

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 742**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/487** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 27/327** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2007 E 11190794 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2437056**

54 Título: **Procedimientos para determinar la presencia de una cantidad suficiente de muestra de fluido en un tira de ensayo**

30 Prioridad:

**05.10.2006 US 850211 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.03.2014**

73 Titular/es:

**LIFESCAN SCOTLAND LTD (100.0%)  
Beechwood Business Park  
North Inverness IV2 3ED, GB**

72 Inventor/es:

**BLYTHE, STEPHEN PATRICK;  
MCEVOY, MARY;  
SUTTON, THOMAS;  
DAY, RICHARD MICHAEL;  
MILLS, LEANNE;  
DAY, EMMA VANESSA JAYNE;  
LEACH, CHRISTOPHER PHILIP;  
CARDOSI, MARCO F.;  
FINCH, MATTHEW;  
THOMPSON, ARLENE;  
NAYLOR, NINA ANTONIA;  
BAILEY, ERIC JASON;  
DOLAN, MICHAEL PATRICK;  
ANDERSON, GRETCHEN y  
COMSTOCK, LORRAINE**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 445 742 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).

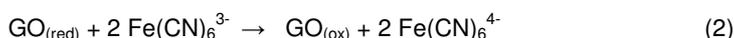
## Procedimientos para determinar la presencia de una cantidad suficiente de muestra de fluido en un tira de ensayo

### Descripción

5

#### 2. Descripción de la técnica relacionada

10 Las tiras de ensayo de glucosa electroquímicas, tales como las que se usan en el kit de ensayo de sangre completa One Touch® Ultra®, que están disponibles en LifeScan, Inc., están diseñadas para medir la concentración de glucosa en una muestra de sangre de pacientes con diabetes. La medición de la glucosa se basa en la oxidación específica de la glucosa por la flavoenzima glucosa oxidasa. Las reacciones que pueden tener lugar en una tira de ensayo de glucosa se resumen a continuación en las Ecuaciones 1 y 2.



20 Como se muestra en la Ecuación 1, la glucosa se oxida a ácido glucónico por acción de la forma oxidada de la glucosa oxidasa ( $\text{GO}_{(\text{ox})}$ ). Se debe señalar que  $\text{GO}_{(\text{ox})}$  también puede denominarse "enzima oxidada". Durante la reacción de la Ecuación 1, la enzima oxidada  $\text{GO}_{(\text{ox})}$  se convierte en su estado reducido, lo que se representa como  $\text{GO}_{(\text{red})}$  (es decir, "enzima reducida"). A continuación, la enzima reducida  $\text{GO}_{(\text{red})}$  se reoxida de nuevo a  $\text{GO}_{(\text{ox})}$  por reacción con  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  (denominado mediador oxidado o ferricianuro) como se muestra en la Ecuación 2. Durante la reoxidación de  $\text{GO}_{(\text{red})}$  a su estado oxidado  $\text{GO}_{(\text{ox})}$ ,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  se reduce a  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  (denominado mediador reducido o ferrocianuro).

25 Cuando las reacciones expuestas anteriormente se realizan con un voltaje de ensayo aplicado entre dos electrodos, se puede crear una corriente de ensayo por la reoxidación electroquímica del mediador reducido en la superficie del electrodo. De esta manera, como en un entorno ideal, la cantidad de ferricianuro creada durante la reacción química descrita anteriormente es directamente proporcional a la cantidad de glucosa en la muestra situada entre los electrodos, la corriente de ensayo generada sería proporcional al contenido de glucosa de la muestra. Un mediador, tal como el ferricianuro, es un compuesto que acepta electrones de una enzima tal como la glucosa oxidasa y después dona los electrones a un electrodo. Según se incrementa la concentración de glucosa en la muestra, la cantidad de mediador reducido que se forma también se incrementa, por tanto, hay una relación directa entre la corriente de ensayo resultante de la reoxidación del mediador reducido y la concentración de glucosa. En particular, la transferencia de electrones a través de la interfase eléctrica da lugar a un flujo de corriente de ensayo (2 moles de electrones por cada mol de glucosa que se oxida). La corriente de ensayo que resulta de la introducción de glucosa se puede denominar, por tanto, corriente de glucosa.

