprendan vapores. Luego se decolora con ácido clorhídrico concentrado y alcohol del 96% y se lava con agua. Después se introduce la extensión en una disolución de azul de metileno entre 2 y 5 min y se lava otra vez con agua. Los microorganismos acidorresistentes aparecen con una coloración roja, mientras que el fondo y los microorganismos que no son acidorresistentes aparecen de color azul.

RECUESTO DE BACTERIAS

Cuando se realiza un recuento de bacterias debe diferenciarse el número total, sin considerar si están vivas o muertas, y el número de las vivas, esto es, las capaces de crecer y multiplicarse. La masa celular total puede determinarse de forma directa en términos de peso seco; sin embargo, este método es tedioso y sólo suele utilizarse como referencia para calibrar otros. El método más empleado para determinar la *cantidad total* de microorganismos en suspensión es medir la turbidez. Esta puede cuantificarse de forma visual, por comparación con una serie de tubos calibrados, o por nefelometría o turbidimetría, utilizando como patrones disoluciones de bacterias que contengan una cantidad conocida de estas. Las técnicas turbidimétricas son muy útiles para determinar la masa celular en un cultivo en crecimiento y para evaluar la acción de determinados fármacos sobre las bacterias.

Las *bacterias totales* (vivas y muertas) pueden cuantificarse con una cámara de recuento bacteriano como la de Petroff-Hausser, o utilizando un contador electrónico de partículas, que además proporciona la distribución de tamaños.

Las *bacterias vivas* se cuentan diluyendo el espécimen con un diluyente adecuado y sembrándolas en un medio de cultivo sólido apropiado. Después de la incubación, se cuenta el número de colonias que aparezcan en la placa y se multiplica por la dilución, con lo que se obtiene el número de bacterias vivas presentes originalmente en el espécimen. Los especímenes que contengan menos de 100 microorganismos por mililitro, como la orina, en vez de diluirse deberán concentrarse. Para ello, se pasa el espécimen a través de filtros estériles que retengan las bacterias. La membrana se traslada al medio sólido de incubación y se cuenta el número de colonias originadas, que serán las que había en el volumen filtrado. Contar las bacterias vivas es útil en las bacteriemias y en las bacteriurias.

MEDIOS DE CULTIVO

Los microorganismos no pueden estudiarse fácilmente utilizando una sola célula microscópica, por lo que suelen estudiarse cultivos puros de un solo tipo celular. El medio de cultivo es el pilar fundamental de la microbiología, pues con él se aíslan e identifican los microorganismos. Muchos componentes proporcionan un crecimiento óptimo de los microorganismos en el medio. Los requerimientos básicos de un medio son: una fuente de nutrientes, un agente solidificante para los medios sólidos, un pH específico y diversos aditivos específicos.

La mayoría de los microorganismos utilizan diversos nutrientes con nitrógeno, carbono, sales inorgánicas, minerales y otras sustancias diversas. Algu-

nos microorganismos pueden utilizar un medio muy simple, como nitrato o amoníaco, pero la mayoría necesita hidrolizados proteínicos o peptonas. El agar se emplea como agente solidificante y los amortiguadores mantienen el pH del medio. Finalmente, pueden añadirse agentes selectivos, como antibióticos, colorantes y otros nutrientes, para el aislamiento de un microorganismo determinado.

CLASES DE MEDIOS

Se utilizan muchos medios de cultivo que se dividen en medios generales, enriquecidos, diferenciales, selectivos especializados y de transporte. Los *medios generales* son aquellos con los que pueden detectarse la mayoría de los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos. Tienen como base un extracto acuoso de carne o caldo y sales minerales.

Los *medios enriquecidos* son los que contienen algunas sustancias necesarias para el crecimiento de determinados microorganismos. Entre estos medios está el agar achocolatado, que contiene sangre que se ha calentado a más de 100 °C para destruir los eritrocitos, y es adecuado para el crecimiento de *Haemophilus*. También puede indicarse el medio de Loeffler, que contiene un 75% de suero y un 25% de caldo glucosado, y se usa para cultivar el *Corynebacterium*.

Los *medios diferenciales* son aquellos que, por su composición química, dan características especiales a las colonias en cultivo de determinados géneros. Entre estos medios están el agar-eosina y azul de metileno y el agar de McConkey, que contienen lactosa y un indicador. De esta forma, si se fermenta ese azúcar, se producen colonias rojas o con reflejo metálico y pueden distinguirse los microorganismos que fermentan lactosa de los que no la fermentan. Estos medios se utilizan para identificar y aislar bacilos entéricos gramnegativos. Dentro de los medios diferenciales pueden considerarse los medios cromogénicos, que son también muy selectivos y permiten reconocer más claramente grupos de microorganismos dentro de un género.

Los *medios selectivos* son medios complejos que contienen sustancias que sólo permiten que crezcan determinados microorganismos, o sustancias que estimulan el crecimiento de algunos microorganismos. Entre estos medios están el agar de *Salmonella-Shigella*, el agar desoxicolato-citrato y el agar sulfito de bismuto, que inhiben el crecimiento de la mayoría de los coliformes, junto con cepas de *Proteus*, y permiten aislar enteropatógenos. Para *Clostridium* se usa un medio con tioglicolato y un hidrolizado de caseína, glucosa y cistina. Otro medio selectivo es el de Löwenstein-Jensen, que contiene glicerol —además de diversos fosfatos, citratos y sulfatos—, líquido que estimula la proliferación de *Mycobacterium tuberculosis*.

Los *medios especializados* contienen aditivos para aislar un patógeno específico. Entre estos medios se encuentra el agar BCYE complementado con factores de crecimiento y cefmetazol, polimixina B y anisomicina para aislar *Legionella*.

Finalmente, los *medios de transporte* son aquellos en los que deben incluirse las tomas, desde el momento de su recogida hasta su entrega al laboratorio. El más utilizado es el de Stuart, que contiene tioglicolato, cloruro de calcio y glicerofosfato.

MEDIOS LÍQUIDOS Y SÓLIDOS

Los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos. En los primeros, los microorganismos inoculados se multiplican de forma difusa por todo el medio, sin que se formen colonias aisladas de cada microorganismo. Por su parte, los *medios sólidos* son los más habituales en los laboratorios clínicos de microbiología. El agente solidificante más utilizado es el agar, un polisacárido complejo que se extrae a partir de algas marinas. Al calentarlo a 100 °C, forma una disolución que, después de enfriarse a 32-40 °C, da lugar a un gel por el que los solutos pueden difundirse igual que en una disolución acuosa. El agar es químicamente inerte y no es atacado por ningún microorganismo de interés clínico.

Los componentes del medio de cultivo se mezclan con el agar líquido y, al enfriarse, quedan incluidos en él. En el mercado se dispone de muchos medios de cultivo deshidratados para reconstituirlos en el laboratorio. Para preparar el medio de cultivo, se pesa exactamente la cantidad adecuada del medio deshidratado y se disuelve con agitación. Una vez disuelto, debe esterilizarse en la autoclave. Suele emplearse una temperatura de 121 °C durante 15 min. Como las sustancias enriquecedoras y los suplementos de los medios suelen ser sensibles al calor, hay que enfriar el medio a 45-55 °C en un baño de agua antes de añadir las sustancias enriquecedoras y los suplementos. Luego, se dispensa el medio en los tubos o las placas de Petri, con una agitación suave, haciendo la operación con rapidez. Inmediatamente, se tapan los tubos o las placas, y se dejan estas ligeramente abiertas entre 1 y 2 h para obtener una superficie seca. Después se almacenan los medios en placa esterilizados por vapor, invertidos en una bolsa de plástico o en otro contenedor, en un refrigerador a oscuras entre 1 y 2 semanas.

SIEMBRA

La siembra de los medios sólidos incluidos en placas de Petri suele hacerse con un asa de platino, pasada previamente por la llama, o un asa de plástico estéril desechable, en la forma que se indica en la figura 33-1. Cuando se trata de hisopos, en lugar de cargar un asa de platino se utiliza para sembrar el mismo

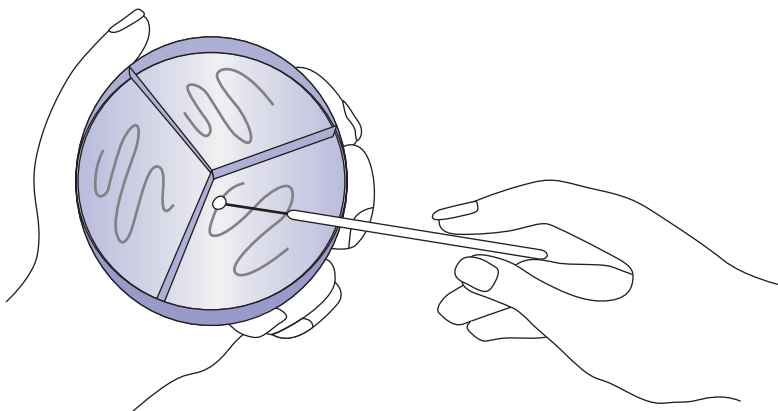


FIGURA 33-1 Forma de sembrar las placas para los cultivos bacterianos.

escobillón. Los medios inoculados suelen cultivarse a temperatura ambiente y entre 35 y 37 °C. Cuando se quiera hacer subcultivos, se tomarán las colonias del medio sólido y se llevarán a los otros medios.

MÉTODOS AEROBIOS Y ANAEROBIOS

Los microorganismos generalmente se cultivan en condiciones aerobias; sin embargo, algunas especies sólo se reproducen en condiciones de anaerobiosis. La forma más sencilla de conseguir estas condiciones es hacer que los microorganismos crezcan en un medio sólido o semisólido que contenga una sustancia reductora, como el tioglicolato o el ácido ascórbico. En estas condiciones, los microorganismos proliferan en los lugares más profundos de las placas.

El sistema GasPak consiste en un frasco de plástico en el que se introducen las placas de Petri y que se cierra herméticamente. Dentro del frasco se colocan varios sobres que contienen los reactivos que proporcionan H₂ y CO₂ cuando se añade agua y un indicador.

CULTIVOS EN ATMÓSFERA DE CO₂

Casi todos los gérmenes crecen mejor en un ambiente que contenga un 10% de CO₂, pero algunos, como *Neisseria meningitidis* y *Brucella abortus*, sin ese ambiente lo hacen muy difícilmente o no lo hacen. El método más sencillo para conseguir una atmósfera con abundante CO₂ ha sido colocar las placas de cultivo en un frasco herméticamente cerrado que contenga una vela donde, al producirse la combustión, se consuma el oxígeno y se produzca el CO₂. Actualmente se emplean incubadoras que permiten seleccionar la concentración de CO₂ adecuada para el microorganismo que se quiere estudiar, así como controlar la humedad del medio.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Los estudios microbiológicos utilizan diversas reacciones bioquímicas para identificar los microorganismos. Entre ellas, pueden considerarse las pruebas de fermentación, las de producción de ácido sulfhídrico, las de utilización de diversas sustancias y las de detección de ciertas enzimas. Las pruebas de fermentación de varios azúcares son un método muy útil para identificar muchos microorganismos, especialmente bacterias gramnegativas.

PRUEBA DE LA CATALASA

Algunas bacterias y los macrófagos pueden reducir el oxígeno diatómico a peróxido de hidrógeno o superóxido, que son tóxicos para las bacterias. Sin embargo, algunas bacterias poseen enzimas para defenderse de esas sustancias. Una de ellas es la catalasa, que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La principal excepción es *Streptococcus*. La prueba para detectar catalasa requiere añadir peróxido de hidrógeno al cultivo o la placa de agar y, si la bacteria tiene catalasa, transforma el peróxido de hidrógeno en oxígeno. En tal caso se producen burbujas que indican que la prueba es positiva.

PRUEBA DEL CITRATO

Esta prueba se utiliza para determinar la capacidad que tiene una bacteria para usar citrato como única fuente de carbono. Entre las enterobacterias, esta característica se da en los géneros: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* y algunas especies de *Salmonella*. No producen esta reacción *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*.

Se cultiva el microorganismo en agar citrato de Simmons. Este medio contiene citrato sódico y fosfato amónico como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, y azul de bromotimol como indicador de pH. Las bacterias que metabolizan citrato se multiplican en este medio donde liberan CO₂, que se combina con el sodio para dar carbonato sódico (un compuesto básico). Hay un cambio de color del indicador de verde a azul.

PRUEBA DE LA FENILALANINA DESAMINASA

Esta prueba determina la capacidad de la bacteria para desaminar el aminoácido fenilalanina a ácido fenilpirúvico. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies del género *Proteus* y del grupo *Providencia*, por lo que se usa para separar ambos géneros de otras enterobacterias.

Para realizarla, se cultiva el microorganismo en agar fenilalanina y se incuba durante 12-16 h. Se añade cloruro férrico al 10%. La presencia de ácido fenilpirúvico produce un color verde oscuro o verde azulado.

PRUEBA DE LA COAGULASA

Esta prueba se emplea para diferenciar entre las cepas patógenas y las no patógenas de estafilococos. Las bacterias que producen coagulasa utilizan esta como mecanismo de defensa, coagulando las áreas de plasma a su alrededor, de forma que se hacen resistentes a la fagocitosis por el sistema inmunitario del hospedador. Para realizar la prueba se inocula el espécimen en 0,5 ml de plasma de conejo y se incuba a 37 °C entre 1 y 4 h. En una prueba positiva se formará un coágulo en el tubo de ensayo.

PRUEBA DEL INDOL

El indol es un componente del aminoácido triptófano. Algunas bacterias tienen la capacidad de romper el triptófano con fines nutritivos utilizando la enzima triptofanasa. Cuando se rompe el triptófano puede detectarse la presencia del indol mediante el reactivo de Kovacs, que es amarillo y que, al reaccionar con el indol, produce un color rojo sobre la superficie del tubo de ensayo.

PRUEBA DE LA OXIDASA

La citocromo oxidasa transfiere los electrones al oxígeno, que es el aceptor electrónico final de algunas cadenas transportadoras de las bacterias. La presencia de citocromo oxidasa puede detectarse usando un donador de electrones. Por lo general, la citocromo oxidasa sólo se encuentra en los microorganis-

mos aerobios, algunos anaerobios facultativos y algún microaerófilo, mientras que los anaerobios estrictos carecen de ella. La prueba de la oxidasa se utiliza para identificar las especies de *Neisseria* y para diferenciar *Pseudomonas* de los miembros oxidasa negativos de las enterobacterias.

Se emplea el reactivo de Kovacs, que es una disolución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina. Tiñe las colonias positivas para oxidasa de color lavanda, que vira gradualmente a púrpura-negro intenso.

PRUEBA DE LA UREASA

La ureasa es una enzima que rompe los enlaces carbono-nitrógeno de las amidas para formar CO_2 , NH_3 y agua. Los miembros del género *Proteus* producen ureasa, que puede detectarse colocando las bacterias en un medio que contenga urea. Cuando se fracciona esta, se libera amoníaco y aumenta el pH del medio. El cambio se detecta por un indicador de pH, que en el medio básico es de color rosa.

PRUEBA DE LA LACTOSA

Esta prueba se utiliza para diferenciar dentro de las enterobacterias el grupo denominado coliforme, que no es un grupo taxonómico, y que incluye la mayoría de las bacterias intestinales.

Una forma sencilla de realizar la prueba es sembrar en agar McConkey, ya que este medio, además de selectivo frente a bacterias no entéricas, es diferencial, pues contiene lactosa y un indicador de pH (rojo neutro). En agar de McConkey no crecen las bacterias grampositivas y sólo lo hacen las enterobacterias. Dentro de estas, las que fermentan lactosa (coliformes) liberan productos ácidos que dan lugar a un cambio de pH que se detecta con el rojo neutro. Las colonias positivas para lactosa aparecen de color rojo o violeta, mientras que las negativas dan un color amarillo.

SISTEMAS COMERCIALES MANUALES DE IDENTIFICACIÓN

Se comercializan diversos sistemas para realizar las pruebas bioquímicas de identificación de microorganismos. Hay paneles para anaerobios, enterobacterias y otros bacilos gramnegativos, gramnegativos no enterobacterias, gramnegativos exigentes, cocos grampositivos y bacilos grampositivos. Para todos estos paneles, el buen funcionamiento del sistema depende de la base de datos que se construye utilizando cepas conocidas. El número de especies incluidas en una base de datos puede variar desde unas pocas para algunas pruebas hasta más de 2.000 para algunos sistemas automáticos. Estas bases de datos se renuevan continuamente introduciéndose nuevas especies. En la tabla 33-1 se presentan los principales sistemas.

SISTEMAS AUTOMÁTICOS DE IDENTIFICACIÓN

En el mercado hay varios sistemas automáticos que utilizan pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos. Las principales casas comerciales que los tienen son BD Biosciences (Phoenix 100), bioMérieux

TABLA 33-1 Sistemas comerciales manuales para la identificación de microorganismos

| Sistema | Número de pruebas |
|--|-------------------|
| <i>Anaerobios</i> | |
| API 20 A (bioMérieux) | 21 |
| BBL Crystal (BD) | 29 |
| Rapid ANA II (Remel) | 18 |
| <i>Enterobacterias y otros bacilos gramnegativos</i> | |
| API 20E (bioMérieux) | 21 |
| Enterotube (BD) | 15 |
| Microbact (Oxoid) | 24 |
| Rapid ONE (Remel) | 19 |
| <i>Gramnegativas no enterobacterias</i> | |
| API 20NE (bioMérieux) | 20 |
| Oxi-Ferm II (BD) | 14 |
| <i>Gramnegativas exigentes</i> | |
| API NH (bioMérieux) | 12 |
| BBL Crystal <i>Neisseria/Haemophilus</i> (BD) | 29 |
| <i>Cocos grampositivos</i> | |
| API 20 Strep (bioMérieux) | 20 |
| API Staph (bioMérieux) | 20 |
| BBL Crystal Rapid (BD) | 29 |
| <i>Bacilos grampositivos</i> | |
| API Coryne (bioMérieux) | 20 |
| Microbact <i>Listeria</i> (Oxoid) | 12 |

(Vitek) y Siemens (Microscan). Cada uno de ellos tiene unas características y una base de datos diferente. Cada laboratorio debe seleccionar el sistema que más se adecue a sus necesidades de acuerdo con el volumen de especímenes diario.

PRUEBAS SEROLÓGICAS

En los laboratorios clínicos, reciben el nombre de pruebas serológicas las determinaciones en suero de antígenos y anticuerpos por técnicas inmunológicas. Los métodos principales que se utilizan en estas pruebas en los laboratorios de microbiología clínica son las reacciones de aglutinación y precipitación, las técnicas de fijación del complemento, las técnicas con anticuerpos fluorescentes y los inmunoanálisis. En el capítulo 29 se describen los fundamentos de estas técnicas.

MÉTODOS MOLECULARES

El uso de métodos moleculares para la detección e identificación de microorganismos en microbiología clínica ha progresado con rapidez en los últimos años. Sus aplicaciones prácticas incluyen la utilización directa de sondas de ácidos nucleicos, las técnicas de amplificación y la detección y el análisis tras

la amplificación. Además, las técnicas moleculares se emplean para detectar e identificar y para definir características como los genes de resistencia a los antibióticos. Finalmente, los métodos moleculares proporcionan unos medios potentes para caracterizar los microorganismos con relación a las subespecies en las investigaciones epidemiológicas.

DETECCIÓN DIRECTA CON SONDAS SIN AMPLIFICACIÓN

Se comercializan diversas sondas de ADN para la detección directa de patógenos en especímenes clínicos y la identificación de patógenos tras su aislamiento mediante cultivo. La hibridación puede hacerse en fase líquida, en fase sólida o *in situ*. Debido a la baja sensibilidad analítica de esta técnica, se emplea para aquellas situaciones con un número alto de microorganismos, como en las faringitis estreptocócicas del grupo A y las infecciones del tracto genital con *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*. También es útil para identificar microorganismos de crecimiento lento tras su aislamiento en cultivo empleando medios líquidos o sólidos. Las pruebas de hibridación directa para la identificación bacteriana requieren un gran número de células, lo que proporciona una baja sensibilidad. Esta desventaja puede solventarse, en parte, detectando las moléculas de ARNr que se encuentran con un número elevado de copias en cada célula.

La técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) se emplea para visualizar directamente los microorganismos en las muestras clínicas. Así, puede también detectarse su localización en el tejido o el material clínico.

TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN

Las técnicas moleculares de amplificación pueden amplificar la señal, la diana o la sonda.

Amplificación de la señal

En estas técnicas se amplifica la concentración de las moléculas marcadas unidas al ácido nucleico diana. Las principales son la técnica de ADN ramificado (*branched DNA*, bDNA), que emplea una molécula de ADN con 15 ramas, cada una de las cuales puede unirse a tres sondas marcadas. Se han comercializado equipos para los virus VHC, VHB y VIH. Otra técnica es la de análisis de captura híbrido para el que hay equipos comerciales para *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*, el virus del papiloma humano y los citomegalovirus.

Amplificación de la diana

Estas técnicas emplean enzimas que sintetizan muchas copias del ácido nucleico diana. Las principales son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con un gran número de variantes (PCR en tiempo real, PCR multiplex, PCR anidada), la amplificación de ácidos nucleicos basada en la secuencia (*nucleic acid sequence-based amplification*, NASBA) y la amplificación con desplazamiento de cadena (*strand displacement amplification*, SDA). Se han comercializado muchos equipos para la determinación de patógenos utilizando estas técnicas.

Recientemente, se ha comercializado la primera prueba multiparamétrica de PCR para las infecciones sanguíneas que identifica hasta 40 patógenos bacterianos y fúngicos diferentes directamente de la sangre (SeptiFast Roche). Emplea PCR multiplex, esto es, la amplificación paralela de diferentes dianas en un tubo con un par específico de cebadores para cada determinante.

Amplificación de la sonda

En estas técnicas se amplifica la sonda. Las principales son la reacción en cadena de la ligasa (*ligase chain reaction*, LCR) y la ciclación de la sonda.

TÉCNICAS DE PCR EN TIEMPO REAL

La introducción de las pruebas de PCR en tiempo real con el empleo de sondas fluorescentes junto con la amplificación ha representado un avance importante de los métodos moleculares en el laboratorio de microbiología clínica. Se dispone de diversos instrumentos de PCR en tiempo real y formatos de sondas de detección. En la actualidad, uno de los principales inconvenientes de estas técnicas es que son muy caras.

AUTOMATIZACIÓN E INSTRUMENTACIÓN

Los análisis que emplean los métodos moleculares constan de tres pasos fundamentales: procesamiento del espécimen, amplificación del ácido nucleico y detección del producto. El paso que requiere mayor trabajo es el procesamiento de los especímenes. Existen diversos sistemas automáticos de extracción de los ácidos nucleicos, con diferentes técnicas de extracción, como el uso de partículas magnéticas y la utilización de columnas. Asimismo, se han comercializado varios sistemas de PCR en tiempo real con diversos sistemas para cuantificar los ácidos nucleicos amplificados.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

La espectrometría de masas empleando la técnica MALDI-TOF para la identificación de microorganismos utiliza los perfiles de péptidos y proteínas que son característicos de cada especie. Se suelen emplear moléculas dentro del intervalo de pesos moleculares 2.000-20.000 Da, entre las que se encuentran las proteínas ribosómicas, que son buenos marcadores para la identificación de microorganismos debido a su elevada abundancia y semejanza del número de copias por célula.

La forma más simple de análisis es aplicar directamente una pequeña cantidad del material biológico sobre la placa MALDI. Este material puede ser una colonia o una alícuota de un cultivo líquido. Sobre el material biológico, se aplica la matriz constituida por ácido α -ciano-4-hidroxi cinámico en acetonitrilo al 50% y ácido trifluoroacético al 2,5%.

La medida en el espectrómetro de masas MALDI-TOF nos proporciona un espectro de masas de los péptidos y proteínas. Se han elaborado bibliotecas de espectros generadas con la medida de especies de microorganismos. Hay bibliotecas comerciales con cerca de 4.000 especies.

Se han propuesto diferentes algoritmos para la comparación de los espectros de los microorganismos que se diferencian en los procedimientos utilizados para comparar y calcular la semejanza entre dos espectros.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD MICROBIANA

El tratamiento de una infección requiere conocer no sólo el microorganismo que la produce, sino también su sensibilidad a los antibióticos. De forma general, los antibióticos pueden clasificarse, según su forma de actuación, en bactericidas y bacteriostáticos. Los primeros son los que destruyen las bacterias, y los bacteriostáticos son los que impiden la división celular, evitando que proliferen los microorganismos.

MECANISMOS DE ACTUACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos pueden actuar a través de los mecanismos siguientes:

- Afectando la pared celular, lo que permite que salga el contenido celular o que entre líquido, lo que diluye las células. De esta forma actúan las penicilinas, las cefalosporinas, la vancomicina y la bacitracina.
- Alterando la membrana celular, con lo que se afectan los sistemas de transporte de sustancias. Actúan así la anfotericina C, la polimixina y la colistina.
- Interfiriendo en la biosíntesis de proteínas. Los antibióticos pueden actuar en los diferentes pasos de transcripción y traducción. Así operan el cloranfenicol, la estreptomina, la kanamicina, las tetraciclinas y los macrólidos.
- Inhibiendo la síntesis de ADN, como la 5-yodo-2-desoxiuridina y la griseofulvina.
- Por antagonismo competitivo, como las sulfamidas.

Las sustancias de los grupos 1 y 2 son bactericidas y las de los grupos 3 y 4, bacteriostáticas.

CONCEPTOS GENERALES Y TERMINOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD

Con relación a los antibióticos, las bacterias pueden ser susceptibles, intermedias o resistentes. *Susceptible* significa que una infección producida por el microorganismo puede tratarse adecuadamente con el antibiótico. *Intermedio* quiere decir que una infección causada por el microorganismo puede tratarse con las concentraciones adecuadas, mientras que *resistente* señala que no puede tratarse con ese antibiótico la infección producida por ese microorganismo.

La sensibilidad de los antibióticos debe estudiarse en las bacterias patógenas potenciales o probables en situaciones no frecuentes, como en las personas inmunodeprimidas. Los microorganismos que adquieren resistencia con facilidad, tras ser expuestos a los antibióticos, deben estudiarse de nuevo si se

aíslan durante el tratamiento. No hay que determinar la sensibilidad de los microorganismos que representen la flora normal, ni la de los cultivos mixtos. En este último caso deben separarse primero los microorganismos.

Los microorganismos principales cuya sensibilidad suele estudiarse son: enterobacterias, *Pseudomonas*, estafilococos, enterococos y estreptococos. Respecto a los antibióticos, ha de probarse un representante de cada grupo de sustancias con actividad *in vitro* parecida.

En los estudios de sensibilidad antimicrobiana se utilizan los términos siguientes:

- **Concentración inhibitoria mínima (CIM).** Es la menor concentración de la sustancia antimicrobiana con la que no se produce el crecimiento de un determinado microorganismo.
- **Concentración letal mínima (CLM).** Es la menor concentración de la sustancia antimicrobiana con la que no quedan microorganismos viables de una determinada cepa.
- **Resistencia.** Un microorganismo es resistente a un agente antimicrobiano cuando su sensibilidad es muy pequeña, de forma que se necesita una gran concentración de este para impedir el crecimiento de aquel.
- **Sensibilidad.** Concentración de un agente antimicrobiano con la que se inhibe o elimina el crecimiento de un microorganismo.

