



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 499**

51 Int. Cl.:
G01N 21/31 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06115338 .3**
96 Fecha de presentación : **20.12.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1698883**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.09.2006**

54 Título: **Método para determinar la concentración de hemoglobina total en sangre completa, no diluida y no hemolizada.**

30 Prioridad: **28.12.2001 SE 0104443**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.07.2011

73 Titular/es: **HEMOCUE AB.**
P.O. Box 1204
262 23 Angelholm, SE

72 Inventor/es: **Pettersson, Joakim y**
Svensson, Johnny

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 362 499 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para determinar la concentración de hemoglobina total en sangre completa, no diluida y no hemolizada.

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a un método de análisis para determinar hemoglobina en sangre completa no alterada.

Técnica Antecedente

10 Una cubeta desechable para muestrear un fluido, mezclar la muestra con un reactivo y realizar directamente análisis ópticos de la muestra mezclada con el reactivo se conoce previamente de la Patente de Estados Unidos N° 4.088.448. Esta cubeta conocida tiene diversas ventajas, tales como que simplifica el procedimiento de muestreo, reduce el número de utensilios y mejora considerablemente la precisión del análisis, haciendo al procedimiento de análisis independiente de la técnica operativa del operario que realiza el análisis. Una construcción de cubeta basada en el mismo principio y con características de flujo mejoradas se describe en la Patente de Estados Unidos 5 674 457.

15 Una cubeta desechable, desarrollada de acuerdo con estas patentes, se usa mucho actualmente para la medición de hemoglobina (determinación de Hb) de sangre completa no diluida. Para ello, la cavidad de la cubeta se ha pre-tratado con un reactivo, de manera que cuando una muestra de sangre se pone en la cubeta, las paredes de los glóbulos rojos se desintegran y se inicia una reacción química. El resultado de la reacción permite la determinación de Hb mediante una medición de absorción directamente a través de las paredes transparentes de la cubeta que, en la zona de medición, denominada también ventana óptica, tiene una distancia predeterminada y
20 definida con precisión entre las superficies internas de las paredes planas opuestas. El método de medición está basado en un método de azidmethemoglobina modificado de acuerdo con Vanzetti, G., Am. J. Lab. & Clin. Med. 67, 116 (1966).

25 Las mediciones espectrofotométricas se realizan a 570 y 880 nm. Este método de medición cuantitativo, basado en química seca, ha alcanzado un éxito considerable como puede verse, por ejemplo, en el artículo de von Schenck et al en Clinical Chemistry, vol 32, No 3, 1986, puesto que el método da resultados iguales o incluso superiores en comparación con los resultados obtenidos con los métodos en húmedo normalizados para la determinación de Hb. El reactivo usado está compuesto por desoxicolato sódico, que hemoliza los glóbulos rojos, azida sódica y nitrito sódico, que convierten la hemoglobina en azidmethemoglobina.

30 Debido a las propiedades higroscópicas de los reactivos usados, la vida útil está limitada y se requiere el almacenamiento de las cubetas en envases sellados, incluyendo un agente de secado. Es aún más problemático el hecho de que, en climas con alta humedad, la cubeta tenga que usarse unos pocos minutos después de la retirada del envase, puesto que de lo contrario los reactivos se destruirán y la medición será imprecisa y, por tanto, inútil.

35 Sin embargo, los problemas originados de las propiedades higroscópicas de los reactivos usados, pueden eliminarse, puesto que se ha encontrado que estos reactivos no pueden usarse como se describe en la solicitud de patente en trámite junto con la presente PCT SE01/01442 de acuerdo con la cual la primera medición de absorción se realiza a un intervalo de longitud de onda de 490-520 nm, directamente sobre la muestra en la microcubeta. Sin embargo, de acuerdo con la invención descrita en esta solicitud de patente, es necesario hemolizar la sangre antes de realizar la medición. Por lo tanto, la cavidad de la cubeta debe incluir un agente de hemólisis para disgregar los glóbulos rojos y liberar la hemoglobina contenida en estas células. La necesidad de usar un agente de hemólisis
40 cuando se realizan mediciones de absorbancia fotométrica de hemoglobina en una muestra de sangre también se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 5 064 282 (Artel).

45 Se conocen métodos cuantitativos para la determinación óptica de hemoglobina en sangre completa sin usar un agente de hemólisis, aunque estos métodos tienen en común que todos ellos son comparativamente complicados. Esto depende, sobre todo, de la falta de homogeneidad de la sangre, debido a la alta concentración de glóbulos rojos, una consecuencia de lo cual es que la luz se dispersa tras la interacción con estas partículas de las muestras de sangre no homogénea. Por consiguiente, la luz no se transmite directamente a través de la muestra, sino que se desvía en un intervalo de ángulos de dispersión. Otro factor que provoca problemas es el hecho de que la sangre puede contener tantas como cinco especies diferentes de hemoglobina. Las publicaciones de patente que abordan estos problemas son, entre otras, la Patente de Estados Unidos 6 262 798 (Shepherd) y el documento WO
50 01/53806 (Radiometer).

55 De acuerdo con la invención descrita en la Patente de Estados Unidos 6 262 798, es necesaria una pluralidad de longitudes de onda para conseguir una medición correcta. El hecho de que se necesiten muchas longitudes de onda hace que el espectrofotómetro sea comparativamente complicado. Las longitudes de onda se seleccionan por su capacidad para distinguir las especies de hemoglobina a una dispersión mínima y una absorbancia máxima. La patente describe también el uso de un gran detector que reduce el problema de la

dispersión más allá del intervalo de detección.