40 Debido a que puede ser muy importante conocer la concentración de glucosa en la sangre, particularmente para las personas con diabetes, se han desarrollado sistemas de medición que usan los principios expuestos anteriormente para permitir a una persona normal recoger una muestra y comprobar su sangre para determinar la concentración de glucosa en cualquier momento dado. La corriente de glucosa generada se monitoriza por los sistemas de medición y se convierte en una lectura de la concentración de glucosa usando un algoritmo que relaciona la corriente de ensayo con una concentración de glucosa por medio de una fórmula matemática sencilla. En general, los sistemas de medición funcionan en conjunto con una tira de ensayo desechable que incluye una cámara de recepción de la muestra y al menos dos electrodos colocados en la cámara de recepción de muestra además de la enzima (por ejemplo, glucosa oxidasa) y el mediador (por ejemplo, ferricianuro). En cuanto a su utilización, el usuario se pincha un dedo u otro sitio conveniente para inducir el sangrado e introduce una muestra de sangre en la cámara de recepción de la muestra, iniciándose de esta manera la reacción química expresada anteriormente.

55 En términos electroquímicos, la función del medidor es doble. Primero, proporciona un voltaje polarizante (aproximadamente de 0,4 V en el caso de One Touch® Ultra®) que polariza la interfase eléctrica y permite el flujo de corriente en la superficie de carbono del electrodo de trabajo. Segundo, mide la corriente que fluye en el circuito externo entre el ánodo (electrodo de trabajo) y el cátodo (electrodo de referencia). Por lo tanto, puede considerarse que el medidor de ensayo es un sistema electroquímico simple que funciona en modo de dos electrodos aunque, en la práctica, puede usarse un tercero o incluso un cuarto electrodo para facilitar la medición de la glucosa y/o llevar a cabo otras funciones del medidor del ensayo.

60 En la mayoría de las situaciones, la ecuación expuesta anteriormente se considera una aproximación suficiente de la reacción química que tiene lugar en la tira de ensayo y en el sistema de medición del ensayo que proporciona una representación suficientemente precisa del contenido en glucosa de la muestra de sangre. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias y para ciertos propósitos, puede ser ventajoso mejorar la precisión de la medición. Por ejemplo, las muestras de sangre que tienen un nivel alto o bajo del hematocrito pueden hacer que una medición de la glucosa sea imprecisa.

65

Un nivel de hematocrito representa un porcentaje del volumen de una muestra de sangre completa ocupado por glóbulos rojos. El nivel de hematocrito también puede representarse como una fracción de los glóbulos rojos presentes en una muestra de sangre completa. En general, una muestra de sangre con un hematocrito alto es más viscosa (hasta aproximadamente 10 centipoise a un hematocrito del 70%) que una muestra de sangre con un hematocrito bajo (aproximadamente 3 centipoise a un hematocrito del 20%). Además, una muestra de sangre con un hematocrito alto tiene un contenido mayor de oxígeno que la sangre con hematocrito bajo debido al incremento concomitante de hemoglobina, que es un vehículo para el oxígeno. Por tanto, el nivel de hematocrito puede tener influencia sobre la viscosidad y el contenido de oxígeno de la sangre. Como se describirá más adelante, tanto la viscosidad como el contenido de oxígeno pueden cambiar la magnitud de la corriente de glucosa y, a su vez, hacer que la concentración de glucosa sea imprecisa.

Una muestra con viscosidad alta (es decir, una muestra de sangre con hematocrito alto) puede ocasionar que la corriente de ensayo disminuya por varios factores tales como un descenso en 1) la tasa de disolución de la enzima y/o el mediador, 2) la tasa de reacción de la enzima, y 3) la difusión de un mediador reducido hacia el electrodo de trabajo. Un descenso de la corriente que no está basado en un descenso de la concentración de glucosa puede potencialmente causar una imprecisión en la concentración de glucosa que se tiene que medir.