PRUEBAS DE DILUCIÓN EN TUBO

En los métodos en tubo, el microorganismo se inocula en una serie de tubos de cultivo a los que se han añadido diferentes concentraciones del antibiótico. El medio que se suele utilizar es el de Mueller-Hinton para bacterias aerobias o anaerobias facultativas de crecimiento rápido. Pueden utilizarse otros medios, según los requerimientos del microorganismo. El inóculo se prepara de forma que contenga entre 10^5 y 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. Se incuban los tubos de 16 a 20 h a 35 °C y se observa el crecimiento bacteriano. El tubo que contenga la menor cantidad de antibiótico, en el que se ha inhibido el crecimiento del microorganismo, dará cuenta de la cantidad necesaria de antibiótico por mililitro para destruir la bacteria. Las concentraciones de los antibióticos se eligen de forma que correspondan a concentraciones en sangre que puedan obtenerse fácilmente con dosis normales.

Las ventajas principales de esta técnica son que genera un resultado cuantitativo (CIM) y se observa un número sustancial de células bacterianas debido a que el inóculo inicial en cada tubo es grande. Sus desventajas principales son el trabajo de preparación de las disoluciones de los antibióticos para cada tubo, la gran cantidad de reactivos y espacio que se requiere y la posibilidad de cometer errores al preparar las concentraciones de antibióticos. Este tipo de pruebas prácticamente ya no se realizan así en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica. La técnica que se emplea es la de microdilución.

La prueba se ha mecanizado usando bandejas de plástico de 96 pocillos, cada uno de ellos con un volumen de unos 100 µl, que permiten analizar ocho diluciones de 12 antibióticos. Hay a la venta paneles de antibióticos ya preparados. Se inoculan las bandejas con la misma densidad celular (5×10^5 UFC/ml), mediante aparatos automáticos que dispensan entre 1 y 15 µl de la suspensión

bacteriana. Después de 16 a 20 h de incubación, se observan las bandejas con sistemas adecuados y se obtiene la CIM. Las principales ventajas de esta prueba son que proporciona resultados cuantitativos, se necesita poco espacio, existen bandejas ya preparadas y puede automatizarse.

PRUEBAS DE DILUCIÓN EN AGAR

Para las pruebas de dilución en agar se suele utilizar también el medio de Mueller-Hinton para bacterias de crecimiento rápido aerobias o anaerobias facultativas. Para bacterias con requerimientos especiales se usan otros medios suplementados. Se prepara el medio con el agar y la dilución del antibiótico. Se extiende el agar en las placas y se deja que solidifique sobre una superficie plana. Cuando haya solidificado, se pueden guardar las placas a 4 °C. Para utilizarlas, se inocula puntualmente la superficie del agar de las placas y se dejan a temperatura ambiente hasta que se sequen los puntos de inoculación. Deben depositarse unas 10^4 UFC en cada punto. Se incuban a 35 °C entre 16 y 20 h, y la interpretación de los resultados es similar a la de las pruebas en tubo.

PRUEBAS DE DIFUSIÓN EN DISCO

En las pruebas de difusión se utilizan discos de papel de filtro, impregnados con una cantidad conocida del antibiótico, sobre placas de agar inoculadas con el microorganismo (alrededor de 2×10^8 UFC/ml). El antibiótico se difunde en el agar y, cuando alcanza concentraciones inhibitorias, impide el crecimiento del microorganismo. El diámetro de la zona de inhibición está correlacionado con el logaritmo de la CIM. Basándose en la farmacocinética de cada antibiótico y en el comportamiento de los microorganismos, se puede seleccionar la CIM por encima de la cual un microorganismo puede considerarse resistente. El método de difusión debe utilizarse para aquellos microorganismos de crecimiento rápido para los que puedan determinarse fácilmente los límites de las zonas.

Como medio se usa agar Mueller-Hinton, que se extiende en placas de Petri hasta conseguir una profundidad de unos 4 mm. Se deja enfriar y se almacena en un refrigerador. Cuando se vayan a usar las placas, se colocan en una estufa a 35 °C, con la tapa entreabierta, hasta que se pierda la humedad por evaporación.

Para inocular el medio de agar, se sumerge una escobilla estéril o un palillo de madera con algodón en la suspensión bacteriana y se desliza la escobilla por toda la superficie de la placa hasta conseguir un inóculo uniforme. Alternativamente, puede prepararse el medio con el agar y el microorganismo y, en estado líquido, pasarlo a las placas de Petri.

Los discos con los antibióticos se aplican sobre la superficie de las placas inoculadas con unas pinzas estériles. Se presionan los discos sobre el agar con las pinzas para asegurar el contacto completo sobre la superficie del agar. Quince minutos después de aplicar los discos, se invierten las placas y se llevan al incubador de 35 °C. Transcurridas de 16 a 18 h, se examinan las placas y se miden los diámetros de las zonas de inhibición. Los diámetros se correlacionan con las tablas en las categorías de sensible, intermedio o resistente.

El procedimiento de difusión en disco, además de estar bien estandarizado y ser reproducible, es una prueba sencilla que no necesita equipos especiales y proporciona resultados categóricos que se interpretan fácilmente, y es la más flexible de las pruebas disponibles, ya que pueden seleccionarse los discos. Asimismo, es la más barata de las pruebas de sensibilidad. Sus desventajas principales son que no puede automatizarse y no pueden analizarse algunas bacterias exigentes o de crecimiento lento. Se dispone de sistemas semiautomáticos para la lectura y la interpretación de las pruebas de difusión en disco. En todos los sistemas se insertan de forma manual las placas de agar en el instrumento tras la incubación para la adquisición de la imagen y la medida de la zona de inhibición. El programa proporciona los resultados.

ESTUDIOS DE SINERGIA DE LOS ANTIBIÓTICOS

La valoración de las combinaciones de antibióticos son útiles en varias situaciones clínicas; por ejemplo, cuando se quiere obtener un espectro más amplio de la actividad antibiótica durante el tratamiento empírico de los pacientes graves, cuando se sospecha una infección con varios microorganismos y cuando se intenta evitar o minimizar la posibilidad de que aparezcan subpoblaciones resistentes, o permitir el uso de una concentración menor de fármacos combinados y, así, disminuir la incidencia de toxicidad del antibiótico. Se considera que una combinación es sinérgica cuando el efecto que se observa es mayor que la suma del efecto de cada fármaco por separado. La interacción de los antibióticos también puede ser antagónica, cuando su combinación sea menos eficaz que usar sólo el antibiótico más activo. Para realizar los estudios de sinergia, se enfrenta el microorganismo con diversas combinaciones de los dos antibióticos diluidos formando series dentro de un intervalo determinado de diluciones.

PRUEBA BACTERICIDA

La prueba bactericida en suero puede emplearse para determinar si las concentraciones del antibiótico en el suero del paciente son capaces de destruir el microorganismo infeccioso. Las situaciones en las que esta prueba puede ser útil para controlar el tratamiento son las endocarditis bacterianas, las osteomielitis bacterianas, los pacientes inmunocomprometidos con infecciones poco frecuentes y en combinaciones poco habituales de los fármacos. Para realizar la prueba, se añade un inóculo estándar del microorganismo que infecta al paciente preparado en un medio de Mueller-Hinton y se complementa con cationes a diluciones seriadas del suero del paciente en el pico y en el valle de concentraciones del antibiótico. Tras 24 h de incubación, el título bactericida del suero será igual a la dilución del último pocillo sin crecimiento bacteriano.

SISTEMAS AUTOMÁTICOS

Se han comercializado aparatos automáticos para las pruebas de sensibilidad que proporcionan los resultados en períodos de tiempo más cortos que los métodos manuales debido a que usan sistemas sensibles de detección óptica. En general, los sistemas automáticos para las pruebas de sensibilidad microbiana se combinan con los de identificación.

Procesamiento de los especímenes en microbiología

INTRODUCCIÓN

Los laboratorios clínicos de microbiología analizan una gran variedad de especímenes como sangre, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), heces, exudados y efusiones de diversas cavidades corporales. La recogida y la manipulación adecuada de los especímenes son fundamentales para diagnosticar las enfermedades infecciosas. En este capítulo se presentan los pasos fundamentales que hay que realizar para la preparación de los especímenes para los análisis microbiológicos.

CONSIDERACIONES GENERALES

Los especímenes deben recogerse en el momento más apropiado, cuando mayor sea la probabilidad de detectar el microorganismo, que para las bacterias es antes de comenzar el tratamiento y para la mayor parte de los virus, la fase aguda de la enfermedad. La cantidad de espécimen recogido tiene que ser la adecuada para poder realizar de forma completa los estudios que se soliciten. Los especímenes tienen que recogerse del lugar de la infección, evitando la contaminación de los lugares adyacentes. Todos los especímenes, excepto las heces, deben recogerse en un contenedor estéril e identificarse de forma adecuada con el fin de que no haya confusiones en el laboratorio.

Una vez obtenidos, hay que enviar los especímenes al laboratorio lo más rápidamente posible. Si no puede evitarse la tardanza, la orina, las heces, los esputos y los especímenes para detectar *Chlamydia trachomatis* o virus deben refrigerarse para impedir que crezca la flora normal. La sangre, el LCR y otros líquidos tienen que mantenerse a temperatura ambiente. El transporte de los especímenes para los estudios microbiológicos debe realizarse de forma muy cuidadosa para evitar los contagios.

ESPECÍMENES DE SANGRE. HEMOCULTIVOS

El *hemocultivo* es la técnica empleada para detectar microorganismos en sangre. En condiciones normales, la sangre es estéril y cualquier microorganismo que penetre en la circulación sanguínea se elimina inmediatamente. La sepsis es una de las complicaciones más importantes en las unidades de cuidados intensivos y el diagnóstico temprano es uno de los factores más decisivos para el desenlace del paciente. Un cultivo de sangre positivo establece o confirma la etiología infecciosa de la enfermedad del paciente. Proporciona también el agente etiológico para las pruebas de susceptibilidad, permitiendo optimizar el tratamiento antibiótico.

MOMENTO DE LA RECOGIDA

La bacteriemia suele ser intermitente, excepto en la endocarditis, la fiebre tifoidea, la brucelosis y las infecciones incontroladas; por ello es muy importante en qué momento se recoge el espécimen. El mejor momento para recoger la sangre para los hemocultivos es cuando comienza a subir la temperatura. Deben tomarse varios especímenes espaciados en el tiempo. Su número dependerá de la naturaleza de la bacteriemia: transitoria, intermitente o continua.

EXTRACCIÓN

En el capítulo 5 se ha señalado el procedimiento para obtener la sangre para los hemocultivos. Como se ha expuesto, la sangre se obtiene con un sistema de vacío en botellas que contienen los medios adecuados. Una vez recogida la cantidad de sangre que proporciona el vacío de las botellas, estas se retiran de la aguja y se invierten varias veces para que se mezclen bien el medio y la sangre. La cantidad de sangre que se recoge en cada botella es de 20 ml. Las botellas se llevan al laboratorio lo antes posible manteniéndolas a temperatura ambiente. Los recipientes de los hemocultivos no deben refrigerarse nunca.

PRINCIPALES MICROORGANISMOS QUE INFECTAN LA SANGRE

Las bacterias principales que pueden encontrarse en los cultivos sanguíneos son: *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Brucella*, *Proteus*, *Neisseria*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Haemophilus* y *Leptospira*. Asimismo, los cultivos sanguíneos son muy útiles para diagnosticar las infecciones diseminadas por hongos como *Candida*, *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum*. Los principales parásitos sanguíneos son *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Toxoplasma*.

TIPOS DE CULTIVOS SANGUÍNEOS

Hay varios tipos de cultivos para sangre, cada uno con sus ventajas e inconvenientes. El medio más empleado para los hemocultivos es el caldo de digerido de caseína y soja, que permite el crecimiento de microorganismos aerobios, anaerobios y dependientes de CO₂. La relación más adecuada es de 1:5 (sangre:medio). Generalmente, los medios comerciales líquidos se envasan al vacío con CO₂ y contienen el anticoagulante polianetol sulfonato (PSS) al 0,025%. Además de inhibir la coagulación, el PSS inhibe la lisozima, inactiva los aminoglucósidos e inhibe parte de la cascada del complemento y la fagocitosis. Los frascos tienen una capacidad de 50 a 100 ml de medio de cultivo. La sangre obtenida en condiciones estériles se diluye un 10% en dicho medio.

Los cultivos se incuban a 35 °C y se observa diariamente, al menos durante 7 días, la aparición de turbidez, hemólisis, gases o colonias definidas. De los cultivos positivos deben hacerse extensiones y teñirlas con Gram, y realizar subcultivos. Para estos, se desinfecta el tapón de goma de los frascos de cultivo y se pincha con una jeringa estéril. Se extraen 0,25 ml de medio y se siembra directamente en agar-tripteína-soja-chocolate. Hay que tener cuidado al intro-

ducir la aguja en el tapón de goma y sujetar bien el émbolo, por si hubiera presión de gas por productos de fermentación. Los subcultivos deben incubarse, preferentemente, en atmósfera de CO₂ y en condiciones anaeróbicas.

Si se sospechase la presencia de *Brucella*, habrá de utilizarse el medio bifásico de Castañeda o caldo de soja-tripticosa, e incubar durante 21 días o más.

SIEMBRA CUANTITATIVA DIRECTA

Cuando la concentración bacteriana en sangre es superior a 100 bacterias/ml, resulta útil la siembra directa de una cantidad determinada de sangre heparinizada. La siembra se realiza en sábana, en placas de agar sanguíneo y agar achocolatado. A las 18 h, aparecen colonias que pueden utilizarse para estudiar sensibilidades. Este método es útil para *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae*. Con él, crecen menos contaminantes y, cuando lo hacen, interfieren menos en las bacterias productoras de la infección. Con este método no hay enriquecimiento, por lo que no es útil para microorganismos de crecimiento difícil, y tampoco vale para brucelosis y bacteriemias de pequeño inóculo, como la endocarditis.

SISTEMAS AUTOMÁTICOS

Hay sistemas automáticos comerciales para el seguimiento continuo de los hemocultivos. Las principales ventajas de estos sistemas son que se elimina la necesidad de los subcultivos ciegos y se acorta el período normal de incubación de 7 a 5 días. La detección del crecimiento bacteriano por los sistemas automáticos puede realizarse de diversas formas. Unos sistemas se basan en la detección colorimétrica del CO₂ formado por el crecimiento bacteriano. En el fondo de cada botella de cultivo hay un sensor separado del medio por una membrana permeable al CO₂. La producción de este gas da lugar a un cambio de color del sensor. El CO₂ formado puede también detectarse por fluorescencia. Finalmente, algunos sistemas detectan el consumo o la producción de gas (CO₂, N₂ y H₂).

Los principales sistemas automáticos para hemocultivos son: BacT/Alert (bioMérieux), con detección colorimétrica del CO₂, el BACTEC (Becton Dickinson), con detección fluorimétrica, y el Versa TREK (TREK), con detección manométrica del crecimiento bacteriano.

ESPECÍMENES DE ORINA. URINOCULTIVOS

El sistema urinario está dividido en dos partes: la superior, que comprende los riñones y los uréteres, y la inferior, que comprende la uretra y la vejiga urinaria. En condiciones normales, el sistema urinario no contiene microorganismos. Las infecciones agudas o crónicas del aparato urinario pueden afectar a los riñones, los uréteres, la vejiga o la uretra. En algunos casos, estas infecciones producen hipertensión, una lesión renal y uremia, mientras que en otros pueden pasar inadvertidas durante algún tiempo. La mayoría de las infecciones del aparato urinario se producen a través de la uretra, y en muy pocas ocasiones a través de la sangre. Las infecciones del aparato urinario son más frecuentes en las mujeres que en los hombres.

RECOGIDA DE ESPECÍMENES

En el capítulo 5 se han señalado las condiciones para recoger los especímenes de orina para los urinocultivos. Para poder obtener unos buenos resultados, es muy importante transportar y almacenar adecuadamente los especímenes de orina para los urinocultivos. Así, deben llevarse lo antes posible al laboratorio para su siembra. Cuando no sea posible pueden mantenerse en un refrigerador hasta 24 h antes de realizar el cultivo.

MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE INFECCIONES URINARIAS

Los principales microorganismos hallados en la orina infectada son *E. coli*, otros miembros de las enterobacterias, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa* y estafilococos. La mayoría de las infecciones urinarias son producidas por *E. coli* y pertenecen a un número limitado de serotipos. Los análisis microbiológicos de la orina deben ser tanto cuantitativos como cualitativos. Un recuento de 10^5 bacterias/ml de orina representa un nivel significativo que indica una infección del sistema urinario. Un recuento menor de 10^4 bacterias/ml se considera contaminación, mientras que los recuentos comprendidos entre 10^4 y 10^5 bacterias/ml requieren un nuevo espécimen para confirmar o desechar la infección.

La presencia de leucocitos en la orina (piuria) se ha considerado un signo de infección urinaria; sin embargo, se ha comprobado que, a menudo, las bacteriurias significativas no producen piuria o esta es intermitente.

CULTIVO BACTERIANO

La siembra de la orina se realiza con un asa calibrada con la que se toman 0,001 ml. Se inocula la orina homogeneizada sin centrifugar en agar CLED (cistina, lactosa y déficit de electrolitos) y agar sanguíneo, o un medio general. Se incuba a 37 °C de 24 a 48 h y se cuentan las colonias. Se multiplica el número obtenido por 1.000 y se da el resultado en bacterias por mililitro de orina. El crecimiento de dos o más especies en una orina recogida adecuadamente indica contaminación.

MÉTODOS DE CRIBADO

Un gran porcentaje de las orinas que se envían al laboratorio para su cultivo no proporcionan un crecimiento bacteriano o los recuentos están por debajo de los valores con significación clínica, por lo que se emplean sistemas de cribado para proporcionar resultados rápidos, eliminar los especímenes negativos y simplificar el trabajo. Se han empleado diversos métodos para excluir la infección del tracto urinario. Uno de ellos es el método microscópico. Para ello se centrifuga la orina y se realiza una extensión del sedimento que se tiñe con Gram. La presencia de más de dos bacterias por campo de gran aumento señala bacteriuria en más del 90% de los casos.

En la actualidad, los analizadores automáticos del sedimento urinario proporcionan la cuantificación de bacterias. Diversos estudios han valorado el

punto de corte más adecuado para excluir la infección del tracto urinario; la mayoría de ellos lo sitúan entre 1.500 y 3.000 bacterias/μl. Asimismo, también se han utilizado los resultados de nitritos y leucocitos de las tiras reactivas para excluir las infecciones del tracto urinario, que en algunas circunstancias son útiles.

LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

El LCR es un medio estéril. La presencia en él de microorganismos produce meningitis. Los principales microorganismos que la causan son: *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Streptococcus pneumoniae* y *Mycobacterium tuberculosis*.

En el capítulo 5 se ha señalado cómo debe recogerse el LCR para los análisis bacteriológicos. El líquido debe llevarse al laboratorio lo antes posible y no refrigerarse, pues esto destruiría algunas especies bacterianas. El LCR se centrifuga, se hace una extensión del sedimento, que se tiñe con Gram, y se observa con el microscopio la presencia de bacterias. Dada la posibilidad de pequeñas concentraciones de bacterias, hay que observar con detenimiento un gran número de campos.

El espécimen de LCR ha de cultivarse tan pronto como llegue al laboratorio. Se siembra en medios no selectivos, como el agar sanguíneo o el agar achocolatado, y en un medio con tioglicolato para anaerobios. Cualquier crecimiento debe considerarse significativo hasta que se confirme de otra forma. Por otra parte, algunas bacterias pueden necesitar un tiempo prolongado de incubación antes de que sea visible el crecimiento.

HECES. COPROCULTIVO

La mayoría de las bacterias que están normalmente en las heces son gramnegativas aerobias o anaerobias facultativas. Los principales microorganismos patógenos que se aíslan en los cultivos de heces son *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* y *Campylobacter jejuni*. Cuando se sospeche la existencia de microorganismos anaerobios, estafilococos o *Vibrio cholerae*, deberán utilizarse medios especiales para sembrar directamente las heces.

Hay que cultivar todos los especímenes para *Salmonella* y *Shigella*. Los especímenes se inoculan en un medio selectivo como el agar de McConkey, un medio selectivo para patógenos entéricos, para impedir el crecimiento de las especies comensales. Los medios entéricos y los enriquecidos se incuban de forma aeróbica durante, al menos, 48 h, y se los observa a las 24 y las 48 h. Y los medios para aislar *Salmonella* y *Shigella* deben incubarse entre 35 y 37 °C. La identificación definitiva de las especies de estos dos géneros requiere pruebas bioquímicas y serológicas.

ESPUTOS

Los microorganismos comensales que están en los esputos son los mismos que los de las vías respiratorias altas. Asociados con neumonías se hallan *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *Klebsiella pneumoniae*. En los trastornos crónicos se encuentran *H. influenzae* y *Pasteurella*.

Recoger adecuadamente los esputos es muy importante, ya que debe obtenerse el esputo, y no saliva. Se recogen en un recipiente de plástico desechable estéril. Después se realiza una extensión, se tiñe con Gram y se observa al microscopio. En los procesos inflamatorios se encuentra un gran número de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos. Algunos laboratorios utilizan la proporción polimorfonucleares/células epiteliales para analizar la conveniencia del cultivo de especímenes de esputos. A veces, reconocer un solo tipo de microorganismo en la tinción de Gram puede ayudar a tomar una primera decisión sobre la elección del antibiótico. También se tiñe con Ziehl-Neelsen para bacilos tuberculosos.

Los cultivos se realizan directamente en agar sanguíneo, de forma aerobia y anaerobia, y con CO₂. Se incuban durante 18 h a 37 °C. Para las micobacterias se realiza un cultivo en un medio de Löwenstein-Jensen.

SECRECIONES GENITALES

Los principales patógenos del tracto genital asociados con las enfermedades de transmisión sexual son el *Treponema pallidum*, *N. gonorrhoeae*, *Haemophilus ducreyi*, *C. trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, el virus de la inmunodeficiencia humana y el herpes genital. Los especímenes que se envían para cultivo son, en la mujer, las secreciones vaginales y los especímenes endocervicales y, en el hombre, los exudados uretrales, las secreciones prostáticas y los aspirados testiculares.

Para recoger las secreciones vaginales se emplea un hisopo que luego se coloca en un tubo que contiene alrededor de 1 ml de solución salina y se envía al laboratorio. Los especímenes endocervicales los recoge el ginecólogo con un hisopo que se coloca en el medio de transporte adecuado y se envía al laboratorio. Los exudados uretrales en los varones se obtienen también con un hisopo que se coloca en el medio de transporte adecuado y se envía al laboratorio.

N. gonorrhoeae y *C. trachomatis* son las bacterias principales que se asocian a las enfermedades de transmisión sexual. En el hombre, las extensiones de exudados uretrales teñidos con Gram son sensibles y específicas para diagnosticar la gonorrea. Cuando las extensiones sean negativas, habrá que realizar cultivos. En las mujeres, las extensiones de exudados vaginales teñidos con Gram no son lo bastante sensibles ni específicas, y deberán realizarse cultivos. El material recogido se siembra directamente en agar de Thayer-Martin y se coloca en un ambiente enriquecido en CO₂.

ESPECÍMENES NASOFARÍNGEOS

Los cultivos nasofaríngeos se utilizan, fundamentalmente, para detectar los portadores de *N. meningitidis* y *S. pyogenes*; los nasales, para neumococos y *Haemophilus*; y los faríngeos, para estreptococos β -hemolíticos del grupo A. Los especímenes faríngeos se obtienen con un hisopo que se introduce por la boca, deprimiendo la lengua mientras se pasa vigorosamente por la faringe. Los especímenes nasales se obtienen introduciendo el hisopo por la nariz. Si el espécimen se procesa inmediatamente, no es necesario un medio de transporte; en caso contrario, se usan los medios de transporte adecuados. Con el hiso-

po se preparan extensiones que se tiñen con la técnica de Gram. Luego se siembra en agar-tripteína-soja con un 5% de sangre de carnero, y se incuba a 35 °C en una atmósfera con un 10% de CO₂.

ESPECÍMENES OCULARES

Las infecciones oculares más frecuentes son las producidas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* y *Streptococcus* β-hemolítico. Para los estudios de los especímenes oculares, se recogen estos con un hisopo estéril. A continuación se realizan extensiones que se tiñen con técnicas de Gram y se siembran placas de agar achocolatado, un medio con tioglicolato y otro de Sabouraud para hongos.

PUNTAS DE CATÉTER

Las puntas de catéter se recogen en condiciones estériles y se introducen en tubos igualmente estériles con tapón de rosca. Una vez en el laboratorio, se coloca un trozo del catéter en una placa de agar sanguíneo y se reparte su contenido con una pinza flameada por la superficie del agar. Luego, se sumerge el trozo del catéter en un caldo de soja-tripticosa. Se incuba la placa y el caldo a 35-37 °C y se hacen subcultivos.

OTROS LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

Los líquidos pleural, pericárdico, sinovial y peritoneal deben extraerse de forma aséptica. Después se inyecta el espécimen en un tubo o frasco estéril y se lleva al laboratorio lo antes posible. Parte del líquido se centrifuga, y con el sedimento se realiza una extensión que se tiñe con la técnica de Gram. Luego se siembra el líquido en placas de agar sanguíneo y en un medio de McConkey.

Los microorganismos más frecuentes en los líquidos biológicos son:

- Líquido pleural: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus* y flora anaerobia mixta.
- Líquido pericárdico: *S. pneumoniae*, *S. aureus* y enterobacterias.
- Líquido sinovial: *S. aureus*, *H. influenzae* y *N. gonorrhoeae*.
- Líquido peritoneal: *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y enterobacterias.

ALMACENAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

Los laboratorios de microbiología clínica deben conservar los microorganismos aislados para realizar estudios posteriores. Las colecciones de cultivos de microorganismos son fundamentales para una gran cantidad de estudios; entre ellos, las investigaciones epidemiológicas y la formación. Hay muchos métodos para conservar los microorganismos. Todos ellos deben mantener un estado viable sin contaminación y sin alteraciones de las características genotípicas o fenotípicas. Además, debe ser fácil restablecer las condiciones anteriores a la conservación. Los métodos pueden dividirse en aquellos a corto plazo y a largo plazo.

MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A CORTO PLAZO

El método más sencillo para mantener la viabilidad de los microorganismos a corto plazo que suele emplearse para las bacterias es el subcultivo periódico o un medio nuevo. El intervalo de las transferencias depende del microorganismo. El medio debe mantener la supervivencia al tiempo que permite que se produzcan de forma mínima los procesos metabólicos y se enlentezca la velocidad de crecimiento. Otra forma de conservar los microorganismos a corto plazo es la congelación a -20°C . La viabilidad puede mantenerse hasta 1 o 2 años.

Algunos microorganismos como los hongos y algunas bacterias formadoras de esporas pueden almacenarse secas durante períodos prolongados. Las muestras se almacenan en refrigerador. Aunque la mayoría de microorganismos no sobreviven en agua destilada, muchos hongos y *Pseudomonas* sí lo hacen durante varios años a temperatura ambiente, por lo que esta es una forma de conservación fácil y barata.

MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO

Los principales métodos de conservación a largo plazo son la congelación a -80°C y la liofilización. Para proteger a los microorganismos durante el proceso de congelación, almacenamiento y descongelación pueden añadirse crioprotectores como el dimetilsulfóxido, el glicerol, la sacarosa o la leche desnatada.

Técnicas bacteriológicas y bacteriología clínica

INTRODUCCIÓN

En los laboratorios de microbiología clínica las bacterias se identifican empleando la observación directa, el cultivo y las pruebas bioquímicas. En este capítulo se presentan las principales técnicas que se emplean en el laboratorio de microbiología clínica para la caracterización e identificación de las bacterias.

MÉTODOS DE CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN

Los primeros sistemas de clasificación utilizaban principalmente criterios morfológicos y bioquímicos. En el momento actual, toda la información genotípica, fenotípica y filogenética puede utilizarse para clasificar las bacterias. La información genotípica se obtiene de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) presentes en la célula, mientras que la información fenotípica procede de las proteínas y sus funciones, los distintos marcadores quimiotaxonómicos y de un amplio intervalo de características que se expresan.

La *identificación* es el proceso por el que se reconoce que un microorganismo pertenece a una especie y género y, de acuerdo con esto, se le designa. Para ello se comparan las características del desconocido con las de las especies ya establecidas para identificarlo de forma adecuada. La identificación puede realizarse empleando pruebas bioquímicas o detectando componentes antigénicos y/o características moleculares.

Las bacterias pueden agruparse de acuerdo con la reacción de Gram (grampositivas y gramnegativas), la forma (cocos, bacilos y espiroquetas), la atmósfera preferida (aerobia, microaerófila, anaerobia) y la presencia o ausencia de esporas.

Las bacterias se pueden englobar en tres grandes grupos: grampositivas (cocos aerobios y bacilos aerobios), gramnegativas y anaerobias (grampositivas y gramnegativas). Otros grupos son los bacilos gramnegativos con forma curvada y espiral, los micoplasmas y las bacterias intracelulares estrictas.

COCOS GRAMPOSITIVOS

Los cocos grampositivos se agrupan juntos en función de su reacción positiva a la tinción de Gram, la composición de su pared celular gruesa y su forma esférica. Los cocos grampositivos aerobios y anaerobios facultativos comprenden varios géneros de importancia clínica, entre los cuales están los estafilococos, los estreptococos y los enterococos. Todas las bacterias de estos grupos son heterótrofas y no forman esporas.

ESTAFILOCOCOS

Los estafilococos son cocos esféricos, positivos para catalasa, que en las extensiones teñidas suelen aparecer agrupados. Crecen bien en cualquier medio

nutriente que contenga peptona en condiciones aerobias o anaerobias. Pueden producir la hemólisis de la sangre de animales de varias especies. El principal estafilococo patógeno es el *Staphylococcus aureus*, que se encuentra presente en racimos en la flora de la piel, el ojo, las vías respiratorias altas, el tubo digestivo y la uretra. Las infecciones por *S. aureus* pueden afectar a muchos órganos, entre ellos la piel, el corazón y las articulaciones. Los efectos patógenos de los estafilococos se deben, fundamentalmente, a las toxinas que producen en la fase estacionaria de crecimiento.

El diagnóstico de laboratorio se realiza mediante la observación microscópica, el cultivo y la prueba de la coagulasa. En el microscopio se observan cocos grampositivos redondeados en racimos en las extensiones de material de las lesiones que no se hayan abierto o drenado antes, o en las extensiones de siembras de hemocultivos. La colonia típica de *S. aureus* a las 24 h es pigmentada (de amarillo crema a naranja), lisa, ligeramente elevada y hemolítica en agar sanguíneo rutinario. *S. aureus* produce coagulasa, una enzima que se une al fibrinógeno del plasma, haciendo que se aglutinen los microorganismos o que coagule el plasma. La prueba de la coagulasa puede realizarse en placa o en tubo. En la prueba en placa se mezcla una emulsión densa del microorganismo con plasma sobre una placa. La prueba es positiva cuando se produce el apelsonamiento en 30 s. También hay pruebas comerciales de aglutinación con látex que detectan la proteína A, el factor de apelsonamiento o el polisacárido capsular. Se comercializan sistemas de pruebas bioquímicas, como el API Staph-Ident (bioMérieux), para identificar estafilococos.

ESTREPTOCOCOS

Los estreptococos tienen forma esférica, ovoide o de lanceta y, con frecuencia, se observan pareados o en cadenas. Son anaerobios facultativos y algunas cepas requieren que se añada CO₂ para su aislamiento inicial. No obstante, pueden perder este requisito en los subcultivos.

Hay cuatro sistemas diferentes para clasificar estos microorganismos: clínico (piógenos, bucales y entéricos), hemolítico (α , β y γ), serológico (Lancefield A-H, K-U) y bioquímico. Según su reacción hemolítica en agar sanguíneo, los estreptococos se dividen en β -hemolíticos, que hemolizan totalmente los eritrocitos; α -hemolíticos, que producen una hemólisis parcial; y γ -hemolíticos, que no hemolizan los eritrocitos. Los β -hemolíticos se dividen en varios grupos de acuerdo con Lancefield (A, B, C y D). Los principales miembros de estos grupos son el *Streptococcus pyogenes* (grupo A) y el *S. agalactiae* (grupo B). *S. pyogenes* es un patógeno oportunista responsable de más o menos el 90% de todos los casos de faringitis. Un estreptococo α -hemolítico es el *S. pneumoniae*, que produce neumonía, meningitis y otitis media.

La observación microscópica muestra a los estreptococos como bacterias grampositivas que crecen en cadenas de longitud variable. *Streptococcus pneumoniae* suele presentarse como diplococos de aspecto alargado. Los estreptococos crecen bien en agar sanguíneo o agar achocolatado. Las colonias de estreptococos tienen aspecto gris o casi blanco con características húmedas o brillantes. El tamaño de las colonias varía entre las diferentes especies de β -hemolíticos y ayuda a distinguir los grupos de estreptococos.

Hay pruebas rápidas comerciales para detectar los estreptococos del grupo A en especímenes faríngeos. También se dispone de pruebas de aglutinación con látex para detectar directamente los estreptococos del grupo B en líquido cefalorraquídeo, suero y orina. Asimismo, hay sistemas comerciales de pruebas bioquímicas para identificar los estreptococos, como API 20 Strep (bio-Mérieux).

ENTEROCOCOS

Los enterococos son anaerobios facultativos que viven aislados en pares o en cadenas cortas. La mayoría son α o γ -hemolíticos, pero algunos pueden ser β -hemolíticos. Aunque las especies más comunes, *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, son parte de la flora normal del intestino inferior, pueden producir infecciones del aparato urinario, de heridas quirúrgicas y tejidos blandos, así como endocarditis y septicemia, particularmente en los enfermos graves o en los pacientes inmunodeprimidos.

La observación microscópica directa de extensiones teñidas con Gram de especímenes clínicos normalmente estériles como la sangre puede ser útil para el diagnóstico de las infecciones por enterococos. Recientemente, se están empleando medios que contienen sustratos cromogénicos para el aislamiento y la identificación de enterococos. Una vez establecido que es un enterococo, se utilizan las características fenotípicas para identificar la especie empleando sistemas manuales comerciales como API 20S y Crystal Gram-Positive, y sistemas automáticos. También se dispone de métodos moleculares.

ESQUEMA IDENTIFICATIVO

En la figura 35-1 se presenta un esquema para identificar los principales componentes del grupo de cocos grampositivos.

BACILOS GRAMPOSITIVOS

Los bacilos grampositivos son aerobios estrictos o anaerobios facultativos que poseen forma alargada y pueden o no formar esporas. Con la excepción del *Bacillus anthracis*, se mueven mediante flagelos laterales. Los principales géneros patógenos para el hombre son *Bacillus*, *Listeria*, *Corynebacterium*, actinomicetos y micobacterias.

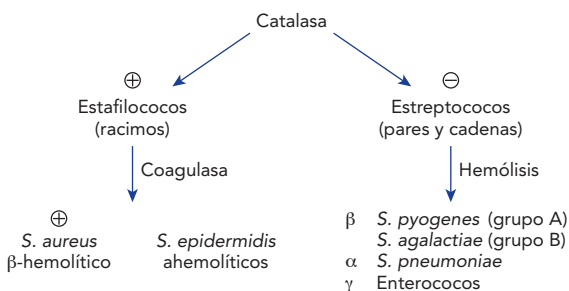


FIGURA 35-1

Esquema para identificar los principales componentes del grupo de cocos grampositivos.

BACILLUS

De las numerosas especies de *Bacillus*, dos tienen significación médica: *B. anthracis* y *B. cereus*. El primero es muy patógeno y hay que tener mucho cuidado cuando se manipule material que pueda contener esta especie. *B. cereus* puede producir otitis, neumonía, septicemia y endocarditis. Asimismo, las especies de *Bacillus* pueden producir gastroenteritis.

Crecen bien en agar sanguíneo. El primer examen de las extensiones debe ser con la tinción de Gram. Es fácil distinguir *B. anthracis* de otros miembros del grupo, ya que presenta el aspecto microscópico y la morfología característicos de las colonias. Las colonias son blancas o grises. Además del análisis fenotípico, se dispone de análisis moleculares y de detección de antígeno para la identificación rápida de *B. anthracis*.

Las colonias de *B. cereus* son muy variables, pero fácilmente reconocibles. Son grandes y su forma varía desde circular a irregular con textura mate o granular.

LISTERIA

Las especies de *Listeria* no forman esporas, no se ramifican y suelen presentarse de forma única o en cadenas cortas. La única especie patógena es *L. monocytogenes*, que en los adultos produce principalmente meningitis, encefalitis y/o septicemia. Son especialmente sensibles las personas mayores y las inmunodeprimidas.

Las especies se cultivan en agar sanguíneo en el que producen colonias pequeñas de color azul grisáceo, rodeadas por una zona estrecha de β -hemólisis. La identificación se basa en las siguientes pruebas: tinción de Gram, observación de motilidad volteante en una preparación húmeda, una prueba de catalasa positiva e hidrólisis de esculina.

CORYNEBACTERIUM

La principal especie patógena de este género es *C. diphtheriae*, que produce difteria, una enfermedad del sistema respiratorio superior. Se caracteriza por la formación de una pseudomembrana fibrinosa, normalmente sobre la mucosa respiratoria, y por una lesión tisular en el miocardio y el tejido nervioso como consecuencia de una exotoxina. Actualmente, se vacuna contra esta bacteria a todos los niños, por lo que es difícil observarla.

El diagnóstico de la difteria es principalmente clínico. En caso de difteria respiratoria, el material para el cultivo debe obtenerse de una muestra de las áreas inflamadas de la nasofaringe. Al microscopio, con tinción de azul de metileno de Löeffler, se observan colonias apiladas entre sí. Hay métodos comerciales de identificación como API (RAPID) Coryne System (bioMérieux) y RAPID CB Plus System (Remel).

ACTINOMICETOS AEROBIOS

Los principales actinomicetos aerobios patógenos son *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomadura* y *Streptomyces*, que producen diversos tipos de infec-

ciones. Los miembros de este grupo son ubicuos en la naturaleza y se han aislado del suelo, el agua dulce, el agua marina y la materia orgánica.

Es muy importante la observación microscópica de los especímenes clínicos de los que se sospecha que contienen actinomicetos aerobios. Las extensiones pueden realizarse directamente de esputos, drenajes y aspirados. Se usa la tinción de Gram y la tinción acidorresistente. Se cultivan en agar sanguíneo y agar achocolatado.

MICOBACTERIAS

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* está formado por *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*; son los agentes etiológicos de la tuberculosis humana. Son microorganismos aerobios en forma de bacilos delgados inmóviles, que no forman esporas y que pueden ramificarse. Las principales micobacterias atuberculosas son *M. leprae* y *M. ulcerans*.

La identificación de las micobacterias se basa en la detección de bacilos acidorresistentes en extensiones teñidas de especímenes clínicos, el crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo adecuado, las pruebas bioquímicas y las pruebas moleculares. Se recogen diversos especímenes diferentes para el análisis de micobacterias. Los principales son los de las vías respiratorias, como los esputos y los aspirados, pero también pueden recogerse de otros lugares. Es importante la observación directa de las extensiones, ya que proporciona un diagnóstico fácil y rápido. La observación al microscopio también puede utilizarse para el seguimiento de los pacientes en tratamiento. Además, es muy importante detectar la presencia de una infección por micobacterias lo más rápidamente posible, ya que los pacientes que la presentan son focos de diseminación de la tuberculosis.

La detección óptima de las micobacterias en especímenes clínicos requiere cultivos en medio sólido y en medio líquido. El principal medio de cultivo sólido es el de Löwenstein-Jensen. Existen medios comerciales líquidos para los analizadores automáticos. La morfología de las colonias depende de la especie y va desde lisa a rugosa y de no pigmentada a pigmentada. Estas últimas suelen ser amarillas o naranjas.

Debido a que las micobacterias crecen lentamente y necesitan períodos de incubación largos, pueden crecer otros microorganismos en los especímenes de lugares no estériles. Por eso deben elegirse unos procedimientos adecuados de pretratamiento, cultivo y condiciones de incubación para facilitar el crecimiento óptimo de las micobacterias.

En la actualidad, los métodos más rápidos de diagnóstico de la tuberculosis pulmonar son los moleculares. Se han comercializado varios métodos que emplean amplificación: AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* Test (Roche), BDProbeTec ET System (BD) y Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (Gen Probe).

BACTERIAS GRAMNEGATIVAS

Las bacterias gramnegativas no se tiñen con el colorante de Gram a causa de que su pared celular tiene un alto contenido de lípidos y pocos peptidoglucanos. La capacidad patogénica de estas bacterias se debe a determinados com-

ponentes de sus paredes celulares, principalmente la capa de lipopolisacáridos. Dentro de este grupo se incluyen *Neisseria*, *Haemophilus*, enterobacterias, *Yersinia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, bacilos afermentadores, *Bordetella*, *Francisella*, *Brucella*, *Legionella* y *Bartonella*.

NEISSERIA

El género *Neisseria* está formado por cocos aerobios que se encuentran en pares, no forman esporas y colonizan las membranas mucosas del ser humano. Estos microorganismos inmóviles requieren un ambiente húmedo y temperaturas templadas para crecer de modo óptimo. Los principales miembros del género *Neisseria* que se encuentran en el ser humano son: *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. sicca* y *N. subflava*. Desde el punto de vista clínico, los dos miembros más significativos del género son *N. gonorrhoeae*, que produce gonorrea, y *N. meningitidis*, que produce meningitis.

El diagnóstico de uretritis gonocócica en los varones puede realizarse por la observación de diplococos gramnegativos asociados con leucocitos polinucleares en extensiones preparadas con la descarga uretral.

Las especies de *Neisseria* crecen bien en agar achocolatado, que contiene antibióticos que inhiben el crecimiento de otras bacterias y hongos. Existen métodos rápidos con pruebas bioquímicas para identificar las especies de *Neisseria*, como NHI card (bioMérieux) y HNID (BD). También se han comercializado pruebas de enzimoanálisis y métodos moleculares.

HAEMOPHILUS

Los miembros del género *Haemophilus* son bacilos anaerobios facultativos, gramnegativos, no acidófilos, que no forman esporas y que van desde pequeños cocobacilos hasta bacilos filamentosos. Son parásitos estrictos, exclusivamente adaptados a las membranas mucosas de las vías respiratorias superiores del ser humano. Las principales especies de *Haemophilus* con interés clínico son *H. influenzae*, *H. haemolyticus*, *H. ducreyi* y *H. parainfluenzae*.

La infección por *H. influenzae* es frecuente en los niños, donde produce una infección respiratoria secundaria que normalmente afecta a los que ya tienen gripe. Esta especie puede tener dos cepas, según tengan o no una cápsula de polisacárido patógena. Aunque ambas cepas se encuentran como flora normal en la nariz y la faringe, pueden producir una enfermedad grave en los pacientes inmunodeprimidos o con problemas respiratorios. Diversas subpoblaciones de *H. influenzae* expresan cápsulas de polisacárido de las que se han descrito seis serotipos diferentes, denominados de la a hasta la f. Las cepas que carecen de cápsula normalmente producen infecciones localizadas (otitis y sinusitis), mientras que las de tipo b, que tienen cápsula, dan lugar a infecciones graves, principalmente en los niños menores de 5 años sin vacunar. Estas infecciones son, entre otras, meningitis, epiglotitis, bronquitis y neumonías.

Hay varios métodos rápidos para identificar y/o tipar las especies de *Haemophilus*. Estos métodos emplean pruebas enzimáticas con sustratos cromogénicos, pruebas de aglutinación, equipos comerciales para la tipificación serológica y pruebas moleculares.

ENTEROBACTERIAS

La familia de las enterobacterias incluye varios miembros que van desde los patógenos entéricos hasta los patógenos oportunistas extraintestinales. Son aerobios y anaerobios facultativos, no forman esporas y no se mueven. Las enterobacterias representan un grupo heterogéneo que tiene en común estas propiedades: son gramnegativas y con forma de bacilo, no forman esporas, se mueven con flagelos peritricosos o son inmóviles, crecen en medios con peptona o extracto de carne sin otros complementos o cloruro sódico, crecen bien en agar de McConkey, crecen tanto de forma aerobia como anaerobia, fermentan glucosa, normalmente con producción de gas, dan positiva la reacción de la catalasa, dan negativa la reacción de la oxidasa, reducen el nitrato a nitrito y contienen el antígeno común enterobacteriano.

Los principales géneros que producen infecciones en el ser humano son: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Providencia*. Muchas se producen o aíslan de abscesos, neumonía, meningitis, septicemia e infecciones de heridas, las vías urinarias y el intestino. Las enterobacterias dan cuenta del 80% de los aislamientos clínicos de bacilos gramnegativos y el 50% de las bacterias con significado clínico en los laboratorios de microbiología clínica. Representan cerca del 50% de los casos de septicemia, más del 70% de las infecciones de las vías urinarias y un porcentaje significativo de las infecciones intestinales.

Escherichia coli es la bacteria que se encuentra con mayor frecuencia en el laboratorio clínico. Además de ser la primera causa de infecciones del aparato urinario, produce otras en muchas otras partes del cuerpo. Entre las principales enfermedades producidas por las cepas patógenas de *E. coli* están las neumonías, las meningitis y la diarrea.

La especie de mayor importancia clínica del género *Klebsiella* es *K. pneumoniae*, que produce neumonía e infecciones del aparato urinario en los pacientes con catéteres.

Proteus produce infecciones del aparato urinario e infecciones nosocomiales (hospitalarias). Es muy móvil y no forma colonias regulares, sino de tipo pululante cuando se cultiva en un medio no inhibidor.

Las especies de *Enterobacter* poseen una gran movilidad y producen infecciones urinarias y de otras partes del cuerpo, como el sistema respiratorio.

Salmonella es causa de intoxicaciones alimentarias, que dan lugar a infecciones intestinales con diarrea, vómitos, escalofríos y cefalea. Las dos especies principales que producen salmonelosis son *S. typhimurium* y *S. enteritidis*. Mientras que la mayoría de las salmonelas las portan los animales, la *S. typhi* sólo la porta el ser humano. Este parásito intracelular produce fiebre tifoidea que se caracteriza por fiebre, diarrea e infección de los órganos infectados.

Shigella causa diarrea, que se acompaña de fiebre, y también es un patógeno invasor que puede recuperarse de las heces sanguinolentas de un hospedador infectado. Por su parte, *Serratia marcescens* produce infecciones del aparato urinario, heridas infectadas y neumonía.

Las especies de *Citrobacter* tienen poca importancia clínica. Finalmente, aunque son raras, las especies de *Providencia* producen infecciones hospitalarias del aparato urinario.

La mayoría de las cepas de enterobacterias crecen fácilmente en los medios que se usan habitualmente en los laboratorios de microbiología clínica. Suele utilizarse el agar de McConkey. La mayoría de los aislamientos de enterobacterias tienen una apariencia característica en agar sanguíneo y agar de McConkey que es útil para la identificación preliminar (fig. 35-2). La identificación de las enterobacterias suele hacerse empleando equipos comerciales de pruebas bioquímicas, como API 20E (bioMérieux).

YERSINIA

Las principales especies patógenas de este género son *Y. pestis*, que produce peste, *Y. enterocolitica*, que da lugar a una gastroenteritis alimentaria y *Y. pseudotuberculosis*, que da lugar a una enfermedad autolimitada, especialmente en los niños y los adultos jóvenes. Morfológicamente, *Y. pestis* es un bacilo gramnegativo que no se mueve por carecer de flagelos, capsulado y oval. Se cultiva fácilmente en los medios habituales a una temperatura óptima de 30 °C, aunque crece lentamente y no es posible observar las colonias hasta después de 48 h. Se diferencia de *Y. pseudotuberculosis*, pues esta se mueve, además de presentar pruebas bioquímicas distintas.

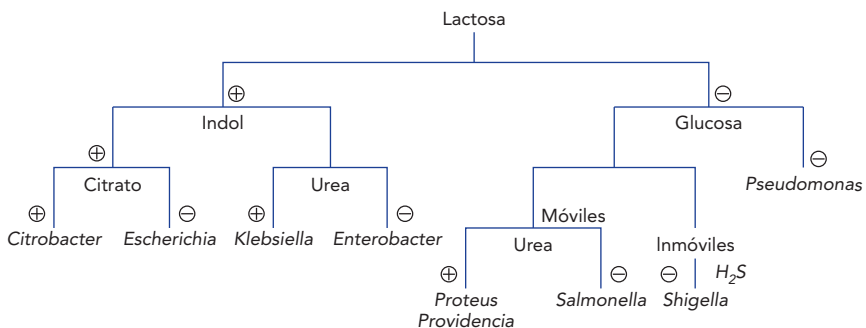
AEROMONAS

Los miembros de este género son bacilos anaerobios facultativos gramnegativos, generalmente móviles. Producen enfermedades intestinales y extraintestinales. Las gastroenteritis por *Aeromonas* van desde una diarrea acuosa, que es la forma más corriente, pasando por una enfermedad disentérica hasta una enfermedad crónica.

Las *Aeromonas* generalmente crecen bien en diversos agares entéricos diferenciales y selectivos. Producen colonias de aspecto verdoso y un olor afrutado. La mayoría de las especies son β -hemolíticas en agar sanguíneo.

VIBRIO

El género *Vibrio* lo forman bacterias gramnegativas anaerobias facultativas con forma curvada que se mueven mediante un flagelo polar. Aunque sus especies



no son patógenas invasivas, pueden producir algunos de los casos más graves de diarrea. Estos microorganismos de vida acuática se transmiten al ser humano a través de las aguas contaminadas. El patógeno más conocido es *V. cholerae*, que produce el cólera. La identificación de este bacilo en el laboratorio es casi concluyente si el espécimen de heces recogido se siembra en agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa. En este medio, *V. cholerae* forma pequeñas colonias amarillas. La administración simultánea de doxiciclina destruye el microorganismo.

PSEUDOMONAS

Las *Pseudomonas* son bacilos gramnegativos anaerobios estrictos. El patógeno humano más significativo es *P. aeruginosa*, que puede producir infecciones graves en los pacientes con quemaduras, traumatismos y heridas quirúrgicas. Puede sospecharse la presencia de *P. aeruginosa* en los cultivos por su olor a uvas mohosas, el aspecto rugoso de sus colonias en agar sanguíneo y el brillo metálico debido al pigmento pioverdina. Además, se utilizan sistemas comerciales de identificación tanto manuales como automáticos. Entre los manuales, API 20NE, Crystal E/NF y RAPID NF Plus.

BURKHOLDERIA

Son bacilos gramnegativos, aerobios, móviles, que no forman esporas. Los dos patógenos humanos importantes del género son *B. pseudomallei* y *B. cepacia*. Esta última, un patógeno nosocomial, puede producir bacteriemia, infecciones de las vías urinarias, artritis séptica e infecciones de las vías respiratorias. Es también un patógeno importante en los pacientes con fibrosis quística y enfermedades granulomatosas.

Las especies *Burkholderia* crecen bien en los medios estándares, como el agar sanguíneo y el agar achocolatado. Se emplean diversas pruebas bioquímicas para diferenciar estos microorganismos.

BACILOS AFERMENTADORES

Estos bacilos se clasifican así debido a la forma de metabolizar la glucosa y otros hidratos de carbono. Son bacilos gramnegativos aerobios que no forman esporas. En este grupo se incluyen los géneros *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium* y *Moraxella*.

Las especies de *Acinetobacter* son cortas, con forma alargada o esférica, inmóviles, estrictamente aerobias y gramnegativas, que con frecuencia se encuentran en pares. Las especies de *Acinetobacter* se consideran no patógenas en las personas sanas, pero pueden producir infecciones en las personas debilitadas. La especie más frecuente es *A. baumannii*, que origina infecciones hospitalarias de la piel, heridas, neumonía y meningitis. *Acinetobacter* producen colonias violetas características en agar de McConkey.

Dentro del género *Achromobacter*, *A. xylosoxidans* es un agente relativamente frecuente de infección en los pacientes inmunocomprometidos, y produce infecciones locales y sistémicas. *Chryseobacterium meningosepticum* produce meningitis y sepsis neonatal. Las *Moraxella* son parásitos de la piel y las membranas

mucosas humanas. *M. catarrhalis* produce bronquitis, sinusitis, otitis y neumonía. Crece fácilmente en agar sanguíneo o agar achocolatado y carece de metabolismo oxidativo.

BORDETELLA

Las especies de *Bordetella* son cocobacilos gramnegativos pequeños, aerobios estrictos. La especie más importante es *B. pertussis*, que produce la tosferina. Esta bacteria, muy contagiosa, penetra por inhalación en el aparato respiratorio, donde destruye las células epiteliales ciliadas de la tráquea y los bronquios.

El aislamiento de *B. pertussis* requiere medios que contengan sustancias protectoras como carbón, sangre o almidón. Los cultivos proporcionan el diagnóstico más específico de la tosferina. Se han descrito varios medios para el aislamiento de *B. pertussis*. Las colonias son pequeñas, lisas, redondeadas y brillantes y tienen el aspecto de una gota de mercurio. Los métodos de diagnóstico serológico están limitados a la detección de la respuesta inmunitaria. Se dispone de reactivos comerciales de ELISA e inmunotransferencia.

FRANCISELLA

La especie de *Francisella* de mayor importancia clínica es la *F. tularensis*, que produce tularemia. Esta enfermedad es muy infecciosa y la transmiten los roedores y los animales domésticos. El aislamiento bacteriano es difícil debido a que el microorganismo tiene requerimientos especiales de crecimiento y crece lentamente, lo cual permite el sobrecrecimiento de otras especies presentes en el espécimen. Crece en agar glucosa-cisteína complementado con sangre, agar achocolatado con IsoVitalX o agar BCYE. Desde el punto de vista de la seguridad del laboratorio y para establecer la causa de la infección de un paciente, es importante reconocer pronto que un aislamiento puede ser *F. tularensis*. El aislamiento de colibacilos diminutos, gramnegativos, poco teñidos, que producen colonias entre grises y blanquecinas de 1-2 mm de diámetro en medio agar achocolatado tras 48 h hace sospechar *F. tularensis*.

