

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 320**

51 Int. Cl.:  
**A61B 5/00**

(2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03718220 .1**

96 Fecha de presentación: **04.04.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1494577**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2005**

54 Título: **Análisis espectroscópico de tejido para detectar diabetes**

30 Prioridad:  
**04.04.2002 US 116272**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.07.2012**

73 Titular/es:  
**VERALIGHT, INC.  
800 BRADBURY, S.E.  
ALBUQUERQUE, NM 87106, US**

72 Inventor/es:  
**DAVIS, Herbert T., III;  
ROWE, Robert K. y  
VANSLYKE, Stephen J.**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 384 320 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

Análisis espectroscópico de tejido para detectar diabetes

## CAMPO TÉCNICO

5 El presente invento se refiere en general al campo de la espectroscopia diagnóstica. Más específicamente el presente invento proporciona un método y aparato para la selección o diagnóstico rápida no invasiva de diabetes en un individuo irradiando tejido con luz que comprende al menos una longitud de onda mayor de 500 nm y menor de 3300 nm, recogiendo y midiendo información óptica procedente del tejido y aplicando técnicas multivariantes a la información óptica para predecir la probabilidad de que un sujeto tenga diabetes.

## TÉCNICA ANTERIOR

10 En 1997, se estimó que 15,7 millones de personas en los Estados Unidos de Norteamérica tenían diabetes, de las cuales aproximadamente 10,3 millones fueron diagnosticados y 5,4 millones estaban sin diagnosticar. Debido al estilo de vida Norteamericano de dieta pobre y teniendo sobrepeso, la incidencia de la diabetes está resultando de proporciones epidémicas. La diabetes de tipo II representa el 90 a 95% de todos los casos de diabetes en los Estados Unidos de Norteamérica, haciendo de ello y de sus consecuencias clínicas y económicas previsibles uno de los principales problemas de salud pública. Aunque la prevalencia de la diabetes en los Estados Unidos de Norteamérica es de aproximadamente el 5% de la población, el cuidado de la diabetes representa aproximadamente el 15% de los gastos de asistencia médica.

20 La hiperglicemia crónica de diabetes está asociada con daños, disfunciones, y fallos de varios órganos a largo plazo, especialmente de los ojos, riñones, nervios, corazón, y vasos sanguíneos. La mayoría de los casos de diabetes de tipo I son detectados poco después de desarrollar síntomas, lo que no sucede para la diabetes de tipo II. Los individuos con diabetes de tipo II sin diagnosticar tienen un riesgo significativamente mayor de enfermedad coronaria cardíaca, derrame cerebral o ictus, y enfermedad periférica vascular que la población no diabética. También tienen una mayor probabilidad de tener dislipidemia, hipertensión, y obesidad. La detección temprana puede reducir la carga de la diabetes de tipo II y sus complicaciones así como reducir las consecuencias económicas.

25 Las pruebas para la diabetes generalmente pueden ser divididas en dos categorías, pruebas diagnósticas y selección. "Indicar diabetes" se ha usado aquí para referirse a una cualquiera, o ambas, de estas. Cuando un individuo presenta síntomas o signos de enfermedad, se le realizan pruebas diagnósticas y tales pruebas confirman si la enfermedad está presente. El propósito de la selección es identificar a un individuo generalmente asintomático que tiene un alto riesgo de desarrollar la enfermedad o está en las primeras etapas de la enfermedad cuando los síntomas son difíciles de identificar.

30 Se han desarrollado dos dispositivos de selección para diabetes, ambos de los cuales son cuestionarios basados en factores de riesgo para la diabetes.

35 En 1993, la ADA distribuyó un cuestionario titulado "Hágase la prueba. Conozca el resultado". Este cuestionario evaluaba los posibles síntomas y los factores de riesgo históricos. Se daban puntos para ciertas respuestas; una puntuación menor o igual a 5 puntos era considerada de bajo riesgo para la diabetes, y una puntuación mayor de 5 puntos era considerada de alto riesgo. Las pruebas subsiguientes entre las poblaciones tanto de los Estados Unidos de Norteamérica como del Reino Unido encontraron que la prueba realizada era bastante pobre. Dos años más tarde, se desarrolló otro cuestionario en los Estados Unidos de Norteamérica con datos procedentes de la Segunda Salud Nacional y Vigilancia de Examen Alimenticio. Una prueba del cuestionario en la población en la que se desarrolló encontró una sensibilidad del 79% (es decir, el 79% de los diabéticos fueron identificados como diabéticos), una especificidad del 65% (es decir, el 35% de los no diabéticos fueron identificados como diabéticos), y un PPV (valor predictivo positivo) del 10% (es decir, una indicación positiva de la selección significa que el sujeto tiene un 10% de probabilidad de tener realmente diabetes).

40 Otro cuestionario, desarrollado en la población del Estudio de Hoom de Holanda, incorporaba posibles síntomas, características demográficas y clínicas, y preferencias de ejercicio. Cuando fue subsiguientemente evaluado en un subgrupo separado de la población del Estudio de Hoom, este cuestionario encontró tener una sensibilidad del 56%, una especificidad del 72% y un rendimiento ligeramente mejor que el cuestionario ADA para esta población.

45 En resumen, los cuestionarios para la selección de diabetes, incluso con intentos de identificar síntomas, resultan bastante más pobres que las pruebas de selección por sí solas. Además, son la evidencia de la necesidad de una prueba de selección exacta para identificar aquellos con un alto riesgo de desarrollar diabetes o aquellos que están en las primeras etapas de la diabetes antes del desarrollo de síntomas presentes en un estado de enfermedad posterior.

50 En contraste con los cuestionarios de selección, dos tipos de pruebas son dispositivos de diagnóstico actualmente aceptables para la diabetes. La prueba de glucosa de plasma rápida (FPG) requiere no consumir alimentos ni bebidas distintas del agua durante las ocho horas anteriores a la prueba. Una muestra intravenosa de sangre es extraída y analizada. Si las pruebas de FPG dan como resultado un nivel de glucosa superior a 126 mg/dl, la prueba debe ser

repetida en una fecha posterior. Si ambos valores de glucosa FPG son superiores a 126 mg/dl, el paciente es diagnosticado como que tiene diabetes. La prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) consiste en una exigencia de glucosa oral de 75 g. Una muestra de sangre de carga posterior a las dos horas con un valor de 200 mg/dl o mayor es también una indicación para repetir la prueba. Aunque la OGTT es la más exacta de las dos, la FPG requiere menos tiempo por parte del sujeto y es usualmente recomendada por su conveniencia en lugar de por su exactitud.

La ADA recomienda usar pruebas invasivas basadas en sangre que son usadas para la diagnosis de diabetes como dispositivos de selección. El criterio es que si una prueba de glucosa de plasma rápida (FPG) da como resultado un valor de 126 mg/dl o mayor; o si una prueba de glucosa de plasma ocasional da como resultado un valor de 200 mg/dl o mayor; o si una OGTT de 75 g da como resultado un valor de 200 mg/dl o mayor dos horas más tarde, el paciente es un candidato para la diagnosis de diabetes. Si en un segundo día, uno de los criterios es cumplido una segunda vez, entonces está justificada una diagnosis de diabetes. Se cree, sin embargo, que estas pruebas no proporcionan capacidad de selección, cuando son incapaces para identificar a aquellas personas con un alto riesgo de desarrollar diabetes o a aquellas que se encuentran en las primeras etapas de la enfermedad.

Se conoce otro conjunto de pruebas relacionadas con la diabetes que no son utilizadas para selección o diagnosis, sino como una medida del cumplimiento a largo plazo del paciente con el programa terapéutico y el control del paciente de la enfermedad. Estas pruebas están basadas en proteínas glicosiladas. La glucosa atacará en un límite covalente a proteínas en una tasa proporcional al nivel de glucosa. Este proceso es irreversible y así la proteína permanecerá glicosilada para el resto de su vida. La acumulación de proteínas glicosiladas depende de la vida media de la proteína. La fructosamina es el producto de proteínas de suero glicosiladas que tienen una tasa de renovación normal de dos a tres semanas. Por lo tanto, la fructosamina es un marcador de control de glucosa sobre el mes anterior. Aunque hay algunos instrumentos de prueba para fructosamina corrientemente disponibles, no son comúnmente aceptados por los expertos en diabetología debido a la corta ventana de tiempo. La hemoglobina glicosilada (HbA1c) es el resultado de glicosilación de glóbulos rojos de sangre que tiene una renovación normal de ocho a diez semanas. Por lo tanto, HbA1c es un marcador para el control de glucosa para los dos o tres meses anteriores. Otros proceso de glicosilacion que se ha sido indicado es colágeno glicosilado (furosina). El colágeno glicosilado tiene una vida muy larga y un turn-over lento. Se ha encontrado hasta un aumento de trece veces en el colágeno glicosilado en algunos pacientes con diabetes diagnosticada.

El concepto de utilizar métodos multivariantes para clasificar elementos en poblaciones parentales fue propuesto en primer lugar por Fisher en 1936. Con la aparición del ordenador en los años 60, varios autores propusieron utilizar técnicas diferentes para la diagnosis por ordenador de la enfermedad. Las técnicas propuestas incluían análisis discriminante lineal (LDA), análisis discriminante cuadrático (QDA) y regresión logística (LR). La diagnosis de diabetes que utiliza técnicas multivariantes fue propuesta por Glesser en 1972 donde fue recomendada para combinar los resultados de OGTT con otros factores ambientales tales como edad, sexo, peso, etc.

Geladi y colaboradores, dirigieron un estudio que buscaba utilizar mediciones espectroscópicas multivariantes próximas a los infrarrojos (NIR) con diabéticos y no diabéticos. El artículo describía las consecuencias de los cambios en las microbacterias y el flujo de sangre disminuido resultante que da como resultado edemas en el tejido. El artículo describe el uso de Análisis de Impedancia Bioeléctrica Multi-frecuencia así como espectroscopia próxima a los infrarrojos para detectar el daño en la piel. Los autores observan una diferencia en el espectro entre diabéticos y no diabéticos, relativa a diferencias en el daño de las microarterias. Un dispositivo de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1 es conocido por el documento EP 631.137.

#### EXPOSICIÓN DEL INVENTO

El presente invento incluye un aparato para determinar la probabilidad, la progresión o el nivel de diabetes en un individuo y un método para indicar un alto riesgo de desarrollar diabetes. El aparato puede ser utilizado para detectar la diabetes de tipo II antes de que sea clínicamente identificable a través de otros métodos actualmente en uso tales como la prueba de tolerancia a la glucosa oral o la prueba de glucosa de plasma rápida.

El aparato del presente invento incluye la utilización en vivo de espectroscopia próxima a los infrarrojos en la región de 20.000 a 3.000  $\text{cm}^{-1}$  (500 a 3.300 nm) bien para detectar, o seleccionar, o diagnosticar, y establecer la progresión de complicaciones o predecir una probabilidad de diabetes de tipo II en un individuo. La información óptica puede ser usada para generar un predictor o vaticinador de enfermedad que usa técnicas multivariantes tales como análisis discriminatorios, análisis discriminatorios cuadráticos, regresión logística, redes nerviosas o cuadrados parciales. Una base de discriminación en los métodos descritos aquí esta basada al menos en parte en la detección de colágeno glicosilado (furosina) en el tejido que se está analizando.