5 El documento WO 01/53806 describe un aparato que es especialmente aplicable para mediciones ópticas en sangre completa. Este aparato comprende un filtro de absorción o un filtro de interferencia, que proporciona corrección para las variaciones en la sensibilidad del detector y en la longitud eficaz de la trayectoria óptica, como se observa tras variar el nivel de dispersión. El aparato usa un gran detector para detectar la luz dispersada transmitida a través del filtro de absorción o el filtro de interferencia.

10 El hallazgo de acuerdo con la presente invención de que una determinación precisa de la cantidad total de hemoglobina en sangre completa puede hacerse no solo sin usar un agente de hemólisis sino también sin usar una pluralidad de longitudes de onda como se describe en la Patente de Estados Unidos 6 262 798 o un filtro de absorción o interferencia especial que proporciona corrección para las variaciones en la sensibilidad del detector y en la longitud de la trayectoria óptica eficaz, como se observa tras variar el nivel de dispersión como se describe en el documento WO 01/53806, por lo tanto, fue muy inesperado.

Objetos de la Invención

15 Un objeto de la presente invención es proporcionar un método cuantitativo y rápido, para la determinación de hemoglobina en sangre completa no alterada.

Otros objetos resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Sumario de la Invención

20 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para determinar una concentración de hemoglobina en una muestra de sangre completa no hemolizada, no diluida, a partir de los resultados de dos, y solo dos, mediciones de absorción, en concreto una primera medición de absorción sobre la muestra realizada a una longitud de onda en el intervalo de 490-520 nm y una segunda medición de absorción sobre la muestra realizada a una longitud de onda en el intervalo de 650-1200 nm. El método comprende: procesar los resultados de la primera y segunda mediciones de absorción para determinar la concentración de hemoglobina en la muestra, en el que el paso de procesamiento comprende compensar la dispersión en la muestra, dependiendo dicha compensación del resultado de la segunda medición de absorción.

30 Inesperadamente, se ha encontrado que las determinaciones cuantitativas de hemoglobina pueden realizarse fácilmente no solo sin reactivos químicos de azida sódica y nitrito sódico, sino también sin un agente de hemólisis directamente sobre la sangre completa no alterada, es decir, no diluida y no hemolizada. Puesto que la sangre completa no alterada contiene células sanguíneas, hay una dispersión sustancial de la luz en la muestra. De esta manera, hasta ahora se ha esperado que una determinación cuantitativa de hemoglobina en sangre completa no diluida, no hemolizada, requeriría detectar y analizar la luz dispersada. De acuerdo con la invención, la determinación de hemoglobina puede realizarse mediante dos mediciones de absorción, sin necesidad de conocer cuantitativamente los coeficientes de dispersión de los contenidos de la sangre, o reducir físicamente los efectos medidos de la luz dispersada. Inesperadamente, se ha encontrado que compensando el nivel de absorción de la muestra en la segunda medición de absorción, el efecto de la dispersión puede tenerse en cuenta fácilmente. De esta manera, de acuerdo con la invención, la determinación de la hemoglobina es simple, requiriendo solo dos mediciones de absorción.

40 De acuerdo con la presente invención, por lo tanto, se ha encontrado que los reactivos higroscópicos pueden eliminarse. Adicionalmente, se ha encontrado ahora que el tiempo para obtener la determinación analítica puede reducirse. Como los análisis que realizan en grandes cantidades, por ejemplo en hospitales y bancos de sangre, el aspecto temporal es importante.

45 En el contexto de esta solicitud, la expresión "medición de absorción" debería considerarse como una medición relacionada con la absorción en una muestra. En una medición de absorción, la intensidad de la luz detectada después de interactuar con una muestra se compara con la intensidad de la luz irradiada sobre la muestra. La luz detectada corresponde a la transmitancia a través de la muestra. La luz que no alcanza el detector se considera que se absorbe. De esta manera, en los resultados de las mediciones, puede usarse la transmitancia en lugar de la absorción. Como la transmitancia es la inversa de la absorción, detectar la transmitancia aún sería una medición de absorción. Sin embargo, la absorción medida no solo corresponde a la luz que se ha absorbido ciertamente en la muestra, puesto que parte de la luz se ha dispersado en la muestra, de manera que no alcanza el detector.

50 Adicionalmente, el término "determinación" debería considerarse como la medición que no necesariamente obtiene un valor absolutamente exacto de la concentración de hemoglobina en la muestra. De esta manera, la concentración de hemoglobina se "determina" con márgenes de error razonables, de manera que el resultado, simplemente, no da un orden de magnitud de la concentración, aunque no necesariamente dando un valor absoluto.

55 De acuerdo con una realización del método, la primera medición de absorción se realiza a una longitud de

onda en el intervalo de 500-510 nm, más preferiblemente a 506 nm.

De acuerdo con otra realización del método, la segunda medición de absorción se realiza a una longitud de onda en el intervalo de 850-910 nm, más preferiblemente en el intervalo de 860-900 nm.

$$[\text{Tot Hb}] = (\text{Abs}_1 - \text{Abs}_2) \cdot k + F(\text{Abs}_2)$$

- 5 en la que [Tot Hb] es la concentración total de hemoglobina en la muestra, Abs_1 es la absorbancia medida de la primera medición de absorción, Abs_2 es la absorbancia medida de la segunda medición de absorción, k es un coeficiente de calibrado, que depende del dispositivo de medición y $F(\text{Abs}_2)$ es una función que depende de la absorbancia medida de la segunda medición de absorción.