Una tasa de disolución más lenta de la capa de reactivo puede ralentizar la reacción enzimática que se ilustra en las Ecuaciones 1 y 2 debido a que la enzima oxidada  $GO_{(ox)}$  debe disolverse primero antes de que pueda reaccionar con la glucosa. De forma similar, el ferricianuro ( $Fe(CN)_6^{3-}$ ) debe disolverse primero antes de que pueda reaccionar con la enzima reducida  $GO_{(red)}$ . Si la enzima oxidada no disuelta  $GO_{(ox)}$  no puede oxidar la glucosa, entonces la enzima reducida  $GO_{(red)}$  no puede producir el mediador reducido  $Fe(CN)_6^{4-}$  necesario para generar la corriente de ensayo. Además, la enzima oxidada  $GO_{(ox)}$  reaccionará con la glucosa y el mediador oxidado  $Fe(CN)_6^{3-}$  más lentamente si está en una muestra con viscosidad alta que si está en una muestra con viscosidad baja. La tasa más lenta de reacción en las muestras con viscosidad alta se atribuye al descenso total en la difusión de masa. La enzima oxidada  $GO_{(ox)}$  y la glucosa deben colisionar e interactuar juntas para que la reacción ocurra como se muestra en la Ecuación 1. La capacidad de la enzima oxidada  $GO_{(ox)}$  y de la glucosa para colisionar e interactuar juntas está ralentizada cuando están en una muestra viscosa. Además, el mediador reducido  $Fe(CN)_6^{4-}$  difundirá hacia el electrodo de trabajo más lentamente cuando está disuelto en una muestra de viscosidad alta. Debido a que la corriente de ensayo está típicamente limitada por la difusión del mediador reducido  $Fe(CN)_6^{4-}$  hacia el electrodo de trabajo, una muestra con viscosidad alta también atenuará la corriente de ensayo. En resumen, hay varios factores que causan el descenso de la corriente de ensayo cuando la muestra tiene una viscosidad aumentada.

Un contenido alto de oxígeno también puede causar un descenso en la corriente de ensayo. La enzima reducida  $GO_{(red)}$  puede reducir el oxígeno ( $O_2$ ) a peróxido de hidrógeno como se muestra en la Ecuación 3.



Como se señaló anteriormente, la enzima reducida  $GO_{(red)}$  puede también reducir el ferricianuro ( $Fe(CN)_6^{3-}$ ) a ferrocianuro ( $Fe(CN)_6^{4-}$ ) como se muestra en la Ecuación 2. Por lo tanto, el oxígeno puede competir con el ferricianuro por reaccionar con la enzima reducida ( $GO_{(red)}$ ). En otras palabras, que ocurra la reacción de la Ecuación 3 probablemente causará un descenso de la tasa de la reacción de la Ecuación 2. Debido a esta competición entre el ferricianuro y el oxígeno, un mayor contenido de oxígeno hará que se produzca menos ferrocianuro. A su vez, un descenso en ferrocianuro causaría una disminución en la magnitud de la corriente de ensayo. Por tanto, una muestra de sangre con alto contenido de oxígeno puede disminuir potencialmente la corriente de ensayo y afectar a la precisión de la medición de glucosa.