Así, la luz utilizada incluye al menos una longitud de onda indicativa de productos finales de glicosilacion que es evidenciada al menos en parte por el contenido de colágeno glicosilado en el tejido. Además, la información óptica analizada resultante o los datos espectrales también incluyen información o una medición de luz desde al menos una longitud de onda indicativa de productos finales de glicosilacion, evidenciada por el contenido de colágeno glicosilado en el tejido. En una realización, al menos una longitud de onda indicativa del contenido de colágeno glicosilado incluye una

longitud de onda seleccionada a partir de las siguientes bandas: 2.240 nm-2.300 nm, 2.145 nm-2.200 nm, 2.025 nm-2.060 nm, y 1.670 nm-1.745 nm.

5 En otra realización del presente invento, la fuente de luz y la información óptica de tejido resultante o datos espectrales incluye al menos una segunda longitud de onda y una información o medición de longitud de onda indicativa del contenido de colágeno glicosilado en el tejido. De nuevo, esta segunda longitud de onda puede ser seleccionada a partir de las bandas descritas anteriormente.

Un dispositivo de acuerdo con el invento se ha definido en la reivindicación 1, un método en la reivindicación 8.

10 Un sistema puede además incluir un subsistema de espectrómetro FTIR acoplado óptimamente al subsistema de muestreo del tejido para recibir al menos una parte de la luz reflejada de forma difusa desde el tejido, incluyendo el subsistema de espectrómetro FTIR un espectrómetro que crea un interferograma y un detector que recibe el interferograma y lo convierte en una representación eléctrica. El sistema puede incluir además un subsistema de adquisición de datos que recibe la representación eléctrica del interferograma e incluye medios para amplificar y filtrar la representación eléctrica y convertir la señal eléctrica resultante a su representación digital. El sistema puede también  
15 incluir un subsistema de cálculo para recibir la representación digital que incluye además un modelo de calibración derivado de un análisis multivariante para detectar la probabilidad, progresión o nivel de diabetes en el que el modelo de calibración incluye al menos un factor dependiente de la medición de al menos una longitud de onda indicativa de productos finales de glicosilación como evidenciado por el contenido de colágeno glicosilado en el tejido humano. El algoritmo puede ser utilizado para clasificar al individuo como diabético o no diabético.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 La fig. 1 es un gráfico que representa la diferencia en un espectro medio de una población de muestra de individuos diabéticos y no diabéticos comparada con el espectro de colágeno;

La fig. 2 es un gráfico que representa la distancia discriminativa entre diabéticos y no diabéticos en un conjunto de datos espectrales recogidos;

La fig. 3 es un gráfico que representa la distancia de Mahalanobis para los datos de la fig. 2;

25 La fig. 4 es una representación esquemática de un sistema espectrómetro no invasivo;

La fig. 5 es una vista diagramática de un sistema que incorpora filtros que eliminan longitudes de onda seleccionadas de radiación desde la fuente de iluminación;

La fig. 6 es una vista en perspectiva de elementos de un subsistema de muestreo de tejido;

30 La fig. 7 es una vista plana de la superficie de muestreo del subsistema de muestreo del tejido de la fig. 6 que ilustra una disposición de extremos de fibra óptica de entrada y salida;

La fig. 8 es una vista en perspectiva de un aparato ergonómico para sujetar la superficie de muestreo y posicionar una superficie de tejido en él; y

La fig. 9 es una vista esquemática simplificada de un espectrómetro FTIR.

#### MODOS PARA LLEVAR A LA PRÁCTICA EL INVENTO Y APLICABILIDAD INDUSTRIAL

35 La siguiente descripción detallada debe ser leída con referencia a los dibujos en los que elementos similares han sido numerados igualmente en dibujos diferentes. Los dibujos, que no están necesariamente a escala, representan realizaciones ilustrativas que no se pretende que limiten el marco del invento.

40 Las realizaciones del presente invento incluyen aparatos y métodos útiles para proporcionar una diagnosis exacta y rápida de la diabetes sin los inconvenientes que incumben de la actual prueba de glucosa de plasma rápida actual o de la prueba de tolerancia a la glucosa oral. Los métodos y aparatos pueden también ser utilizados para seleccionar diabetes, incluyendo la diabetes de tipo II, antes de que sea clínicamente identificable a través de otros métodos actualmente en uso. El método utiliza la espectroscopia próxima al infrarrojo para interrogar de forma no invasiva al tejido del sujeto para detectar la presencia o progresión de la diabetes.

45 El método, en una realización, incluye la utilización en vivo de espectroscopia óptica con números de longitud de onda en la región de 20.000 a 3.000  $\text{cm}^{-1}$  (longitudes de onda en la región de 500 a 3300 nm) para seleccionar o diagnosticar la diabetes mellitus de tipo II. La información óptica que puede ser tratada en forma de espectros puede ser utilizada para generar un vaticinador de enfermedad utilizando métodos multivariantes tales como análisis discriminativo lineal, análisis discriminativo cuadrático, regresión logística, redes nerviosas, y regresión de cuadrados menos parcial. El método de discriminación esta basado en parte en detectar la evidencia de glucosa elevada como vista por el nivel de productos

5 finales de glicosilación preferiblemente evidenciada por colágeno glicosilado (furosina) en el tejido analizado.

5 Los individuos que han sido diagnosticados con diabetes tiene un nivel elevado de colágeno glicosilado y los niveles de colágeno glicosilado pueden ser utilizados como un marcador distintivo de control de glucosa a largo plazo. La solicitante ha encontrado que pueden utilizarse técnicas de espectroscópicas próximas al infrarrojo con técnicas multivariantes para  
5 proporcionar tanto selección como diagnóstico de diabetes basándose en cambios en el tejido asociado con los niveles crecientes de productos finales de glicosilación tales como colágeno glicosilado. Es posible que, cuando el colágeno se glicosila, se desenrede y se reticule lo que provoca un nivel aumentado de dispersión de la luz. El nivel incrementado de dispersión da como resultado más luz devuelta, o en otras palabras, menor absorción de luz. También, el colágeno glicosilado absorbe directamente luz alrededor de varias longitudes de onda características. En el presente invento, el  
10 tejido puede ser irradiado con luz que tiene al menos una longitud de onda que es indicativa del contenido de colágeno glicosilado en el tejido (por la dispersión aumentada o por absorción directa aumentada). Se han utilizado múltiples longitudes de onda o grupos de longitudes de onda de luz que son indicativos del nivel de colágeno glicosilado. Longitudes de onda adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, longitudes de onda seleccionadas de las siguientes bandas: 2.240 nm-2.300 nm, 2.145 nm-2.200 nm, 2.025 nm-2.060 nm, y 1.670 nm-1.745 nm.

15 La solicitante ha encontrado que la detección o selección de diabetes utilizando espectroscopia próxima al infrarrojo es facilitada midiendo la información óptica o el espectro de un tejido de un individuo y buscando picos identificados para la presencia de niveles elevados de productos finales de glicosilación en múltiples longitudes de onda. Así, en una realización para diagnosticar o seleccionar diabetes, los datos que comprenden información o espectros próximos al infrarrojo y lecturas de glucosa en sangre de no diabéticos, sujetos con tolerancia a la glucosa empeorada y diabéticos de tipo II recién diagnosticados son utilizados en los análisis multivariantes. La información óptica o espectros usados  
20 pueden corresponder a niveles de glucosa en sangre concurrentes menores que un cierto nivel máximo, por ejemplo 125 mg/dl, para impedir que los niveles de glucosa transitorios sean el vaticinador para el estado de la enfermedad. Pueden utilizarse otros métodos para delimitar el efecto del nivel de glucosa en sangre en un individuo particular. Una prueba de tolerancia a la glucosa rápida y una prueba de tolerancia a la glucosa oral también pueden ser administradas a los sujetos para confirmar su pertenencia a una de las tres clases anteriores. Los datos pueden incluir un número suficiente de  
25 sujetos en cada una de las tres categorías para desarrollar una calibración de forma que los algoritmos de discriminación desarrollados que utilizan esta base de datos crean vaticinadores que dan una determinación apropiada del estado de la enfermedad del individuo. Además, la información óptica y espectros son términos usados a lo largo de esta exposición. Sin embargo, se ha reconocido que medir un espectro es solo una de las muchas formas de codificar información óptica para análisis. En realizaciones preferidas, se han utilizado datos espectrales.

30 Para el desarrollo de la calibración, puede utilizarse una base de datos que incluye espectros próximos al infrarrojo, pruebas de tolerancia a la glucosa rápidas y resultados de prueba de tolerancia oral a la glucosa para al menos 3000 individuos que se cree que no son diabéticos. Una prueba de tolerancia a la glucosa oral rápida y una prueba de tolerancia a la glucosa oral pueden ser administradas a cada participante para determinar cual es el estado real de la enfermedad del sujeto. Dada la incidencia de la diabetes no diagnosticada en los Estados Unidos de Norteamérica, se cree que una muestra suficiente de aproximadamente 75 diabéticos de tipo II sin diagnosticar sería identificada en la base de datos por las pruebas de tolerancia a la glucosa empleadas. El diabético sin diagnosticar puede ser un sujeto preferido ya que la extensión de glicosilación de colágeno puede ser más típica para seleccionar que para uno que ya ha sido diagnosticado y está bajo algún tratamiento para la diabetes. Este método permite que se establezca una calibración exacta que ayude a la clasificación exacta de individuos recién analizados. También proporciona la base para seleccionar aquellos pacientes con un alto riesgo de desarrollar diabetes o que tienen diabetes, pero que aún no experimentan síntomas fácilmente identificables comparados con aquellos que han sido diagnosticados precozmente con diabetes.

35 Una base de datos adecuada puede también incluir la utilización de no diabéticos en una población de riesgo. Tal población puede incluir sujetos que tienen un sobrepeso serio o los parientes cercanos de pacientes con diabetes de tipo II. Otra población puede incluir no diabéticos procedentes de ciertos grupos étnicos con mucha propensión a la diabetes de tipo II tales como los Indios Prima. De nuevo, las pruebas de tolerancia a la glucosa oral pueden ser utilizadas en todos los sujetos para determinar su estado particular de la enfermedad.