Breve Descripción de los Dibujos

- 10 La invención se describirá ahora a modo de ejemplo con más detalle con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 es un diagrama de flujo de un método de acuerdo con la invención,

La Figura 2 es un diagrama esquemático de la absorbancia de hemoglobina,

La Figura 3 es una vista esquemática de un sistema adecuado para realizar la invención,

- 15 La Figura 4A es un diagrama que ilustra una evaluación preliminar del método de la invención, en comparación con las microcubetas HemoCue usadas actualmente.

La Figura 4B es un diagrama que ilustra una evaluación preliminar del método de la invención, en comparación con un método de referencia internacional.

Descripción Detallada de la Invención

- 20 Haciendo referencia ahora a la Figura 1, se describirá ahora un método para la determinación de hemoglobina de acuerdo con la invención. En primer lugar, una cubeta capilar, desechable, se llena con una muestra de sangre completa, no alterada, paso 1. De esta manera, se obtiene una muestra a analizar. Después, se realiza una primera medición de absorción sobre la muestra, a una longitud de onda en el intervalo de 490-520 nm, paso 2. Adicionalmente, se realiza una segunda medición de absorción sobre la muestra, paso 3. La segunda medición de absorción se realiza a una longitud de onda en el intervalo de 650-1200 nm. Esta segunda medición de absorción se usa para compensar la dispersión de la luz en la muestra, como se describirá con más detalle más adelante. Finalmente, los resultados de las mediciones se procesan, paso 4, usando un algoritmo predeterminado para determinar la concentración de hemoglobina en la muestra.

- 30 La microcubeta desechable puede ser del tipo descrito en la Patente de Estados Unidos 4 088 448 o, preferiblemente, en la Patente de Estados Unidos 5 674 457. La cubeta puede definirse como un miembro de cuerpo unitario que incluye, al menos, una cavidad con una ventana óptica (zona de medición) en la que dos superficies, planas o curvas, orientadas hacia la cavidad, se colocan a una distancia predeterminada entre sí y, de esta manera, definen una longitud de la trayectoria óptica predeterminada. Esta distancia entre las superficies que definen la zona de medición es un parámetro crítico a la hora de proporcionar la longitud de la trayectoria óptica apropiada para la medición de hemoglobina. La longitud de la trayectoria óptica debería ser menor de 1 mm para asegurar que la intensidad de la luz transmitida a través de la muestra en la cubeta es suficiente para posibilitar la determinación de la hemoglobina en la muestra. Preferiblemente, esta distancia es menor de 0,2 mm y, más preferiblemente, entre 0,05 y 0,2 mm. La distancia entre las superficies internas del resto de la cavidad es preferiblemente del orden de 0,1-2 mm, que es eficaz para permitir que en la muestra entre en la cavidad por fuerza capilar, a través de la entrada de la cavidad, que está en comunicación con el exterior del miembro del cuerpo. Adicionalmente, la cavidad tiene un volumen fijo predeterminado de menos de aproximadamente 25 μl . No son necesarios aditivos activos, tales como reactivos o agentes de hemólisis, para la determinación de acuerdo con el método de la invención.

- 45 Las cubetas pueden formarse de cualquier material adecuado, que permita la formación de los altos niveles de tolerancia necesarios. Preferiblemente, la cubeta se fabrica por moldeo por inyección de un material polimérico transparente.

- 50 Para superar los problemas relacionados con el llenado capilar de la cubeta puede ser necesario pretratar las superficies internas de la cubeta, para conferir un carácter hidrófilo a estas superficies. Esto puede conseguirse recubriendo las superficies con un detergente adecuado, tal como Brij 35. Otra posibilidad es seleccionar un material hidrófilo para la fabricación de la cubeta. Una característica crítica del método de la invención es que la determinación de la absorción debería realizarse a una longitud de onda en el intervalo de 490-520 nm, más preferiblemente en el intervalo de 500-510 nm y, aún más preferiblemente, a 506 nm. La medición de absorción compensatoria secundaria se realiza a una longitud de onda en el intervalo de 650-1200 nm, más preferiblemente en

el intervalo de 850-910 nm y, aún más preferiblemente, en el intervalo de 860-900 nm.

Las mediciones de absorción se realizan directamente sobre la muestra de sangre completa, es decir, la sangre no está alterada (no diluida y no hemolizada).

5 En el intervalo de longitud de onda de 490-520 nm las absorciones de las cinco formas diferentes de hemoglobina, en concreto oxi-, desoxi-, carboxi-, met- y sulfhemoglobina, son similares y significativas. De esta manera, la absorción en este intervalo de longitud de onda dependerá solo ligeramente de la distribución entre las diferentes formas de hemoglobina en la sangre. Especialmente, a 506 nm, la diferencia entre las absorbancias de oxi- y desoxihemoglobina es próxima a cero. Puesto que estas formas de hemoglobina son predominantes en sangre normal, la absorción de oxi- y desoxihemoglobina podría usarse ventajosamente para determinar un coeficiente de absorción para relacionar una absorción medida con la concentración de hemoglobina a 506 nm. Por consiguiente, se hacen algunas suposiciones respecto a los contenidos de las diferentes formas de hemoglobina en la muestra de sangre. De esta manera, la determinación de hemoglobina no será tan precisa, o el procesamiento de los resultados de medición tendrá que modificarse, si se hace una medición sobre una muestra de sangre que tiene una distribución muy diferente de las formas de hemoglobina. Adicionalmente, las mediciones solo determinarán la concentración total de hemoglobina y no las concentraciones de las formas específicas de hemoglobina.