La serología es el método más habitual de diagnóstico de infección por *F. tularensis*. Se han comercializado reactivos para la detección de antígenos y anticuerpos.

BRUCELLA

Las especies de *Brucella* son cocobacilos gramnegativos aerobios estrictos que producen brucelosis. Las cuatro especies que infectan al ser humano se nombran según el animal en el que están normalmente: *B. abortus* (vaca), *B. suis* (cerdo), *B. melitensis* (cabra) y *B. canis* (perro). Las *Brucella* pueden entrar en el organismo a través de la piel, el aparato respiratorio o el tubo digestivo. Una vez aquí, este microorganismo intracelular puede entrar en la sangre o los conductos linfáticos, donde se multiplica dentro de los fagocitos. Las especies de *Brucella* producen enfermedades febriles septicémicas e infecciones localizadas del hueso o diversos órganos. La brucelosis se asocia con la exposición

ocupacional o no profesional a los animales. Presenta un tiempo de incubación variable, un comienzo brusco y no tiene síntomas específicos.

La observación microscópica de la sangre o la médula ósea no es suficientemente sensible para el diagnóstico de la brucelosis. *Brucella* presenta ciertas características que hacen sospechar la identidad del microorganismo. La tinción de Gram presenta colibacilos diminutos gramnegativos. Con la excepción de *F. tularensis*, la *Brucella* es el microorganismo gramnegativo más pequeño que se ve en el laboratorio clínico. El aislamiento de *Brucella* proporciona la prueba de la enfermedad. Los métodos modernos automatizados de hemocultivos son muy sensibles, especialmente en las infecciones agudas.

Las pruebas serológicas son de gran ayuda, junto con el cultivo, para el diagnóstico de laboratorio de la brucelosis. Habitualmente se emplean pruebas de aglutinación, que detectan anticuerpos en el suero.

LEGIONELLA

Las especies de *Legionella* se encuentran muy dispersas por la naturaleza, especialmente en ambientes acuosos. Son aerobias, no forman esporas, se mueven y son bacilos gramnegativos. La *Legionella* produce la enfermedad de los legionarios, que es un tipo de neumonía. El cultivo es la forma definitiva para identificar las especies de *Legionella*. Los medios inoculados deben incubarse durante 5 días en una atmósfera húmeda que contenga entre un 2 y un 5% de CO₂. Las colonias suelen aparecer iridiscentes y tienen una consistencia pegajosa. Puede identificarse mediante tinción fluorescente directa de antígenos de especímenes procedentes de las colonias de los cultivos. La identificación de este microorganismo se consigue de forma más exacta empleando detección de anticuerpos por ELISA.

BACTERIAS ANAEROBIAS

Para crecer normalmente, los microorganismos anaerobios requieren un ambiente sin oxígeno. Las bacterias anaerobias presentan un grado variable de tolerancia al oxígeno y, según el mismo, se clasifican en anaerobios estrictos, anaerobios moderados y anaerobios tolerantes al aire. Los anaerobios dan cuenta del 5 al 10% de todas las infecciones. En el ser humano, las bacterias anaerobias son parte de la flora normal de la piel, la cavidad bucal, el tubo digestivo y las vías urinarias.

Las infecciones por anaerobios pueden ser endógenas o exógenas. Los factores responsables de las endógenas son los traumatismos, la actividad quirúrgica, los agentes inmunodepresores, las enfermedades debilitantes —como la diabetes y la insuficiencia renal— y las enfermedades inmunodepresoras como el sida. Los factores exógenos principales son el botulismo, el tétanos y la gangrena gaseosa. Las infecciones anaerobias tienen estas características: olor desagradable de las secreciones, proximidad a la membrana mucosa, tejido necrótico, formación de gas en los tejidos o las secreciones e infección tras una picadura.

Las bacterias anaerobias pueden ser grampositivas o gramnegativas. Los principales anaerobios grampositivos son los géneros *Clostridium*, *Actinomyces*,

Propionibacterium y *Lactobacillus*; y los principales anaerobios gramnegativos, los géneros *Bacteroides* y *Fusobacterium*.

ANAEROBIOS GRAMPOSITIVOS

Clostridium

Los miembros del género *Clostridium* son bacilos grampositivos que forman esporas. Estas bacterias móviles se encuentran en todas partes, especialmente en el suelo. Al microscopio tienen forma de palillo de tambor con una protuberancia en uno de sus extremos. Con la tinción de Gram, el colorante se incorpora a la célula y no se tiñen las esporas. Estos bacilos presentan un crecimiento óptimo en agar sanguíneo a la temperatura corporal. En su forma activa, segregan potentes exotoxinas, responsables de enfermedades como el tétanos, el botulismo y la gangrena gaseosa. Las especies de mayor importancia clínica son *C. tetani*, *C. difficile*, *C. perfringens* y *C. botulinum*.

C. tetani produce tétanos y *C. botulinum*, botulismo. Más que infecciones, el tétanos y el botulismo son intoxicaciones, debido a que sus manifestaciones están relacionadas con la elaboración de neurotoxinas potentes. El botulismo se debe a la ingestión de alimentos preparados en casa que se han enlatado o procesado inadecuadamente. El período de incubación es corto, de 18 a 36 h tras ingerir el alimento contaminado. La toxina se une a las terminales de las motoneuronas, evitando la liberación de acetilcolina en las terminales nerviosas. En cambio, el tétanos se produce en personas no vacunadas a las 2 semanas de un pinchazo profundo, una laceración o una abrasión traumáticas. La confirmación del botulismo por el laboratorio requiere detectar la toxina en el suero, las heridas, los contenidos gástricos, las heces o la comida que se sospeche produjo la enfermedad. Estas determinaciones no se realizan habitualmente, y los especímenes se envían a laboratorios de referencia.

Clostridium difficile es la causa principal de la diarrea asociada con los antibióticos y de la colitis, y el microorganismo que produce todos los casos de colitis pseudomembranosa. El diagnóstico de laboratorio generalmente emplea el cultivo y el análisis de las exotoxinas. El cultivo de las heces se realiza en agar fructosa con cicloserina-cefoxitina y en un caldo de carne glucosado. Los cultivos se incuban de forma anaerobia a 35 °C. *C. difficile* produce colonias amarillas con un olor característico a establo de caballos. Las colonias producen una fluorescencia marrón cuando se observan con la lámpara de Wood y las exotoxinas se determinan en las heces mediante inmunoanálisis.

Actinomyces

Las especies de *Actinomyces* son bacterias semejantes a los hongos que forman ramas filamentosas. Se hallan en la boca y el tubo digestivo. La proliferación patógena de estos microorganismos por un traumatismo de la región infectada da lugar a un absceso y a la hinchazón del lugar infectado. El diagnóstico puede realizarse por observación directa al microscopio del pus producido. El líquido tiene una textura granular, causada por gránulos de azufre compuestos por la bacteria y sus desechos.

Propionibacterium

Las especies de *Propionibacterium* son los anaerobios grampositivos que se aíslan más a menudo en el laboratorio clínico. Pueden producir endocarditis, heridas infectadas y abscesos.

Lactobacillus

La mayoría de las bacterias de este género, que no forman esporas, fermentan la glucosa a ácido láctico (de aquí su nombre). La aplicación más corriente de los *Lactobacillus* es industrial, concretamente la producción de lácteos. Este género contiene también varias bacterias que forman parte de la flora natural de la vagina de la mujer. Debido a que forman ácido láctico a partir de glucosa, estas bacterias crean un ambiente ácido que inhibe el crecimiento de muchas especies bacterianas patógenas, por lo que su eliminación puede dar lugar a infecciones urogenitales.

ANAEROBIOS GRAMNEGATIVOS**Bacteroides**

El género *Bacteroides* de bacterias anaerobias gramnegativas representa la mayoría de los microorganismos que viven en el tubo digestivo. El más abundante es *B. fragilis*. Su patogenicidad es limitada, ya que no producen endotoxinas en su membrana celular. Sólo se origina la infección que produce un absceso tras un traumatismo grave de la región abdominal. Crecen en agar sanguíneo y vistos al microscopio pueden contener vacuolas grandes parecidas a esporas.

Fusobacterium

Las especies del género *Fusobacterium*, de las que la más frecuente es *F. nucleatum*, causan infecciones pleurales y bucales.

BACILOS GRAMNEGATIVOS CON FORMA CURVADA Y ESPIRAL

Los principales géneros de este grupo son: *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Leptospira*, *Borrelia* y las espiroquetas.

CAMPYLOBACTER

Las especies *Campylobacter* son bacilos con forma de S o espirales, gramnegativos, que no forman esporas. Normalmente son móviles, ya que poseen un flagelo. *C. jejuni* es la causa más frecuente de la enteritis bacteriana. Otras *Campylobacter* asociadas con enteritis son *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*.

Pueden emplearse varios medios para el aislamiento selectivo de las especies *Campylobacter*. Requieren un ambiente microaerobio, que puede conseguirse utilizando paquetes generadores comerciales de gas. Producen colonias

grises, planas, irregulares, que pueden transformarse en redondeadas, convexas y brillantes al reducirse la humedad del medio. Hay ELISA comerciales para determinar antígenos de *C. jejuni* y *C. coli* en especímenes de heces. También existen pruebas moleculares.

HELICOBACTER

Las especies de *Helicobacter* son bacilos gramnegativos con forma espiral o curva que no forman esporas y que son móviles. *H. pylori* es la causa principal de úlcera péptica y un factor de riesgo principal de cáncer gástrico. Aunque *H. pylori* puede aislarse mediante cultivo de biopsias gástricas, la infección normalmente se diagnostica mediante métodos que no implican el cultivo, como los histológicos, los serológicos y la prueba de la ureasa. Esta última es una prueba no invasiva que detecta la actividad ureasa de este bacilo con la medida del CO₂ marcado con ¹⁴H o ¹³C en el aire expelido por el paciente tras ingerir urea marcada.

LEPTOSPIRA

Las leptospiras son muy curvadas y poseen movilidad giratoria. Producen leptospirosis, que afecta tanto al hombre como a los animales. La infección puede ir desde un estado subclínico hasta la gravedad, y mostrar síntomas como fiebre, cefalea, mialgia, meningitis y dolores abdominales. Pueden surgir complicaciones, como una insuficiencia hepatorenal y alteraciones del sistema nervioso central.

Las leptospiras pueden aislarse del LCR, la sangre y los tejidos de forma precoz en la fase bacteriémica (primeros 10 días) y de la orina durante la fase inmunitaria (segunda semana hasta los 30 días). El cultivo requiere un medio semisólido que se incuba en la oscuridad durante 4-6 semanas a 25-30 °C. Las leptospiras crecen 1-3 cm por debajo de la superficie del medio y pueden formar un disco lineal de crecimiento. Se observan mediante microscopía de campo oscuro.

Para el diagnóstico de leptospirosis se ha utilizado también la detección de antígenos mediante ELISA, aunque la mayoría de casos se diagnostican por serología detectando anticuerpos. También se han empleado métodos moleculares.

BORRELIA

El género *Borrelia* contiene varias especies patógenas y no patógenas. Con una morfología semejante a la de los treponemas, los miembros del género *Borrelia* son bacterias helicoidales inmóviles. *B. burgdorferi* produce la enfermedad de Lyme (borreliosis), que se transmite por la picadura de un artrópodo infectado con la bacteria. La enfermedad de Lyme puede dividirse en tres fases generales: una fase temprana localizada, en la que se forma en el lugar de inoculación la lesión primaria, una fase de diseminación y una fase tardía con manifestaciones neurológicas, cardíacas y artríticas.

El diagnóstico de la enfermedad de Lyme suele ser clínico tras observar un eritema migratorio en un paciente con exposición a picadura por garrapata.

Sólo se requiere confirmación con síntomas menos específicos. Hay métodos de enzimoimmunoanálisis para detectar anticuerpos específicos. También hay métodos moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme.

TREPONEMA Y OTRAS ESPIROQUETAS

La principal especie del género *Treponema* que produce enfermedad en el hombre es *T. pallidum*, que origina la sífilis. Se trata de una espiroqueta que penetra a través de las membranas mucosas intactas o las lesiones abrasivas de la piel, y tras multiplicarse en el lugar de la inoculación pasa al sistema linfático y circulatorio por donde se disemina por el cuerpo dando lugar a una infección crónica. La enfermedad se caracteriza por períodos de latencia, a menudo de hasta 20 años. *T. pallidum* no puede aislarse por métodos de cultivo rutinarios, por lo que la detección se consigue por la visualización directa de los microorganismos en material procedente de las lesiones o indirectamente por métodos inmunológicos. La observación microscópica se realiza mediante microscopía de campo oscuro o empleando anticuerpos fluorescentes y microscopía de fluorescencia.

Las pruebas serológicas pueden ser no treponémicas o treponémicas. Las no treponémicas detectan anticuerpos contra el material lipoproteínico de las células dañadas y la cardioplipina de los treponemas, y por tanto no son específicas del género *Treponema*. La más conocida de estas pruebas es el VDRL (*Venereal disease research laboratory*). Se utilizan como detección sistemática de la enfermedad y para el seguimiento tras el tratamiento. Las pruebas serológicas treponémicas detectan la presencia de anticuerpos contra antígenos treponémicos y se emplean para confirmar una prueba de detección sistemática no treponémica positiva o confirmar la infección ante una sospecha con pruebas no treponémicas negativas. Una de estas pruebas es la FTA-ABS (*Fluorescent treponemal antibody absorption test*), que es una prueba de inmunofluorescencia indirecta. Se han comercializado pruebas de enzimoimmunoanálisis que emplean antígenos treponémicos específicos. También se dispone de pruebas moleculares de transferencia Western y de reacción en cadena de la polimerasa.

MICOPLASMAS Y BACTERIAS INTRACELULARES ESTRICTAS

Los micoplasmas son las bacterias más pequeñas de vida libre; entre ellos se encuentran los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. Por otro lado, existen varios géneros que son parásitos intracelulares estrictos. A continuación se presentan las características principales de estos dos grupos.

MYCOPLASMA Y UREAPLASMA

Como se ha señalado, son las bacterias más pequeñas de vida libre. Debido a que carecen de pared celular, adquieren diversas formas, no se tiñen con Gram y son resistentes a los antibióticos de β -lactamasa. Son aerobios o anaerobios facultativos y tienen requisitos de crecimiento exigentes. Los medios para aislarlos precisan la suplementación con ácidos nucleicos y/o precursores de los ácidos grasos. Los principales micoplasmas patógenos son *Mycoplasma pneumoniae* y los genitales *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*.

Mycoplasma pneumoniae

Es uno de los principales agentes etiológicos de neumonía en la edad escolar. Para aislar *M. pneumoniae* se utiliza un sistema de cultivo bifásico. Los cultivos se observan una o dos veces por semana en busca de colonias esféricas típicas con un centro denso y una capa externa semejante a un huevo frito. Debido a que el aislamiento de *M. pneumoniae* puede requerir varias semanas, las pruebas rápidas son útiles para el diagnóstico. La presencia de anticuerpos IgM permite diagnosticar una infección aguda directamente a partir de un espécimen de suero. La presencia o un aumento significativo del título de IgG entre dos especímenes recogidos con un intervalo de unas 2 semanas confirma la infección reciente. Los anticuerpos suelen determinarse por enzimoimmunoanálisis.

Micoplasmas genitales

M. hominis produce en las mujeres vaginitis, endometriosis y salpingitis inespecíficas, mientras que *U. urealyticum* ocasiona en los varones uretritis no gonocócica. Pueden emplearse varios medios de cultivo para aislar los micoplasmas genitales. Se incuban de forma anaerobia en agar.

BACTERIAS INTRACELULARES ESTRICTAS

Las principales bacterias intracelulares estrictas pertenecen a los géneros *Chlamydia* y *Chlamydophila*, *Rickettsia*, *Coxiella* y *Ehrlichia*.

Chlamydia* y *Chlamydophila

Existen dos géneros y tres especies patógenas para el ser humano: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila psittaci* y *Chlamydophila pneumoniae*. Las *Chlamydia* poseen tropismo por las células epiteliales columnares. No pueden sintetizar ATP, por lo que son intracelulares estrictas y no pueden replicarse fuera de las células. *C. trachomatis* es la causa más frecuente de enfermedad de transmisión sexual. Su peligrosidad se debe a las posibles complicaciones asociadas a la infección: endometritis, salpingitis, embarazo ectópico y esterilidad en los adultos, y conjuntivitis y neumonías en los recién nacidos. *Chlamydophila psittaci*, que se halla con menor frecuencia en el ser humano, produce psitacosis, una enfermedad asociada con los pájaros, que afecta a los pulmones. *Chlamydophila pneumoniae* es responsable de al menos un 10% de las neumonías comunitarias.

Actualmente, el cultivo celular es el método de referencia para diagnosticar las infecciones por *Chlamydia*. Las líneas celulares más utilizadas son las células de mono McCoy o Buffalo. Las monocapas celulares crecen en cubreobjetos de vidrio u otro soporte adecuado. Tras la incubación entre 48 y 72 h, se fijan las monocapas y se tiñen con anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína. También puede emplearse una prueba de inmunofluorescencia directa, y se dispone de enzimoimmunoanálisis que detectan los lipopolisacáridos de *Chlamydia*, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y técnicas de amplificación de estos ácidos.

Rickettsia

Las *Rickettsia* son microorganismos que poseen una pared celular gramnegativa, cuyo crecimiento se inhibe por determinados antibióticos y que necesitan una célula eucariota para replicarse. Las dos principales enfermedades producidas por *Rickettsia* son el tifus y las fiebres exantemáticas.

Coxiella

Coxiella burnetti produce la fiebre Q. Los seres humanos generalmente se infectan por inhalación de aerosoles o polvos generados por animales infectados. El diagnóstico de laboratorio de la fiebre Q suele hacerse demostrando la presencia de anticuerpos frente a *C. burnetti*.

Ehrlichia

Ehrlichia chaffeensis es el agente causal de la ehrlichiosis humana, cuyos síntomas son semejantes a los de las fiebres exantemáticas, aunque normalmente sin exantemas.

Técnicas virológicas y virología clínica

INTRODUCCIÓN

Los virus son la causa más frecuente de las enfermedades infecciosas humanas. La gravedad de sus acciones va desde el resfriado común al sida. Los virus son parásitos intracelulares que necesitan células vivas para propagarse. La detección de los virus patógenos requiere la obtención del espécimen en el momento adecuado y su procesamiento. En este capítulo se presentan las principales técnicas utilizadas para el diagnóstico y el seguimiento de las enfermedades producidas por los virus.

RECOGIDA, TRANSPORTE Y PROCESAMIENTO DE LOS ESPECÍMENES

La viremia suele asociarse con la fase aguda de las enfermedades víricas y puede preceder a la aparición de los síntomas. La aportación del laboratorio para el diagnóstico de las infecciones víricas requiere que los especímenes se recojan, transporten y procesen adecuadamente. En la actualidad, la mayoría de los métodos de laboratorio emplean equipos comerciales. En todo momento deben seguirse las instrucciones de los fabricantes.

Los especímenes potencialmente infecciosos deben procesarse en una cabina de seguridad. Debe tenerse especial cuidado cuando se trabaje con muestras que contengan virus.

La sangre es un espécimen adecuado para muchas pruebas en el laboratorio de virología y ha de procesarse de acuerdo con las instrucciones del método. La sangre se obtiene para pruebas serológicas y pruebas moleculares de detección de ácidos nucleicos. Las muestras de sangre se recogen en tubos de vacío. Cuando se necesite plasma o leucocitos hay que emplear un anticoagulante.

Otras muestras utilizadas para el análisis de virus son el líquido cefalorraquídeo, el líquido amniótico, los especímenes respiratorios, la orina y las heces. Todos ellos han de recogerse en las condiciones adecuadas.

MÉTODOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO VÍRICO

Existen cuatro métodos de laboratorio fundamentales para el diagnóstico de las enfermedades víricas: cultivo, detección de antígenos, detección del ácido nucleico y detección de anticuerpos.

CULTIVOS VÍRICOS

Los virus necesitan células vivas para replicarse. Muchos virus se replican de forma activa en cultivos celulares. Los sistemas de cultivo celular son monocapas de células vivas que sostienen el crecimiento de los virus. La replicación

del virus se detecta mediante el *efecto citopático* en la monocapa celular. Se denomina efecto citopático a las alteraciones morfológicas visibles características en una línea susceptible debido a la replicación del virus.

Las líneas celulares pueden propagarse y/o mantenerse en el laboratorio, aunque lo más habitual es adquirir los cultivos celulares monocapa comerciales. Existen tres sistemas celulares generales: primarios, diploides y continuos. Las *líneas celulares primarias* son las que proceden directamente de tejidos animales o humanos y se preparan troceando el tejido y tratándolo con tripsina. Las *líneas celulares diploides* son aquellas que mantienen la infección vírica hasta de 20 a 50 pasadas y proceden de células fetales o de recién nacidos. Un ejemplo son los fibroblastos humanos diploides. Las *líneas celulares continuas* son las que proceden de cánceres humanos o animales o son células transformadas *in vitro*. Así, estas líneas celulares continuas tienen un cariotipo heteroploide y pueden subcultivarse de forma indefinida sin que se pierda la sensibilidad a la infección por el virus. Las líneas celulares continuas más utilizadas son la HeLa y la HEP-2.

DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VÍRICOS

Los antígenos del virus pueden detectarse mediante métodos inmunológicos con anticuerpos fluorescentes (inmunofluorescencia directa) o con métodos de inmunoanálisis. Los métodos de inmunofluorescencia directa implican bastante trabajo y la interpretación de los resultados es subjetiva. Los métodos de inmunoanálisis son más objetivos.

DETECCIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO

Los métodos moleculares permiten detectar el ácido nucleico del virus. La hibridación *in situ* permite detectar por medio de sondas marcadas con fluorescencia virus como el del papiloma, el citomegalovirus y los virus del herpes. Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos como la PCR o la bADN se emplean para el seguimiento del VIH y del virus de la hepatitis C. El uso de los métodos moleculares se ha potenciado con la PCR en tiempo real.

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

Las medidas de los anticuerpos frente a los virus tienen dos aplicaciones fundamentales: diagnosticar la infección reciente y determinar la inmunidad. Demostrar la infección actual o reciente requiere la detección en el suero de IgM específica del virus.

SÍNDROMES INFECCIOSOS VÍRICOS

Una forma de abordar el diagnóstico de laboratorio de las infecciones víricas es agruparlas en síndromes clínicos específicos. Se consideran los más importantes: infecciones de las vías respiratorias, mononucleosis infecciosa, infecciones congénitas y neonatales, infecciones del sistema nervioso central, gastroenteritis víricas, hepatitis víricas e infecciones por VIH.

INFECCIONES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS

Un gran número de virus dan lugar a infecciones de las vías respiratorias. Los principales patógenos respiratorios son el virus de la gripe, el virus respiratorio sincitial y los metapneumovirus.

El *virus de la gripe* se replica rápidamente en las células de la faringe y el árbol traqueobronquial. El comienzo de la fiebre es repentino, y se produce dolor de cabeza, dolor muscular y debilidad. La gripe sin complicaciones se resuelve tras 4-5 días. El diagnóstico se realiza durante los dos o tres primeros días de la enfermedad, cuando es máxima la expansión vírica. El método más sensible es la RT-PCR (PCR con transcriptasa inversa); el siguiente es el cultivo, y los especímenes más adecuados son las secreciones nasofaríngeas, los esputos y los hisopos faríngeos. Para hacer un diagnóstico rápido es útil la inmunofluorescencia directa de antígenos víricos en secreciones nasofaríngeas. La detección de antígenos víricos en estas secreciones nasofaríngeas puede realizarse mediante enzimoanálisis comerciales.

El *virus respiratorio sincitial* produce infecciones importantes de las vías respiratorias inferiores, sobre todo en los niños pequeños. Puede detectarse mediante inmunofluorescencia directa o enzimoanálisis de los antígenos en las secreciones respiratorias.

Los *metapneumovirus* producen diversas infecciones respiratorias, principalmente en los niños y las personas mayores. El diagnóstico de metapneumovirus se realiza principalmente por RT-PCR, sólo al alcance de algunos laboratorios.

MONONUCLEOSIS INFECCIOSA

La mononucleosis infecciosa es una enfermedad linfoproliferativa producida por el virus de Epstein-Barr (VEB). Es un virus con ADN de doble cadena de la familia de los herpesvirus, que también produce el linfoma de Burkitt, el carcinoma nasofaríngeo y la neumonitis intersticial linfocítica. El VEB se propaga a través de la saliva contaminada e infecta a los linfocitos B. Los antígenos víricos que aparecen sobre la superficie de los linfocitos B afectados inducen la producción de linfocitos T mononucleares anómalos característicos. Los períodos de incubación van de 4 a 6 semanas y, aunque al final la enfermedad suele resolverse, los síntomas pueden durar períodos largos.

El VEB puede cultivarse en líneas celulares linfoblastoides. Sin embargo, esto no es práctico, ya que lleva mucho tiempo y, además, no diferencia entre infecciones primarias y reactivadas. El diagnóstico de la infección por el VEB en el laboratorio generalmente se hace identificando linfocitos atípicos en sangre periférica, junto con una prueba de anticuerpos heterófilos (prueba de Paul-Bunnell). La detección de estos anticuerpos es muy específica, pero muy poco sensible. Asimismo, se dispone de métodos de inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos contra el antígeno de la cápsida del virus. Y los métodos de enzimoanálisis detectan anticuerpos de las clases IgG e IgM contra el antígeno de la cápsida. También pueden determinarse anticuerpos contra el antígeno nuclear del virus.

Recientemente, se ha hecho posible detectar el ADN del VEB mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica puede ser útil para diagnosticar la infección tempranamente. Puede detectarse en suero, líquido

cefalorraquídeo o biopsias tisulares de enfermos con una linfadenopatía inducida por una mononucleosis infecciosa, enfermedades linfoproliferativas tras trasplantes, un linfoma de Burkitt y un carcinoma nasofaríngeo. El ácido nucleico del VEB también puede detectarse mediante hibridación *in situ* (HIS), en la que se emplea una sonda para los ARN codificados por el virus.

INFECCIONES CONGÉNITAS Y NEONATALES

Las principales infecciones congénitas y neonatales están producidas por citomegalovirus, virus de la rubéola y virus del herpes simple.

CITOMEGALOVIRUS

La infección por citomegalovirus (CMV) es la infección intrauterina más frecuente y afecta a cerca del 1% de los recién nacidos. Alrededor del 90% de estos niños son asintomáticos al nacer, de forma que el aislamiento del CMV de la orina o la saliva o la detección de anticuerpos IgM frente al CMV puede ser la única señal de infección congénita. Los IgM pueden determinarse mediante enzimoanálisis con antígenos recombinantes. La prueba prenatal más fiable para verificar la infección fetal es el cultivo del virus y la detección del CMV en el líquido amniótico mediante PCR.

