

Diseño y evaluación de un sistema colorimétrico para análisis clínico basado en una cámara digital y fuente de iluminación difusa

Design and implementation of a colorimetric system for clinical analysis based in a digital camera and diffused lighting

Jonathan Fernández, Héctor Gutiérrez(*)

Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

(*) Email: hector.gutierrez@ciens.ucv.ve

Recibido / Received: 15/05/2012. Revisado / Revised: 27/07/2012. Aceptado / Accepted: 28/07/2012.

DOI: <http://dx.doi.org/10.7149/OPA.45.3.315>

RESUMEN:

En este trabajo se diseñó y evaluó un prototipo de lector de absorbancia, que usa como sistema de detección una cámara digital, para ser usado en el análisis clínico cuantitativo de muestras biológicas. El sistema lector de absorbancia consta de una fuente de iluminación difusa como lámparas fluorescente o incandescente, una cubeta de plástico como compartimiento de muestra, una cámara digital como registrador de la imagen y un *software* de procesamiento de imagen que calcula los valores de absorbancia y concentración de las muestras. El sistema fue probado en la medición de glucosa en muestras reales de plasma sanguíneo, obteniéndose resultados cuantitativos comparables al de un sistema comercial de análisis clínico.

Palabras clave: Lector de Absorbancia, Análisis Clínicos, Cámara Digital.

ABSTRACT:

In this study was designed and evaluated an absorbance reader prototype which use a digital camera as the detection system. The prototype can be used for the quantitative clinical analysis of biological samples. The absorbance reader system consists of a diffuse light source such as fluorescent and incandescent lamps, a plastic bucket and sample compartment, a digital camera as image recorder and an image processing software that calculate the absorbance and concentration values. The system was tested by measuring glucose in real samples of blood plasma. We obtained results similar to those obtained with a commercial equipment for clinical analysis.

Key words: Absorbance Reader, Clinical Analysis, Digital Camera.

REFERENCIAS Y ENLACES / REFERENCES AND LINKS

- [1]. D. Skoog, J. Holler, *Principios de Análisis Instrumental*, McGraw Hill, 5ª Edición, Madrid (2001).
- [2]. X. Fuentes, M. Castiñeiras, J. Queraltó, *Bioquímica Clínica y Patología Molecular*, Reverté, 2ª Edición, Ciudad de México (1998).
- [3]. J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Edition, Springer, Baltimore (2006).
- [4]. A. Alimelli, D. Filippini, R. Paolesse, S. Moretti, G. Ciolfi, A. D'Amico, I. Lundstrom, C. Di Natale, "Direct quantitative evaluation of complex substances using computer screen photo-assisted technology: the case of red wine", *Anal. Chem. Acta* **597**, 103-112 (2007).
- [5]. D. Filipini, P. Asberg, O. Iganas, I. Lundstrom, "Computer screen photo-assisted detection of complementary DNA strand using luminiscens", *Sensor. Actuat. B - Chem* **113**, 410-418 (2006).
- [6]. D. Filipini, S. Svenson, I. Lundstrom, "Computer screen as a programmable light source for visible absorption characterization of bio-chemical assays", *Chem. Commun.* **2**, 240-241 (2003).