15 Se realiza una segunda medición de absorción a una longitud de onda, donde la absorción de luz en sangre es sustancialmente menor. Dicha medición de absorción se realiza a una longitud de onda en el intervalo de 650-1200 nm. Las diferencias entre las mediciones de absorción se consideran entonces que se deben a la absorción de hemoglobina.

20 Sin embargo, la dispersión de luz varía con la concentración de hemoglobina en la muestra, pero la dispersión de luz no solo depende de la concentración de hemoglobina. La dispersión de la luz se debe a la interacción de la luz con las partículas en la sangre, tales como glóbulos rojos, glóbulos blancos y partículas lipídicas. De acuerdo con la invención, se ha encontrado inesperadamente que el efecto de dispersión puede estar relacionado con el resultado medido en la segunda medición de absorción, como se explicará con referencia al diagrama esquemático en la Figura 2. En la Figura 2, la línea continua ilustra, esquemáticamente, la absorción medida en una primera muestra, que tiene una alta concentración de hemoglobina. La absorción incluye tanto absorción verdadera como luz dispersada, de manera que no alcanza un detector. La línea discontinua en la Figura 2 ilustra, esquemáticamente, la absorción medida en una segunda muestra, que tiene una menor concentración de hemoglobina. Debe observarse que el diagrama esquemático en la Figura 2 solo enfatiza las características principales de la absorción de muestras de sangre completa, y no ilustra la absorción de muestras reales. Como puede verse en la Figura 2, la diferencia en la absorción para la primera muestra, entre la primera longitud de onda a 506 nm y una segunda longitud de onda a 880 nm, es sustancialmente igual a la diferencia correspondiente de absorción para la segunda muestra. Por lo tanto, si la concentración de hemoglobina se determina directamente a partir de las diferencias en las absorciones medidas, se devolvería un resultado erróneo, al menos para una de las muestras. De esta manera, será necesaria una compensación para la dispersión de la luz y, de acuerdo con la invención, se ha encontrado que una compensación para el nivel de absorción tendrá en cuenta la dispersión, y posibilita una determinación de hemoglobina sencilla.

35 Se ha determinado empíricamente que, cuando se usa una compensación que es proporcional al nivel de absorción, puede obtenerse un valor correcto de la concentración de hemoglobina.

40 De acuerdo con lo anterior, los resultados de las mediciones de absorción deberían procesarse para determinar la concentración de hemoglobina en la muestra. Este procesamiento puede realizarse mediante un algoritmo predeterminado. Este algoritmo calcula la concentración de hemoglobina de acuerdo con el esquema descrito anteriormente.

45 La compensación para la dispersión de la luz depende, preferiblemente, del resultado de la segunda medición de absorción. La función de compensación podría determinarse realizando las mediciones de absorción en un conjunto de muestras de sangre que tienen concentraciones conocidas de hemoglobina. Estas mediciones de absorción se realizan en el dispositivo de medición que se va a usar. Después, la compensación necesaria para la dispersión de la luz, para obtener los resultados correctos, se compara con los valores de la segunda medición de absorción. De esta manera, puede encontrarse que una función de la segunda medición de absorción daría una compensación de manera que las concentraciones determinadas de hemoglobina caerían dentro de un margen de error aceptable.

50 En un modelo simplificado, la compensación depende linealmente del resultado de la segunda medición de absorción, al menos en un intervalo del resultado de la segunda medición de absorción. Este intervalo del resultado de la segunda medición de absorción puede abarcar valores típicos de la segunda medición de absorción, que se obtienen con el dispositivo de medición específico.

55 El procesamiento puede determinar la concentración de hemoglobina en la muestra calculando la siguiente fórmula:

$$[\text{Tot Hb}] = (\text{Abs}_1 - \text{Abs}_2) \cdot k + F(\text{Abs}_2)$$

5 en la que [Tot Hb] es la concentración total de hemoglobina en la muestra, Abs_1 es la absorbancia medida de la primera medición de absorción, Abs_2 es la absorbancia medida de la segunda medición de absorción, k es un coeficiente de calibrado, que depende del dispositivo de medición y $F(\text{Abs}_2)$ es una función que depende de la
 10 absorción medida de la segunda medición de absorción. El coeficiente de calibrado k puede ser específico para cada instrumento usado para la determinación de hemoglobina. La función de compensación $F(\text{Abs}_2)$ puede tener una parte constante, que también es un calibrado para cada instrumento, y una parte variable, que depende del resultado de la segunda medición de absorción y se obtiene como se ha descrito anteriormente. En este caso, la parte variable puede ser cero para un resultado de la segunda medición de absorción que está en el centro del intervalo de los resultados de la segunda medición de absorción.