40 La capacidad de la espectroscopia próxima al infrarrojo para medir un tejido de un individuo y la utilización de análisis multivariantes en una base de datos de individuos para clasificar la prueba individual basada en colágeno glicosilado puede ser ilustrada examinando y comprendiendo la progresión de productos finales glicosilados con el avance de la diabetes de tipo II. Por ejemplo, en sujetos pre-diabéticos hay una discordancia evidente entre la respuesta inicial de insulina a una carga de carbohidratos y la producción de glucosa resultante de esa carga. Esta discordancia da como resultado en una subida post-prandial prolongada de glucosa. La producción de productos finales glicosilados se cree proporcional al nivel de glucosa medio y a la duración de los niveles de glucosa incrementados. Esto da como resultado una tasa aumentada de glicosilación y una acumulación incrementada de productos finales de glicosilación como se ha evidenciado por la acumulación incrementada de materiales tales como colágeno glicosilado. La acumulación se cree que se amplifica por la persistencia extrema de colágeno. Como resultado, el colágeno glicosilado es un marcador precoz para las excursiones post-prandiales excesivamente elevadas en pacientes pre-diabéticos y precoces. Cuando la diabetes  
55

progresar al estado de diabetes franca, el nivel de glucosa es elevado permanentemente. Si el paciente recibe cuidado médico para controlar los niveles de glucosa, la tasa de glicosilación alcanza un estado de equilibrio. Por consiguiente, la subida más rápida en la glicosilación de colágeno se cree que sucede pronto en la progresión de diabetes. Este es exactamente el estado cuando la selección o diagnóstico es más deseable y efectiva en la gestión a largo plazo de la enfermedad. Debido a la larga vida del colágeno, la acumulación de colágeno glicosilado es rápida en la etapa temprana antes de que se haya alcanzado algún tipo de equilibrio. Esto hace del colágeno glicosilado un marcador sensible para vigilar la progresión temprana de diabetes mellitus. Además, la larga vida del colágeno hace del colágeno glicosilado un marcador de control a largo plazo y es un marcador de complicaciones diabéticas que lo hace útil para diagnosticar la etapa de la enfermedad.

Para mostrar la capacidad para diagnosticar diabetes de tipo II con espectroscopia próxima al infrarrojo combinada con análisis multivariantes, utilizando el método y aparato del presente invento, se ha desarrollado un conjunto de datos experimental utilizando 18 diabéticos de tipo II con buen control de glucosa y 20 no diabéticos. Los diabéticos cubrían un margen que iba desde 1 año a partir de la diagnosis hasta 10 años. Las respuestas ópticas de su tejido fueron recogidas utilizando un espectrómetro de infrarrojos de transformada Fourier (FTIR) y un sistema como se ha descrito aquí. Las mediciones fueron realizadas en el lado inferior del antebrazo. Se usaron un total de 913 espectros próximos al infrarrojo siendo 461 de los espectros próximos al infrarrojo diabéticos del tipo II, y 452 espectros de no diabéticos. Las mediciones de glucosa en sangre correspondientes fueron realizadas utilizando sangre capilar medida con un analizador de sangre de Yellow Springs Instruments, Inc. Solo se utilizaron mediciones próximas al infrarrojo que corresponden a un nivel de glucosa en sangre menor o igual a 125 mg/dl con el fin de impedir que el nivel de glucosa fuera el elemento delineante en la comparación entre diabéticos de tipo II y no diabéticos. Los espectros recogidos fueron seleccionados por inserción pobre del antebrazo en el dispositivo de muestreo de tejido del invento. Los espectros fueron también escalados con el espectro de intensidad media para hacer el ruido más homogéneo sobre el margen del número de onda.

La diferencia en espectros medios entre diabéticos de tipo II y no diabéticos es comparada con el espectro para colágeno en la fig. 1. Como puede verse, los picos de colágeno en 1.690 nm, 1.725 nm, 2.040 nm, 2.170 nm o 2.270 nm ( $4.400$ ,  $4.600$ ,  $4.900$ ,  $5.800$  y  $5.925$   $\text{cm}^{-1}$ ) son repetidos en los espectros de diferencia de diabéticos de tipo II y no diabéticos. Puede observarse una absorción incrementada en la región de agua frecuente de aproximadamente 1.425 nm ( $7.000$   $\text{cm}^{-1}$ ). Debería resaltarse que mientras la banda de agua de 1.920 nm ( $5.200$   $\text{cm}^{-1}$ ) tiene información similar, la absorbancia en esa banda es tan grande como para proporcionar una relación de señal a ruido muy baja.

El análisis de los datos muestra una capacidad para distinguir entre el estado de la enfermedad de diabéticos de tipo II y los no diabéticos. La fig. 2 muestra la separación para los dos grupos de la población enferma y no enferma. Se ha visto una distinción muy clara de los grupos. Además, se ha utilizado una función discriminadora de Bayesian para discriminar los diabéticos de tipo II de los no diabéticos. Utilizando la información de que aproximadamente el 10% de la población adulta de los Estados Unidos de Norteamérica tiene diabetes de tipo II, la función discriminadora de Bayesian produce las probabilidades posteriores para que los sujetos de los dos grupos sean no diabéticos como se ha mostrado en la fig. 3. El análisis de distancia Mahalanobis produce una sensibilidad del instrumento del 100%, una selectividad del 98,9% y un valor de predicción positivo del 98,9%. También puede ser calibrado en cada sujeto para dar estimaciones de la progresión de la enfermedad en un paciente pre-diabético así como un marcador de control de la enfermedad similar a la HbA1c. Los análisis de Bayesian también pueden utilizar una probabilidad anterior basada en factores de riesgo ambientales tales como los usados por la prueba de ADA "Hágase la prueba, conozca el resultado".

La descripción anterior muestra la capacidad de la presente exposición para diagnosticar diabetes. La capacidad del presente invento para seleccionar aquellos individuos a los que se les ha realizado la prueba que tienen un alto riesgo de desarrollar diabetes o aquellos que tienen diabetes en las etapas más tempranas es una extensión natural del modelo anterior. Puede desarrollarse una base de datos que incluya espectros de individuos un instante antes de ser capaz de diagnosticar diabetes utilizando las pruebas de tolerancia a la glucosa, aún subsiguientemente, de que estos individuos desarrollen la diabetes. Así, la base de datos puede ser desarrollada en el tiempo de modo que los espectros de aquellos que están en las primeras etapas de la diabetes son, de hecho, confirmados como indicativos del inicio de la enfermedad basándose en análisis conocidos posteriores en el tiempo. Esto puede requerir la vigilancia de muchos individuos durante un periodo de tiempo prolongado. Sin embargo, como se ha descrito previamente, la construcción de la base de datos puede estar focalizada en aquellos individuos que se cree tiene un alto riesgo de desarrollar diabetes basándose en la historia familiar y otros factores tales como los de los cuestionarios de selección. También, como se ha establecido previamente, una gran muestra de población de individuos aún sin diagnosticar identificará probablemente a muchos individuos precozmente en la progresión de la enfermedad. Además, la capacidad del presente invento para detectar los primeros cambios en colágeno glicosilado es mejorada por un sistema para la medición de los datos espectroscópicos en el tejido. Se han descrito a continuación realizaciones del aparato y método.

También en una realización del presente invento, puede desarrollarse un algoritmo para discriminar los miembros en la población dentro de una base de datos. El algoritmo puede utilizar cuadrados parciales menores (PLS) para reducir la dimensionalidad de los espectros próximos al infrarrojo junto con el análisis discriminador cuadrático ya que la variación de espectros próximos al infrarrojo para diabéticos es considerablemente mayor que la de los espectros próximos al

infrarrojo para no diabéticos. Los espectros en la base de datos constituyen la matriz rectangular con el número de filas igual al número de espectros próximos al infrarrojo y el número de columnas igual al número de frecuencias en el espectro. Las columnas de la matriz espectral están usualmente muy correlacionadas; sin embargo, el análisis discriminatorio puede trabajar mejor si la matriz puede ser transformada para que no sea correlacionada. De modo similar, la correlación entre columnas implica que pueden utilizarse menos columnas una vez transformadas. Aunque el análisis del componente principal (PCA) puede ser utilizado para realizar estas dos tareas, los cuadrados parciales mínimos (PLS) usados para predecir el estado de la enfermedad (diabéticos frente a no diabéticos) pueden lograr lo mismo al tiempo que hacen las columnas más altamente correlacionadas con la etapa de la enfermedad del sujeto y reduciendo el número de factores necesarios en la predicción.

Aunque puede utilizarse análisis discriminario lineal (LDA) para desarrollar un vaticinador del estado de la enfermedad, el LDA asume que la matriz de covarianza de los espectros dentro de cada grupo es la misma. Esta suposición, desafortunadamente, no es cierta cuando la población diabética es mucho más variable en distintas características, incluyendo sus espectros próximos al infrarrojo. Así, no se puede esperar que la matriz de covarianza sea igual sobre los diferentes grupos de etapas de la enfermedad. El análisis discriminario cuadrático (QDA), por otro lado, asume una matriz de covarianza diferente para cada población. Por tanto, el QDA puede ser utilizado para desarrollar los vaticinadores de estado de la enfermedad. Una derivación del LDA y del QDA es el clasificador de Bayesian que predice la probabilidad de diabetes. Los factores de riesgo para la diabetes pueden ser incorporados en la probabilidad anterior para un análisis de Bayesian. Otras etapas del tratamiento tales como una corrección de dispersión multiplicativa (MSC) y normalización no son necesarias obligatoriamente para discriminar con exactitud los espectros próximos al infrarrojo en cuanto al estado de la enfermedad del sujeto, aunque pueden ser utilizadas.

Un aparato para diagnosticar o seleccionar diabetes incorpora un subsistema de iluminación que genera luz próxima al infrarrojo, un accesorio de muestreo del tejido que irradia y recoge luz procedente de un tejido, un espectrómetro, un subsistema de adquisición de datos, un dispositivo de referencia para mantenimiento de calibración, una unidad de tratamiento, y coeficientes de calibrado basados en ciertos algoritmos multivariantes. Cada subsistema tiene un impacto significativo en la exactitud de las predicciones de presencia de la diabetes mellitus. Ejemplos de los primeros seis subsistemas adecuados para el presente invento están descritos en detalle en la Solicitud de Patente Norteamericana US 2003 0023152.

En una realización del sistema, la codificación espectral es realizada después de que la luz haya interactuado con el tejido. La fuente de luz puede ser un dispositivo de iluminación como se ha descrito en la Solicitud de Patente Norteamericana US 2003 007147. Ejemplos de fuentes de luz incluyen filamentos de tungsteno, QTH, tubos de efluvios, o cualesquiera fuentes de cuerpo gris de onda continua. El dispositivo de muestreo puede incluir un bloqueador que separe la luz entrante de la luz saliente como se ha descrito en la Patente Norteamericana nº 6.230.034, titulada Aparato de Vigilancia de Reflectancia Difusa. El espectrómetro puede ser cualquier dispositivo que permita la interpretación de la información de longitud de onda a partir de la luz modificada que sale de la interfaz del tejido. Tales sistemas incluyen espectrómetros de infrarrojos de transformada de Fourier, filtros sintonizables acústico- ópticos, espectrómetros dispersivos que utilizan una agrupación o matriz detectora, un sistema dispersivo escalonado con un solo detector, y un espectrómetro codificado tal como un dispositivo de transformación Hadamard. Ejemplos de foto-detectores adecuados incluyen detectores fotovoltaicos tales como detectores de Si, de InGaAs, de InAs, de Ge y de InSb, detectores fotoconductores tales como de PbS y de PbSe, y detectores piroelectricos tales como de DTGS y de tantalato de litio.