RUBÉOLA

La rubéola la causa un virus con ARN de la familia togavirus. Es una enfermedad muy contagiosa que se propaga a través de las secreciones respiratorias. El paso a la cavidad amniótica a través de la placenta durante el primer trimestre produce en el feto muchas malformaciones. Sin embargo, en la actualidad, la rubéola congénita es rara debido a la eficacia de la vacunación y la detección sistemática prenatal. El cultivo requiere mucho tiempo y no suele realizarse. Se emplean enzimoanálisis para detectar anticuerpos de los tipos IgG o IgM. Estos señalan una infección reciente, mientras que aquellos indican el estado inmunitario.

VIRUS DEL HERPES SIMPLE

La infección neonatal por el virus del herpes simple (VHS) posee una elevada mortalidad y una morbilidad significativa. Normalmente se adquiere durante el nacimiento por un tracto genital materno infectado. La infección puede ser localizada o sistémica y las manifestaciones se presentan entre la primera y la segunda semana de vida. Pueden aparecer lesiones cutáneas, oculares o daño cerebral grave. El diagnóstico se realiza por el cultivo del virus mediante PCR a partir del material de las vesículas cutáneas o del líquido cefalorraquídeo.

INFECCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Las principales infecciones del sistema nervioso central son las meningitis y las encefalitis. En las meningitis se produce la inflamación de las capas meníngeas que recubren el cerebro, mientras que en las encefalitis el virus se replica en el

parénquima cerebral. Muchos virus se asocian bien con meningitis o con encefalitis, aunque pueden afectarse ambos lugares en la meningoencefalitis, especialmente por infección por arbovirus. Los principales virus que producen meningitis son los enterovirus, mientras que el que ocasiona más a menudo encefalitis es el virus del herpes simple. La técnica más adecuada para el diagnóstico de la encefalitis vírica y la meningitis vírica es la amplificación de ácidos nucleicos en el líquido cefalorraquídeo.

GASTROENTERITIS VÍRICAS

Las gastroenteritis víricas son patologías frecuentes especialmente en los niños. Los principales virus que producen estas enfermedades son los rotavirus, los adenovirus entéricos, los calicivirus y los coronavirus. Los rotavirus son virus con ARN que tienen una cápsida de dos capas, lo cual da al virus el aspecto de una rueda. Son responsables de al menos el 50% de los casos de diarreas acuosas en los niños pequeños. Los serotipos 40 y 41 de los adenovirus están asociados con gastroenteritis y representan el 10-20% de los casos pediátricos. Los calicivirus producen gastroenteritis epidémicas agudas y, finalmente, los coronavirus producen gastroenteritis leves en adultos.

Tradicionalmente, el diagnóstico de las gastroenteritis víricas se ha hecho según las características morfológicas mediante microscopía electrónica (ME) en especímenes de heces. Sin embargo, la ME no está al alcance de la mayoría de los laboratorios. La detección rápida de antígenos de rotavirus en especímenes de heces puede hacerse fácilmente y con gran exactitud mediante pruebas de aglutinación con látex o inmunoanálisis.

HEPATITIS VÍRICAS

Hay un gran número de virus que producen afectación hepática. Sin embargo, la mayor parte de las enfermedades hepáticas víricas las producen los virus llamados A, B, C, D y E, todos ellos hepatotrópicos y productores de alteraciones líticas en los hepatocitos.

Los virus de la hepatitis A (VHA) y hepatitis E (VHE) se transmiten de forma oral-fecal. El virus de la hepatitis B (VHB) se transmite fácilmente a través de la sangre y se ha adquirido, clásicamente, mediante transfusiones y pinchazos con agujas contaminadas. Sin embargo, son rutas importantes la infección vertical durante el embarazo, la transmisión mediante contactos sexuales y los líquidos biológicos infectados, como la saliva. El virus de la hepatitis C (VHC) se transmite fundamentalmente por vía sanguínea y en mucha menor medida durante el embarazo, o a través del contacto sexual o en casa.

Los cinco virus de la hepatitis no se replican en las líneas celulares estándares, y la detección de antígenos víricos y de anticuerpos específicos de los tipos IgM e IgG señala la fase de la infección. La determinación de la carga viral se emplea para el control de la respuesta al tratamiento de la infección crónica.

HEPATITIS A

La hepatitis A la causa un pequeño virus de la clase picornavirus, que son virus con ARN. El virus está muy extendido por todo el mundo y produce infección

nes tanto epidémicas como esporádicas, sobre todo en áreas con poca higiene y condiciones socioeconómicas bajas. El período de incubación del VHA es de 7 a 42 días, y los pacientes son infecciosos entre 7 y 10 días antes de que aparezcan los síntomas y durante unos pocos días después. En la figura 36-1 se presenta la evolución cronológica de la infección por el VHA.

El diagnóstico serológico de la infección aguda por el VHA depende de la demostración de anticuerpos anti-VHA de tipo IgM. Generalmente, aparecen unas 4 semanas después de la infección y pueden mantenerse hasta 4 meses tras el comienzo de los síntomas clínicos. La presencia de anticuerpos IgG o totales (IgM e IgG) indica una infección pasada y una inmunidad asociada.

HEPATITIS B

La hepatitis B la produce un virus con ADN de doble cadena, miembro de la familia hepadna. El virus está formado por un núcleo (*core*) central que contiene el ADN, rodeado por una cápsida proteínica. El VHB se halla repartido por todo el mundo, y esta enfermedad es una de las causas principales del carcinoma hepático. El período de incubación del VHB está comprendido entre 30 y 180 días. Alrededor del 60% de las infecciones son asintomáticas, pero una pequeña proporción son muy graves y producen mucho daño al hígado e insuficiencia hepática.

El diagnóstico y seguimiento de laboratorio de las infecciones agudas y crónicas del VHB utiliza uno o varios de los siguientes marcadores serológicos: antígeno de superficie de la hepatitis B (HB_sAg), antígeno e ($HBeAg$), anticuerpo contra el antígeno *core* ($anti-HB_c$), anticuerpo contra el antígeno e ($anti-HBe$) y anticuerpo contra el antígeno de superficie ($anti-HB_s$). La inmunidad de la vacuna para el VHB puede también valorarse midiendo la concentración de $anti-HB_s$.

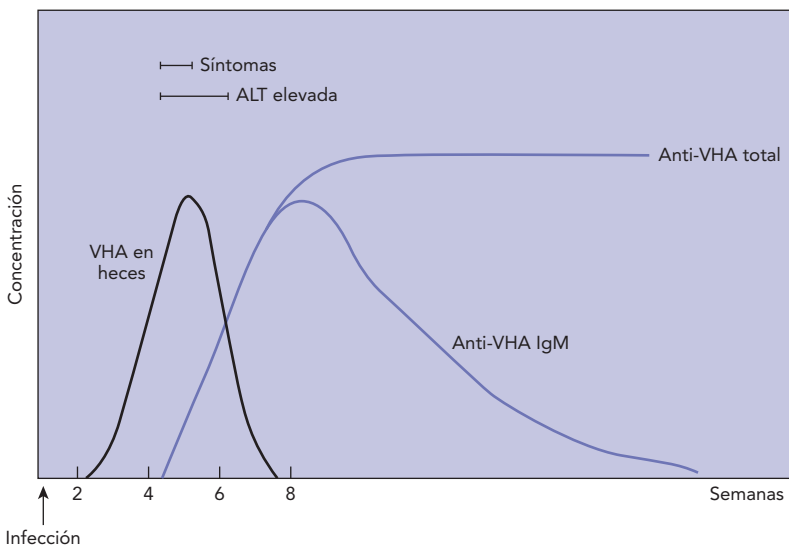


FIGURA 36-1 Evolución cronológica de la infección por el virus de la hepatitis A (VHA).

Las combinaciones de varios de estos marcadores son especialmente útiles para diferenciar la hepatitis aguda, la hepatitis crónica y el estado de portador crónico. Su patrón de reactividad refleja la evolución de la infección. En la figura 36-2 se presenta la temporalidad de la aparición de los antígenos y los anticuerpos durante la infección por el VHB.

El HB_sAg se detecta entre las 2 semanas y los 2 meses anteriores a la aparición de los síntomas clínicos y unas 2 semanas después de la infección. Su presencia varía hasta 2 o 3 meses. Entre un 5 y un 10% de los pacientes tienen concentraciones persistentes de HB_sAg transcurridos 6 meses (portador crónico y hepatitis crónica).

Los *anti- HB_c* de tipo IgM se hacen detectables al mismo tiempo que aparecen los síntomas clínicos y el aumento de las transaminasas. Permanecen elevados varios meses y a veces hasta 1 año. Los *anti- HB_c* de tipo IgG aparecen pronto, tras los de tipo IgM, y permanecen durante años. En algunos pacientes desaparecen en última instancia.

Generalmente, la aparición de los *anti- HB_s* se produce tras la desaparición del HB_sAg . Persisten durante años y se asocian con una inmunidad relativa o absoluta. En los pacientes que han recibido la vacuna contra el VHB, este anticuerpo debe ser el único que se detecte en los que respondan.

El $HBeAg$ está asociado con el HB_sAg , pero normalmente no persiste tanto. Generalmente, su presencia se asocia con una mayor infectividad, pero tiene una utilidad diagnóstica limitada. La aparición de los anticuerpos *anti- HBe* coincide con la desaparición del antígeno e. Esto ocurre, normalmente, después de la aparición de los *anti- HB_c* y antes de que aparezcan los *anti- HB_s* . Aunque los *anti- HBe* a menudo desaparecen, su persistencia se ha asociado con la hepatitis crónica y el estado de portador crónico. No confieren ninguna protección.

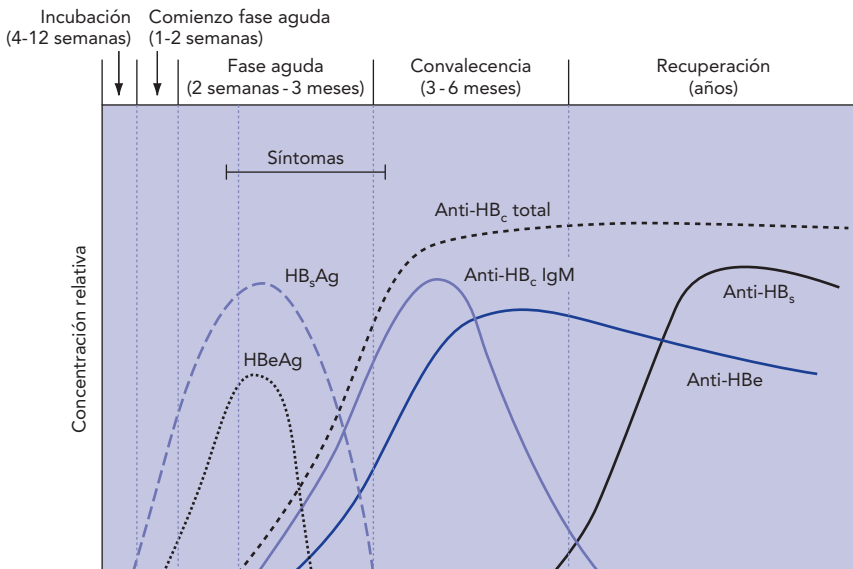


FIGURA 36-2 Temporalidad de la aparición de los antígenos y los anticuerpos en sangre durante una infección por el virus de la hepatitis B.

El caso típico de *hepatitis aguda* por el VHB se caracteriza por la presencia de HB_sAg y anti-HB_c de tipo IgM. Este último es particularmente útil en los casos de HB_sAg negativos. No se recomienda utilizar sólo el HB_sAg para diagnosticar la infección aguda. En los casos de antígeno negativo, la presencia de anti-HB_c de tipo IgM o total, y la del ADN del VHB en ausencia de anti-HB_s, ayuda a confirmar esa infección. Por su parte, en la *hepatitis crónica*, el HB_sAg está presente junto con el anti-HB_c, pero no el anti-HB_s. El HBeAg puede o no estar presente.

Las pruebas más recientes para valorar las infecciones por VHB son las medidas cualitativas y cuantitativas del ADN del VHB mediante métodos moleculares, como la PCR y las sondas específicas.

HEPATITIS C

La hepatitis C la produce un pequeño virus con ARN. Está distribuida por todo el mundo, con más de 100 millones de portadores. La mayoría de los casos son asintomáticos, pero cuando se producen los síntomas es frecuente la hepatitis crónica. La transmisión tiene lugar mediante la exposición a la sangre o a los productos sanguíneos.

La determinación de los anticuerpos contra el virus de la hepatitis C (VHC) es la prueba principal para diagnosticar esta enfermedad. Sin embargo, el tiempo de seroconversión va de 3 a 6 meses en la infección adquirida mediante transfusión y de seis a nueve en los casos que no están relacionados con las transfusiones.

Los enzimoanálisis para el VHC detectan anticuerpos (anti-VHC) para cualquiera de las cuatro proteínas del mismo (5-1-1, c100-3, c33c y c22-3). Estas proteínas se sintetizan mediante técnicas recombinantes y se fusionan con la superóxido dismutasa (SOD) como portadora. El RIBA (*recombinant immunoblot assay*) es una técnica de inmunotransferencia que se emplea para detectar anticuerpos contra proteínas del VHC.

La PCR para el ARN del VHC utiliza cebadores para una región 5' no codificante muy conservada del genoma del virus. Cuando esta prueba es positiva, el paciente tiene una infección activa con el VHC. Esta prueba se recomienda para los pacientes que sean positivos para anti-VHC. La medida cuantitativa del ARN del VHC (carga vírica) es útil para seguir la respuesta al tratamiento en los pacientes que están infectados con este virus.

HEPATITIS D

La hepatitis D (delta) tiene por causa un virus que contiene un ARN circular. Requiere HB_sAg para poder replicarse y, como consecuencia, una coinfección con el VHB. El modo de transmisión es parenteral y en las áreas endémicas está asociado con epidemias de gran mortalidad. Con relación al diagnóstico, al producirse en coinfección con el citado virus, sólo debe considerarse en casos de hepatitis B. El diagnóstico serológico de la hepatitis D depende del hallazgo del antígeno y/o la presencia de anticuerpos contra el virus de la hepatitis D (anti-VHD). En los pacientes con coinfecciones agudas, el antígeno de la hepatitis D (HD_sAg) aparece poco después del HB_sAg y desaparece con la convalecencia. Las infecciones agudas están asociadas con el anticuerpo IgM anti-

VHD, y los casos crónicos normalmente sólo dan el anticuerpo IgG. Ambos anticuerpos pueden finalmente desaparecer después de la convalecencia. El antígeno y los anticuerpos se determinan mediante radioinmunoanálisis o enzimoimmunoanálisis.

HEPATITIS E

El VHE es un virus con ARN esférico sin envoltura. Este agente infeccioso está restringido a los países desarrollados y tiene una distribución mundial. Para el diagnóstico, se utiliza la determinación de anticuerpos contra el VHE mediante radioinmunoanálisis o enzimoimmunoanálisis. También puede detectarse el ácido nucleico mediante PCR.

VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) produce el sida. Se han detectado dos tipos de virus, el VIH-1 y el VIH-2. Estos virus atacan principalmente los linfocitos T4, que tienen un papel fundamental en la coordinación de la respuesta inmunitaria celular. Durante el curso de la enfermedad, estos linfocitos van disminuyendo, con el consiguiente deterioro de la respuesta inmunitaria. En consecuencia, los pacientes con sida son muy susceptibles a las infecciones; las principales las causan protozoos (criptosporidios y *Pneumocystis jirovecii*), hongos (criptococos) y virus (citomegalovirus y herpes), y las bacterias intracelulares (micobacterias).

La infección por el VIH induce al organismo a producir anticuerpos contra las proteínas del virus de diferentes partes del genoma de este, como env, gap y pol. El antígeno del VIH (Ag VIH) se produce durante la fase de replicación del virus y generalmente aparece algunos días después de la exposición; luego desciende rápidamente, al irse formando los anticuerpos. Años después, la antigenemia puede volver a aumentar, lo cual indicaría una replicación intensa del virus. En la figura 36-3 se muestra un perfil cronológico característico de una infección por VIH. Tras la infección aguda, el paciente sufre una enfermedad leve entre las 4 y las 8 semanas siguientes. El antígeno del VIH puede detectarse alrededor de 4 semanas después, y los anticuerpos empiezan a detectarse entre 6 y 8 semanas.

El diagnóstico de infección por el VIH se basa principalmente en las pruebas que detectan los anticuerpos contra el virus. La prueba de detección sistemática primaria es el *enzimoimmunoanálisis* (EIA). La mayoría de los EIA de tercera generación emplean proteínas recombinantes o péptidos sintéticos de la cubierta, tanto del VIH-1 como del VIH-2, lo cual proporciona una sensibilidad elevada. Los EIA de cuarta generación, más recientes, incluyen en la fase sólida anticuerpos contra el antígeno p24 para reducir el período de ventana. Se comercializan en la actualidad pruebas rápidas de detección sistemática con una sensibilidad y especificidad semejante a las pruebas normales, que incorporan en su fase sólida péptidos sintéticos de la región inmunodominante de la proteína transmembrana de la cubierta gp41 para VIH-1 y gp36 para VIH-2.

Todos los enzimoimmunoanálisis que sean positivos deberán confirmarse mediante transferencia Western o inmunotransferencia. La transferencia con-

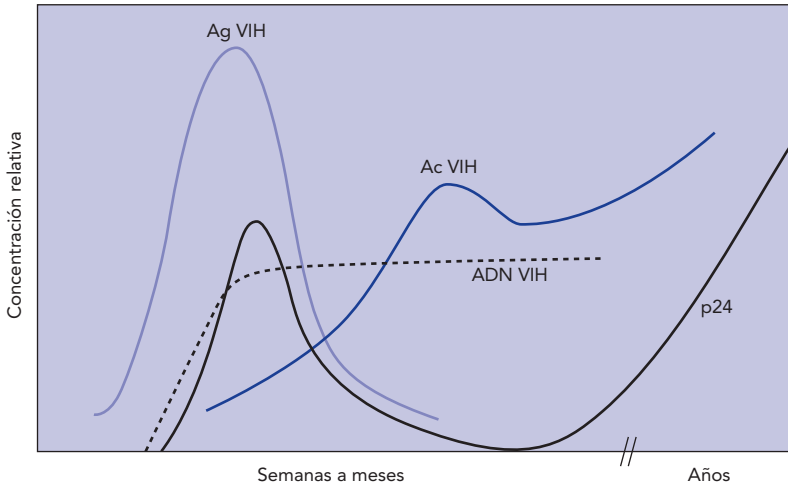


FIGURA 36-3 Perfil cronológico característico de una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

firmatoria detecta anticuerpos contra proteínas del centro (p17, p24 y p55), la polimerasa (p31, p51 y p66) y la cubierta (gp41, gp120 y gp160) del VIH.

Las pruebas de *inmunofluorescencia* confirmatorias utilizan linfocitos T que expresan antígenos del VIH-1 fijados sobre portas de vidrio para capturar los anticuerpos contra el VIH-1 del suero, con la detección de los anticuerpos del paciente unidos mediante un segundo anticuerpo marcado con fluoresceína.

Respecto a las pruebas de detección del ARN del virus y del antígeno p24, no son útiles para el diagnóstico, aunque pueden utilizarse para tratar a los pacientes infectados. El ARN vírico puede dar resultados falsos positivos y no todas las personas infectadas tienen concentraciones detectables del antígeno p24 al comienzo de la infección. Para el cuidado de los pacientes se emplean las técnicas de biología molecular que determinan la concentración del ARN del VIH, que se conoce como carga vírica.

VIRUS DEL PAPILOMA

Las infecciones por el virus del papiloma humano (VPH) están entre las enfermedades de transmisión sexual más frecuentes. Hay más de 70 *genotipos* conocidos del VPH. En los últimos años, muchos investigadores han demostrado que este virus es el factor que se asocia con más fuerza con el cáncer de útero en las mujeres. Los virus pueden detectarse en células teñidas con Papanicolaou (Pap). Actualmente, el mejor método es la detección del ADN del VPH mediante hibridación, utilizando sondas de ADN o ARN. Puede emplearse también la PCR.

Técnicas micológicas y micología clínica

INTRODUCCIÓN

La mayor parte de los hongos de la naturaleza no son patógenos para el ser humano, y la mayoría de las enfermedades por hongos son oportunistas y necesitan un factor de predisposición para que se produzca la infección micótica. La micología clínica es la parte de la microbiología dedicada al estudio de los hongos que producen enfermedades en el ser humano y a los métodos para su detección y diagnóstico. En este capítulo se presentan las principales técnicas que utiliza el laboratorio de microbiología clínica para la caracterización e identificación de los hongos que producen enfermedades en el ser humano.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS

Los hongos son microorganismos heterótrofos que necesitan para nutrirse compuestos orgánicos carbonados ya formados. Los hongos viven embebidos en una fuente alimenticia o medio y obtienen sus nutrientes segregando enzimas al sustrato externo y absorbiendo los nutrientes liberados a través de su pared celular.

Los hongos pueden ser unicelulares o multicelulares. Los unicelulares son las levaduras, que no representan un grupo taxonómico natural o formal, sino que son una forma de crecimiento que presentan muchos hongos no relacionados entre sí. Los hongos multicelulares presentan una unidad estructural básica que es una cadena de células filamentosas tubulares multinucleadas denominadas *hifas*. En la mayoría de los hongos multicelulares la etapa vegetativa consta de una masa de hifas ramificadas denominada *micelio*.

Muchos hongos de importancia médica modifican su forma de crecimiento cuando invaden los tejidos desde la forma multicelular de su entorno natural a la forma de levadura en el tejido, por lo cual reciben el nombre de *patógenos dimórficos*.

Los hongos se reproducen por esporas que pueden ser el resultado de un proceso asexual o de un proceso sexual. Las esporas se producen en cantidades enormes para asegurar la dispersión.

Los hongos se clasifican fundamentalmente de acuerdo con su aspecto, más que con las diferencias fisiológicas y bioquímicas. Las esporas sexuales y su modo de producción forman la base principal de clasificación de los hongos en Zigomicetos, Ascomicetos y Basidiomicetos.

RECOGIDA Y TRANSPORTE DE ESPECÍMENES

Los lugares de recogida más frecuentes para el diagnóstico de las enfermedades micóticas son: sangre, LCR, líquidos estériles (pericárdico, peritoneal, pleural, sinovial), médula ósea, catéteres intravenosos, oído externo, ojo, pelo, dispositivos médicos, uñas, piel, orina y vagina. Todos los especímenes para los estudios micológicos deben considerarse potencialmente peligrosos, por lo

que han de aplicarse precauciones universales durante su recogida. El transporte adecuado es también fundamental para el diagnóstico correcto. Se recomienda un transporte hasta el laboratorio a temperatura ambiente con una duración inferior a las 2 h.

IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS

El diagnóstico de las infecciones producidas por los hongos se basa fundamentalmente en la observación directa y en los cultivos de los especímenes afectados. La identificación de las especies de hongos se basa en las características macroscópicas y microscópicas de sus colonias. Las principales características macroscópicas que se analizan son la velocidad de crecimiento, la textura, la topografía de la colonia y el color. Las levaduras producen colonias cremosas, pastosas y opacas, mientras que los hongos filamentosos originan colonias algodonosas, esponjosas o de crecimiento aéreo pulverulento por el medio de cultivo.

Para la observación microscópica se realizan preparaciones que se tiñen. El criterio más importante para identificar los hongos es observar al microscopio el tamaño, la forma, el color y la disposición de las esporas.

La mayoría de los especímenes clínicos pueden observarse directamente en busca del hongo patógeno. La observación microscópica directa del material clínico teñido de forma adecuada es rápida, rentable y puede señalar al presunto agente etiológico. Los resultados de la observación directa también pueden guiar al laboratorio en la selección de los mejores medios para el crecimiento del hongo *in vitro*. Las preparaciones teñidas hechas a partir de los cultivos de hongos son esenciales para la identificación definitiva.

PREPARACIÓN HÚMEDA

El método más simple para el examen directo de un espécimen es la observación de una suspensión colocada en un porta y con un cubreobjetos. Puede emplearse hidróxido de potasio (KOH) al 10% con especímenes tisulares para disolver el material y ver mejor los hongos.

TINCIÓN CON TINTA CHINA

Las cápsulas de *Cryptococcus neoformans* se tiñen con tinta china. Para ello, se mezcla el espécimen (pus, exudado, tejido, esputo o sedimento de LCR) con una gota de tinta china —cuando es muy oscura puede diluirse con agua— sobre un portaobjetos limpio. Se tapa con un cubre, teniendo en cuenta que el montaje ha de ser delgado, y para ello se puede aplicar una presión suave. Se observa con poco aumento y luz reducida, y se pasa a un gran aumento para buscar las posibles células encapsuladas. Las cápsulas mucoides aparecen como una aureola clara que rodea a la célula de la levadura, que está entre la pared celular y la masa negra circundante de partículas de tinta.

TINCIÓN CON BLANCO CALCOFLÚOR

Este compuesto se une a la quitina de las paredes de los hongos y produce una fluorescencia blanca o verde manzana cuando se expone a la luz ultravioleta

de longitud de onda corta. Para realizar la tinción, se coloca el espécimen en un portaobjetos de cristal, se mezcla con el reactivo de blanco calcoflúor y se observa la preparación con un microscopio de fluorescencia.

TINCIÓN CON GIEMSA

Esta tinción es útil para detectar levaduras intracelulares de *Histoplasma capsulatum*. El hongo se observa como pequeñas células ovales que se tiñen de azul y tienen un halo hialino que es la pared celular poco teñida.

CULTIVOS

Se dispone de diversos medios de cultivo para hongos procedentes de especímenes clínicos. No existe ningún medio o combinación de medios que sirva para todos los especímenes, y el medio debe elegirse de acuerdo con el tipo de espécimen y el hongo que se sospeche. Los medios que más se usan son las infusiones de cerebro-corazón, el glucosado de Sabouraud y los cromogénicos. Con los especímenes de lugares no estériles, debe emplearse también un medio que soporte el crecimiento de los hongos al mismo tiempo que se inhibe el crecimiento bacteriano. El cultivo se realiza en placa o tubo. Se incuba a 25-30 °C. La mayoría de los hongos crecen en dos semanas, pero conviene mantenerlos durante 3-4 semanas.

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Los estudios de identificación morfológica pueden realizarse con las colonias de las placas originales de aislamiento. A menudo es necesario realizar subcultivos para demostrar estructuras diagnósticas.

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Las pruebas bioquímicas son fundamentales para la identificación de las levaduras y, a veces, son útiles para identificar los hongos filamentosos. La caracterización bioquímica puede realizarse mediante estudios de fermentación o patrones de asimilación. Existen diversos sistemas comerciales como API 20C y RapID Yeast Plus System.

PRUEBAS SEROLÓGICAS

Se comercializan diversas pruebas inmunológicas para detectar antígenos y anticuerpos de determinados hongos patógenos. Se emplean para aspergilosis, blastomycosis, candidiasis, coccidioidomycosis, criptococosis, histoplasmosis y esporotricosis.

PRUEBAS MOLECULARES

Los métodos moleculares de detección de ácidos nucleicos tienen una mayor sensibilidad que los métodos tradicionales de tinción y cultivo, pero pueden proporcionar resultados positivos en personas asintomáticas debido a la coloni-

zación o infección subclínica. Los métodos moleculares se han aplicado directamente a los materiales clínicos o al contenido de las botellas de hemocultivo.