15 Con referencia ahora a la Figura 3, se describirá un sistema que implementa el método descrito anteriormente. El sistema comprende un medio 10 para emitir luz a una primera longitud de onda, en un primer intervalo de 490-520 nm, y a una segunda longitud de onda, en un segundo intervalo de 650-1200 nm. Este medio 10 para emitir luz puede implementarse mediante una combinación de una fuente de luz que emite a varias longitudes de onda, o en un amplio intervalo de longitudes de onda, junto con los filtros. De esta manera, la fuente de luz se dispone para emitir luz tanto a la primera longitud de onda como a la segunda longitud de onda. Usando el filtro, la longitud de onda emitida se controlaría selectivamente para que estuviera dentro de uno de estos intervalos. Como alternativa, pueden usarse una primera y una segunda fuentes de luz para emitir a la primera y segunda longitudes de onda, respectivamente. Pueden usarse diodos emisores de luz como fuentes de luz. Después,
 20 encendiendo y apagando las dos fuentes de luz, el medio 10 para emitir luz puede controlarse selectivamente para emitir luz en la primera o en la segunda longitud de onda.

25 Preferiblemente, la primera longitud de onda emitida por el medio 10 para emitir luz está en el intervalo de 500-510 nm, más preferiblemente a 506 nm. Adicionalmente, la segunda longitud de onda emitida por el medio 10 para emitir luz preferiblemente está en el intervalo de 850-910 nm y, más preferiblemente, en el intervalo de 860-900 nm.

30 El sistema comprende, adicionalmente, un soporte de cubeta 12 dispuesto para recibir una cubeta capilar, que tiene una longitud de trayectoria óptica menor de 1 mm y que contiene una muestra de sangre completa, no alterada. Cuando se pone una cubeta en el soporte 12, la ventana óptica estará situada correctamente de manera que se irradiará con la luz de la fuente de luz. Preferiblemente, el soporte de cubeta está dispuesto para recibir una cubeta que tiene una longitud de la trayectoria óptica de menos de 0,2 mm y, más preferiblemente, en el intervalo de 0,05-0,2 mm.

35 La luz transmitida a través de la muestra se detectará por un detector 14, de manera que la primera medición de absorción pueda obtenerse para la luz en el primer intervalo y una segunda medición de absorción pueda obtenerse para luz en el segundo intervalo.

El sistema comprende, adicionalmente, una unidad de procesamiento 16 para procesar los resultados de la primera y segunda mediciones de absorción para determinar la concentración de hemoglobina en la muestra, de acuerdo con el algoritmo descrito anteriormente.

40 El sistema puede implementarse adecuadamente en un fotómetro que comprende el medio 10 para emitir luz, el soporte de cubeta 12 y el detector 14. Los fotómetros adecuados para realizar estas mediciones pueden obtenerse usando fotómetros modificados con filtros de la longitud de onda adecuada, y diodos emisores de luz. Preferiblemente, un fotómetro mide la absorbancia a las dos longitudes de onda y un microprocesador interno calcula, de acuerdo con un algoritmo programado, la concentración total de hemoglobina en sangre. De esta manera, no es necesario un filtro de absorción o interferencia especial que proporcione corrección para las variaciones en la sensibilidad del detector y en la longitud de la trayectoria óptica eficaz, como se describe en el documento WO 01/53806.
 45

En el caso anterior, la unidad de procesamiento 16 está embebida en el fotómetro. Sin embargo, la unidad de procesamiento 16 puede estar conectada también al fotómetro y, de esta manera, implementarse fuera del fotómetro. Por ejemplo, puede usarse un ordenador conectado al fotómetro.

50 El detector 14 puede disponerse para detectar básicamente solo la luz transmitida directamente, puesto que no es necesario detectar la luz dispersada. Esto implica que el detector 14 detecte la luz que está básicamente dentro del diámetro del rayo de luz irradiado sobre la muestra y transmitida directamente a través de la muestra. Por supuesto, algo de luz puede dispersarse mientras que aún está dentro de este diámetro. Preferiblemente, el diámetro de un área de detección de un detector 14 puede ser, típicamente, de aproximadamente 2 mm. El detector 14 se dispone preferiblemente más cerca de 10 mm al portamuestras. Esto implica que se detecta la luz que se ha dispersado a pequeños ángulos.
 55

El siguiente ejemplo no limitante ilustra el método de la invención.

5 Se encontró que el periodo de tiempo para analizar la sangre era aproximadamente 30 segundos más corto para el método de la invención, en una comparación con el método para determinar la hemoglobina en las microcubetas HemoCue conocidas, usadas actualmente. Esto permite una reducción clara del tiempo total de la determinación de hemoglobina, que puede ser ventajoso en hospitales ajetrechos y en otras situaciones donde se hacen muchas determinaciones. Otra ventaja es que no hay necesidad de una cubeta que contenga reactivos activos o agente de hemólisis. De esta manera, el almacenamiento de las cubetas no es sensible a la temperatura y la humedad en el entorno de almacenamiento, lo que hace que la manipulación de las cubetas antes de su uso sea mucho más sencilla.

10 En la Figura 4A se describe una evaluación preliminar del nuevo método, en comparación con el método HemoCue. La evaluación se realizó en condiciones de laboratorio. Como puede verse, la concordancia entre los métodos es muy buena.

Las mediciones de absorción espectrofotométrica se realizaron a aproximadamente 570 nm para el método conocido, y a aproximadamente 505 nm para el nuevo método. Para ambos métodos se realizaron mediciones compensatorias a aproximadamente 880 nm.

15 Adicionalmente, en la Figura 4B se describe una segunda evaluación del nuevo método, en comparación con el método ICSH convencional. Como puede verse, la concordancia entre estos métodos también es muy buena.