- [7]. J. Baker, G. Pernnarum, D. Diamond, "Digital imaging as a detector for generic analytical measurements", *Trac-Trend Anal. Chem.* **19**, 517-522 (2000).
- [8]. N. Malek, A. Safavi, F. Sedaghatpour, "Single-Step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera", *Talanta* **64**, 830-835 (2004).
- [9]. A. Alimelli, D. Filippini, R. Paolesse, S. Moretti, G. Ciolfi, A. D'Amico, I. Lundstrom, C. Di Natale. "Detection of natural Cr(VI) with computer screen photo assisted technology", *Procedia Chem.* **1**, 317-320 (2009).
- [10]. D. Filippini, G. Comina, I. Lundstrom. "Computer screen photo-assisted reflectance fingerprinting", *Sensors and Actuators B: Chemical* **107**, 580-586 (2005).
- [11]. P. Connolly, "A comprehensive review on the opportunities of point-of-care systems for the clinical diagnostics market", *Biosensors Bioelectronics* **10**, 1-6 (1995).
- [12]. A. J. Thewissen, *Solid-State Imaging with Charge-Coupled Devices*, Kluwer Academic Publisher, Netherlands (1996).
- [13]. Ch. Poynton, *Digital Video and HDTV: Algorithms and Interfaces*, Elsevier Science, USA (2003).
- [14]. M. Ebner, "Estimating the spectral sensitivity of a digital sensor using calibration targets", In D. Thierens *et al.* Edts., Proceedings 2007 Genetic and Evolutionary Computation Conference, London, UK, July 7-11, ACM, New York, pp. 642-649 (2007).
- [15]. A.S. Keston, "Method for analysis of the anomers of glucose", Abstr. 129th Meeting Amer. Chemistry. Soc. p. 31 (1956).
- [16]. P. Trinder, "Determination of blood glucose using an oxidaseperoxidase system with a non-carcinogenic chromogen", *J. Clin. Path.* **22**, 158-161 (1969).
- [17]. J. Castillo, H. Gutiérrez, Y. Vitta, M. Martínez, A. Fernández. "Development and testing of multi-well plates absorbance reader for clinical analysis using inexpensive web cam", *Proc. SPIE* **6755**, 67550W (2007).

1. Introducción

Uno de los métodos de análisis químico más ampliamente utilizado y versátil es la espectroscopia, en particular las pruebas colorimétricas [1]. Con este método se pueden identificar y cuantificar biomoléculas en solución y en muestras biológicas. Para tal fin se emplean reactivos específicos que reaccionan con el compuesto a analizar para formar un producto coloreado que permite detectarlo en muestras complejas [2]. La dependencia entre la concentración y la magnitud del color de dichas especies se relacionan mediante la ley de Lambert-Beer, que permite cuantificar la sustancia en estudio mediante métodos espectroscópicos [1,3]. La detección de radiación suele realizarse mediante fotómetros o espectrofotómetros. Estos equipos, permiten la realización de gran variedad de análisis clínicos, no obstante estos son costosos, requieren de personal especializado y de ciertas condiciones ambientales específicas y en algunos casos largos tiempo de análisis [2].

Recientemente diversos investigadores han explorado el uso de sistemas de cámaras

digitales como sistemas de detección espectroscópicos en conjunto con fuentes de radiación no-convencionales tales como pantallas de computadoras y diodos de emisión de luz, con la finalidad de evaluar la aplicación de la fotografía digital y el procesamiento computarizado de imágenes en la construcción de nuevos diseños de espectrofotómetros de bajo costo y más robustos, ideales para trabajos en campo [4-10]. Estas nuevas tecnologías han sido aplicadas en los lectores de absorbancia, obteniendo resultados satisfactorios en la cuantificación de ciertos compuestos químicos en muestras de suero sanguíneo. No obstante su aplicación en análisis clínicos no ha sido suficientemente explotada.

Debido a que estos dispositivos son de costo relativamente bajo, permiten analizar gran número de muestra simultáneamente y en corto tiempo, resulta de gran interés la utilización de estos dispositivos en el área médica. Esto permitiría descentralizar la realización de los exámenes clínicos. De hecho en la actualidad existe una nueva tendencia de atención al paciente llamada *Point of Care* (POC) [11] en la

que se pretende aumentar el número de pruebas que puedan realizarse en el mismo lugar donde se atiende al paciente. Esto facilitaría el procesamiento de muestras al disminuir los costos y el tiempo de entrega de los resultados.

El sistema aquí presentado ofrece la posibilidad de realizar determinaciones bioquímicas de un elevado número de muestras de manera simultánea, sin necesidad de trasladar al paciente a un centro asistencial, contribuyendo al desarrollo del *Point of Care*. En este trabajo nos enfocamos en la implementación y puesta a punto del medidor de absorbancia para análisis colorimétricos de muestras clínicas, y lo aplicamos a la determinación de los niveles de glucosa en plasma sanguíneo de pacientes reales.