Por todo esto, hay un gran interés en el desarrollo de procedimientos que reduzcan los efectos del hematocrito sobre la medición de la glucosa. En algunos protocolos, se ha utilizado una membrana precolada de filtración de sangre que está separada de la capa de reactivo para retirar los glóbulos rojos y por tanto reducir el efecto del hematocrito. La membrana precolada de filtración de sangre que está separada de la capa de reactivo puede colocarse sobre el electrodo de trabajo. La utilización de una discreta membrana precolada de filtración de sangre no es satisfactoria en cuanto a que requiere una tira de ensayo más compleja, mayor volumen de muestra, y se tarda más en realizar el ensayo. La membrana precolada de filtración de sangre retiene una cierta cantidad de sangre que no entra en contacto con los electrodos de trabajo produciendo la necesidad de una muestra de sangre mayor. Además, se necesita un cierto tiempo para que la sangre se filtre en la membrana causando un aumento de los tiempos totales de ensayo. Los solicitantes reconocen que sería ventajoso reducir los efectos del hematocrito sin utilizar una membrana precolada de filtración de sangre que esté separada de la capa de reactivo.

Los solicitantes también reconocen que sería ventajoso implementar un sistema que use múltiples voltajes de ensayo en los que la magnitud del voltaje oscile entre al menos dos o más valores en vez de usarse una membrana precolada para reducir los efectos del hematocrito. Más particularmente, los solicitantes reconocen que sería ventajoso desarrollar un algoritmo que procesara matemáticamente los valores recogidos de la corriente de ensayo usando múltiples voltajes de ensayo de forma que pudiera determinarse una concentración de glucosa sustancialmente independiente del hematocrito.

**SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

5 En un aspecto, se proporciona un procedimiento para determinar la concentración de un analito  
 sustancialmente independiente del hematocrito en una muestra de fluido depositada en una tira de ensayo. La tira de  
 ensayo tiene un electrodo de referencia y un electrodo de trabajo, en la que el electrodo de trabajo está revestido  
 con una capa de reactivo. El procedimiento se puede conseguir por: aplicación de una muestra de fluido en la tira de  
 ensayo durante un periodo de reacción; aplicación de un primer voltaje de ensayo al electrodo de referencia y el  
 electrodo de trabajo y medición de un primer valor de la corriente entre ambos, teniendo el primer voltaje de  
 10 referencia un valor absoluto de aproximadamente 100 milivoltios a aproximadamente 600 milivoltios; aplicación de  
 un primer voltaje de reposo entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo, teniendo el primer voltaje de  
 reposo un valor absoluto de aproximadamente cero a aproximadamente 50 milivoltios; aplicación de un segundo  
 voltaje de ensayo entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo y medición de un segundo valor de  
 corriente, en el que el segundo voltaje de ensayo tiene un valor absoluto de aproximadamente 100 milivoltios a  
 15 aproximadamente 600 milivoltios; aplicación de un segundo voltaje de reposo entre el electrodo de referencia y el  
 electrodo de trabajo, en el que el segundo voltaje de reposo tiene un valor absoluto de aproximadamente cero a  
 aproximadamente 50 milivoltios; aplicación de un tercer voltaje de ensayo entre el electrodo de referencia y el  
 electrodo de trabajo y medición de un tercer valor de corriente, en el que el tercer voltaje de ensayo tiene un valor  
 absoluto de aproximadamente 100 milivoltios a aproximadamente 600 milivoltios; y cálculo de la concentración del  
 20 analito sustancialmente independiente del hematocrito a partir del primer, segundo y tercer valor de corriente.

En otro aspecto, se proporciona un método para detectar la presencia de cantidad suficiente de una  
 muestra de fluido depositada en una tira de ensayo. La tira de ensayo tiene un electrodo de referencia y un electrodo  
 de trabajo, en la que el electrodo de trabajo está recubierto con una capa de reactivo. El método se puede conseguir:  
 25 aplicando un voltaje de ensayo directo entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo y midiendo un valor  
 de corriente directo cerca del extremo del voltaje de ensayo directo, en el que el voltaje de ensayo directo es de  
 alrededor de 100 milivoltios a alrededor de 600 milivoltios; aplicar un voltaje de ensayo inverso de polaridad opuesta  
 y sustancialmente igual magnitud al voltaje de ensayo directo y medir un valor de corriente inverso cerca del extremo  
 del voltaje de ensayo inverso, el voltaje de ensayo inverso siendo de alrededor de 100 milivoltios a alrededor de 600  
 30 milivoltios negativos; calcular una proporción del valor de corriente inverso al valor de corriente directo; y determinar  
 si la proporción del valor de corriente inverso con el valor de corriente directo está dentro de un intervalo de  
 aceptación, el intervalo de aceptación siendo sustancialmente igual a dos cuando el electrodo de referencia es de  
 alrededor dos veces el área de superficie del electrodo de trabajo.