20 Lo anterior ha sido una descripción de una cierta realización preferida de la presente invención, aunque no se pretende limitar la invención de ninguna manera. En lugar de ello, pueden hacerse muchas modificaciones, variaciones y cambios en los detalles dentro del alcance de la presente invención, como se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar una concentración de hemoglobina total en una muestra de sangre completa, no diluida y no hemolizada, a partir de los resultados de las mediciones de absorción sobre la muestra,

5 **caracterizado por que** se realizan dos, y solo dos, mediciones de absorción, en el que una primera de las dos mediciones de absorción sobre la muestra se realiza a una longitud de onda en el intervalo 490-520 nm, y una segunda de las dos mediciones de absorción en la muestra se realiza a una longitud de onda en el intervalo de 650-1200 nm, donde la absorción es sustancialmente menor que para la primera medición de absorción, comprendiendo dicho método:

10 procesar los resultados de la primera y segunda mediciones de absorción para determinar la concentración de hemoglobina en la muestra, en el que el paso de procesamiento comprende compensar la dispersión en la muestra, dependiendo dicha compensación del resultado de la segunda medición de absorción.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho procesamiento determina la concentración de hemoglobina en la muestra calculando la siguiente fórmula:

$$[\text{Tot Hb}] = (\text{Abs}_1 - \text{Abs}_2) \cdot k + F(\text{Abs}_2)$$

15 en la que [Tot Hb] es la concentración total de hemoglobina en la muestra, Abs_1 es la absorbancia medida de la primera medición de absorción, Abs_2 es la absorbancia medida de la segunda medición de absorción, k es un coeficiente de calibrado, que depende del dispositivo de medición y $F(\text{Abs}_2)$ es una función que depende de la absorbancia medida de la segunda medición de absorción.

20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la primera medición de absorción se realiza a una longitud de onda en el intervalo de 500-510 nm, más preferiblemente a 506 nm.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la segunda medición de absorción se realiza a una longitud de onda en el intervalo de 850-910 nm, más preferiblemente en el intervalo de 860-900 nm.