En otra realización del sistema, la luz es codificada antes de interrogar el tejido. El espectrómetro puede ser cualquier dispositivo que codifique la información de longitud de onda en la luz entrante en la interfaz de tejido. Dispositivos ejemplares están descritos en la Solicitud de Patente Norteamericana US 2002 0171834. Tales sistemas pueden incluir espectrómetros dispersivos escalonados o un espectrómetro codificado tal como un dispositivo de transformación de Hadamard o un FTIR. Ejemplos de fotodetectores adecuados incluyen detectores fotovoltaicos tales como detectores de Si, de InGaAs, de InAs, de Ge y de InSe, detectores fotoconductores tales como de PbS y de PbSe, y detectores piroeléctricos tales como de DTGS y de tantalato de litio.

Como para muchas zonas de pruebas de tejido el colágeno está 2 mm hacia dentro de la superficie, la luz próxima al infrarrojo debería ser del orden de números de onda que penetre el tejido a esa profundidad con el fin de interrogar al tejido que contiene colágeno. La luz que tiene longitudes de onda en la región desde 1.250 nm a 2.500 nm (números de onda en la región desde 8.000 hasta 4.000  $\text{cm}^{-1}$ ) es adecuada para análisis de acuerdo con el presente invento. Algunas zonas que contienen colágeno 2 mm hacia dentro de la superficie incluyen el lado inferior del antebrazo, el muslo, la pantorrilla, el dorso de la mano y el tenar.

Con referencia ahora a la fig. 4, un sistema para diagnosticar o seleccionar diabetes ha sido representado en una vista esquemática. El sistema total incluye seis subsistemas. Los subsistemas incluyen un subsistema 100, un subsistema 200 de muestreo de tejido, un subsistema 300 de mantenimiento de calibración, un subsistema 400 de espectrómetro FTIR, un subsistema 500 de adquisición de datos y un subsistema 600 de tratamiento integrado. Los subsistemas puede estar diseñados e integrados con el fin de asegurar que la relación señal a ruido es preservada en su

máxima cantidad. La relación señal a ruido de analítica neto está directamente relacionada con la exactitud y precisión de la clasificación no invasiva de individuos como diabéticos o no diabéticos por espectroscopia próxima al infrarrojo con el presente invento.

5 Los subsistemas pueden proporcionar una radiancia reproducible y preferiblemente uniforme del tejido, una baja variancia de muestreo del tejido, una marcación de un objetivo profundo de las capas que soportan colágeno del tejido, una recogida eficiente de los espectros de reflectancia difusa del tejido, un alto rendimiento óptico, una elevada precisión fotométrica, un amplio margen dinámico, una estabilidad térmica excelente, un mantenimiento de calibración efectivo, una transferencia de calibración efectiva, un control de calidad integrado y fácil de utilizar. Cada uno de los subsistemas se ha descrito a continuación en detalle.

10 El subsistema de iluminación 100 genera la luz próxima al infrarrojo (NIR) usada para interrogar al tejido de un ser humano para la determinación no invasiva del estado de la enfermedad. El subsistema de iluminación, en una realización ejemplar, contiene una fuente de luz 14 de amplia banda, policromática que emite radiación en la porción próxima al infrarrojo del espectro. La fuente de luz 14 puede emitir también radiación situada fuera de la proximidad al infrarrojo. Un ejemplo de una fuente de luz adecuada 14 sería una lámpara de filamento de tungsteno de 40 vatios, de 22,8 voltios. La  
15 fuente de luz 14 es típicamente alimentada por una alimentación de corriente regulada. La alimentación de corriente puede alimentar a la lámpara con corriente constante, tensión constante o potencia constante. La alimentación de corriente para la fuente de luz puede proporcionar regulación de corriente, tensión o potencia para mantener la temperatura del color y la emisividad de la fuente de luz tan estable como sea posible. Las fluctuaciones de la temperatura de color y de la emisividad de la fuente de luz pueden ser una fuente de ruido en la medición no invasiva y pueden reducir la relación señal a ruido analítica neta (SNR) y, subsiguientemente la capacidad de precisión y de predicción de la  
20 medición.

El sistema total del presente invento puede incluir una alimentación de corriente que proporciona corriente de bajo ruido, regulada a todos los subsistemas. La alimentación de corriente puede ser 300 vatios, onda cuadrada, potencia resonante, grado o clase médico, convertidor de corriente alterna a corriente continua que proporciona tensiones de salida de +28,  
25 +15, -15, y +5 V de corriente continua. El rizado en cada una de las tensiones puede ser menor de 20 milivoltios de pico a pico y la frecuencia de conmutación de la alimentación puede ser mayor de 200 kilohercios para facilitar el filtrado adicional de la corriente y para reducir más el ruido. Adicionalmente, la alimentación de corriente puede tener una eficacia de conversión de al menos el 80% lo que puede ser importante para reducir la carga térmica del instrumento no invasivo hasta el punto de que solo se requiera refrigeración por convección para el funcionamiento normal del dispositivo. El  
30 subsistema de iluminación 100 utiliza corriente de 20 V de corriente continua para alimentar a la fuente de luz. Un convertidor de corriente continua a corriente continua puede regular la entrada de corriente por debajo de 21,4 V de corriente continua y también puede proporcionar una función de arranque suave que encienda gradualmente la fuente de luz cuando el sistema es encendido la primera vez. La función de arranque suave puede prolongar la vida útil de la fuente de luz eliminando los transitorios en el arranque y limitando la corriente requerida para alimentar inicialmente a la fuente  
35 de luz.

Además de la fuente de luz y de la alimentación de corriente regulada, el subsistema de iluminación puede contener elementos ópticos 12, 13, 90 que recogen la radiación de la fuente de luz y transfieren esa luz a la entrada del subsistema de muestreo del tejido. Los elementos que realizan las transferencias ópticas pueden incluir ópticas de colimación y/o  
40 condensación, filtros ópticos, difusores ópticos, un homogenizador o tubo de luz para mezclar y los componentes mecánicos correspondientes para soportar o contener las ópticas y la fuente de luz.

Las ópticas de colimación pueden ser refringentes (por ejemplo, una lente) o reflectantes (por ejemplo, un reflector o espejo elíptico). Las ópticas condensadoras también pueden ser refringentes o reflectantes. Los materiales para lentes y reflectores son conocidos en la técnica. Las ópticas reflectantes pueden tener un acabado liso, un acabado rugoso o un  
45 acabado facetado dependiendo de la configuración del subsistema de iluminación. Un acabado rugoso o facetado para las ópticas reflectantes puede destruir la coherencia de la imagen de la fuente de luz y crear un diseño de radiancia mas uniforme. Las ópticas refringentes pueden ser esféricas o asféricas. Una lente de Fresnel es un tipo especial de lente asférica que también puede ser empleada. Las ópticas colimadoras y/o condensadoras pueden recoger radiación de la fuente y transferir la radiación a la entrada del subsistema 200 de muestreo del tejido o a otros elementos ópticos que realizan operaciones adicionales sobre la luz antes de ser hecha pasar al subsistema 200 de muestreo del tejido.

50 Uno o más filtros ópticos 13 pueden ser empleados para dejar pasar preferentemente radiación solo en la región espectral de interés. El filtro óptico puede ser uno o una combinación de filtros de paso largo, paso corto, o pasa banda. Estos filtros pueden ser de naturaleza absorbente, de interferencia o dicroico. En algunas realizaciones, los filtros ópticos tienen un revestimiento anti-reflexión para preservar la transmitancia de luz en la región espectral de interés. Estos filtros pueden realizar también la conformación espectral de la radiación procedente de la fuente de luz para enfatizar ciertas partes del  
55 espectro próximo al infrarrojo sobre otros. El filtrado óptico puede limitar la banda de la radiación que incide sobre el tejido y aumentar la SNR en la región de interés e impedir que se quemé o se dañe de otra forma el tejido del sujeto. Limitar la banda de la radiación puede mejorar la SNR efectiva reduciendo el ruido de detector Shot que resulta de la radiación



indeseada fuera de la región espectral de interés.

Los difusores ópticos 13 y los mezcladores 90 en el subsistema de iluminación pueden proporcionar una radiancia reproducible y uniforme en la entrada del subsistema 200 de muestreo del tejido. Una radiancia uniforme puede ayudar a asegurar una buena precisión fotométrica e incluso la iluminación del tejido. Una radiancia uniforme puede también ayudar a reducir errores asociados con diferencias de fabricación entre fuentes de luz. La radiancia uniforme es utilizada en el presente invento para conseguir una predicción exacta del estado de la enfermedad.

Un ejemplo de un difusor óptico es una placa de vidrio en el suelo. La superficie del suelo de la placa mezcla efectivamente el ángulo de la radiación que emana de la fuente de luz y sus ópticas de transferencia. Un tubo de luz puede ser utilizado para mezclar la intensidad de la radiación de tal forma que la intensidad sea uniforme a la salida del tubo de luz. Además, los tubos de luz con una curva doble pueden mezclar los ángulos de la radiación. Para la creación de intensidad uniforme y distribución regular, la sección transversal del tubo de luz no debería ser circular. Secciones transversales cuadrada, hexagonal y octogonal pueden ser geometrías de mezclado efectivas. La salida del tubo de luz puede acoplarse directamente a la entrada del dispositivo de muestreo de tejido o puede ser utilizada en conjunción con ópticas de transferencia adicionales antes de que la luz sea enviada al dispositivo de muestreo de tejido.

Con referencia ahora a la fig. 5, se ha representado otro aspecto de la presente exposición. El sistema representado proporciona un filtrado espectral o un filtrado pasa bandas para eliminar las longitudes de banda o las bandas de longitudes de onda innecesarias antes de que la luz haga contacto con el tejido. Esto se consigue colocando uno o más elementos entre la fuente de luz y el tejido. Los elementos pueden incluir filtros absorbentes fabricados de cualquier substrato transparente o parcialmente transparente; una rejilla o prisma que dispersa la radiación, permitiendo que las longitudes de onda indeseadas sean bloqueadas antes de que alcancen el tejido; y/o una abertura que bloquea selectivamente la radiación indeseable.