2. Materiales y métodos

2.1. Montaje experimental

El montaje diseñado para realizar la lectura de absorbancia se muestra esquemáticamente en la Fig. 1. El mismo consta de una fuente de radiación difusa compuesta por una lámpara incandescente o fluorescente junto con una placa

difusora, un porta muestra, una cubeta de plástico y seguida a ella la cámara digital CCD Marca Canon modelo PowerShot A590, que permite registrar la imagen, y un *software* de procesamiento de la imagen (implementado en MATLAB R) con el cual se obtiene los valores de absorbancia de las muestras. La cámara almacena las fotografías en el formato JPG, sin embargo este tipo de imágenes reciben un preprocesamiento en la misma cámara que incluye un "balance de blancos", entre otras transformaciones de color. Debido a que no conocemos a priori el tipo de transformaciones que sufren las imágenes, y no sabemos el efecto que puedan tener en la exactitud del sistema propuesto, se modificó la cámara con el fin de obtener también las imágenes no procesadas, tal como las genera el sensor CCD. Este tipo de imágenes vienen en un formato denominado RAW. Todas las medidas realizadas con el sistema desarrollado se realizaron usando ambos tipo de imágenes.

Las medidas de absorbancia y concentración obtenidas con el sistema diseñado se compararon con las obtenidas con un espectrofotómetro comercial marca Ocean Optics modelo USB-2000.

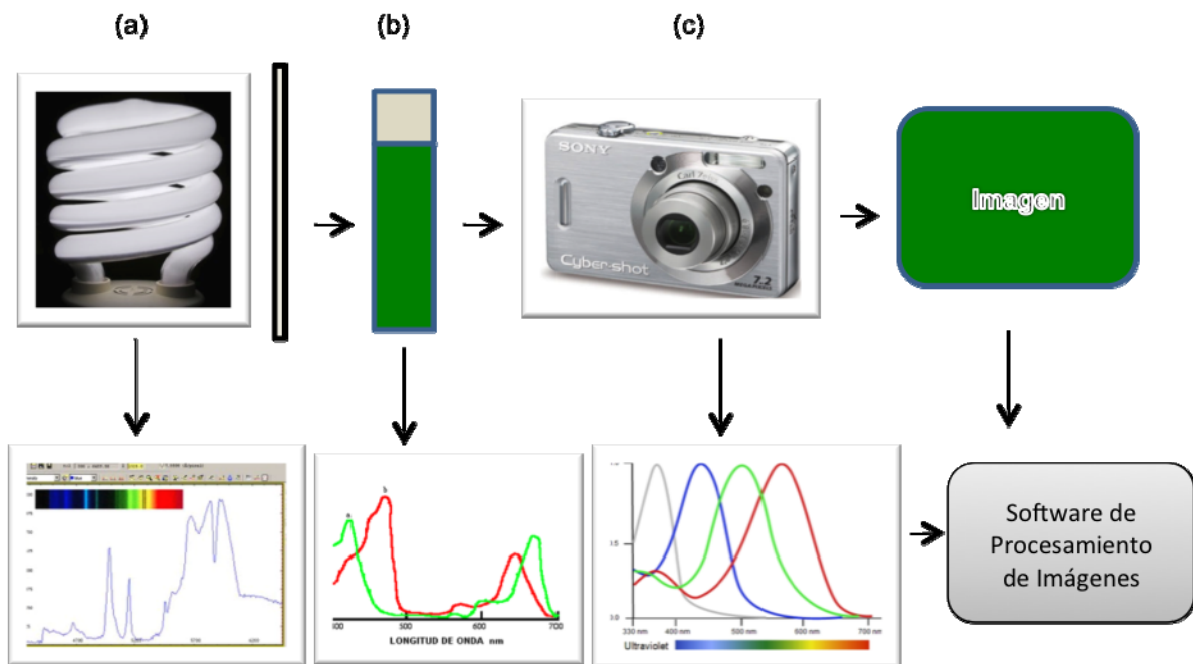


Fig. 1: Esquema del montaje. (a) fuente de luz y espectro de emisión respectivo, (b) celda con muestra y espectro de absorción de la misma, (c) cámara digital y respuesta espectral de la CCD.