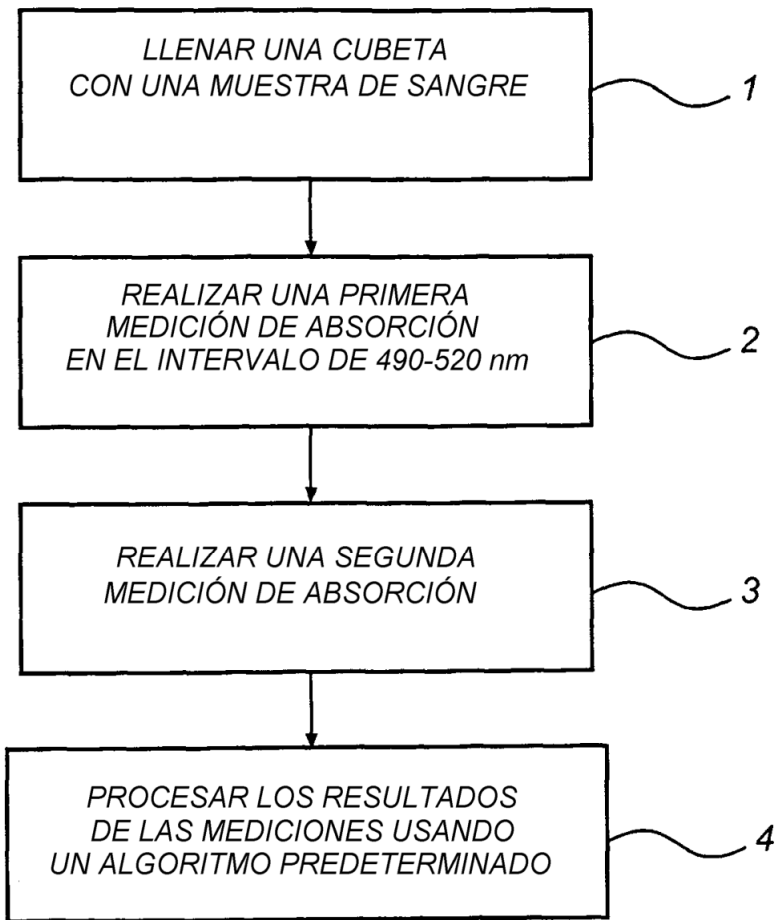


Fig. 1

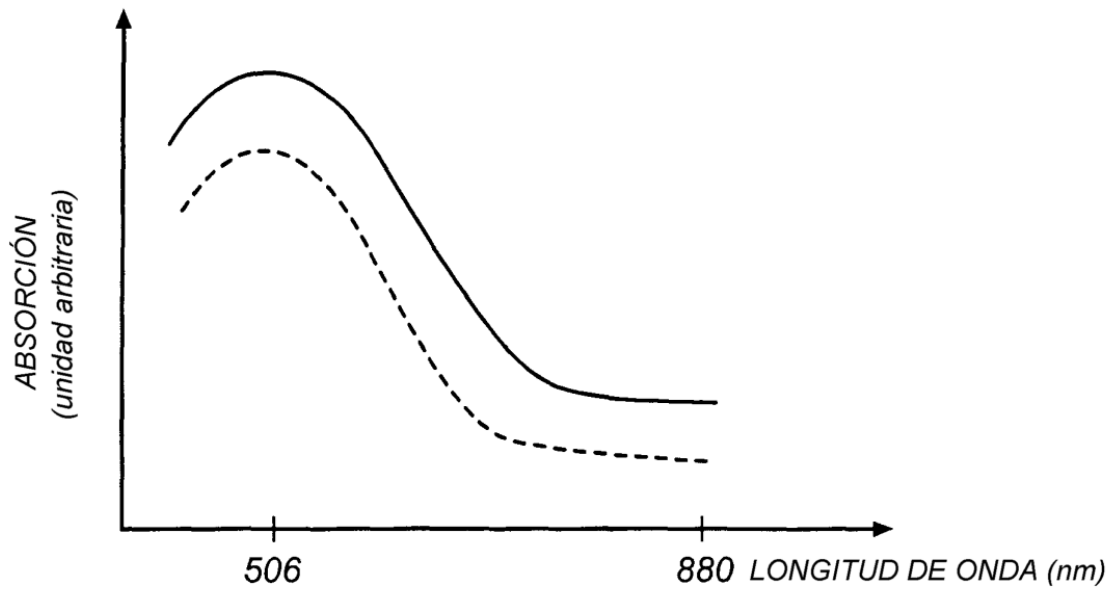


Fig. 2

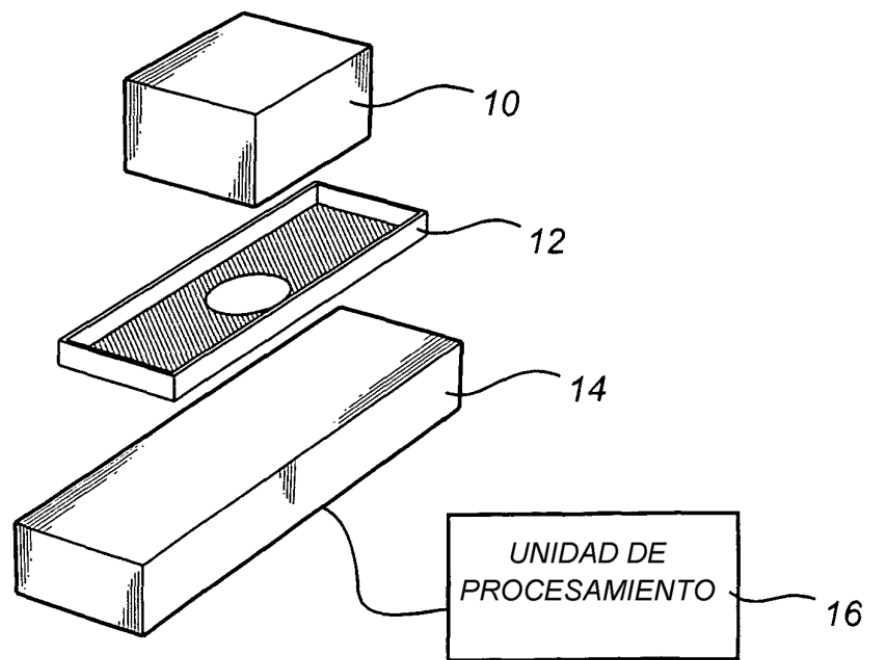