35 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para comprobar la funcionalidad de una tira de ensayo.  
 La tira de ensayo tiene un electrodo de referencia y un electrodo de trabajo, estando el electrodo de trabajo revestido  
 con una capa de reactivo. El procedimiento se puede conseguir por:

40 aplicación de una muestra de fluido en la tira de ensayo durante un periodo de reacción; aplicación de un  
 primer voltaje de ensayo entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo y medición de un primer  
 valor de corriente, en el que el primer voltaje de ensayo tiene un valor absoluto de aproximadamente 100  
 milivoltios a aproximadamente 600 milivoltios; aplicación de un primer voltaje de reposo entre el electrodo de  
 referencia y el electrodo de trabajo, teniendo el primer voltaje de reposo un valor absoluto de  
 aproximadamente cero a aproximadamente 50 milivoltios; aplicación de un segundo voltaje de ensayo entre  
 45 el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo y medición de un segundo valor de corriente, en el que el  
 segundo voltaje de ensayo tiene un valor absoluto de aproximadamente 100 milivoltios a aproximadamente  
 600 milivoltios; aplicación de un segundo voltaje de reposo entre el electrodo de referencia y el electrodo de  
 trabajo, en el que el segundo voltaje de reposo tiene un valor absoluto de aproximadamente cero a  
 aproximadamente 50 milivoltios; aplicación un tercer voltaje de ensayo entre el electrodo de referencia y el  
 electrodo de trabajo y medición de un tercer valor de corriente, en el que el tercer voltaje de ensayo tiene un  
 50 valor absoluto de aproximadamente 100 milivoltios a aproximadamente 600 milivoltios; aplicación de un tercer  
 voltaje de reposo entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo, en el que el tercer voltaje de  
 reposo tiene un valor absoluto de aproximadamente cero a aproximadamente 50 milivoltios; aplicación un  
 cuarto voltaje de ensayo entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo y medición de un cuarto  
 55 valor de corriente, en el que el cuarto voltaje de ensayo tiene un valor absoluto de aproximadamente 100  
 milivoltios a aproximadamente 600 milivoltios; aplicación de un cuarto voltaje de reposo entre el electrodo de  
 referencia y el electrodo de trabajo, en el que el cuarto voltaje de reposo tiene un valor absoluto de  
 aproximadamente cero a aproximadamente 50 milivoltios; aplicación de un quinto voltaje de ensayo entre el  
 electrodo de referencia y el electrodo de trabajo y medición de un quinto valor de corriente, en el que el quinto  
 60 voltaje de ensayo tiene un valor absoluto de aproximadamente 100 milivoltios a aproximadamente  
 600 milivoltios; generación de una curva que represente el primer, segundo, tercero, cuarto y quinto valores  
 de corriente como una función de tiempo de pulso, en el que el tiempo del pulso se mide en relación al inicio  
 del primer voltaje de ensayo; y utilización de regresión de mínimos cuadrados para ajustar la curva a la  
 siguiente ecuación:  
 65

$$I_i = \hat{\alpha} \sqrt{\frac{t_1}{t_i}} + \hat{\beta} \left(1 - \frac{t_1}{t_i}\right) + \eta_i$$

5

Donde:

10

$I_i$  es el valor de la corriente medido al final de cada voltaje de ensayo obtenido a un tiempo de pulso  $t_i$ ; en el que  $i$  varía de 1 a 5;

$\eta_i$  es un término de interferencia;

$\alpha$  es el primer parámetro de forma definido por la siguiente ecuación:

15

$$\hat{\alpha} = \sum_{i=1}^n \lambda_i I_i;$$

donde:

20

$$\lambda_i = \frac{S_{xx} Y_i - S_{xy} X_i}{\Delta};$$

25

$$X_i = 1 - \frac{t_1}{t_i};$$

30

$$Y_i = \sqrt{\frac{t_1}{t_i}};$$

35

$$S_{AB} = \sum_{i=1}^n A_i B_i;$$

40

$$\Delta = S_{xx} S_{yy} - S_{xy}^2;$$

45

y

$\beta$  es el segundo parámetro de la forma definido por la siguiente ecuación:

50

$$\hat{\beta} = \sum_{i=1}^n \theta_i I_i;$$

donde

55

$$\theta_i = \frac{S_{yy} X_i - S_{xy} Y_i}{\Delta}.$$

60

calculando un valor de  $\lambda$  y de  $\theta$  para cada tiempo de pulso y guardando los valores de  $\lambda$  y de  $\theta$  en una tabla de consulta del sistema de medición; calculando el valor de  $\alpha$  y de  $\beta$  usando los cinco valores de corriente y los valores de  $\lambda$  y de  $\theta$  de la tabla de consulta para obtener un ajuste mejor a la curva; y calculando la relación entre  $\alpha$  y  $\beta$  para la tira de ensayo y comparando la relación entre  $\alpha$  y  $\beta$  con un intervalo de aceptación para una tira de ensayo que funciona normalmente.

65

En otro aspecto, se proporciona un sistema de medición de un analito que incluye una tira de ensayo y un medidor del ensayo. Las tiras de ensayo incluyen un electrodo de referencia y un electrodo de trabajo, en el que el electrodo de trabajo está revestido con una capa de reactivo. El medidor del ensayo incluye un circuito electrónico y un procesador de señal. El circuito electrónico aplica varios voltajes al electrodo de referencia y al electrodo de trabajo con sus duraciones respectivas. El procesador de señal está configurado para determinar una concentración del analito sustancialmente independiente del hematocrito a partir de una pluralidad de valores de corriente que se han medido por el procesador tras la aplicación de una pluralidad de voltajes de ensayo a los electrodos de referencia y de trabajo, con una pluralidad de duraciones, intercalados con voltajes de reposo menores que los voltajes de ensayo que se aplican a los electrodos.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Se obtendrá un entendimiento mejor de las características y ventajas por referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se han utilizado los principios de la invención, y los dibujos adjuntos, de los que:

La FIG. 1 es una vista desde arriba de un sistema de medición que incorpora un algoritmo de acuerdo con las realizaciones ejemplares;

La FIG. 2 es una vista desde arriba, ampliada, del indicador de intervalos en la pantalla del sistema de medición mostrado en la FIG. 1 de acuerdo con una realización ejemplar;

La FIG. 3 es una vista desde arriba, ampliada, de un indicador de intervalos de acuerdo con otra realización ejemplar;

La FIG. 4 es una vista alternativa de la pantalla de un sistema de medición con un indicador de intervalos de acuerdo con una realización ejemplar;

La FIG. 5 es una vista frontal, ampliada, de un indicador de intervalos en la pantalla que se muestra en la FIG. 4;

La FIG. 6B es una vista esquemática simplificada del sistema de medición de la FIG. 1 formando una conexión eléctrica con una tira de ensayo;

La FIG. 7A es una representación gráfica de una pluralidad de voltajes de ensayo aplicados a un primer electrodo de trabajo de una tira de ensayo de acuerdo con un procedimiento;

La FIG. 7B es un gráfico que ilustra una realización alternativa por aplicación de una pluralidad de voltajes de ensayo que incluye un intervalo de tiempo de circuito abierto;

La FIG. 8 es una representación gráfica de las transiciones de corriente obtenidas cuando la pluralidad de voltajes de ensayo de la FIG. 7A se aplican a una tira de ensayo de acuerdo con un procedimiento;