2.2. Algoritmo de procesamiento de la imagen

Una cámara digital está equipada con un dispositivo CCD, el cual no es más que un conjunto de sensores (píxeles) ordenados en una matriz bidimensional. Cada uno de estos píxeles miden la intensidad de la luz que sobre ellos incide, la cual es una parte pequeña de la escena que enfoca la cámara [12]. De esta forma la imagen continua se hace discreta y se representa en el dispositivo como una matriz de valores de intensidad. Cada píxel esta cubierto con uno de 3 tipos de filtros, rojo (R), verde (G) o azul (B), en un patrón conocido como *Bayer pattern* [12]. De este modo, mediante un procesamiento de la imagen "cruda" realizado por el firmware de la cámara, se logra reconstruir la imagen a color. Por lo tanto a cada pixel le corresponde tres valores de intensidad: los llamados valores RGB [13]. Los valores RGB (I_R, I_G, I_B) arrojados por cada pixel son proporcionales al producto de su área, el tiempo de exposición, la irradiancia espectral de la luz incidente sobre el mismo y la sensibilidad espectral de dicho pixel (la cual incluye el efecto del filtro respectivo) integrado sobre todas la longitudes de onda:

$$I \propto \int_0^{\infty} R(\lambda)L(\lambda)d\lambda. \quad (1)$$

En la medición de absorbancia usando la cámara digital, la luz que incide sobre el sensor debe atravesar primero la celda con la muestra, donde es absorbida parte de la radiación. De acuerdo a la ley de Lambert-Beer la luz que atraviesa la muestra tiene una intensidad dada por:

$$L'(\lambda) = L(\lambda)10^{-A(\lambda)}, \quad (2)$$

donde $L(\lambda)$ es la irradiancia espectro de la luz incidente, y $A(\lambda)$ es el espectro de absorbancia de la muestra, la cual depende de la concentración de la misma de acuerdo a: $A = \epsilon lc$, donde ϵ es el coeficiente de absorptividad molar de la muestra, c su concentración y l la longitud de la celda. Si $R_i(\lambda)$ es la sensibilidad espectral del sensor de color i ($i = R, G$ o B), entonces el valor medio de intensidad de los píxeles correspondiente a la imagen de la muestra es:

$$\bar{I}_i(muestra) = K \int_0^{\infty} R_i(\lambda)L(\lambda)10^{-A(\lambda)}d\lambda. \quad (3)$$

Análogamente el valor medio de la intensidad de los píxeles correspondientes a la imagen del blanco (solución de referencia sin moléculas absorbentes) es:

$$\bar{I}_i(blanco) = K \int_0^{\infty} R_i(\lambda)L(\lambda)d\lambda. \quad (4)$$

La intensidad normalizada es:

$$\hat{I}_i = \frac{\bar{I}_i(muestra)}{\bar{I}_i(blanco)}. \quad (5)$$

Si se conocen tanto el espectro de absorbancia, $A_p(\lambda)$, de una muestra patrón de concentración conocida, c_p , como la irradiancia espectral de la fuente de iluminación, y tomado en cuenta la dependencia lineal de la absorbancia con la concentración, la absorbancia de una muestra problema de concentración $c = \alpha c_p$ es: $A(\lambda) = \alpha A_p(\lambda)$. Por lo tanto el valor teórico de la intensidad media (normalizada) arrojada por los píxeles de color i de la imagen de la muestra es:

$$\hat{I}_{teo,i} = \frac{\int_0^{\infty} R_i(\lambda)L(\lambda)10^{-A_p(\lambda)}d\lambda}{\int_0^{\infty} R_i(\lambda)L(\lambda)d\lambda}. \quad (6)$$

El error cuadrático entre el valor experimental de la intensidad media de los píxeles, \hat{I}_i , y el valor teórico es:

$$\varepsilon(\alpha) = \sum_{i=R,G,B} [\hat{I}_i - \hat{I}_{teo,i}]^2. \quad (7)$$

El *software* desarrollado en MATLAB realiza la minimización de $\varepsilon(\alpha)$ y proporciona el valor optimo del parámetro α que nos proporciona el valor de concentración de la muestra problema: $c = \alpha c_p$. El *software* realiza los siguiente pasos:

- De un fichero de datos lee:
 - Espectro de la lámpara, $L(\lambda)$.
 - Sensibilidad espectral de la CCD, $R_R(\lambda), R_G(\lambda), R_B(\lambda)$.
 - Espectro de absorbancia de las muestras patrón y sus valores de concentración, $A_p(\lambda), c_p$.
- Realiza la curva de calibración absorbancia vs. concentración con las muestras patrón.