Un sistema para filtrado pasa bandas está representado en la fig. 5, que representa una fuente de luz 101 situada dentro de un reflector eléctrico 102. La fig. 5 también representa un tubo de luz con curva-S hexagonal 104 para recibir luz de la fuente 101. Una serie de filtros están colocados entre la fuente de luz 101 y el tubo de luz 104. El primer filtro óptico es un filtro de silicona 106 que tiene un revestimiento anti-reflexión para transmitir al menos el noventa por ciento (90%) de la luz que incide en la banda. El filtro de silicona deja pasar longitudes de onda de luz mayores de 1,1 micras. El segundo filtro óptico puede ser un filtro 108 de vidrio coloreado KOPP 4-67 108 que, en combinación con el filtro de silicona, dejar pasar luz en la región espectral de 1,2 a 2,5 micras. La pendiente del filtro COP es tal que deja pasar preferentemente luz en longitudes de onda comprendidas entre 2,0 y 2,5 micras. El tercer filtro óptico puede ser un filtro 110 de absorción ORIEL WG295 que corta longitudes de onda mayores de 2,5 micras. La superficie frontal del filtro WG295 puede ser pulida o amolada finamente. Si la superficie frontal está amolada finamente, el WG295 actúa como un difusor y también como un filtro de luz. Estos filtros pueden impedir que el tejido se queme, mientras mejoran la relación de señal a ruido del sistema limitando la banda de luz solo de la región espectral de interés. Limitar en banda la luz puede reducir el ruido de golpeo generado por el flujo de fotones que incide sobre el detector.

El subsistema 200 de muestreo de tejido puede introducir radiación generada por el subsistema de iluminación 100 en el tejido del sujeto y puede recoger las partes de la radiación que no son absorbidas por el tejido y enviar esa radiación al subsistema 400 de espectrómetro FTIR para medición. Las figs. 6, 7 y 8 representan elementos de un subsistema 200 de muestreo de tejido. Con referencia en primer lugar a la fig. 6, el subsistema 200 de muestreo de tejido tiene una entrada óptica 202, una superficie de muestreo 204 que forma una interfaz de tejido 206 que interroga al tejido y una salida óptica 207. El subsistema puede incluir además un aparato ergonómico 210, representado en la fig. 8, que contiene la superficie de muestreo 204 y posiciona el tejido en la interfaz 206. Un dispositivo que controla la temperatura de la interfaz de tejido puede ser incluido y, en algunas realizaciones, está incluido un aparato que reposiciona el tejido sobre la interfaz de tejido de una forma repetitiva.

La entrada óptica 202 del subsistema 200 de muestreo de tejido recibe radiación del subsistema de iluminación 100 (es decir, luz que sale del tubo de luz) y transfiere esa radiación a la interfaz de tejido 206. La entrada óptica puede consistir de un mazo de fibras ópticas que están dispuestas en un diseño geométrico que recoge la mayor cantidad de luz posible del subsistema de iluminación. Una disposición está representada en la fig. 7. La vista en planta representa los extremos de las fibras de entrada y salida en una geometría en la superficie de muestreo incluyendo seis grupos 208 dispuestos en un diseño circular. Cada grupo incluye cuatro fibras de salida centrales 212 que recogen la luz reflejada de manera difusa desde el tejido. Alrededor de cada agrupación de las cuatro fibras de salida centrales 212 hay un cilindro de material 215 que asegura un espacio de alrededor de 100  $\mu\text{m}$  entre los bordes de las fibras de salida centrales 212 y el anillo interior de las fibras de entrada 214. El espacio de 100  $\mu\text{m}$  puede ser importante para señalar el colágeno en el tejido. Como se ha mostrado en la fig. 7, dos anillos concéntricos de fibras de entrada 214 están dispuestos alrededor del cilindro de material 215. Como se ha mostrado en una realización, 32 fibras de entrada rodean las cuatro fibras de salida. La elevada relación de fibras de entrada a fibras de salida es mantenida en reconocimiento de pérdidas dentro del tejido.

Todas las fibras de entrada y salida agrupadas pueden ser integradas en un accesorio o herraje de grupo que es pegado o

5 encolado a un cabezal de muestreo 216. El cabezal de muestreo 216 incluye la superficie de muestreo 204 que puede ser pulida plana para permitir la formación de una buena interfaz de tejido. De manera similar, las fibras de entrada pueden ser agrupadas en un accesorio 218 conectado en los extremos de entrada para enlazar con el subsistema de iluminación 100. Los extremos de salida de las fibras de salida pueden ser agrupados en un accesorio 220 para enlazar con el subsistema 400 de espectrómetro FTIR.

10 Alternativamente, la entrada óptica puede utilizar una combinación de tubos de luz, ópticas refringentes y/o reflectantes para transferir la máxima cantidad de luz entrante a la interfaz de tejido. Las ópticas de entrada del subsistema de muestreo de tejido pueden recoger tanta luz como sea posible procedente del subsistema de iluminación 100 con el fin de maximizar el SNR conseguido por el sistema total. En el presente invento, la colocación del subsistema de iluminación 100 y del subsistema 200 de muestreo de tejido antes del subsistema 400 de espectrómetro FTIR puede dar como resultado sobre por encima de un orden de mejora de magnitud en rendimiento para un tamaño dado de medidor de espectrómetro FTIR porque la entrada al subsistema 200 de muestreo de tejido está diseñada para manejar una amplia gama de ángulos desde el subsistema de iluminación 100 y el pequeño tamaño de imagen de salida del subsistema de muestreo de tejido es hecho coincidir mejor con el rendimiento soportado por un espectrómetro FTIR dimensionado razonablemente. Los beneficios de la configuración de fuente, muestra, espectrómetro FTIR, detector (SSFD) para clasificación no invasiva del estado de la enfermedad pueden ser significativos.

20 La interfaz de tejido puede irradiar el tejido de forma que señale las partes del tejido que soportan colágeno y discrimine contra la luz que no se desplace en una distancia significativa a través de aquellas partes. Como se ha establecido antes, el espacio de 100  $\mu\text{m}$  discrimina contra luz que contiene poca información útil. Además, la interfaz de tejido puede promediar sobre una cierta área del tejido para reducir errores debido a la naturaleza heterogénea del tejido. La interfaz de muestreo de tejido puede rechazar rayos especulares (devueltos por reflexión especular desde la superficie del tejido) y de longitud de trayecto corta y puede recoger la porción de la luz que se desplace la longitud de trayecto deseada a través del tejido con una elevada eficacia con el fin de maximizar la SNR del sistema. La interfaz de muestreo de tejido puede emplear fibras ópticas para canalizar la luz desde la entrada al tejido en una geometría predeterminada como se ha descrito antes. Las fibras ópticas pueden ser dispuestas en un diseño que señala ciertas capas del tejido que contienen buena información del colágeno glicosilado. La separación y la colocación de las fibras de entrada y salida pueden ser previstas de una forma óptima para conseguir el objetivo de profundidad efectiva. Además del uso de fibras ópticas, la interfaz de muestreo de tejido puede utilizar una disposición no basada en las fibras que coloca un diseño de áreas de entrada y de salida sobre la superficie del tejido cuando se utiliza reflectancia difusa. El enmascaramiento apropiado de la interfaz de muestreo de tejido no basado en las fibras puede asegurar que la luz de entrada se desplace en una distancia mínima en el tejido y contiene información válida de colágeno glicosilado. Finalmente, la interfaz de muestreo de tejido puede ser usada para controlar la temperatura del tejido de una manera predeterminada.

35 El subsistema de muestreo de tejido puede emplear un aparato ergonómico o cuna 210 que posiciona el tejido sobre la interfaz de muestreo 206 de una manera reproducible. Un aparato ergonómico 210 está representado en la fig. 8. En el caso de muestrear el lado inferior del antebrazo, un diseño de cuna ergonómica puede asegurar un buen contacto con la interfaz de muestreo. La cuna ergonómica 210 incluye una base 221 que tiene una abertura 223 a su través. La abertura está dimensionada para recibir el cabezal de muestreo 216 en ella para posicionar la superficie de muestreo 204 generalmente coplanaria con una superficie superior 225 de la base 221. La cuna ergonómica 210 referencia el codo y la parte superior del brazo del sujeto a través de un soporte o ménsula 222 en unión con una empuñadura 224 flotante para su ajuste para posicionar exactamente el antebrazo en la interfaz de muestreo de tejido. Una especial atención a la ergonomía de la interfaz de muestreo de tejido puede minimizar errores de muestreo. Los errores en el muestreo del tejido pueden ser una fuente principal de exactitud reducida para la clasificación no invasiva del estado de la enfermedad.

45 La cuna ergonómica 210 puede estar diseñada de tal forma que el antebrazo del sujeto sea posicionado de forma fiable sobre el cabezal de muestreo 216. El soporte o ménsula 222 forma un descanso para el codo que ajusta el ángulo apropiado entre el brazo superior y el cabezal de muestreo 216, y también sirve como un punto de registro para el brazo. La posición de descanso de la mano puede ser ajustada para que cada sujeto acomode diferentes longitudes de antebrazo. Un mecanismo de elevación puede estar incluido que sube y baja la cuna periódicamente durante el muestreo para romper y reformar la interfaz de tejido. La reforma de la interfaz puede facilitar la reducción de errores de muestreo debido a la naturaleza rugosa y la falta de homogeneidad de la piel.

50 La imagen formada por la salida del subsistema de muestreo de tejido es típicamente un orden de magnitud menor de tamaño que su entrada. Esta relación de imagen de entrada a imagen de salida puede hacer coincidir el rendimiento soportado por el espectrómetro FTIR al tiempo que maximiza la relación de señal a ruido del sistema completo. La salida del subsistema 200 de muestreo de tejido transfiere la porción de la luz no absorbida por el tejido que se ha desplazado un trayecto aceptable a través del tejido a la entrada del subsistema 400 de espectrómetro FTIR. La salida del subsistema 200 de muestreo de tejido puede utilizar cualquier combinación de ópticas refringente y/o reflectante para producir un haz colimado que será modulado por el espectrómetro FTIR. La luz reflejada de forma difusa recogida por las fibras de salida 207 del cabezal de muestreo 216 puede ser colimada por una lente plano-aféptica hecha de ZnSe. El diseño de la lente puede ser tal que el haz colimado tenga menos de cinco grados de divergencia. Esta lente 228 ha sido representada

esquemáticamente en la fig. 4 como parte del subsistema 400 de espectrómetro FTIR. La lente colimadora 228 produce un haz con baja distorsión óptica que sirve como la entrada apropiada al espectrómetro FTIR descrito a continuación.

Como se ha mostrado en la fig. 4, el subsistema 400 de espectrómetro FTIR incluye un espectrómetro 230 que modula la luz suficientemente colimada desde el subsistema 200 de muestreo de tejido para crear un interferograma que es recibido por un detector 232. El interferograma codifica espacialmente el espectro próximo al infrarrojo recogido por el subsistema de muestreo de tejido. La fig. 9 representa esquemáticamente una realización de un espectrómetro FTIR 230 que incluye un divisor de haz 234 y ópticas de compensación 236, un retroreflector fijo 238 y un retroreflector móvil 240. La luz de entrada colimada 242 incide sobre la óptica divisora de haz 234 y es reflejada parcialmente y transmitida parcialmente por el revestimiento sobre la superficie posterior del divisor de haz 234. La luz reflejada pasa de nuevo a través de la óptica divisora de haz 234 y se refleja en el retroreflector fijo 238 y vuelve de nuevo al divisor de haz 234. La luz transmitida pasa a través de la óptica compensadora 236 y se refleja en el retroreflector móvil 240 y de nuevo al divisor de haz 234. Las porciones de luz transmitida y reflejada se recombinan en el divisor de haz para crear un diseño de interferencia o interferograma. La cantidad de interferencia constructiva y/o destructiva entre los haces transmitido y reflejado depende del contenido espectral del haz de entrada colimado 242 y de la diferencia de trayecto óptico entre el retroreflector fijo 238 y el retroreflector móvil 240.