La FIG. 9 es un gráfico logarítmico de los valores de corriente obtenidos a partir de las transiciones de corriente mostradas en la FIG. 8 representados como una función del tiempo al que los valores de la corriente se miden de acuerdo con un procedimiento;

La FIG. 10 es una representación gráfica de cinco voltajes de ensayo aplicados a la tira de ensayo de acuerdo con un procedimiento;

La FIG. 11 es una representación gráfica de las transiciones de corriente obtenidas cuando los cinco voltajes de ensayo de la FIG. 10 se aplican a una tira de ensayo de acuerdo con un procedimiento;

La FIG. 12 es un gráfico logarítmico de los valores de corriente  $I_1$  a  $I_5$  obtenidos a partir de las transiciones de corriente mostradas en la FIG. 13 representados como una función del tiempo al que los valores de la corriente se miden de acuerdo con un procedimiento;

La FIG. 13 es una representación de datos experimentales que muestra la relación entre el valor de la corriente  $I_0$  obtenido con muestras de varias concentraciones de glucosa y hematocrito y la concentración de glucosa obtenida en un instrumento de referencia de acuerdo con un procedimiento;

La FIG. 14 es una representación gráfica de un voltaje de ensayo constante aplicado a un segundo electrodo de trabajo de una tira de ensayo de acuerdo con un procedimiento;

La FIG. 15 es una representación gráfica de una transición de corriente obtenida cuando el voltaje de ensayo constante de la FIG. 14 se aplica a una tira de ensayo de acuerdo con un procedimiento;

La FIG. 16 es una representación gráfica de un voltaje de ensayo directo y un voltaje de ensayo inverso aplicados a una tira de ensayo de acuerdo con un procedimiento;

5 La FIG. 17 es una representación gráfica de las transiciones de corriente obtenidas cuando los voltajes de ensayo directo e inverso de la FIG. 17 se aplican a una tira de ensayo de acuerdo con un procedimiento;

10 La FIG. 18 es una representación gráfica de una pluralidad de voltajes de ensayo directo e inverso aplicados a una tira de ensayo de acuerdo con un procedimiento;

La FIG. 19 es una representación gráfica de las transiciones de corriente obtenidas cuando la pluralidad de voltajes de ensayo directo e inverso de la FIG. 19 se aplican a una tira de ensayo de acuerdo con un procedimiento;

15 La FIG. 20 es una representación gráfica de los valores de corriente directa e inversa obtenidos a partir de las transiciones de corriente mostradas en la FIG. 20 representadas como una función de la concentración de glucosa de las muestras de ensayo medidas con un instrumento de referencia;

20 La FIG. 21 es una representación del valor de la corriente en función del tiempo de pulso  $t_i$ , en el que el tiempo se mide en relación al inicio de un primer voltaje de ensayo y se aplican cinco voltajes de ensayo a la tira de ensayo de forma que  $i$  varía de 1 a 5 de acuerdo con un procedimiento;

La FIG. 22 es un gráfico que ilustra las relaciones  $\frac{a}{b}$  para las tiras de ensayo que presentan respuestas normales o anormales de acuerdo con un procedimiento;

25 La FIG. 23 es un gráfico que muestra la frecuencia en función de la relación  $\frac{a}{b}$  para tiras de ensayo nuevas (es decir, del grupo B) y antiguas (es decir, del grupo A) de acuerdo con un procedimiento;

30 La FIG. 24 ilustra una vista en perspectiva, despiezada, desde arriba de una tira de ensayo sin ensamblar que es una realización;

Las FIG. 25 y 26 son vistas desde arriba de una porción distal de una tira de ensayo parcialmente ensamblada que es adecuada para su uso en la presente invención;

35 La FIG. 27 es una vista en sección transversal a través de una matriz de microelectrodos del primer electrodo de trabajo de la tira de ensayo que se muestra en la FIG. 26;