Los métodos moleculares requieren, en general, tres pasos: aislamiento del ácido nucleico de la muestra, amplificación del ácido nucleico y un método para identificar la presencia de la región diana amplificada del hongo. Se han empleado técnicas como las sondas de ADN, las micromatrices, la hibridación fluorescente *in situ*, la PCR y la secuenciación. En los últimos años se están produciendo avances importantes en la aplicación de los métodos moleculares en el análisis de los hongos.

LEVADURAS

De las muchas levaduras de la naturaleza, seis géneros (*Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Malassezia* y *Rhodotorula*) son responsables de la mayoría de las infecciones en el ser humano. La inmensa mayoría de estas levaduras tienen un potencial patógeno bajo y son parte de la microflora humana. Las infecciones se producen cuando las defensas normales del hospedador están abatidas.

En el diagnóstico de las infecciones por levaduras es esencial la observación adecuada del espécimen antes de procesar el material. Tras el aislamiento de la levadura, la primera observación debe ser una preparación húmeda de la colonia. Debe observarse el tamaño y la forma de la levadura, el método de unión del brote y la presencia o ausencia de pseudohifas, verdaderas hifas o arthroconidias. La misma preparación húmeda que se utiliza para la observación microscópica puede emplearse para la observación con tinta china. Se observa la presencia de levaduras encapsuladas.

CANDIDA

Las especies de *Candida* son las más importantes levaduras patógenas. De ellas *C. albicans* es la principal, seguida de *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. lusitaniae*. En las personas normales, las infecciones por *Candida* son limitadas en extensión y gravedad, ya que las especies de *Candida* son parte de la flora normal del tubo digestivo, las membranas mucosas y la piel. La enfermedad grave e invasora se produce cuando están comprometidas las defensas del hospedador.

Para el diagnóstico de infección por *Candida* se obtienen especímenes para cultivo de los lugares afectados. Los sistemas actuales de hemocultivo de seguimiento continuo detectan la mayoría de las levaduras con significación clínica. Se siembran en los medios adecuados y se observan las colonias. La presencia de extensiones filamentosas en los bordes de las colonias es una indicación macroscópica de la producción de pseudohifas.

CRYPTOCOCCUS

El principal patógeno de este género es *Cryptococcus neoformans*, que puede causar enfermedades generalizadas, con predilección por el sistema nervioso central. La criptococosis es una infección oportunista grave en los pacientes con sida. La extensión del sedimento del LCR, centrifugado y teñido con tinta

china, permite observar la levadura encapsulada en más de la mitad de los casos, aunque los artefactos pueden dar lugar a confusiones. El agar sanguíneo presenta colonias con aspecto mucoso. La identificación definitiva se realiza mediante pruebas bioquímicas.

El antígeno polisacárido de *C. neoformans* puede detectarse en LCR y suero mediante aglutinación con látex. Esta prueba tiene gran sensibilidad. En cualquier caso, la prueba diagnóstica concluyente es el cultivo.

CLASIFICACIÓN DE LAS MICOSIS

Una forma habitual de clasificar las micosis es según la localización. De acuerdo con este criterio, se clasifican en superficiales y cutáneas, subcutáneas, profundas y sistémicas.

MICOSIS SUPERFICIALES Y CUTÁNEAS

Las micosis superficiales y cutáneas son aquellas que afectan a las capas más externas de la piel y el pelo. Su virulencia es baja y sus efectos principales son cosméticos. Los agentes micóticos cutáneos atacan el tejido queratinizado de la piel, el pelo y las uñas. Los principales agentes de micosis superficiales son: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*.

Entre las micosis superficiales se encuentran la pitiriasis versicolor, producida por especies de levaduras del género *Malassezia*; la tiña negra palmar, producida por la levadura *Phaeoannellomyces werneckii*; la piedra negra, producida por *Piedraia hortae*; y la piedra blanca, producida por *Trichosporon*. Dentro de las micosis cutáneas están las dermatofitosis, producidas por hongos queratinófilos denominados dermatofitos, y las candidiasis cutáneas y de las mucosas.

Las micosis superficiales y cutáneas se diagnostican mediante el examen directo y el cultivo de las muestras de piel y los anejos cutáneos.

MICOSIS SUBCUTÁNEAS

Las micosis subcutáneas están producidas por hongos ambientales que penetran directamente en el tejido subcutáneo como consecuencia de un traumatismo. Las principales micosis subcutáneas son: esporotricosis, rinosporidiosis, lobomicosis, feohifomicosis, cromomicosis, micetoma, conidiobolomicosis y basidiobolomicosis. Entre los hongos que producen micosis subcutáneas se encuentran los hongos dematiáceos, también llamados hongos negros, que se caracterizan por la formación de un pigmento negro debido a la producción de melanina en las paredes celulares de las hifas o los conidios.

Las micosis subcutáneas se diagnostican principalmente por el examen microscópico directo y el cultivo de las muestras. Para algunos casos hay pruebas serológicas de determinación de anticuerpos circulantes.

MICOSIS PROFUNDAS Y SISTÉMICAS

Son las que afectan a los tejidos internos. Las principales las causan los hongos dimórficos como *Blastomyces*, *Histoplasma* y *Coccidioides*. Las infecciones van desde asintomáticas y autolimitadas hasta las que progresan y se hacen diseminadas.

BLASTOMYCES

El hongo dimórfico *Blastomyces dermatitidis* produce blastomycosis, una enfermedad granulomatosa crónica. Normalmente, tiene lugar una infección pulmonar, pero puede generalizarse y dispersarse a la piel y otros órganos. El principal medio diagnóstico es la observación directa de preparaciones húmedas de especímenes tratados con KOH al 10%. Puede también emplearse tinción con blanco calcoflúor. La conversión a la fase de levadura puede producirse en los medios de rutina incubados a 37 °C con hemoglobina y cisteína. Hay pruebas serológicas de fijación del complemento, pero menos del 40% de los pacientes tienen pruebas positivas cuando está presente la enfermedad.

HISTOPLASMA

Histoplasma capsulatum produce histoplasmosis, que normalmente da lugar a una infección respiratoria aguda, que en general es autolimitada o subclínica. Cuando progresa y se generaliza se afectan el hígado, los ganglios linfáticos y el bazo. Como patógeno intracelular facultativo, *H. capsulatum* se encuentra predominantemente en los macrófagos.

El diagnóstico se realiza observando preparaciones de especímenes de secreciones respiratorias, líquidos, sangre periférica, médula ósea o tejidos. Pueden usarse preparaciones húmedas o teñidas con blanco calcoflúor, aunque la morfología de las células tisulares y las levaduras se ve mejor con la tinción de Giemsa.

Cuando se sospecha una infección diseminada, pueden realizarse cultivos sanguíneos de *H. capsulatum*. Las colonias aparecen a los 10-14 días, aunque en ocasiones son necesarias incubaciones de hasta 4 semanas. El color de las colonias va del blanco al marrón.

Las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos mediante inmunodifusión o fijación del complemento tienen varias limitaciones, ya que la producción de anticuerpos requiere de 2 a 6 semanas.

COCCIDIOIDES

Coccidioides immitis produce coccidioidomicosis, que frecuentemente es asintomática. La enfermedad sintomática normalmente se manifiesta con fiebre, tos y dolor torácico, y se asemeja a una neumonía bacteriana. La infección generalizada afecta normalmente la piel, el esqueleto y las meninges.

La observación de esférulas de *C. immitis* en los tejidos es diagnóstica de la coccidioidomicosis, aunque tiene una baja sensibilidad. Deben extremarse las precauciones cuando se manipulen los especímenes que pueden contener el microorganismo para evitar contagios en el personal del laboratorio. Hay pruebas serológicas de fijación del complemento, de inmunodifusión y de ELISA para detectar anticuerpos contra el hongo. En cualquier caso, una serología negativa no excluye la posibilidad de una infección actual.

HONGOS MONILIÁCEOS OPORTUNISTAS

Los hongos moniliáceos (hialinos o ligeramente coloreados) oportunistas son un grupo filogenéticamente diverso que normalmente se encuentran como

saprotitos en el suelo, el aire o los desechos de las plantas, o como patógenos vegetales facultativos. Los principales son los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*. El espectro de enfermedades producidas por los hongos moniliáceos es diverso y la enfermedad está determinada en gran medida por el estado inmunológico y fisiológico del huésped, y puede ser sintomática o asintomática.

ASPERGILLUS

Aspergillus fumigatus da cuenta de la mayoría de las aspergilosis, término general que se usa para designar las infecciones producidas por los miembros del género *Aspergillus*. La aspergilosis pulmonar invasiva es la forma más grave y se produce en las personas inmunocomprometidas. Las infecciones pueden ser primarias o secundarias. Las aspergilosis pueden producir reacciones alérgicas pulmonares, una colonización en cavidades preformadas (aspergilomas), la infección superficial de la piel, los senos paranasales y el canal externo del oído, la infección necrosante invasora de los pulmones y la enfermedad diseminada fatal.

Las hifas y su morfología pueden observarse fácilmente con preparaciones de KOH sin y con el compuesto fluorescente blanco calcoflúor. La identificación de las especies de *Aspergillus* se realiza tras el estudio de las estructuras reproductoras y el aspecto macroscópico del cultivo. El hongo crece rápidamente y forma colonias con un aspecto sedoso. El aislamiento repetido de *Aspergillus* en el esputo, o la demostración de las hifas en el esputo o el líquido de lavado broncoalveolar, sugieren una infección.

En los pacientes con infección invasora, la detección del antígeno puede ser útil para establecer un diagnóstico precoz. También se han puesto a punto métodos moleculares.

FUSARIUM

Las especies de *Fusarium* producen diversas enfermedades infecciosas y son los segundos hongos que producen enfermedades invasoras. Las colonias de *Fusarium* se forman rápidamente, con un micelio aéreo sedoso de un color sonrosado. La estructura distintiva es un microconidio con forma de canoa o forma creciente que puede tener uno o varios tabiques.

ZIGOMICOSIS

Los *Zigomicetos* producen infecciones subcutáneas y generalizadas, especialmente en los enfermos inmunocomprometidos. Los principales géneros patógenos son *Rhizopus*, *Rhizomucor* y *Absidia*. Una de las presentaciones clínicas más frecuente de las zigomicosis es la enfermedad rinocerebral, que puede evolucionar rápidamente y conducir a la muerte. La otra presentación más habitual de la zigomicosis es la enfermedad pulmonar, que puede diseminarse. Una presentación menos común de la zigomicosis es la infección de la piel y los tejidos blandos.

Para el diagnóstico es importante la observación directa de los especímenes empleando tinción con blanco calcoflúor. Los *Zigomicetos* crecen rápidamente y producen abundantes hifas aéreas. Las colonias son algodonosas, primero blancas, pasando luego a grises y negras al formarse las esporas.

P. jiroveci es un hongo oportunista que produce neumonía en los pacientes inmunodeprimidos. Las personas con riesgo de infección por *P. jiroveci* son los prematuros, los pacientes con sida y los tratados con fármacos inmunosupresores, como los corticoides. Este hongo es el agente infeccioso oportunista más común en los pacientes con sida, de los que el 80% sufre su infección.

El diagnóstico se realiza en el esputo inducido en el líquido de lavado broncoalveolar. Se tiñe con blanco calcoflúor o con anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia. También pueden utilizarse técnicas de biología molecular, mediante amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa.

Técnicas parasitológicas y parasitología clínica

INTRODUCCIÓN

El laboratorio de parasitología clínica emplea diversas técnicas y métodos para la detección de parásitos que producen enfermedades en el ser humano. El diagnóstico de las infecciones parasitarias generalmente se realiza por la observación macroscópica y microscópica de los especímenes que se han recogido y conservado de forma adecuada. En este capítulo se presentan las principales técnicas y métodos que se emplean en el laboratorio de microbiología clínica para detectar los parásitos de importancia médica.

CONCEPTOS GENERALES

Desde un enfoque biológico, un parásito es un organismo que vive dentro de otro y se aprovecha de todos sus sistemas vitales. El parásito puede ser desde un protozoo unicelular simple hasta un organismo complejo como un helmineto. Estos organismos pueden tener ciclos vitales muy sencillos, en los que se forma una relación íntima con un solo hospedador, o tener ciclos vitales complejos, en los que participan formas de vida libre y uno o varios hospedadores intermediarios. En medicina se aplica el nombre de parasitología al estudio de los protozoos, helmintos y artrópodos que causan enfermedades al hombre. Según el lugar donde se localicen los parásitos, pueden considerarse los intestinales, los sanguíneos, los de algunos órganos y tejidos y los cutáneos.

RECOGIDA Y TRANSPORTE DE ESPECÍMENES

Son varios los métodos de recogida de los especímenes que se sospecha que contienen parásitos. Todos los especímenes recientes deben manipularse con cuidado, ya que representan una fuente potencial de material contaminante. Los dos principales especímenes que se utilizan para el estudio de parásitos son las heces y la sangre. Otros especímenes menos frecuentes son la orina, el líquido cefalorraquídeo, los esputos, los aspirados y el material procedente de las biopsias.

MÉTODOS DE LABORATORIO

Se emplean diversos métodos para la identificación de los parásitos y el diagnóstico de las enfermedades parasitarias. Entre ellos, el examen de la sangre y las heces, los cultivos, los métodos inmunológicos y los métodos moleculares.

EXAMEN DE SANGRE

Los principales parásitos que se detectan en sangre son *Plasmodium*, que produce el paludismo; *Babesia*, que causa babesiosis; *Trypanosoma*, que produce tripanosomiasis; y *Leishmania*, que da lugar a leishmaniasis.

Los parásitos sanguíneos se buscan e identifican en extensiones gruesas y finas de sangre. Las extensiones gruesas se realizan de forma análoga a las finas, pero presionando menos con el portaobjetos. Las extensiones se dejan secar sin calentar, hasta que no brillen. Una vez secas, se sumergen en agua destilada hasta que se elimine la hemoglobina. Luego, se cubren con colorante de Giemsa de 30 a 60 min, se lavan con agua para eliminar el exceso de colorante y se dejan secar. Las extensiones sanguíneas gruesas y finas pueden utilizarse no sólo para la detección sistemática en pacientes con riesgo de parásitos sanguíneos, sino también para determinar la especie y el nivel de parasitemia en los casos positivos.

EXAMEN DE HECES

Los parásitos intestinales se detectan por medio de la observación directa de las heces utilizando preparaciones húmedas, concentrándolas, haciendo extensiones que se tiñen o con menor frecuencia realizando cultivos.

Los especímenes de heces deben recogerse en contenedores limpios de boca ancha. Los especímenes no deben estar contaminados con agua u orina, pues el agua puede contener microorganismos de vida libre que pueden confundirse con parásitos humanos y la orina puede destruir los microorganismos móviles. El vertido cíclico de la mayor parte de los parásitos en las heces requiere observar, al menos, tres especímenes recogidos en días alternos. Cuando haya un retardo desde el momento de la recogida hasta la observación en el laboratorio, debe utilizarse un conservante; los más empleados son formol, alcohol polivinílico, acetato sódico-formol y líquido de Schauclinn.

En la observación directa de protozoos y helmintos deben buscarse trofozoitos, quistes, huevos y larvas. Algunos parásitos requieren que se concentren las heces antes de realizar el examen. Para concentrarlas hay que mezclar de 2 a 5 g (de 2 a 5 ml) del espécimen de heces con de 10 a 12 ml de formol al 10%. Se filtra una alícuota de la suspensión con dos capas de gasa, hasta obtener 3 ml en un tubo de centrífuga de 15 ml. Después se añade 10 ml de una solución salina al tubo y se centrifuga durante 2 min a 2.000 rpm. Se decanta el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 9 ml de formol al 10%. A continuación se añade 3 ml de acetato de etilo. Se tapa el tubo con un tapón de goma o corcho y se agita durante 30 s. Luego se quita con cuidado el tapón manteniendo el tubo alejado. Se eliminan las capas superiores y se conserva el sedimento, donde están los parásitos. El sedimento se utiliza para realizar la preparación.

MÉTODOS DE CULTIVO

Aunque se han descrito métodos de cultivo para una amplia variedad de parásitos, principalmente protozoos, en muy pocos laboratorios clínicos se emplean.

MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

En el momento actual, se comercializan diversos métodos inmunológicos para detectar antígenos del parásito o los anticuerpos que produce el hospedador

como respuesta a la infección por el parásito. Los principales métodos son los enzimoimmunoanálisis (EIA), los fluoroinmunoanálisis (FIA) y la inmunotransferencia.

MÉTODOS MOLECULARES

Se han descrito métodos moleculares con amplificación del ADN y sondas de ácidos nucleicos para la mayoría de las enfermedades parasitarias más comunes. En los últimos años se han comercializado diversas pruebas que emplean fundamentalmente PCR en tiempo real.

PARÁSITOS INTESTINALES

Los principales parásitos intestinales son los protozoos (amebas, flagelados, ciliados, coccidios y microsporidios) y los helmintos (nematodos, cestodos y trematodos).

PROTOZOOS INTESTINALES

Los principales protozoos intestinales que causan enfermedad en el hombre son las amebas, los flagelados y los ciliados, los coccidios y los microsporidios.

Amebas

La *Entamoeba histolytica* es la única ameba capaz de invadir los tejidos y producir enfermedad. Da lugar a disentería amebiana, que es una infección del intestino grueso. La infección se adquiere ingiriendo quistes en alimentos o agua contaminados, sobre todo en zonas con una higiene deficiente. El grado de enfermedad va desde un estado asintomático a una disentería aguda, con heces frecuentes que contienen sangre y moco, y dolor abdominal de tipo cólico.

En la mayoría de los casos, la observación de varios especímenes de heces debe ser suficiente para el diagnóstico de amebiasis intestinal. También se comercializan pruebas de enzimoimmunoanálisis para detectar antígenos que son específicas y sensibles. Las pruebas serológicas de determinación de anticuerpos son útiles para el diagnóstico de infecciones extraintestinales.

Flagelados

G. lamblia es un protozoo flagelado cuyas infecciones pueden ser asintomáticas o producir una enfermedad que va desde una diarrea ligera hasta un síndrome de malabsorción con diarrea grave. El diagnóstico se establece con la observación de trofozoitos o quistes en las heces. También se dispone de técnicas comerciales de EIA o FIA para detectar antígenos con buena sensibilidad y especificidad.

Ciliados, coccidios y microsporidios

El principal ciliado patógeno es *Balantidium coli*; los principales coccidios que infectan el intestino humano pertenecen a los géneros *Isospora*, *Sarcocystis*, *Cryptosporidium* y *Cyclospora*; y los microsporidios son protozoos intracelulares obli-

gados que forman esporas. El diagnóstico se realiza mediante la observación de las heces y la detección de antígenos mediante métodos inmunológicos.

HELMINTOS INTESTINALES

Los helmintos intestinales o residen como adultos en el tubo digestivo o bien viven en otras partes como el hígado, los pulmones o la sangre, y producen huevos que salen del cuerpo humano a través del tracto intestinal. El tamaño de los helmintos adultos va de 1 mm hasta cerca de 10 metros.

Nematodos

Los principales *nematodos* patógenos son *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiuria* y *Strongyloides stercoralis*.

E. vermicularis tiene un tamaño de 1 cm de longitud. Aunque la infección puede ser asintomática, los niños tienen prurito anal, irritabilidad y falta de sueño. La recuperación de huevos y algunas veces adultos de la piel perianal se realiza con la técnica del celo.

A. lumbricoides es el nematodo más largo que infecta el tracto intestinal del ser humano, ya que puede medir hasta 35 cm. Los síntomas de la ascariasis van desde una infección asintomática hasta una enfermedad grave. La infección se diagnostica por la observación de huevos en las heces o la recuperación de un adulto que ha sido excretado o vomitado.

T. trichiuria produce tricuriasis, una enfermedad corriente en regiones tropicales y subtropicales. Finalmente, *S. stercoralis* da lugar a alteraciones pulmonares e intestinales, como úlcera péptica, dolor abdominal y diarrea. El diagnóstico se realiza por la observación de una extensión húmeda de las heces.

Cestodos

Los principales *cestodos* patógenos intestinales son *Taenia saginata* y *Taenia solium*. Se trata de gusanos planos con una cabeza donde está el escólex, mediante el que se unen a la mucosa intestinal, y un conjunto de segmentos cuya longitud puede variar entre unos pocos centímetros y varios metros, según las especies. El diagnóstico se realiza por el hallazgo de huevos en las heces o en los pliegues perianales empleando la técnica del celo.

Trematodos

El principal *trematodo* intestinal que infecta al ser humano en nuestro país es *Fasciola hepática*. Los parásitos adultos viven en el árbol biliar y ponen huevos que se excretan por las heces. El diagnóstico se realiza por la observación de estos huevos en las heces.

HELMINTOS EN TEJIDOS

Las larvas de diversos helmintos penetran hasta los tejidos donde producen enfermedades. Los principales helmintos que producen enfermedades en el ser humano son los nematodos y los cestodos.

NEMATODOS

Los principales nematodos productores de enfermedades en el ser humano son las filarias y el *Anisakis*.

Filaria

Las filarias son parásitos transmitidos por artrópodos que se encuentran en diversos tejidos, como el subcutáneo, los vasos sanguíneos, las cavidades pleural y peritoneal, el corazón y el cerebro. Todas las especies producen larvas denominadas microfilarias. El diagnóstico de la filariasis normalmente se realiza observando microfilarias en la sangre o la piel.

Anisakis

Anisakis es un parásito gastrointestinal habitual de los mamíferos marinos, y las larvas infecciosas se encuentran en varios peces de agua salada. Cuando se ingieren estas larvas pueden penetrar en la pared del estómago o el intestino delgado y dar lugar a dolor abdominal agudo. La anisakiasis se diagnostica por los antecedentes y los hallazgos clínicos, y se confirma por la recuperación mediante endoscopia del gusano o por la presencia de un granuloma eosinófilo que contiene el nematodo en un espécimen quirúrgico.

CESTODOS

Varias especies de cestodos en sus estados de larva infectan los tejidos humanos y dan lugar a enfermedades. Las larvas de *T. solium* producen cisticercosis. La recuperación de un cisticerco intacto mediante cirugía confirma el diagnóstico. Hay pruebas serológicas de inmunotransferencia y enzimoanálisis, pero no diferencian las infecciones activas e inactivas, por lo que no son útiles para el control del tratamiento.

Las larvas de *Echinococcus granulosus* producen hidatidosis. Los quistes se forman en el hígado y de forma secundaria en otros lugares. Las pruebas serológicas son muy útiles para confirmar el diagnóstico. Se emplea enzimoanálisis e inmunotransferencia de confirmación.

PROTOZOOS SANGUÍNEOS Y TISULARES

Diversos protozoos con localización en sangre y tejidos producen enfermedades en el ser humano. Las principales son el paludismo, la babesiosis, la tripanosomiasis, la toxoplasmosis y la leishmaniasis.

PLASMODIUM

Existen cuatro especies de *Plasmodium* que producen el paludismo. El paludismo maligno, que causa el *P. falciparum*, presenta la máxima mortalidad. *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae* dan lugar a una enfermedad menos grave que se denomina paludismo benigno. Los plasmodios comparten su ciclo vital entre el ser

humano y los mosquitos, se transmiten por la picadura de un insecto hembra y no se transmiten de persona a persona excepto, posiblemente, por la transfusión de productos sanguíneos contaminados. El paludismo debe considerarse siempre la posible causa de fiebre en un paciente que haya estado en un país tropical o subtropical, con independencia de que haya tomado profilaxis anti-palúdica.

El paludismo debe incluirse en el diagnóstico diferencial de fiebre en los pacientes que hayan viajado o residido en áreas endémicas, hayan tenido adición a las drogas o hayan recibido una transfusión sanguínea. El diagnóstico normalmente se establece por la presencia del parásito en extensiones de sangre gruesas y finas.

Existen métodos comerciales de detección del antígeno. Estos métodos rápidos normalmente detectan en sangre periférica la proteína II con abundante histidina, la lactato deshidrogenasa del parásito o ambas.

BABESIA

En Europa, el parásito canino *Babesia divergens*, transmitido por *Ixodes ricinus*, infecta al ser humano produciendo babesiosis, cuyo espectro varía desde una infección subclínica hasta una enfermedad hemolítica fulminante. Los *Babesia* se multiplican en los eritrocitos. El diagnóstico se realiza por el análisis de extensiones sanguíneas gruesas y finas.

TRYPANOSOMA

Los *trypanosomas* son protozoos flagelados que se transmiten por medio de insectos chupadores de sangre. En África, dos especies, el *Trypanosoma rhodesiense* y el *T. gambiense* se propagan mediante la mosca tsetse y producen la enfermedad del sueño. Y en América Central y del Sur, una especie diferente, el *T. cruzi*, se propaga por una chinche que chupa la sangre y da lugar a la enfermedad de Chagas. El diagnóstico se establece por la demostración de los parásitos en extensiones gruesas y finas de sangre periférica. Hay también pruebas serológicas para las fases crónicas.

TOXOPLASMA

T. gondii produce toxoplasmosis, cuyo hospedador primario es el gato. La infección humana se adquiere por la ingestión de quistes presentes en la carne poco cocinada. La infección de las personas normales suele ser asintomática o leve, pero en los pacientes inmunocomprometidos pueden producirse complicaciones graves. La infección durante el embarazo es más grave, ya que produce deformaciones en el feto.

El diagnóstico de la toxoplasmosis puede establecerse mediante el examen de los tejidos, la sangre o los líquidos corporales. El aislamiento de los organismos de la sangre o los líquidos corporales señala una infección aguda, mientras que la recuperación en los tejidos puede reflejar una infección crónica.

La serología es todavía la forma más empleada para el diagnóstico de la toxoplasmosis. Existen muchos enzimo-inmunoanálisis comerciales que proporcionan buenos resultados.

LEISHMANIA

Hay varias especies patógenas de *Leishmania*, todas las cuales tienen reservorios animales y se transmiten por mosquitos del género *Phlebotomus*. La leishmaniasis puede presentar diferentes formas clínicas: cutánea, mucocutánea y visceral. La forma y gravedad de la enfermedad varía de acuerdo con la especie infecciosa, el estado inmunitario del hospedador y la exposición previa. El diagnóstico se realiza por la observación de amastigotos en extensiones sanguíneas.

ARTRÓPODOS DE IMPORTANCIA MÉDICA

Los principales artrópodos con importancia médica son los insectos (pulgas, cucarachas, hormigas, abejas, mariposas, mosquitos, moscas), arácnidos (escorpiones, arañas, ciempiés) y crustáceos. Los mecanismos principales de daño son la invasión directa de los tejidos superficiales (infestación), la picadura con la inyección del veneno, la transmisión de agentes infecciosos, las reacciones anafilácticas y las reacciones de hipersensibilidad. Con frecuencia se envían al laboratorio especímenes de artrópodos para su identificación.