En una realización, el subsistema 400 de espectrómetro FTIR no invasivo utiliza un espectrómetro FTIR 230 fabricado por Bomem. Este espectrómetro utiliza una sola placa que contiene funciones de divisor de haz y de compensador. Además, las esquinas del cubo son usadas como los espejos de extremidad y ambas esquinas del cubo son movidas en una suspensión en forma de horquilla para crear la diferencia de trayecto óptico y el subsiguiente registro de interferencia. El espectrómetro FTIR Bomem WorkIR™ consigue prestaciones de estabilidad térmica y complejidad espectral para realizar análisis no invasivo del estado de la enfermedad de la diabetes con espectroscopia próxima al infrarrojo. El espectrómetro FTIR modula la luz colimada procedente del dispositivo de muestreo de tejido para codificar espacialmente el espectro próximo al infrarrojo en un interferograma. La resolución espectral del interferograma puede ser del orden de 7,5 a 64 números de onda. La gama de resolución espectral es de 30 a 50 números de onda. El interferómetro producirá un interferograma con un solo lado o de doble lado; el interferograma de doble lado puede conseguir una SNR más elevada. El interferograma resultante puede ser hecho pasar a una lente de condensación 244, como se ha mostrado en la fig. 4, y esta lente focaliza la luz sobre el detector 232. El material de la lente es ZnSe. El detector 232 puede ser un detector de InGaAs, de 1 mm de diámetro, rango extendido, enfriado termo-eléctricamente que es sensible a la luz en la región de 1,2 a 2,5 μm del espectro. El detector 232 convierte el interferograma óptico en su equivalente eléctrico.

Cualquier fotoprotector que satisfaga los requisitos de sensibilidad básica, ruido y velocidad puede ser usado con el presente invento. Un fotodetector adecuado puede tener una resistencia de shunt o derivación mayor de 6.000 ohmios, una capacitancia terminal menor de 6 nanofaradios y una fotosensibilidad mínima de 0,15 amperios por vatio sobre la región espectral de 1,2 a 2,5 micras. Además, el fotodetector puede tener una frecuencia de corte mayor o igual a 1.000 hercios. La resistencia de shunt del fotodetector define el ruido de Johnson o térmico del detector. Las prestaciones del fotodetector pueden ser mejoradas haciendo que el ruido de Johnson del detector sea relativamente bajo con relación al flujo de fotones en el detector. La capacitancia terminal gobierna la frecuencia de corte del fotodetector y también puede ser un factor en la ganancia de ruido de frecuencia elevada del amplificador del fotodetector. La fotosensibilidad puede impactar directamente en la parte de señal de la ecuación de SNR.

El interferograma óptico puede ser convertido a una señal eléctrica por el detector y esta señal recibida por el subsistema 500 de adquisición de datos. El subsistema 500 de adquisición de datos amplifica y filtra la señal eléctrica procedente del detector y a continuación convierte la señal eléctrica analógica resultante a su representación digital con un convertidor de analógico a digital. La electrónica analógica y la ADC pueden soportar la SNR elevada y la linealidad inherente en el interferograma. El subsistema 500 de adquisición de datos soporta al menos 100 dbc de distorsión de SNR en exceso. El subsistema 500 de adquisición de datos produce un interferograma digitalizado que tiene un desplazamiento espacial uniforme entre muestras. El subsistema 500 de adquisición de datos también recibe la señal láser de referencia desde el subsistema 400 de espectrómetro FTIR. Tanto la señal próxima al infrarrojo como el láser de referencia puede ser digitalizados por un ADC delta-sigma de 24 bits operado a 96 kilohercios. La salida digital del ADC puede ser procesada por un procesador de señal para producir un interferograma que es muestreado a intervalos espaciales constantes. Los interferogramas pueden ser hechos pasar al subsistema 600 de ordenador integrado para tratamiento adicional, como se ha descrito más adelante. Tradicionalmente, los pasos por cero del láser de referencia son utilizados para indicar intervalos espaciales constantes para el muestreo del interferograma. Los pasos por cero del láser de referencia están espaciados a intervalos iguales a la mitad de la longitud de onda de la luz monocromática emitida por el láser.

Además, el subsistema 500 de adquisición de datos puede utilizar un muestreo de tiempo constante, un canal doble, un convertidor delta-sigma de analógico a digital (ADC) para soportar la SNR y los requisitos de precisión fotométrica del análisis actual del estado de la enfermedad. El ADC delta-sigma puede soportar tasas de muestreo de más de 100 KHz por canal, tener una gama dinámica que sobrepase los 117 dbc y tener una distorsión armónica total menor de -105 dbc.

Hay otros tipos de sistemas de adquisición de datos para el espectrómetro FTIR y el fotodetector que son conocidos en la

técnica y podrían ser empleados en el presente invento si proporcionan las siguientes características de rendimiento para muestreo espacial constante, gama dinámica, SNR, distorsión armónica y velocidad de muestreo. Hay un error permisible a la hora de determinar los intervalos de muestreo espacial constante del interferograma, y la determinación del intervalo de muestreo espacial debe tener una variación de retardo de muestreo espacial máximo de +/-25 nanómetros con el fin de preservar una SNR de 100 dbc a 1,2 micras ( $8.000 \text{ cm}^{-1}$ ). Los niveles de la variación de retardo de muestreo espacial mayores que +/- 25 nanómetros pueden introducir artefactos de modulación de frecuencia en el espectro y pueden degradar la señal. Además, el subsistema de adquisición de datos puede soportar un margen dinámico de al menos 100 dbc, una SNR de 90 dbc y tener una distorsión armónica total inferior a 90 dbc. Finalmente, el ADC del subsistema de adquisición de estado puede ser capaz de muestrear a velocidades de 5.000 muestras por segundo o mayor con el fin de soportar una velocidad de exploración del reflector móvil de FTIR mínima de 0,25 centímetros por segundo.

El subsistema 500 de adquisición de datos de muestreo constante en el tiempo tiene varias ventajas distintivas sobre los métodos mas tradicionales para adquirir interferogramas a partir de un espectrómetro FTIR. Estas ventajas incluyen mayor margen dinámico, menor ruido, artefactos espectrales reducidos, operación del detector de ruido limitado y electrónica analógica mas simples y menos costosa. Además, la técnica de muestreo constante en el tiempo mejora la inmunidad a la vibración del FTIR debido a que puede compensar digitalmente las discordancias por retrasos entre el láser de referencia y los detectores de infrarrojos y puede retirar los aspectos no ideales de la función de transferencia de la electrónica. La técnica de muestreo de tiempo constante puede requerir exigencias de calculo y de memoria para traducir las muestras de tiempo constante del interferograma a muestras espaciales constantes. Un procesador de señal digital de alto rendimiento (DSP) puede proporcionar los requisitos de calculo y de memoria adicionales para alcanzar las mejoras en las prestaciones de la técnica de muestreo de tiempo constante.

El subsistema de adquisición de datos pasa los interferogramas muestreados espacialmente constantes, digitalizados al subsistema 600 de ordenador integrado para otro tratamiento. El subsistema 600 de ordenador integrado convierte la corriente de interferogramas a espectros de un solo haz encuadrando el interferograma, realizando la corrección de fase del interferograma encuadrado y a continuación tomando la transformada de Fourier del interferograma encuadrado y corregido en fase. Pueden utilizarse los métodos de Mertz y de corrección de fase de potencia. El método de corrección de fase de potencia puede ser mas sencillo de poner en práctica, pero da como resultado un ruido que no tiene media cero y es mayor en magnitud por un factor de 1.414. El método de corrección de fase de Mertz puede ser mas complicado pero puede producir ruido con media cero y no inyecta ruido desde la parte imaginaria del espectro complejo. El método de Mertz puede dar como resultado en espectros con una precisión fotométrica más elevada. Cuando se utilizan técnicas de análisis multivariante o multivariado ambos métodos de corrección de fase dan como resultado un rendimiento de predicción equivalente.

Después de convertir los interferogramas a espectros de un solo haz, el sistema de ordenador integrado puede comprobar los espectros de un solo haz para exploraciones atípicas o malas. Una muestra atípica o una exploración mala es una que viola la relación hipotética entre la señal medida y las propiedades de interés (es decir, medición de colágeno glicosilado en tejido humano). Ejemplos de condiciones atípicas incluyen condiciones en las que el instrumento calibrado es operado fuera de los márgenes operativos especificados para temperatura ambiente, humedad ambiente, tolerancia a las vibraciones, tolerancia de componentes, niveles de potencia, etc. Además, un atípico puede ocurrir si la composición o concentración de la muestra es diferente que la gama de composición o margen de concentración de las muestras usadas para construir el modelo de calibración. Cualesquiera exploraciones atípicas o malas pueden ser borradas y los espectros buenos restantes son promediados juntos para producir un espectro de un solo haz medio para la medición, El espectro medio de un solo haz puede ser convertido a absorbancia tomando la base negativa de logaritmo en base 10 ( $\log_{10}$ ) del espectro. El espectro de absorbancia puede ser escalado por un espectro de un solo haz para renormalizar el ruido. El espectro de absorbancia escalado resultante puede entonces tener algoritmos de mantenimiento de calibración y/o transferencia de calibración aplicados a él. La técnicas de mantenimiento de calibración han sido descritas en detalle a continuación y en la Solicitud de Patente Norteamericana numero de Serie 09/832.608, de cesionaria común, presentada el 11 de Abril de 2001, y titulada "Muestras de Referencia Ópticamente Similares y Métodos Relacionados para Modelos de Calibración Multivariantes Utilizados en Espectroscopia Óptica", incorporada aquí a modo de referencia. Las técnicas de transferencia de calibración están descritas en la Solicitud de Patente Norteamericana con numero de serie 09/563.865, de cesionaria común, presentada el 3 de Mayo de 2000, titulada "Método y Aparato para Transferencia de Modelo de Calibración Espectroscópica", incorporada aquí como referencia.

Un algoritmo almacenado en el subsistema de ordenador integrado puede ser entonces aplicado al espectro de absorbancia escalado, como calibrado, para determinar el estado de la enfermedad. Después de generar una predicción del estado de la enfermedad, el subsistema 600 de ordenador integrado informara del nivel predicho 830 al sujeto. Opcionalmente, el subsistema 600 de ordenador integrado puede informar el nivel de confianza en la calidad del valor predicho. Si el nivel de confianza es bajo, el subsistema 600 de ordenador integrado puede ocultar el estado de la enfermedad predicho y preguntar al sujeto para volver a realizar la prueba. La clasificación puede ser informada visualmente en una pantalla de presentación, por audio y/o medios impresos. Adicionalmente, el estado de la enfermedad predicho puede ser almacenado en la memoria con el fin de formar un registro histórico del análisis.