- Lee el fichero de la imagen de las muestras y blanco y selecciona la región de interés.
- Calcula las intensidades media de la imagen y el blanco para cada canal (R, G y B) y normaliza dichas intensidades (Ec. 5).
- Define función para la intensidad teórica (Ec. 6). Para ello realiza las integrales en forma numérica mediante el método de Simpson.
- Define la función para el error cuadrático (Ec. 7) y la minimiza utilizando el método de la regla de oro con interpolación cuadrática. Obtiene valor del parámetro α .
- Calcula los valores de absorbancia y concentración de cada muestra, $A(\lambda) = \alpha A_p(\lambda)$, $c = \alpha c_p$.

2.3. Sensibilidad espectral del sensor CCD

Para realizar el procesamiento de la imagen y obtener el valor de absorbancia y concentración de la muestra es necesario conocer la respuesta espectral del sensor CCD de la cámara. Esta respuesta se obtuvo a partir de la imagen, tomada por la cámara, de un patrón de calibración de color IT8, mediante un *software* de calibración desarrollado para este trabajo, siguiendo el procedimiento descrito en [14]. El *software* recibe como entrada la imagen del patrón de color (una cuadrícula con todo la gama de colores del espectro visible) y los espectros de reflectancia de cada parche de color y estima, mediante un algoritmo genético, la mejor sensibilidad espectral los tres tipos de elementos sensores que tienen los detectores CCD, que reproduce los valores de intensidad de los diferentes parches de color de patrón de color IT8.

2.4. Determinación de glucosa en plasma sanguíneo

Para la determinación cuantitativa de glucosa en sangre, se utilizó el método glucosa oxidasa enzimática colorimétrica [15,16]. Este método emplea la enzima glucosa oxidasa, que cataliza la oxidación de glucosa a peróxido de hidrógeno y ácido glucónico, y una modificación de la reacción de color Trinder [16] catalizada por la enzima peroxidasa. En presencia de peroxidasa, la 4 aminoantipirina e hidroxibenzoato es oxidada por el peróxido de hidrógeno para dar

una coloración roja debido a la formación de quinoneimina, cuyo máximo de absorción esta entre 500–520 nm. La intensidad de color de la reacción es proporcional a la concentración de glucosa en la sangre. Finalmente la determinación de la concentración de glucosa, se lleva a cabo mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{C_m}{\text{mgdl}^{-1}} = C_p \frac{A_m}{A_p}, \quad (8)$$

C_p : Concentración del patrón de glucosa en mg/dl,

C_m : Concentración de la muestra,

A_m : Absorbancia de la muestra,

A_p : Absorbancia del patrón.

Para la realización de los ensayos se utilizó un kit comercial para análisis de glucosa en fluidos biológicos. El kit proporciona todos los reactivos y un patrón de glucosa de 100 mg/dl. Para la determinación de la concentración de la muestra problema se realizó una dilución del patrón de glucosa para obtener otro valor en la curva de calibración y asegurar mejores resultados.

3. Resultados y discusión

3.1. Sensitividad espectral de la cámara

En la Fig. 2 se presenta la respuesta espectral de los 3 tipos de pixels del detector CCD de la cámara, obtenida con el *software* de calibración desarrollado.