Bibliografía

- Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical Chemistry: Techniques, principles, correlations*. 6th ed. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns D. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th ed. Saunders Elsevier, 2005.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns D. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6th ed. Saunders Elsevier, 2006.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott's. Diagnóstico Microbiológico*. 12^a ed. Panamericana, 2009.
- González de Buitrago JM, Arilla E, Rodríguez-Segade S, Sánchez Pozo A. *Bioquímica Clínica*. McGraw-Hill Interamericana, 1998.
- González de Buitrago JM, Ferreira L. *Proteómica Clínica*. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, 2006.
- González de Buitrago JM, Medina JM. *Patología Molecular*. McGraw-Hill Interamericana, 2001.
- Kaplan LA, Pesce AI, Kazmierczak S. *Clinical Chemistry. Theory, analysis and correlations*. 5th ed. Mosby Elsevier, 2010.
- Mahon C, Manuselis G, Lehman D. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 3th ed. Saunders Elsevier, 2006.
- McPherson R, Pincus M. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by laboratory methods*. 21th ed. Saunders Elsevier, 2006.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. American Society for Clinical Microbiology, 2007.
- Rodak BF, Fritsma GA, Doig K. *Hematology. Clinical principles and applications*. 3th ed. Saunders Elsevier, 2007.
- Vives JL, Aguilar JL. *Manual de técnicas de laboratorio en Hematología*. 3^a ed. Masson Elsevier, 2006.
- Wilson K, Walker J. *Principles and techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. 7th ed. Cambridge University Press, 2010.

Bibliografía

- Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical Chemistry: Techniques, principles, correlations*. 6th ed. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns D. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th ed. Saunders Elsevier, 2005.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns D. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6th ed. Saunders Elsevier, 2006.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott's. Diagnóstico Microbiológico*. 12^ª ed. Panamericana, 2009.
- González de Buitrago JM, Arilla E, Rodríguez-Segade S, Sánchez Pozo A. *Bioquímica Clínica*. McGraw-Hill Interamericana, 1998.
- González de Buitrago JM, Ferreira L. *Proteómica Clínica*. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, 2006.
- González de Buitrago JM, Medina JM. *Patología Molecular*. McGraw-Hill Interamericana, 2001.
- Kaplan LA, Pesce AI, Kazmierczak S. *Clinical Chemistry. Theory, analysis and correlations*. 5th ed. Mosby Elsevier, 2010.
- Mahon C, Manuselis G, Lehman D. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 3th ed. Saunders Elsevier, 2006.
- McPherson R, Pincus M. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by laboratory methods*. 21th ed. Saunders Elsevier, 2006.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. American Society for Clinical Microbiology, 2007.
- Rodak BF, Fritsma GA, Doig K. *Hematology. Clinical principles and applications*. 3th ed. Saunders Elsevier, 2007.
- Vives JL, Aguilar JL. *Manual de técnicas de laboratorio en Hematología*. 3^ª ed. Masson Elsevier, 2006.
- Wilson K, Walker J. *Principles and techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. 7th ed. Cambridge University Press, 2010.

Índice alfabético

A

- A-ANCA, patrón, 430
- ABO, sistema, 337
- Absorbancias, exactitud, 172
- Acantocitos, 318
- Achromobacter*, 491
- Ácidos nucleicos
 - aislamiento, 227
 - amplificación, 232
 - concentración, 229
 - hibridación, 239
 - marcaje de las sondas, 239
 - sondas, 238
- Acidosis
 - metabólica, 195
 - respiratoria, 195
- Acinetobacter*, 491
- Acoplamiento de reacciones, 144
- Actinomicetos aerobios, 486
- Actinomyces*, 494
- Actividad(es)
 - específica, 396
 - enzimáticas, métodos de medida
 - absorción molecular
 - Beckman DS, amilasa, 145
 - colorimétrico
 - con butiriltiocolina, colinesterasa, 146
 - fosfatasa ácida, 147
 - fosfatasa alcalina, 147
 - gammaglutamil transferasa, 147
 - estandarizado, lactato deshidrogenasa, 148
- IFCC
 - con *N*-acetilcisteína, creatina cinasa, 146
 - con piridoxal-fosfato
 - alanina aminotransferasa, 145
 - aspartato aminotransferasa, 146
 - seguimiento continuos o cinéticos, 144
 - tiempo fijo, 144
- Adenovirus entéricos, 505
- Administrativos, 8
- ADN
 - aislamiento, 228
 - de cadena ramificada, 238
 - extracción, 228
 - en fase líquida, 228
 - micromatriz, 250
 - polimerasa Taq, 232
 - secuenciación, 243
 - técnicas de separación, 229
- Adsorción pasiva, 397
- Aeromonas*, 490
- Aféresis, 350
- Afinidad, 387
- Agentes biológicos, 47
- Aglutinación, 388
 - autoinmunidad, 421
 - directa, reacciones, 389
 - indirecta, reacciones, 390
 - inhibición, 390
 - técnicas, 389
- Agregación plaquetaria, estudio, 360
- Agregómetros, 360
- Agua, 22
 - de grado reactivo, 22
- Agujas, 53
- Alcalosis
 - metabólica, 195
 - respiratoria, 195
- Alérgenos, 449
- Alicuotador, 161
- Almacenamiento, especímenes, 11
- Aloanticuerpos, 337
- Alteraciones
 - del ADN mitocondrial, 246
 - aneoplásicas, 330
 - cromosómicas, 245
 - de los electrodos, 191
 - leucocitarias, 329
 - mendelianas, 245
 - monogénicas, 245
 - multigénicas, 246
 - de las plaquetas, 365
- Altura del plato, 198
- Alzheimer, enfermedad, 261

- Amebas, 521
- Amniocentesis, 67
- Amortiguadores, 42
 - electroforesis, 211
- Amplificación
 - de la diana, 468
 - múltiplex, 235
 - de la señal, 468
 - de la sonda, 469
- Amplitud de distribución
 - de eritrocitos, 291
 - de plaquetas, 292
- Anaerobios gramnegativos, 495
- Análisis, 33
 - de costes, 14
 - cuantitativos, cromatografía en
 - columna, 199
 - digital de imagen, fórmula
 - leucocitaria, 284
 - con endonucleasas de restricción,
 - 247
 - físicos, 219
 - heterodúplex, 247
 - de identidad, 250
 - de la inmunidad celular, 384
 - inmunorradiométrico, 405
 - inmunosorbente con la enzima
 - ligada, 413
 - de microlinfocitotoxicidad,
 - 447
 - multielemental, 149
 - de polimorfismos de conformación
 - de cadena sencilla, 247
 - químico, 220
 - del quimiotactismo, 335
 - de la sangre oculta en heces, 266
 - sistemático, 219
 - de la variancia, 81
 - volúmen(es)
 - de la célula intacta, 288
 - celulares, 287
 - del núcleo, 288
- Analizadores
 - automáticos
 - para bioquímica clínica, 159,
 - 161
 - dispensación de los
 - especímenes, 171
 - dispositivos de carga
 - de los especímenes, 171
 - especificaciones, 166
 - evaluación, 167
 - fuentes de luz, 164
 - practicabilidad, evaluación, 167
 - comunicación con el
 - ordenador principal, 170
 - disposiciones espaciales, 168
 - entorno, 168
 - facilidad de operación, 168
 - flexibilidad, 170
 - mantenimiento, 169
 - organización del trabajo,
 - 168
 - programas informáticos,
 - 170
 - tiempos, 170
 - prestaciones analíticas,
 - evaluación, 170
 - para hematología, 294
 - alarmas, 299
 - cualitativas, 299
 - cuantitativas, 299
 - deseables, 299
 - útiles, 299
 - comerciales, 301
 - dispositivos de medida, 294
 - errores
 - equipo, 300
 - naturaleza del espécimen,
 - 299
 - operador, 300
 - de orina, 225
 - de pH y gases sanguíneos, 188
 - calibración, 189
 - magnitudes derivadas, 189
 - de electrolitos y de pH y gases en
 - sangre, 269
 - de masa, 258
 - ANCA, 439
 - Anemia(s), 319, 280
 - arregenerativa, 319, 322
 - por deficiencia de hierro, 320, 322
 - hemolíticas, 320
 - adquiridas, 320, 322
 - hereditarias, 320
 - megaloblástica, 321
 - microcítica, 322
 - posthemorrágica, 319
 - aguda, 319
 - crónica, 319
 - regenerativa, 319, 322
 - Aneuploidía, 378
 - Anfolitos, 215
 - Anisakiasis, 523
 - Anisakis*, 523
 - Anisocitosis, 317

- Anomalías
 cromosómicas, 377
 estructurales, 378
 numéricas, 378
- ANOVA, pruebas, 81
- Antibióticos, mecanismos de
 actuación, 470
- Anti-CCP. *Véase* Anticuerpos
 antipéptido cíclico citrulinado
- Anticoagulante, 52
- Anticuerpos, 387
 antinucleares, 439, 424
 citoplasma de los neutrófilos, 429
 desmosomas, 429
 enzimoimmunoanálisis
 contra el ADN, 434
 antifosfolípidos, 437
 antimitocondriales, 436
 antinucleares, 434
 antinucleosomas, 434
 antipéptido cíclico citrulinado, 437
 antitiroideos, 436
 contra el centrómero, 435
 contra el citoplasma
 de los neutrófilos, 435
 contra el endomisio, 437
 contra la glutamato
 descarboxilasa, 436
 contra la histidil-ARNt sintetasa,
 435
 contra Jo-1, 435
 contra la membrana basal
 glomerular, 438
 contra los microsomas
 hepáticos
 renales, 436
 contra las ribonucleoproteínas, 435
 contra la transglutaminasa tisular,
 437
 contra la α_2 -glucoproteína, 437
 heterófilos, 401
 HLA, 446
 IgE específicos del alérgeno, 450
 inmunofluorescencia
 ADN, 426
 antimitocondriales, 427
 células
 de los islotes, 428
 productoras de esteroides, 428
 membrana basal glomerular, 428
 microsomas
 hepáticos, 427
 renales, 427
 músculo liso, 427
 tiroglobulina, 428
 irregulares, 341, 343
 monoclonales, 389
 naturales, 337
 piel y el epitelio escamoso, 429
 policlonales, 388
 titulación, 343
- Antígenos, 387
 en los ELISA, estrategias, 433
 exceso, 395
 de histocompatibilidad, 441
 HLA, 441
 estructura, 441
 recombinantes, 432, 451
- Antisuero, 389
- Antitrombina, determinación, 363
- Área
 administrativa
 de autoinmunidad, 6
 de bacteriología, 6
 de bioquímica automatizada, 4
 de citogenética, 5
 de citometría de flujo, 5
 de coagulación, 5
 bajo la curva ROC, 106
 de HLA, 6
 de inmunoanálisis automatizado, 4
 de inmunología celular, 6
 de micobacterias, 6
 de micología, 6
 de microbiología molecular, 6
 de orinas, 5
 de parasitología, 6
 de proteínas, 4
 de recuento/morfología, 5
 de serología, 6
 de técnicas
 especiales, 5
 manuales, 5
 moleculares, 5
 de virología, 6
- ARN
 celular, aislamiento, 229
 mensajero, aislamiento, 229
- Artritis reumatoide, 437
- Arthrocentesis, 67
- Artrópodos, 525
- Ascariasis, 522
- Ascomicetos, 511
- Asimetría, 77
- Aspergillus*, 517
- Aspergilosis, 517

Aspiración, 304
 Aspirador-diluidor, 294
 Ataxias espinocerebelosas, 249
 Atrofia
 dentato-rubro-pálido-luisiana, 249
 muscular bulboespinal, 249
 Autoanticuerpos, 337
 Autoclaves, 458
 Automatización, 159
 Autosomas, 371
 Avidez, 387
 Ayuno, 56

B

Babesia, 524
 Babesiosis, 524
Bacillus, 486
 Bacilos
 afermentadores, 491
 gramnegativos con forma curvada
 y espiral, 495
 grampositivos, 485
 Bacterias
 anaerobias, 493
 clasificación, 483
 gramnegativas, 487
 intracelulares estrictas, 498
Bacteroides, 495
 Baculovirus/células de insectos, 433
 Balanzas, 25
 analíticas, 26
 de dos platillos, 25
 de un platillo, 26
 Banco
 de especímenes, 11
 de sangre, 339, 347
 Baños, 26
 de incubación, 164
 Basidiomicetos, 511
 Basofilia, 331
 Basófilos, 273, 329
 Basopenia, 331
 Bernard-Soulier, síndrome, 366
 Bilirrubina, 221
 Biobancos, 350
 almacenamiento de las muestras,
 352
 ácidos nucleicos, 352
 líquidos biológicos, 352
 tejidos, 352
 gestión de la calidad, 353
 organización, 351

recogida de las muestras, 351
 ADN/ARN, 352
 células, 352
 líquidos biológicos, 351
 muestras de tejido, 351
 de tejidos para trasplante, 353
 Biomarcadores, 253
 Biopsia, médula ósea, 304
 Biosensores, 185
 amperométricos, 186
 enzimáticos, 185
 inmunológicos, 186
 inmunosensores, 186
 Blastomycosis, 516
Blastomyces, 516
 Bloque inyector, 204
 Bombas impulsoras, HPLC, 207
 modo
 isocrático, 207
 gradiente, 207
Bordetella, 492
Borrelia, 496
 Brazos, 371
Brucella, 492
 Buretas, 19
Burkholderia, 491

C

Calicivirus, 505
 Calidad
 control, 109
 garantía, 109
 gestión, 109
 Cámaras de recuento, citometría
 hemática, 275
 Cambiadores
 aniónicos, 200
 catiónicos, 200
 iónicos, 200
 Campana de extracción, 46
Campylobacter, 495
 Canal
 de basófilos/lobularidad, 287
 de la peroxidasa, 285
 C-ANCA, patrón, 429
Candida, 514
albicans, 225
 Cantidad de amplificación, PCR, 234
 Capacidad total de fijación de hierro,
 320
 Carboxihemoglobina, 290
 Carga de los especímenes, 162

- Cariotipo, 372
 - mediante ordenador, 373
- Cascada de la coagulación, 356
- Categorización, 100
- Cebado específico de secuencia, 445
- Célula(s)
 - electroquímica, 177
 - potencial, 178
 - epiteliales
 - de descamación, 224
 - renales, 224
 - fagocíticas, 335
 - sanguíneas, 273
 - de trabajo, 3
- Centrífugas, 26
 - automáticas, 161
- Centrómero, 371
- Cestodos, 522, 523
- Chagas, enfermedad, 524
- Chlamydia*, 498
- Cilindros, 223, 224
 - celulares, 225
 - céreos, 225
 - granulosos, 225
 - hialinos, 224
- Cisticercosis, 523
- Citocinas, producción, 386
- Citoféresis, 350
- Citogenética, 371
 - de interfase, 377
 - molecular, 375
 - prenatal, 379
- Citomegalovirus, 504
- Citometría
 - de flujo, 307
 - detección, 439
 - fundamentos, 307
 - preparación de los especímenes, 314
 - hemática, 274
- Citómetro de flujo, componentes, 307
 - amplificador/convertidor, 311
 - cámara de flujo, 308
 - detectores, 310
 - fotodiodos, 309
 - fotomultiplicadores, 309
 - monocromáticos, 309
 - fuente de luz, 309
 - sistema
 - para inyectar la muestra, 307
 - óptico, 309
- Citoquímica celular, 285
- Citotoxicidad linfocitaria, 386
- Citrato, 52
- Citrobacter*, 489
- Clark, electrodo, 183
- Clasificador, 161
- Cloruro de plata. Véase Electrodo de plata
- Clostridium*, 494
- Coagulación, 355
- Coccidioides*, 516
- Coccidioidomycosis, 516
- Cociente
 - internacional normalizado, 266, 362
 - de verosimilitud, 107
 - diagnóstico, 107
- Cocos grampositivos, 483
- Coefficiente
 - de absorción molar, 133
 - de asimetría, 77
 - de correlación, 82
 - de curtosis, 77
 - de rozamiento, 211
 - de variación, 76
- Coincidencia, 301
- Colimador, 134
- Columnas, 204
- Comparación
 - multivariante, 101
 - univariante, 101
- Competencia técnica, 110
- Componente(s)
 - magnitudes, 33
 - sanguíneos, 350
 - elaboración, 348
- Concentración
 - de hemoglobina
 - corpúscular media, 291
 - determinación, 296
 - inhibitoria mínima, 471
 - letal mínima, 471
- Concentrados
 - de eritrocitos, 348
 - de plaquetas
 - almacenamiento, 349
 - componentes sanguíneos, 349
- Concurso público, 15
- Condensador, 30
- Conductimetría, 185
- Consultas al laboratorio, 13
- Contraste, 30
 - de hipótesis, 78
 - no paramétricos, 80

- Control
 antidopaje, cromatografía de gases, 206
 de la calidad, pruebas cerca del paciente, 265
 automático, 265
 electrónico, 265
 de la coagulación, 358
 interno de la calidad, 118
 de la pCO_2 , 192
 del pH, 192
 de la pO_2 , 192
 de las variables
 analíticas, 114
 preanalíticas, 110
 Coombs, pruebas, 342, 390
 Cooximetría, 193
 Cooxímetros, 193
 Coprocultivo, 479
 Coronavirus, 505
 Correlación, 82
 entre las pruebas, 117
 Correo electrónico, 123
 Cortes de tejidos, 423
Corynebacterium, 486
 Coste(s)
 directos, 14
 fijos, 14
 indirectos, 14
 por prueba, método analítico, 86
 variables, 14
Coxiella, 499
 Crioconservación, 354
 Crioprotectores, 354
 Criptococosis, 514
 Cristales, 225
 Cromatografía, 197
 de afinidad, 202
 de cambio de ión, 200
 en capa fina, 200
 en columna, 197
 de exclusión, 201
 fase
 estacionaria, 197
 móvil, 197
 reversa, 209
 de gases, 203
 líquida
 de alta resolución, 206
 cromatógrafo, 207
 en fase normal, 209
 en placa, 197
 de reparto, 200
 Cromosomas, 371
 sexuales, 371
Cryptococcus, 514
 Cuantificación de los ácidos nucleicos, citometría de flujo, 316
 Cuartiles, 77
 Cubeta, 135
 de reacción, 163
 Cuerpos cetónicos, 221
 Culombimetría, 184
 Cultivo(s), 513
 bacteriano, 478
 celular, 371
 de mamíferos, 433
 sanguíneos, tipos, 476
 víricos, 501
 Curtosis, 77
 Curvas de calibración, ajuste, 401
- ## D
-
- Datos, donación de sangre
 almacenamiento, 353
 recogida, 352
 Deciles, 77
 Deficiencia
 de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 323
 de piruvato cinasa, 324
 Degradación enzimática, 266
 Densidad, análisis de orina, 222
 Densitómetros, 213
 Derivatización, 204
 Dermatitis herpetiforme, 429
 Dermatofitosis, 515
 Descargas eléctricas, 49
 Desequilibrio de ligamiento, 443
 Desinfección, microorganismos, 457
 métodos, 459
 Desinfectantes
 bactericidas, 459
 bacteriostáticos, 459
 Desionización, 22
 Desorción/ionización por láser con ayuda de una matriz, 258
 Desoxinucleotidil transferasa terminal, 334
 Destaponador, 161
 Destilación, 22
 Desviación estándar, 76
 Detección
 del ácido nucleico, 502
 de anticuerpos, 502

de antígenos víricos, 502
de la enfermedad residual mínima,
316

Detector
analizadores automáticos, 164
de carga acoplada, 135
cromatografía de gases, 205
de captura electrónica, 205
de conductividad térmica, 205
de ionización, 205
termoiónico, 206
electroquímicos, 210
fotométricos, 210
HPLC, 209

DGGE. *Véase* Electroforesis en gel con
gradiente desnaturalizante

Diagnóstico de componentes resueltos,
alergia, 451

Dificultad técnica, método analítico, 85

DIGE-2D. *Véase* Electroforesis
bidimensional en gel diferencial

Diluciones, 39

Diluidores, 25

Dímeros D, 365

Diploidía, 378

Discos
duros, 122
ópticos, 122

Discriminador, analizadores
hematológicos, 295

Disentería amebiana, 521

Disoluciones
amortiguadoras, 42
preparación, 38

Dispensadores, 23

Dispersión de la luz, 155
citometría hemática, 279

Dispositivo
de entrada/salida de datos, 122
de lectura, 136
de mariposa, 56
de sujeción de los tubos, 53

Distribución(es), 74
especímenes, 10
de frecuencias, 74
normal
de la población, 74
de referencia, 98
paramétricas, 74

Distrofina, 248

Donación de sangre, 347
autólogas, 348

Donantes, requisitos, 347

Dot blot, 240

Duchenne, distrofia muscular, 248

Duplicados de los especímenes, 117

E

EDTA, 52

Efecto
citopático, 502
del hematocrito, 266

Eficacia de la columna, 198

Efusiones serosas, 66

Ehrlichia, 499

Electrodo(s)
de calomelanos, 179
de cambio de ión, 181
de estado sólido, 180
de hidrógeno, 179
metálicos, 179
de pCO₂, 181
de plata, 179
de pO₂, 183
potenciométricos, 186
de referencia, 179
selectivos a los iones, 180
de urea, 186
de vidrio, 180

Electroforesis, 211
bidimensional, 255
en gel diferencial, 257
capilar, 215
en gel, 217
en gel, 214
de acrilamida con dodecil sulfato
sódico, 255
de agarosa, 214
con campos pulsantes, 230
con gradiente desnaturalizante,
248
de zona, 212

Electroinmunodifusión, 394

Electroquimioluminiscencia, 416

ELISA, 413 *Véase también*
Enzimoimmunoanálisis
sándwich, 413

Encefalitis, 504

Endonucleasas de restricción, 230

Enfermedades
alérgicas, 449
diagnóstico, 449
autoinmunitarias, 419
específicas de un órgano, 420
generalizadas, 419

- Enfermedades (*cont.*)
 genéticas, 245
 diagnóstico, 245
 infecciosas, diagnóstico, 250
 linfoproliferativas, 332
 mielodisplásicas, 331
 mieloproliferativas crónicas,
 331
 neurodegenerativas, 249
 oncológicas, 250
 Enfoque isoelectrico, 215, 255
Enterobacter, 489
 Enterobacterias, 489
 Enterococos, 485
 Enzimoinmunoanálisis, 396, 408
 heterogéneos, 411
 homogéneos, 409
 Enzimología clínica, 144
 Eosinofilia, 330
 Eosinófilos, 273, 329
 Eosinopenia, 331
Epidermophyton, 515
 Epítipo, 387
 Epstein-Barr, virus, 503
 Equipo
 de reactivos, 21
 de seguridad, 46
 Eritrocitemia, 318
 Eritrocitos, 273, 317
 alteraciones morfológicas,
 317
 análisis de orina, 222
 anisocrómicos, 318
 hipercrómicos, 318
 hipocrómicos, 318
 macrocíticos, 317
 microcíticos, 317
 normocrómicos, 317
 nucleados, 293
 sedimento urinario, 224
 dismórficos, 224
 Eritrocitosis, 318
 absoluta, 318
 idiopática, 318
 pruebas diagnósticas,
 319
 relativa, 318
 secundaria, 318
 Erlenmeyers, 18
 Error(es)
 sistemáticos, 86
 aleatorios, 86
 muestreo, 86
 personales, 86
 sistemáticos, 86
 tipo I, 79
 tipo II, 79
 Escategrama, 312
Escherichia coli, 489
 Esclerosis múltiple, 261
 Esferocitos, 318
 Esferocitosis hereditaria, 322
 Especificidad
 analítica, 91
 diagnóstica, 102
 Especímenes, 371
 almacenamiento, 113
 autoinmunidad, 421
 dispositivo
 de carga, 162
 de toma y dispensación, 162
 distribución, 12
 envío, 9
 identificación, 9
 analizadores automáticos, 162
 calidad analítica, 111
 método manual, 9
 microbiología, 475
 nasofaríngeos, 480
 obtención, 112
 oculares, 481
 procesado, 70
 líquido
 amniótico, 72
 cefalorraquídeo, 71
 semen, 72
 tamaño, 85
 transporte, 68, 113
 condiciones, 69
 de orina, 69
 de sangre, 51
 unidad de entrada, 159
 Espectro electromagnético, 131
 Espectrofotómetros, 133
 detector de luz, 135
 dispositivos de estado sólido,
 135
 tubos fotomultiplicadores,
 135
 fuente de luz, 133
 Espectrometría de masas, 257
 secuenciación de péptidos, 260
 tándem, 259
 Espectrómetro
 de absorción atómica, componentes,
 150

- de masas, 206
 - clases, 259
 - componentes, 258
 - Espectroscopia
 - de absorción
 - molecular, 132
 - atómica, 150
 - principios generales, 150
 - de dispersión, 155
 - de emisión atómica, 148
 - por llama, 148
 - por plasma, 149
 - de fluorescencia, 153
 - de luminiscencia, 155
 - Espustos, 479
 - Estabilidad fotométrica, 173
 - Estadística, 73
 - descriptiva, 73
 - no paramétrica, 80
 - Estafilococos, 483
 - Estándar interno, 199
 - Esterilización, 457
 - por calor, 458
 - por filtración, 458
 - por radiaciones y ultrasonidos, 458
 - Estimación, inferencia estadística, 78
 - Estratificación, 100
 - Estreptococos, 484
 - Estructura organizativa, 3
 - Estudio(s)
 - de sinergia de los antibióticos, 473
 - de subpoblaciones linfocitarias, 315
 - Etiqueta de código de barras, 9
 - Etiquetador, 161
 - Euglobulinas, 365
 - tiempo de lisis, 365
 - Euploidía, 378
 - Evaluación externa de la calidad, 118
 - Exactitud analítica, 87
 - Examen
 - de heces, 520
 - de sangre, 519
 - Extensión(es)
 - gruesas, 520
 - sanguínea, 281
 - Extranet, 123
 - Exudados, 67
- F**
-
- Factor
 - reumatoide, 437
 - tisular, 357
 - Facultativos especialistas, 7
 - Fagocitosis, 336
 - análisis, 336
 - Fallos de la termostatación,
 - analizadores de pH y gases, 192
 - Fase
 - analítica, 8
 - estacionaria, 204
 - postanalítica, 8
 - preanalítica, 8, 159
 - Fenómeno zona, 388
 - Fibrina, formación, 363
 - Fibrinógeno, 363
 - Fibrinólisis, 355, 357, 364
 - Fibrosis quística, 248
 - Ficoeritrina, 314
 - Filaria*, 523
 - Filtración del plasma, 219
 - Filtrado glomerular, 219
 - FISH. Véase Hibridación fluorescente *in situ*
 - Flagelados, 521
 - Flujo electroendosmótico, 212
 - Fluorescencia, 153
 - de fondo, 424
 - Fluorímetros, 153
 - Fluoroimmunoanálisis, 396, 413
 - de disociación aumentada por un lantánido, 415
 - heterogéneo, 415
 - homogéneos, 414
 - Fórmula leucocitaria
 - analizadores hematológicos, 298
 - automática, 284
 - alteraciones
 - cualitativas, 289
 - cuantitativas, 289
 - citometría hemática, 281
 - Fotodiodos, 135
 - Fotometría de llama, 148
 - Fotones, 131
 - Fourier, infrarrojos con transformada, 206
 - Fragilidad osmótica de los eritrocitos, 322
 - Francisella*, 492
 - Frecuencia
 - de calibración, 86
 - de la onda, 131
 - Friedreich, ataxia, 249
 - Fuchs-Rosenthal, cámara, 275
 - Fuentes de material antigénico, 431