5 El subsistema 600 de ordenador integrado puede incluir una unidad de tratamiento central (CPU), una memoria, un almacenamiento, una pantalla de presentación y un enlace de comunicación. Un ejemplo de una CPU es el microprocesador Pentium de Intel. La memoria puede ser, por ejemplo, una memoria de acceso aleatorio estática (RAM) y/o una memoria de acceso aleatorio dinámica. El almacenamiento puede ser realizado con una RAM no volátil o una  
10 unidad de disco. Una pantalla de presentación de cristal liquido es un ejemplo del tipo de pantalla de presentación que se utilizaría en el dispositivo. El enlace de comunicación puede ser un enlace en serie de alta velocidad, un enlace Ethernet o un enlace de comunicación inalámbrico. El subsistema de ordenador integrado puede producir predicciones sobre el estado de la enfermedad a partir de los interferogramas recibidos y tratados, realizar el mantenimiento de la calibración, realizar la transferencia de calibración, llevar a cabo los diagnósticos instrumentales, almacenar una historia de análisis pasados y otra información pertinente, y en algunas realizaciones, puede comunicar con anfitriones remotos para enviar y recibir datos y nuevas actualizaciones del software.

15 El sistema de ordenador integrado puede también contener un enlace de comunicación que permite la transferencia de los registros de predicciones del sujeto y los espectros correspondientes a una base de datos externa. Además, el enlace de comunicación puede ser utilizado para descargar un nuevo software al ordenador integrado, actualizar el modelo de calibración multivariante, proporcionar información al sujeto para mejorar la gestión de la enfermedad, etc. El sistema de ordenador integrado es muy parecido a un dispositivo de información. Ejemplos de dispositivos de información incluyen asistentes personales digitales, teléfonos móviles habilitados en red y ordenadores portátiles.

**REIVINDICACIONES**

1.- Un aparato para determinar la probabilidad, progresión o nivel de diabetes, comprendiendo el aparato:

una fuente de luz que genera luz próxima al infrarrojo, incluyendo luz al menos a una longitud de onda indicativa del contenido glicosilado en la piel;

5 un medio de muestreo para acoplar la luz a la piel en vivo y recoger la luz modificada por la piel;

un espectrómetro de infrarrojos acoplado al medio de muestreo para medir la información óptica de la luz modificada recogida desde la piel; y

10 medios para tratar la información óptica para detectar colágeno glicosilado en la piel para determinar la probabilidad, progresión o nivel de diabetes, teniendo el medio adaptado para utilizar un algoritmo como un factor la información óptica procedente de al menos una longitud de onda indicativa del contenido de producto final glicosilado en la piel, caracterizado porque:

dicho algoritmo que es un algoritmo multivariante desarrollado a partir de una base de datos de información óptica o datos espectrales de individuos que tienen un estado de enfermedad conocido y utilizando atenuación de intensidades que es una función de los productos finales glicosilados incluyendo colágeno glicosilado.

15 2.- El aparato según la reivindicación 1, en el que al menos una longitud de onda indicativa de productos finales glicosilados es seleccionada de las siguientes bandas: 2.240 nm – 2.300 nm, 2.145 nm – 2.200 nm, 2.025 nm – 2.060 nm, y 1.670 nm – 1.745 nm.

20 3.- El aparato según la reivindicación 1, en el que la fuente de luz genera una luz que incluye una segunda longitud de onda indicativa del contenido de colágeno glicosilado en la piel y el algoritmo incluye un segundo factor dependiente de la información óptica en la segunda longitud de onda indicativa del contenido de colágeno glicosilado.

4.- El aparato según la reivindicación 1, en el que la fuente de luz comprende un subsistema de iluminación que genera la luz próxima al infrarrojo que incluye al menos una longitud de onda indicativa del contenido de colágeno glicosilado en la piel humana;

25 los medios de muestreo comprenden un subsistema de muestreo de la piel acoplado ópticamente al subsistema de iluminación que recibe al menos una porción de la luz infrarroja, incluyendo el subsistema de muestreo de la piel medios para irradiar la piel humana con al menos una porción de la luz infrarroja recibida y recoger al menos una porción de la luz reflejada de forma difusa desde la piel humana;

30 el espectrómetro comprende un subsistema de espectrómetro FTIR acoplado ópticamente al subsistema de muestreo de la piel para recibir al menos una porción de la luz reflejada de forma difusa desde la piel, incluyendo el subsistema de espectrómetro FTIR un espectrómetro que crea un interferograma, incluyendo además el subsistema de espectrómetro FTIR un detector que recibe el interferograma y convierte el interferograma a una representación eléctrica; y

35 los medios para procesar la información óptica para determinar la probabilidad, progresión o nivel de diabetes comprenden un subsistema de adquisición de datos que incluye medios para amplificar y filtrar la representación eléctrica y convertir una señal eléctrica resultante a su representación digital, y un subsistema de cálculo para recibir la representación digital y además adaptado para utilizar dicho algoritmo multivariante.

5.- El aparato según la reivindicación 4, en el que al menos una longitud de onda indicativa del contenido de colágeno glicosilado es seleccionada a partir de las siguientes bandas: 2.240 nm – 2.300 nm, 2.145 nm – 2.200 nm, 2.025 nm – 2.060 nm, y 1.670 nm – 1.745 nm.

40 6.- El aparato según la reivindicación 4, en el que el subsistema de iluminación genera una luz que incluye una segunda longitud de onda indicativa del contenido de colágeno glicosilado en la piel y el algoritmo multivariante incluye un segundo factor dependiente de las mediciones en la segunda longitud de onda indicativa del contenido de colágeno glicosilado.

7.- El aparato según la reivindicación 3 o 6, en el que al menos una longitud de onda indicativa del contenido de colágeno glicosilado es seleccionada a partir de las siguientes bandas: 2.240 nm – 2.300 nm, 2.145 nm – 2.200 nm, 2.025 nm – 2.060 nm, y 1.670 nm – 1.745 nm.

45 8.- Un método que utiliza un aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para indicar el alto riesgo de desarrollar diabetes en un individuo utilizando en vivo información óptica procedente del individuo que comprende las operaciones de:

obtener en vivo información óptica de la piel procedente del individuo, incluyendo la información óptica de la piel en vivo información de al menos una longitud de onda indicativa del contenido de producto final glicosilado en la piel;

proporcionar dicho algoritmo multivariante; y

aplicar el algoritmo multivariante a la información óptica de la piel procedente del individuo para indicar el alto riesgo de desarrollar diabetes.

5 9.- El método según la reivindicación 8, en el que la operación de obtener información óptica de la piel procedente del individuo comprende:

proporcionar una fuente de iluminación e irradiar la piel con luz que tiene al menos una longitud de onda indicativa de contenido de producto final glicosilado en la piel irradiada;

recoger al menos una porción de la luz que sale de la piel irradiada; y

medir al menos una porción de la luz espectral de la luz recogida procedente de la piel.

10 10.- El método de según la reivindicación 8 ó 9 en el que el producto final de mi consideración incluye colágeno disco asilado.

11.- El método según la reivindicación 8 ó 9, en el que al menos una longitud de onda indicativa del contenido de producto final de glicosilación es seleccionada a partir de las siguientes bandas: 2.240 nm - 2.300 nm, 2.145 nm – 2.200 nm, 2.025 nm – 2.060 nm, y 1.670 nm – 1.745 nm.

15 12.- El método según la reivindicación 8 ó 9, en el que la información óptica de la piel incluye información procedente de una segunda longitud de onda indicativa del contenido de producto final de glicosilación en la piel y el laborismo multivariante incluye un segundo factor dependiente de la información procedente de la segunda longitud de onda indicativa del contenido de producto final de glicosilación.

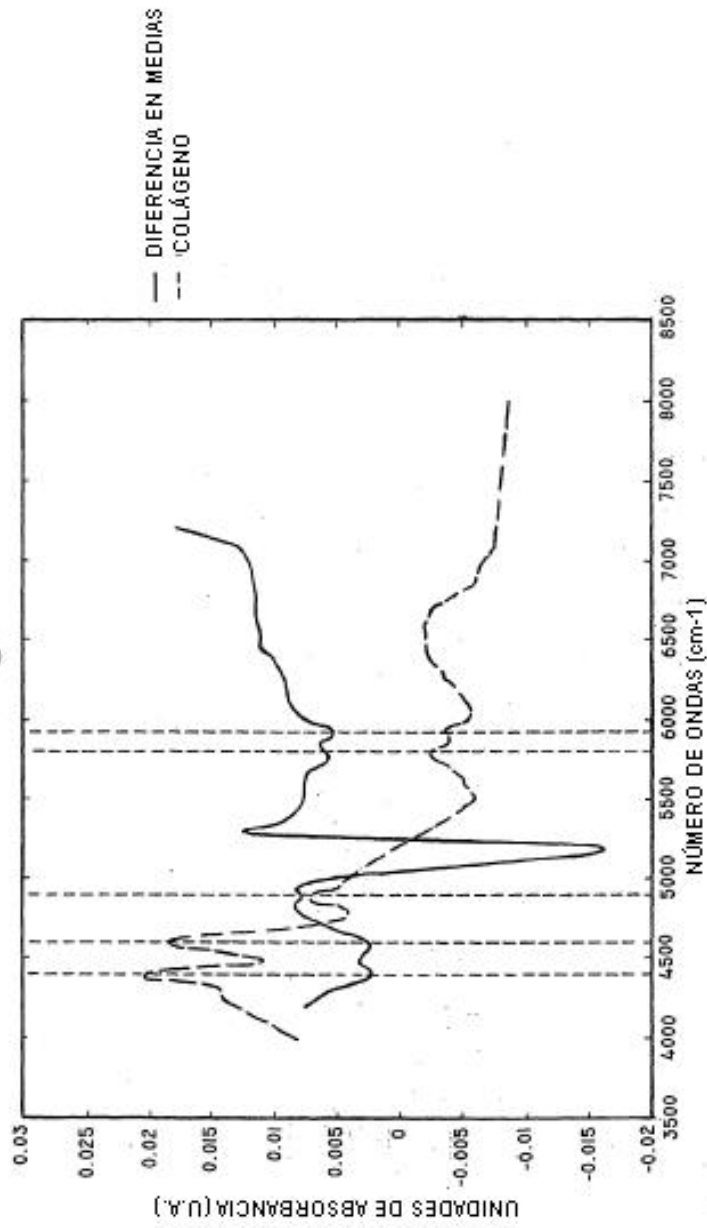
20 13.- El método según la reivindicación 12, en el que la segunda longitud de onda indicativa del contenido de producto final de glicosilación es seleccionada a partir de las siguientes bandas: 2.240 nm - 2.300 nm, 2.145 nm – 2.200 nm, 2.025 nm – 2.060 nm, y 1.670 nm – 1.745 nm.

14.- El método según la reivindicación 8 ó 9, en el que al menos una longitud de onda indicativa del contenido de producto final de glicosilación es mayor de 500 nm y menor de 3300 nm.