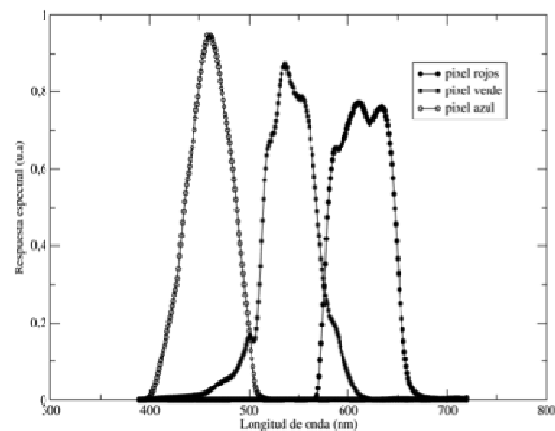


Fig. 2: Respuesta espectral de la CCD obtenida con el *software* de calibración diseñado.

3.2. Medidas de glucosa en sangre

Después de obtener las muestras de suero sanguíneo y de llevar a cabo la reacción colorimétrica, se procedió a obtener las imágenes de las muestras tomadas mediante el sistema elaborado tanto en formato RAW como formato JPG, y se adquirieron tres imágenes de forma consecutiva en un lapso de 3 minutos. En la Fig. 3 se presentan las imágenes captadas por la cámara digital en la cual se han colocado la reacción colorimétrica de las muestras de suero y su blanco o solución de referencia.

En la Tabla I se muestran los valores de absorbancia de los dos patrones de glucosa en plasma sanguíneo, medidos tanto con el sistema desarrollado como con el espectrofotómetro comercial Ocean Optics USB-2000. Se observa que no hay diferencia significativa en los valores de absorbancia medidos con los dos tipos de imágenes (JPG y RAW), y el sistema proporciona valores muy cercanos a los proporcionados por el espectrofotómetro comercial.

En la Tabla II se muestran los valores de los parámetros analíticos de la curva de calibración (absorbancia vs. concentración) para las muestras patrón de glucosa en sangre usando los tres métodos (JPG, RAW y espectrofotómetro comercial). Observamos que la pendiente para ambos tipo de formato de imagen son iguales, lo que indica que no hay un efecto negativo sobre la exactitud del sistema desarrollado cuando se usa las imágenes JPG a pesar del preprocesamiento que sufren éstas en la cámara. Se nota, además, que las pendientes de nuestro sistema y del espectrómetro Ocean Optics son muy parecidas. Es decir que el sistema desarrollado tiene una sensibilidad analítica muy parecida a la de un sistema comercial convencional. En un trabajo previo [17], la sensibilidad reportada para el sistema colorimétrico fue mucho menor comparado con la de un espectrofotómetro comercial, y esto se atribuyó al hecho de que la cámara digital no es selectiva en la longitud de onda para la medición de la absorbancia, sino que utiliza radiación policromática del canal (R, G, o B) utilizado. Con el algoritmo de procesamiento desarrollado se evita dicha falta de sensibilidad.

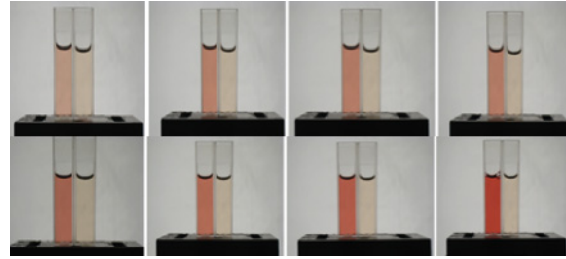


Fig. 3: Imágenes de las muestras de plasma sanguíneo más reacción colorimétrica y blanco o solución de referencia.

Tabla I

Valores de absorbancia de los patrones de glucosa medidos con el sistema diseñado usando ambos tipos de formato de imagen y valores medidos con espectrofotómetro comercial.

Método	Patrón (mg/dl)	Absorbancia
Imagen RAW	100	0,391 ± 0,002
	25	0,112 ± 0,002
Imagen JPG	100	0,394 ± 0,002
	25	0,115 ± 0,003
Espectrómetro Ocean Optics	100	0,399 ± 0,003
	25	0,105 ± 0,003

Tabla II

Valores de la pendiente y punto de corte de las curvas de calibración para las muestras de glucosa en sangre, medidos con los tres métodos. Intervalo de trabajo (mg/dl): (25-250).