Fig. 3

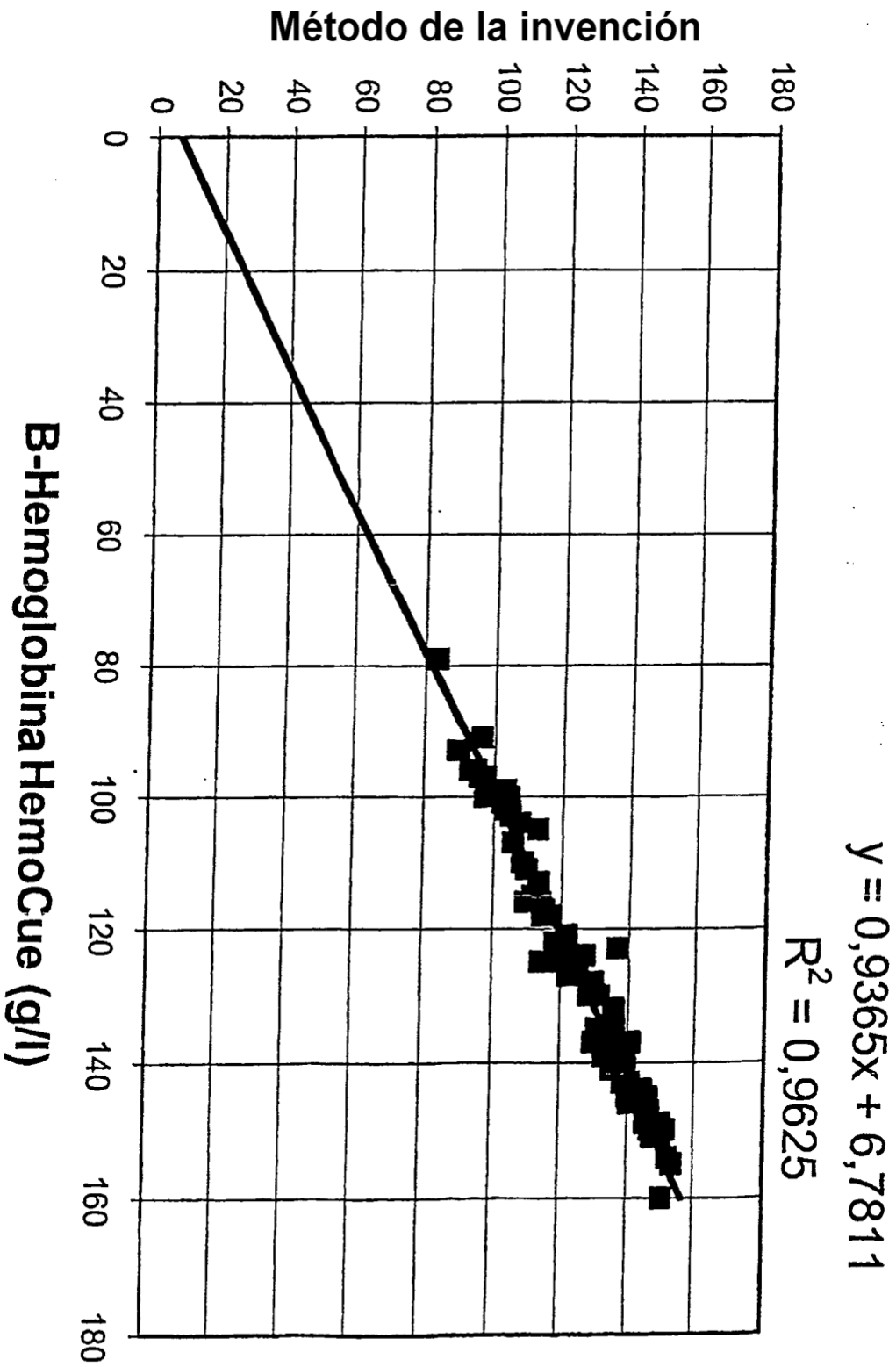


Fig. 4A

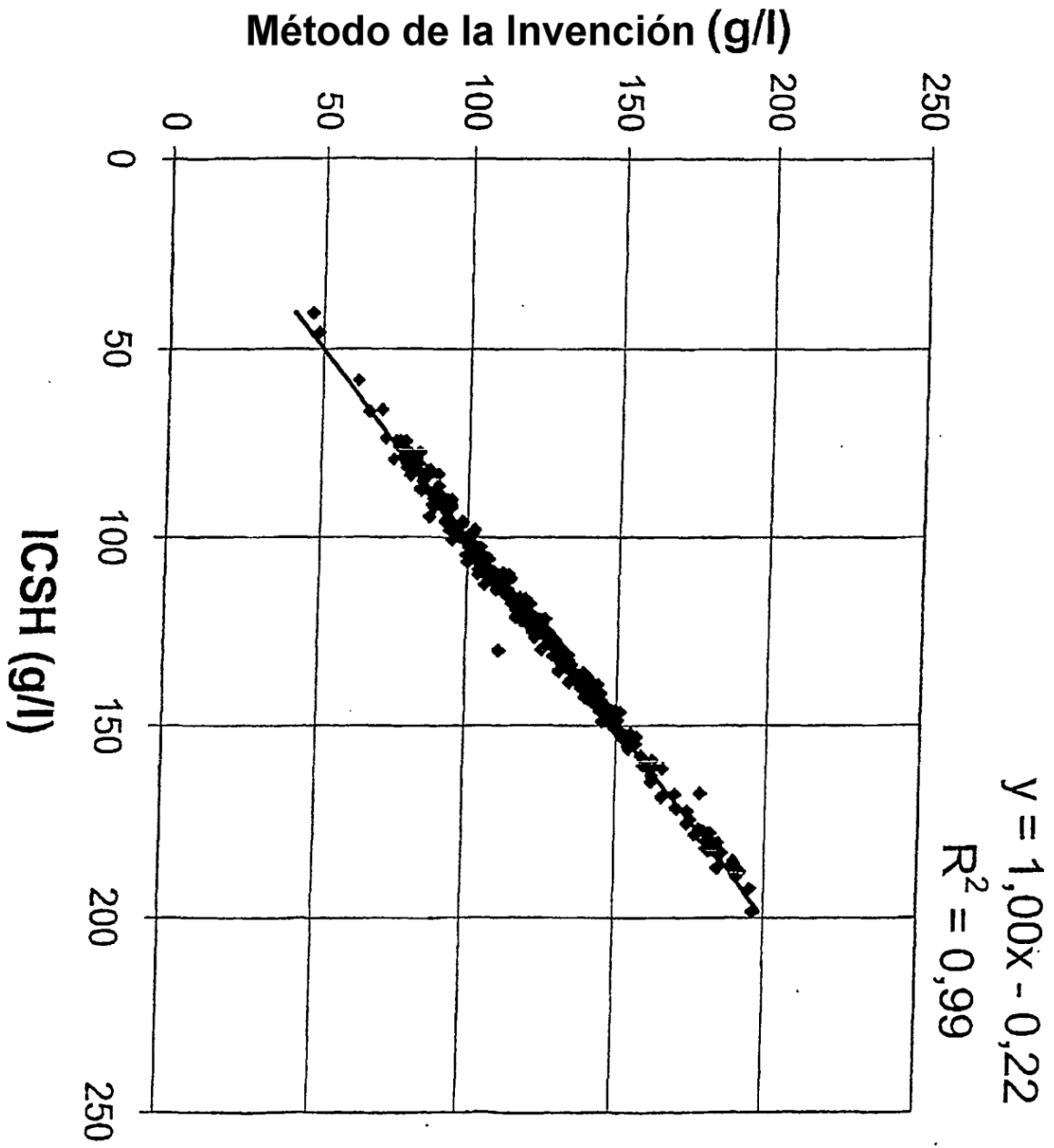


Fig. 4B