25 15.- El método según la reivindicación 8 ó 9, en el que el algoritmo multivariante tiene al menos un factor dependiente de las características del sujeto.

16.- El método según la reivindicación 8 ó 9, en el que el algoritmo multivariante tiene al menos un factor dependiente de los factores de riesgo ambientales.

*Fig. 1*





*Fig. 2*

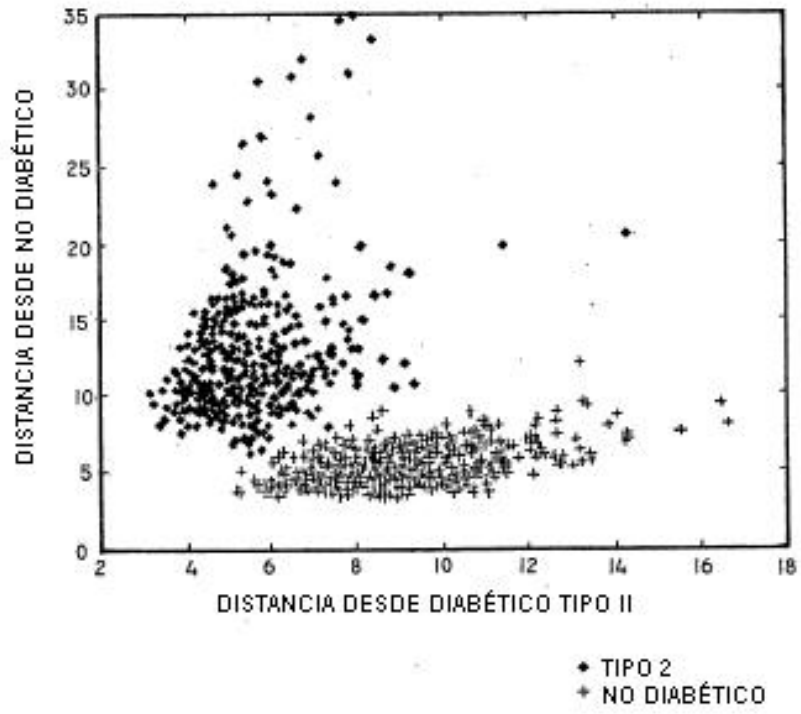


Fig. 3

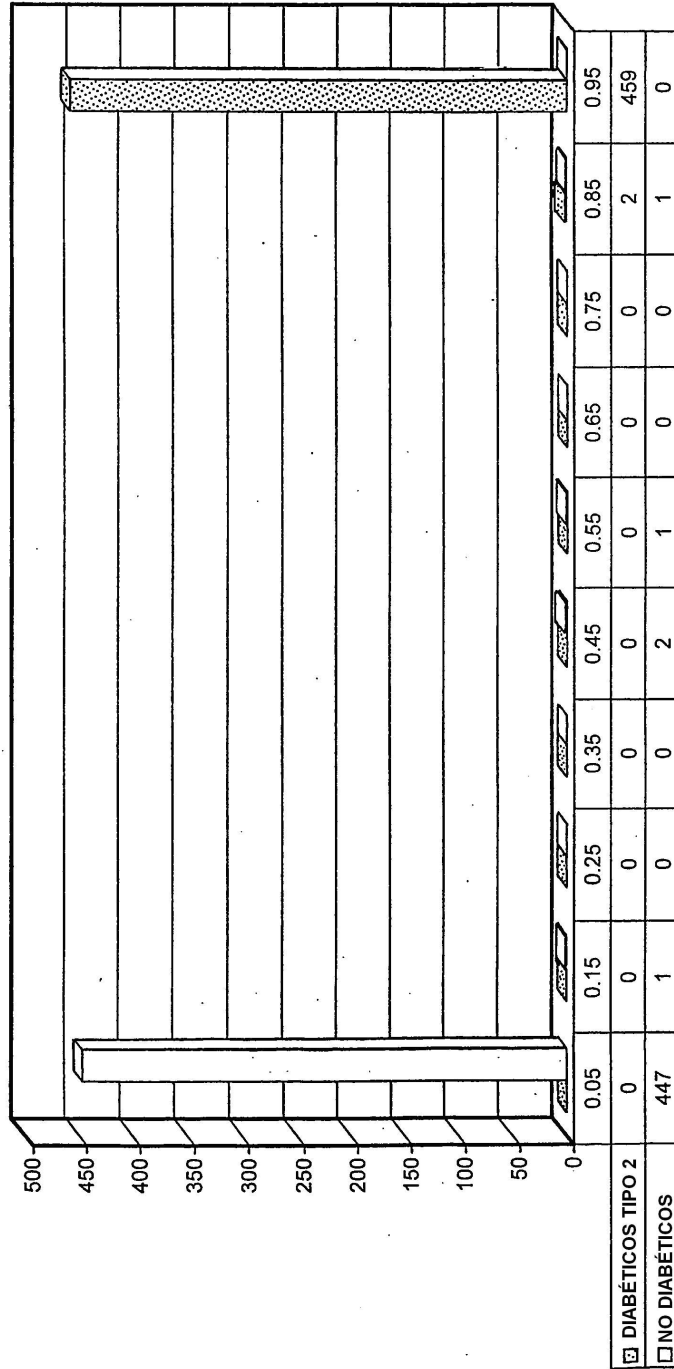
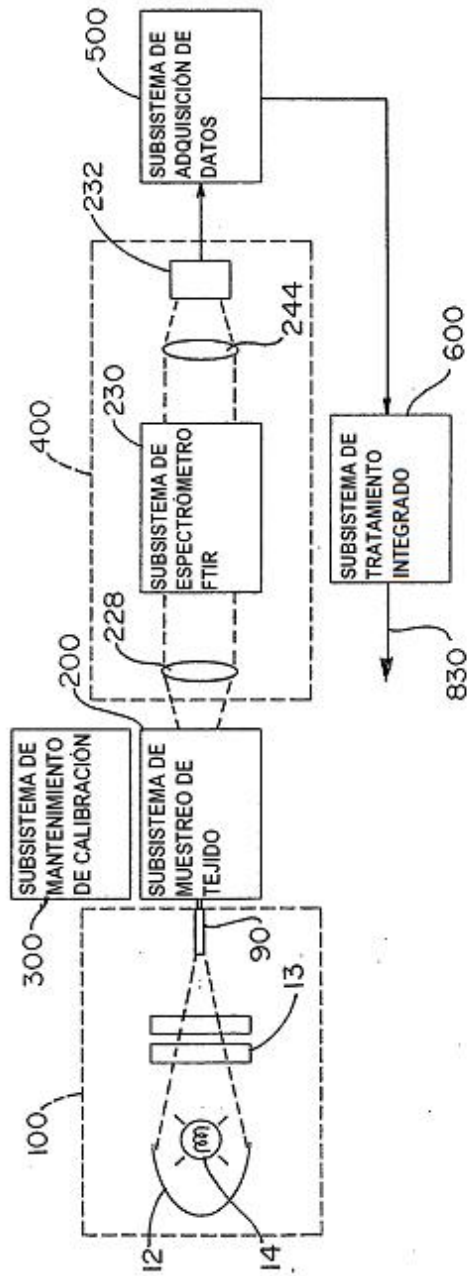
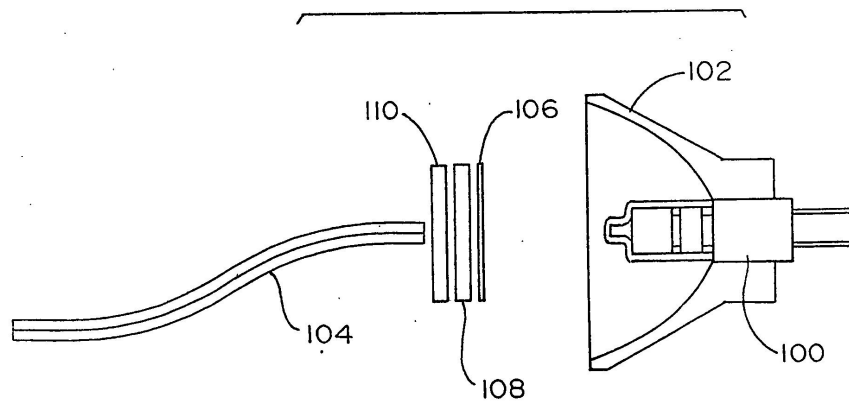


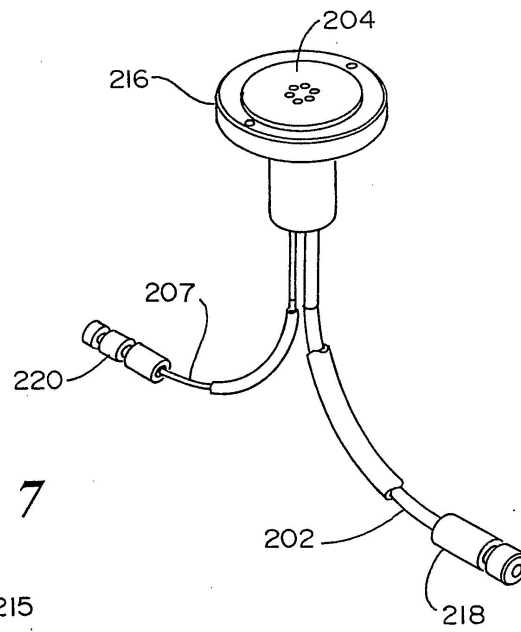
Fig. 4



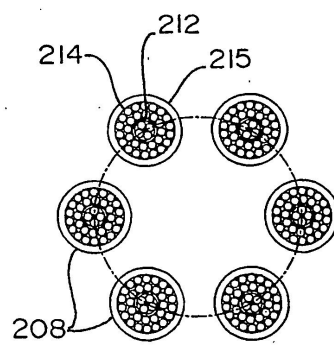
*Fig. 5*



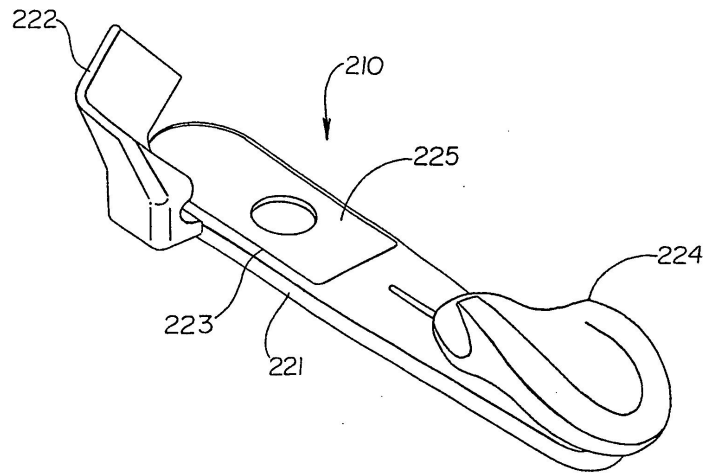
**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**



**Fig. 9**