Método	Pendiente (dl/mg)	Punto de corte
Imagen RAW	0,0037	0,019
Imagen JPG	0,0037	0,022
Espectrómetro Ocean-Optics	0,0039	0,007

En la Tabla III y la Fig. 4 se pueden comparar los valores de concentración de las muestras reales obtenidos mediante el sistema desarrollado y los que se reportarían en un análisis clínico de laboratorio en la determinación de glucosa con un espectrofotómetro comercial. Se observa que los valores de concentración de glucosa obtenidos con el sistema desarrollado es comparable con los obtenidos con un espectrofotómetro comercial. Los errores relativos de nuestro sistema con respecto al instrumento comercial se encuentran en un rango de 0 al 5 %, lo que es suficiente para reportar esos valores al nivel clínico, debido a que el rango reportable de estos valores va del 5 al 10% del valor real.

Tabla III

Valores de concentración de glucosa en sangre de las muestras reales medidas con los tres métodos.

Muestra	Concentración (dl/mg)		
	Ocean Optics	Imagen RAW	Imagen JPG
1	36,2±0,3	35,9±0,3	37,2±1,1
2	76,3±0,4	77,7±0,6	78,3±0,8
3	82,4±0,6	86,7±1,4	87,1±0,4
4	85,4±0,3	88,0±0,8	88,0±0,6
5	103,8±0,6	109,5±0,5	108,7±0,8
6	131,0±0,3	129,5±0,5	130,6±1,2
7	172,9±0,6	168,8±0,8	170,8±0,7
8	251,5±0,4	255,4±0,5	258,7±0,9

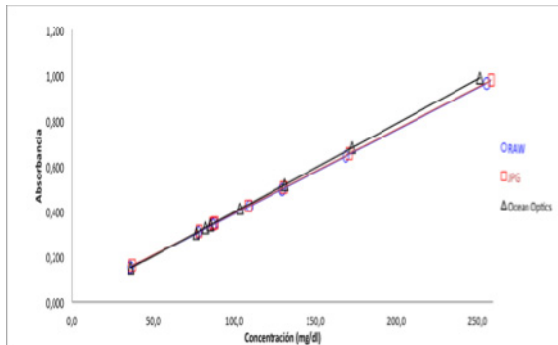


Fig. 4: Curvas de absorbancia vs. Concentración medidas con los tres métodos.

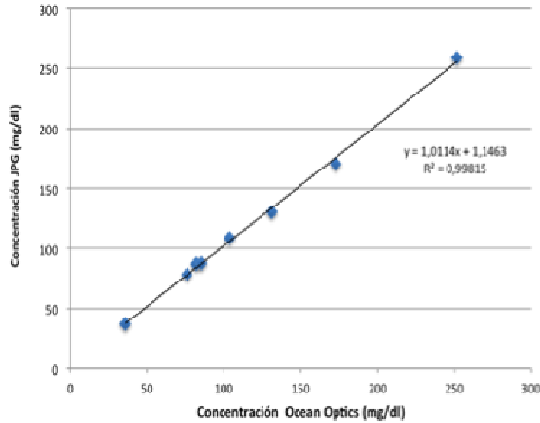


Fig. 5: Comparación entre las medidas hechas con el instrumento comercial y el sistema diseñado.

En la Fig. 5 se muestra una curva que representa los valores de concentración para el sistema desarrollado en función de los valores obtenidos con el espectrofotómetro comercial. Se observa que se obtiene una pendiente cercana a 1 y un buen coeficiente de correlación.

4. Conclusiones

El prototipo diseñado presentó una buena reproducibilidad, sensibilidad y una respuesta lineal en la evaluación analítica. La sensibilidad del prototipo es comparable a la de un espectrofotómetro comercial, lo que permitió realizar análisis cuantitativos de analitos de interés clínico, tal como la glucosa en suero sanguíneo humano. No se encontró diferencias significativas en el uso de las imágenes en los formatos JPG y RAW, es decir que basta con usar las imágenes en el formato JPG tal como las proporcionan las cámaras digitales convencionales de uso corriente.