Fusarium, 517
Fusobacterium, 495

G

Gafas de seguridad, 46
Gases comprimidos, 47
Gastos
 de bienes corrientes y servicios, 14
 financieros, 14
 de personal, 14
Gastroenteritis víricas, 505
Gauss, distribución. *Véase* Distribución normal
Gel de poliacrilamida, 215
Gestión
 de almacenes, 15
 económica, 14
 de residuos, 49
Giemsa
 método, 282
 tinción, 513
Glanzmann, tromboastenia, 366
Glucosa, 220
 analizadores, 265
Glucosuria, 220
 renal, 221
Goodpasture, enfermedad, 428
Grado
 de dependencia, 85
 reactivo, 20
Gráficas de control, 114
Gram, tinción, 460
Granulocitos, 273, 329
 neutrófilos, aislamiento, 335
Grupo
 ABO
 pruebas
 directas, 340
 inversas, 341
 tipificación, 340
 de muestra de referencia, 97
 sanguíneos, 337

H

Haemophilus, 488
Haplotipo, 443
Haptenos, 387
Helicobacter, 496
Helmintos, 522
 intestinales, 522
Hematocrito, 291

Hematuria, 222
Hemocitometría, 274
Hemocitómetros, 275
Hemocromatosis hereditaria, 249
Hemocultivo, 475
 extracción, 476
 momento de la recogida, 476
Hemofilias, 366
Hemoglobina(s), 289
 corpúscular media, 291
 derivados, 290
 glucosilada, 269
 inestables, 326
 separación, 326
Hemoglobina F, 326
Hemoglobina S, 326
Hemoglobinopatías, 325
Hemostasia, 355
 primaria, 355
 trastornos, 365
 secundaria, 355, 356
Heparina, 52
Hepatitis
 A, 505
 aguda, 508
 autoinmunitaria, 427
 B, 506
 C, 508
 crónica, 508
 D, 508
 E, 509
 víricas, 505
Herencia, 442
Hibridación
 directa, 240
 en disolución, 240
 en filtro, 240
 fluorescente *in situ*, 243, 375, 468
 aplicaciones, 377
 multicolor, 376
 técnica, 243
 genómica comparada, 376
 con oligonucleótidos, 247
 sándwich, 242
 con sondas específicas de secuencia, 445
Hidatidosis, 523
Hifas, 511
Hiperclorémias, 188
Hipernatremia, 187
Hiperpotasemia, 187
Hipersensibilidad inmediata, 449
Hipoclorémias, 188

Hiponatremia, 187
Hipopotasemia, 187
Hipótesis
 alternativa, 78
 nula, 78
Histogramas, 307
 de frecuencia, 312
Histoplasma, 516
Histoplasmosis, 516
HLA
 y enfermedad, 448
 expresión, 442
 genética, 442
 nomenclatura, 443
 técnicas para el tipado, 443
 y trasplantes, 447
 rechazo del injerto, 448
Hojas de trabajo, 11
Hongos, 511
 identificación, 512
 observación microscópica, 512
 moniliáceos, 516
Horno, 205
 de grafito, 150
HPLC. Véase Cromatografía líquida de
 alta resolución
Huntington, enfermedad, 249

Identidad del paciente, 51
Identificación
 bacterias, 483
 morfológica, 513
 de las proteínas, 259
IgE total en suero, 450
Impedancia eléctrica, 278
Imprecisión, 86
 fotométrica, 173
 interserial, 87
 intraserial, 87
Impresos
 convencionales, 13
 de lectura por máquinas, 13
 de petición, 12
Incorporación de timidina tritiada,
 385
Incrementos monoclonales, 393
Índice(s)
 corpusculares eritrocitarios, 291
 determinación, 297
 plaquetarios, 292
 de sensibilidad internacional, 362

Inexactitud, 87
Infección(es)
 del sistema nervioso, 504
 urinaria, 478
 de las vías respiratorias, 503
Inferencia estadística, 73, 78
Informes de resultados, 13
Inmovilina, 255
Inmunidad humoral, 384
Inmunoanálisis
 analizadores automáticos, 416
 competitivos, 398
 diseño, 402
 donador con una enzima clonada,
 411
 estandarización, 403
 heterogéneos, 396, 417
 homogéneos, 396, 416
 ideal, 404
 con microesferas, 439
 no competitivos, 398
 de polarización de fluorescencia,
 414
 potenciados, 395
 reactivo(s)
 en exceso, 399
 limitado, 398
 marcados, 396, 430
Inmunodeficiencias, 315, 384
 primarias, 315
Inmunodifusión
 doble, 391
 radial, 392
Inmunolectroforesis, 393
 en contracorriente, 393
Inmunofenotipado de cánceres
 hematológicos, 316
Inmunofijación, 394
Inmunofluorescencia, 422
 directa, 423
 indirecta, 423
Inmunohematología, 337
 molecular, 345
Inmunofelometría, 395
Inmunoprecipitación, 422
 en geles, 422
Inmunotransferencia, 422
Inmunoturbidimetría, 395
Interferencias, 91, 152, 136, 401
 cinéticas, 136
 estáticas, 136
Intermedio, bacterias, 470
Internet, 122

- Interpolación
 curvilínea, 402
 lineal punto a punto, 402
spline, 402
- Intervalo, 76
 de confianza, 78
 de linealidad, 90
 de referencia, 98
- Intranet, 123
- Inyector(es), 208
 automáticos, 204
- Ionización por pulverización eléctrica, 258
- Iris iQ200, 226
- Islas de automatización, 3
- Isotiocianato de fluoresceína, 424
 citometría de flujo, 314
- Ivy, método, 359
- J**
-
- Jefe(s)
 de sección, 7
 de servicio, 7
- Jeringas, 53
 extracción, 60
- K**
-
- Kappa, 82
- Katal, 144
- Klebsiella*, 489
- Kolmogorov-Smirnov, prueba, 78
- L**
-
- Laboratorio
 abierto, 3
 de autoinmunidad, 420
 centrales, 3
 clínico, 3
 pruebas cerca del paciente, 263
 equipamiento básico, 17, 23
 de microbiología clínica, 457
 modular, 3
 de urgencias, 4
- Lactobacillus*, 495
- Lambert-Beer, ley, 132
- Lámpara(s)
 de cátodo hueco, 150
 de descarga, 133
 de halógenos, 133
 de wolframio, 133
- Laparocentesis, 67
- Láseres, citometría de flujo, 309
- Lecturas a varias longitudes de onda, 136
- Legionella*, 493
- Leishmania*, 525
- Leishmaniasis, 525
- Leptospiras, 496
- Leucemia(s)
 agudas, 332
 no linfoblástica, 380
 linfática crónica, 380
 linfoblástica aguda, 380
 mieloide crónica, 380
- Leucocitos, 273
 mononucleares, 273
 polimorfonucleares, 273
- Leucocitos, 329
 análisis de orina, 222
 sedimento urinario, 224
- Leucocitosis, 280
- Leucocituria, 224
- Leucoféresis, 350
- Leucopenia, citometría hemática, 280
- Levaduras, 225, 433, 511, 514
- Levey-Jennings, 118
- Límite(s)
 de detección, 90
 radioinmunoanálisis, 407
 de referencia, 98
- Linealidad fotométrica, 173
- Líneas celulares
 continuas, 502
 diploides, 502
 primarias, 502
- Linfocitos, 273, 329, 383
 B, 384
 T, 383
 subpoblaciones, 384
- Linfocitosis, 331
- Linfólisis
 dependiente de un anticuerpo, 386
 mediada por células, 386
- Linfomas, 380
- Linfopenia, 331
- Líquido
 amniótico, 67
 ascítico, 67
 cefalorraquídeo, 479
 especímenes, 66
 pericárdico, 481
 peritoneal, 481

pleural, 67, 481
sinovial, 67, 481
Listeria, 486
Longitud de onda, 131
exactitud, 172
Luminex, 439, 447
Luminiscencia, 155
Luminoinmunoanálisis, 396, 415
Luminometría, 155
Luminómetros, 155
Luz, 132

M

Magnitudes, 33
Makler, cámara, 72
MALDI-TOF, masas, espectrometría, 469
Mann-Whitney, prueba, 80
Manual de procedimientos, 96
Marcadores bioquímicos de daño cardíaco, 268
Marcajes fluorescentes, 257
Material(es)
alergénico, 451
de control, 87, 114
de plástico, 17
de referencia, 20
certificados, 21
primarios, 21
secundarios, 21
de relleno, 209
de vidrio, 17
Matraces aforados, 18
May Grünwald-Giemsa, método, 282
Media aritmética, 75
Mediana, 75
Medida(s), 33
de dispersión, 75
de forma, 77
de posición, 77
de tendencia central, 75
Medidores de glucosa, 264
Medio de cultivo, 461
diferenciales, 462
enriquecidos, 462
especializados, 462
generales, 462
líquidos, 463
selectivos, 462
sólidos, 463
de transporte, 462
Médula ósea, 304
Membranas de acetato de celulosa, 212
Memorias, ordenadores, 121
USB, 122
Meningitis, 504
Metahemoglobina, 290
Metahemoglobinemia, 290
Metapneumovirus, 503
Método(s), 35
de la cianmetahemoglobina, 290
comparación, 88
de cribado, 478
de cultivo, 520
de dilución, 274
en gel y en microplaca, 342
prueba directa, 342
del ICSH, 282
inmunológicos, 520
intradérmico, 450
moleculares, 513
microbiología, 467
automatización e instrumentación, 469
detección directa con sondas sin amplificación, 468
técnicas
de amplificación, 468
de PCR en tiempo real, 469
parásitos, 521
de punción, 450
de secuenciación, 446
Micelio, 511
Micobacterias, 487
Micología, 511
Micoplasmas, 497
Micosis
clasificación, 515
cutáneas, 515
subcutáneas, 515
superficiales, 515
Microdelecciones, 379
Microdissección cromosómica, 377
Microhematocrito, 291
Micromatrices, 439
de anticuerpos, 260
proteínicas, 260
alergia, 452
Microorganismos
almacenamiento, 481
conservación
a corto plazo, 482
a largo plazo, 482
observación directa, 459
sedimento urinario, 225

Microscopia
 de campo oscuro, 31
 de contraste de fase, 31
 de fluorescencia, 31
 Microscopios
 componentes, 28
 ópticos, 28
Microsporum, 515
 Mielograma, médula ósea, 304
 Mieloperoxidasa, 429
 Mitógenos policlonales, 385
 Moda, 75
 Módulo
 de microbiología, 126
 de urgencias, 126
 Molaridad, disoluciones, 40
 Monocitopenia, 330
 Monocitos, 273, 329
 Monocitosis, 330
 Mononucleosis infecciosa, 503
Moraxella, 491
 Mosaicismo cromosómico, 374
 Movilidad electroforética, 211
 Muestra(s)
 análisis proteómicos
 de líquido cefalorraquídeo, 255
 de orina, 255
 de plasma/suero, 254
 preparación, 253
 de tejidos, 254
 estadística, 74

N

Nefelometría, 155
 Nefelómetros, 156
Neisseria, 488
 Nematodos, 522, 523
 Neoplasias
 hematológicas, diagnóstico
 molecular, 250
 hematopoyéticas, 335
 Neubauer, cámara, 275
 Neutrofilia, 330
 Neutrófilos, 273, 329
 Neutropenia, 330
 Newman-Keuls, prueba. 81
 Nitritos, 222
 Nivel
 de confianza, 79
 de significación, 79
 Nomenclatura de las bandas, 373
 Normalidad, disoluciones, 41

Northern, transferencia, 242
 Número variable de repeticiones
 tándem, 250

O

Objetivo(s)
 de calidad analítica, 91
 microscopio, 28
 acromáticos, 28
 apocromáticos, 28
 de inmersión, 28
 secos, 28
 Observación de la médula ósea,
 hemostasia primaria, 359
 Ocular, 29
 Oncogenes, 250
 Ordenadores, 121
 Organización del proteoma humano,
 253
 Orina, especímenes, 63
 conservantes, 64
 contenedores, 63
 para cultivos microbiológicos, 65
 de una micción, 65
 de la primera hora de la mañana, 65
 de un tiempo determinado, 65
 Ósmosis inversa, 22
 Ouchterlony, técnica, 392
 Ovalocitos, 318
 Oxidación ultravioleta, 23

P

Pacientes, preparación, 111
 alimento, 111
 ayuno, 111
 ejercicio, 112
 fármacos, 112
 postura, 111
 presión del compresor, 112
 tabaco, 112
 Paludismo, 523
 P-ANCA, patrón, 429
 Parásito(s), 519
 intestinales, 520, 521
 sanguíneos, 520
 Parasitología, 519
 Partes por millón, 40
 Patógenos dimórficos, 511
 Patrón(es)
 en anillo, 426
 centromérico, 426

- de fluorescencia, 423, 424
- homogéneo, 425
- en huso mitótico, 426
- moteado, 425
- nucleolar, 426
 - homogéneo, 426
 - moteado, 426
- PCP. *Véase* Pruebas cerca del paciente
- PCR. *Véase* Reacción en cadena de la polimerasa
- Pendiente, 82
- Pénfigo vulgar, 429
- Percentiles, 77
- Perfil de autoanticuerpos, 438
- Persona de referencia, 97
- Personal, 6
 - facultativo, 7
 - técnico, 7
- Peso de soluto por unidad de volumen de disolución, 40
- pH
 - análisis de orina, 223
 - y gases, 70
- Pipetas, 20
 - dispensación, 20
 - graduadas, 20
 - multicanal, 23
 - semiautomáticas, 23
 - volumétricas, 20
- Pirosecuenciación, 245, 446
- Piuria, 224
- Placas de microtitulación, 418
- Plaquetas, 273
- Plaquetocrito, 292
- Plaquetoféresis, 350
- Plasma fresco congelado,
 - almacenamiento, 349
- Plasma
 - componentes sanguíneos, 349
 - rico en plaquetas, 349
- Plasmaféresis, 350
- Plasmodios, 523
- Platina, 28
- Plato teórico, 198
- Pneumocystis jiroveci*, 518
- Población
 - estadística, 73
 - de referencia, 97
- Poder de resolución, 30
- Poiquilocitosis, 318
- Polarografía, 184
- Policitemia, 318
 - vera, 318
- Poliglobulia, 280
- Porcentaje
 - en peso, 40
 - en volumen, 40
- Potenciales de membrana, 180
- Ppm. *Véase* Partes por millón
- Precisión analítica, 86
- Preparación(es)
 - de eritrocitos, 348
 - húmeda, 512
- Presentación de los datos, citometría de flujo, 312
- Prismas, 134
- Probabilidad *a posteriori*, 104
- Probetas, 19
- Procedimiento(s), 36
 - abierto, 15
 - de compras, 15
 - negociado, 15
 - restringido, 15
- Procesamiento, especímenes, 10
- Proceso de medida, 33
- Productos de degradación del fibrinógeno/fibrina, 365
- Programa
 - estadísticos, 83
 - de seguridad, 45
- Proliferación linfocitaria, 385
- Propionibacterium*, 495
- Proteína (s)
 - análisis de orina, 221
 - C, 364
 - eliminación, 254
 - S, 364
- Proteinasas, 429
- Proteinograma, 212
- Proteinuria, 222
- Proteoma, 253
 - urinario, 261
- Proteómica, 253
 - clínica, 253
 - del líquido cefalorraquídeo, 261
 - de la orina, 261
 - del plasma sanguíneo, 260
- Proteus*, 489
- Protocolo, 36
- Protozoos, 523
 - intestinales, 521
- Providencia*, 489
- Proyecto del Proteoma Plasmático, 260
- Prueba(s)
 - de activación de los basófilos, 452
 - de aglutinación, 340

- Prueba(s) (*cont.*)
 de antiglobulina, 342, 390
 directas, 343
 indirectas, 343
 de autohemólisis, 323
 bactericida, 473
 bioquímicas, 464, 513
 de la catalasa, 464
 del citrato, 465
 de la coagulasa, 465
 de la fenilalanina desaminasa, 465
 del indol, 465
 de la lactosa, 466
 de la oxidasa, 465
 de la ureasa, 466
 cerca del paciente, 263
 de coagulación, 361
 métodos inmunológicos, 361
 pruebas funcionales, 361
 sustratos sintéticos, 361
 de compatibilidad, 344
 cruzada, 344, 447
 electrónica, 344
 mayor, 344
 menor, 344
 cutáneas, 449
 diagnóstica, exactitud, 102
 especificidad, 102
 sensibilidad, 102
 de difusión en disco, 472
 de dilución
 en agar, 472
 en tubo, 471
 del guayacol, 267
 de hemólisis, 322
 inmunohematológicas, especímenes, 339
 inmunoquímica, 267
 fecal, 267
 de laboratorio, interpretación, 107
 de liberación de marcadores, 452
 múltiples, 438, 439
 de sensibilidad microbiana, 470
 de los signos, 80
 del suero acidificado, 323
 en placa, 340
 de provocación *in vivo*, 449
 serológicas, 513, 467
Pseudomonas, 491
 Punción
 arterial, 61
 cutánea, 62
 lumbar, 66
 venosa, 57
 Puntas de catéter, 481
 Puntos cuánticos, 314
- Q**
- Quemadores electrotérmicos, 150
 Quimioluminiscencia, 416
 Quimiotactismo, 335
- R**
- Radiación electromagnética, 131
 Radioinmunoanálisis, 396, 405
 Rapidez, método analítico, 85
 RAST, 451
 Ratón, ordenadores, 122
 Reabsorción tubular, 219
 Reacción(es)
 del ácido peryódico de Schiff, 333
 de aglutinación, 339
 auxiliar, 137
 del azul de toluidina, 332
 en cadena
 de la ligasa, 237
 de la polimerasa, 232
 cruzadas, 399
 de las esterasas, 333
 de la fosfatasa
 ácida, 334
 alcalina granulocítica, 334
 hemolítica postransfusional, 350
 indicadora, absorbancia, 137
 de la mieloperoxidasa, 332
 del negro sudán, 333
 de precipitación, 391
 Recepción, especímenes, 10
 Recogida
 de los especímenes, 519
 de orina, instrucciones, 65
 Recombinación, 378
 Recuento
 de bacterias, 461
 en cámara, 276
 errores, 278
 inherentes a la técnica, 278
 instrumentales, 278
 personales, 278
 celular, métodos electrónicos, 278
 de eritrocitos, 295
 de los leucocitos, 298

plaquetas, 298, 358
de reticulocitos, 298
Recursos, calidad analítica, 110
Red de área local, 122
Reglas de control, 114, 115
Regresión lineal, 82
Rejillas de difracción, 134
Reposición
periódica, 15
por pedido, 15
de productos de caducidad corta,
15
Requerimientos prácticos, 85
Resistencia, estudios de sensibilidad,
471
Resistente, bacterias, 470
Resolución
cromatografía en columna,
198
microscopio, 30
Reticulocitos, 293
Rhesus, sistema, 339
Rickettsia, 499
Riesgos
eléctricos, 49
de incendio, 49
químicos, 46
ROC, curvas, 102, 105
Romanowsky, método, 282
Rotavirus, 505
Rotores, 161
angulares, 27
horizontales, 27
Rubéola, 504

S

Salmonella, 489
Sanger, método, 243
Sangre
capilar, 266
de catéteres, 63
para cultivos, 60
recogida, 347
Secreciones genitales, 480
Secuenciación del producto
amplificado, 248
Sedimento urinario, 71, 223
Seguridad
en el laboratorio, 45
del método, 86
Sellador de tubos, 161
Semen, especímenes, 68

Sensibilidad, 471
analítica, 89
de los antibióticos, 470
diagnóstica, 102
Separaciones multidimensionales,
257
Separador
de células, fundamentos, 312
de gotitas, 313
de líquido, 314
Sepsis, 475
Serratia, 489
Servicios de donación, 347
Shigella, 489
Siembra, 463
cuantitativa directa, 477
Síndrome(s)
antifosfolípido, 438
de genes contiguos, 379
infecciosos víricos, 502
mielodisplásicos, 380
Sistema(s), 33
automáticos
para el banco de sangre, 345
estudios de sensibilidad, 473
para las extensiones sanguíneas,
284
hemocultivos, 477
de identificación, microbiología,
466
avidina-biotina, 397
comerciales manuales de
identificación, 466
de dispensación de los reactivos, 163
expertos, 127
de expresión
eucariotas, 433
procariotas, 432
fotométrico, 172
informáticos de laboratorio, 123
entrada de peticiones, 124
trazabilidad, 125
validación diagnóstica, 124
con instrumentos, pruebas cerca del
paciente, 264
de lavado, 173
de medida, analizadores
automáticos, 164
electroquímicas, 165
espectroscópicas de absorbancia,
164
fluorescencia, 164
operativo, 122

- Sistema(s) (*cont.*)
 de selección de la longitud de onda, 133
 amplitud de banda, 134
 de volatilización/ionización, 258
- Soluciones de dilución, 275
- Sondas
 clonadas, 238
 de oligonucleótidos, 238
 producidas por PCR, 238
- Southern, transferencia, 241
- Stokes, desviación, 153
- Student, *t*, 79
- Subpoblaciones linfocitarias, 315
- Sulfohemoglobina, 290
- Susceptible, bacterias, 470
- Sustancias
 químicas, 20
 volátiles, 47
- Substratos, métodos de medida
 del ácido molíbdico, fosfato inorgánico, 140
 del azul de metiltimol, calcio, 139
 del biuret, triglicéridos, 142
 de la calmagita, magnesio, proteínas totales, 140
 cinéticos, 138
 de diazotación, bilirrubina, 138
 enzimático
 colesterol, 139
 creatinina, 140
 triglicéridos, 143
 urea, 143
 de equilibrio, 137
 de la glucosa oxidasa, glucosa, 140
 de la hexocinasa, glucosa, 140
 de Jaffé sin desproteinizar, creatinina, 140
 de medida de la velocidad de reacción, 138
 de la ortocresolftaleína complexona, calcio, 139
 de punto final, 137
 de la uricasa, ácido úrico, 138
- Sysmex UF-1000i, 226
- T**
-
- Tabla de contingencia, 81
- Talasemias, 325
- Tamaño, estadística, 74
- Tapón hemostático, 355
- Taponador, 161
- Teclado, 122
- Técnica(s), 35
 amperométricas, 182
 de análisis de imagen, 257
 citogenéticas, 334
 de cultivo, 372
 de inmunoanálisis mediado por la enzima, 410
 inmunohematológicas, 339
 electroquímicas, 177
 espectroscópicas, 131, 132
 en microplaca, 342
 potenciométricas, 178
 proteómicas, 253
 de recuento, 276
- Técnicos especialistas de laboratorio, 7
- Tejidos
 animales, 432
 humanos, 431
- TEL. Véase Técnicos especialistas de laboratorio, 7
- Telómeros, 371
- Termociclador, 235
- Tetraploidía, 378
- Thoma, pipeta, 274
- Tiempo
 de coagulación activado, 266
 de hemorragia, 359
 de protrombina, 266, 361, 362
 de reptilasa, 363
 de retención, 198
 de trombina, 363
 de tromboplastina parcial activada, 361, 362
- Tinción, 372
 con blanco calcoflúor, 512
 con colorante(s)
 aniónicos, 256
 único, 460
 diferencial, 460
 de la extensión sanguínea, 282
 con tinta china, 512
- Tipado
 molecular, 445
 resolución, 446
 alta, 446
 baja, 446
 serológico, 444
 antígenos
 de clase I, 444
 de clase II, 444
- Tipificación del grupo Rh, 341

- Tipo, 33
- Tiras reactivas
 análisis químico, 220
 analizadores de glucosa, 265
 cualitativas, pruebas cerca del paciente, 263
- Título, prueba de aglutinación, 389
- Tonometría, 192
- Toracentesis, 67
- Toxoplasma, 524
- Toxoplasmosis, 524
- Transductor, 295
- Transferencia
 en línea, 439
 puntual, 395, 422
- Transferibilidad de los métodos, 95
- Trastornos
 de la coagulación, 366
 vasculares, 365
- Trasudados, 67
- Trematodos, 522
- Treponema*, 497
- Trichophyton*, 515
- Tricuriasis, 522
 Triploidía, 378
- Trombocitemias, 359
- Trombocitopatías, 359
 hemostasia primaria, 365
- Trombocitopenia, 359
- Trombocitosis, 359
 citometría hemática, 281
- Trombofilias hereditarias, 367
- Trombopenia
 citometría hemática, 281
 hemostasia primaria, 365
- Trombosis, 364
- Trypanosoma, 524
- Tubos
 con separador, 54
 neumáticos, 68
 de vacío, 53
- Turbidimetría, 155
- U**
- Unidad(es)
 de actividad enzimática, 144
 central de procesamiento, 121
 de concentración, células sanguíneas, 274
 físicas, 39
 internacional, 144
 de medida, 33, 36
 básicas, 36
 derivadas, 38
 químicas, 40
 rejuvenecidas, 349
- Unión de las enzimas marcadoras, 408
- Urinocultivos, 477
 recogida de especímenes, 478
- Urobilinógeno, 221
- Usuarios, relación, 12
- V**
- Valor(es)
 normales, 97
 observado, 98
 predictivo, 104
 de referencia, 97, 98
 fórmula leucocitaria, 289
 individuales, 97
 poblacionales, 97
 teoría, 97
- Vapores tóxicos, 47
- Variabilidad biológica, 92
- Variable(s), 73
 cualitativas, 73
 nominales, 73
 ordinales, 73
 cuantitativas, 73
 continuas, 73
 discretas, 73
 dependientes, 73
 independientes, 73
- Variación biológica
 interindividual, 92
 intraindividual, 92
- Variancia, 76
- Vasos, 18
- Velocidad de sedimentación globular, 303
 sistemas automáticos, 303
- Verificación
 delta, 117
 de límites, 117
- VHA (virus de la hepatitis A), 506
- VHB (virus de la hepatitis B), 506
- VHC (virus de la hepatitis C), 508
- VHD (virus de la hepatitis D), 508
- VHE (virus de la hepatitis E), 509
- Vía
 intrínseca, hemostasia, 357
 extrínseca, hemostasia, 357
- Vibrio*, 490

VIH. Véase virus de la inmunodeficiencia humana
 VIH-1, 509
 VIH-2, 509
 Virus
 de la gripe, 503
 del herpes simple, 504
 de la inmunodeficiencia humana, 509
 del papiloma humano, 510
 respiratorio sincitial, 503
 Voltimetría, 184
 Volumen
 corpúscular medio, 291
 de elución, 198
 plaquetario medio, 292
 Von Willebrand, enfermedad, 366
 VPH. Véase Virus del papiloma humano

W

Wegener, granulomatosis, 429
 Westergren, método, 303
 Western, transferencia, 394, 422
 Westgard, multirreglas, 115
 Wilcoxon, prueba, 80
 Wright, método, 282

Y

Yersinia, 490

Z

Zeeman, corrección, 152
 Ziehl-Neelsen, tinción, 460
 Zigomicetos, 511, 517
 Zigomicosis, 517



Rincon
Médico



Para Descargar más Libros Visita:

www.RinconMedico.me



www.facebook.com/rinconmedico.me