40 La FIG. 28 es una vista en sección transversal a través de una matriz de microelectrodos de un primer electrodo 306 de trabajo de la FIG. 25 con capas adicionales que revisten una porción de aislamiento que incluye una capa de reactivo, almohadillas adhesivas y una porción hidrófila. La capa de reactivo se dispone en el lado distal de la porción hidrófila;

45 La FIG. 29 es una vista en sección transversal a través de una matriz de microelectrodos de un primer electrodo 306 de trabajo de la FIG. 25 con capas adicionales que revisten una porción de aislamiento que incluye una capa de reactivo, almohadillas adhesivas y una porción hidrófila. La capa de reactivo se dispone sobre la porción de aislamiento; y

50 La FIG. 30 es una vista desde arriba, ampliada, de la matriz de microelectrodos del primer electrodo de trabajo de la tira de ensayo mostrada en la FIG. 25.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

55 La invención que se desvela en el presente documento se refiere a sistemas y procedimientos de medición de la concentración de un analito en una muestra de fluido. La divulgación que se presenta a continuación describe la medición de una concentración de glucosa en una muestra de sangre completa; sin embargo, un experto habitual reconocerá que la descripción es fácilmente adaptable a la medición de las propiedades de otros analitos, tales como el colesterol, los cuerpos cetónicos y el alcohol, y en otros fluidos tales como la saliva, la orina, el líquido intersticial o soluciones de control de las tiras de ensayo.

60 Se entenderá adicionalmente que la presente invención no está limitada únicamente a la corrección por el hematocrito sino que también puede aplicarse para corregir los efectos de variación en la viscosidad y el contenido de oxígeno de las muestras. Por ejemplo, la sangre puede tener una viscosidad alta por una variedad de otras razones además de un hematocrito alto. Por ejemplo, a una temperatura baja (por ejemplo, alrededor de 10 °C), una concentración alta de lípidos y/o una alta concentración de proteínas también pueden hacer que la muestra de sangre se vuelva más viscosa.

65

También se entenderá adicionalmente que la invención sería también aplicable para reducir los efectos causados por el oxígeno y/o la viscosidad de fluidos fisiológicos distintos de la sangre. Por ejemplo, los fluidos fisiológicos pueden también incluir plasma, suero, líquido intersticial y una combinación de los mismos. Debería señalarse que no es raro que al realizar la extracción de muestras de líquido intersticial esté parcialmente mezclado con sangre.

La FIG. 1 ilustra un sistema 100 de medición adecuado para conectar con las tiras 90 de ensayo. El sistema 100 de medición incluye una pantalla 102, una carcasa 104, una pluralidad de botones 106 de interacción con el usuario, una tecla 107 de menú opcional y un puerto 108 de conexión para la tira. El sistema 100 de medición además incluye unos circuitos electrónicos en la carcasa 104 tales como una memoria 190, un microprocesador 192, componentes electrónicos para la aplicación de un voltaje de ensayo, y también para medir una pluralidad de valores de la corriente de ensayo (véase 190 y 192 en la FIG. 68). La parte proximal de la tira de ensayo (mostrada de forma esquemática en la FIG. 6B) puede insertarse en el puerto 108 de conexión para la tira. La pantalla 102 puede mostrar la concentración 110 de un analito y puede usarse para mostrar información que indique a un usuario como llevar a cabo un ensayo. Varios botones 106 de interacción con el usuario y una tecla 107 de menú opcional, permiten al usuario manejar el sistema 100 de medición navegando por el software de interacción con el usuario. Aunque los botones 106 de interacción con el usuario solo tienen una función, la tecla 107 de menú puede realizar múltiples funciones, dependiendo del menú mostrado en la pantalla 102. Por ejemplo, la tecla 107 de menú puede realizar al menos una de las siguientes funciones: atrás, más, añadir información, editar información, añadir comentarios, nuevo mensaje y salir. La tecla 107 de menú puede localizarse en cualquier situación conveniente para el usuario del sistema 100 de medición. En una realización, la tecla 107 de menú se localiza directamente debajo y en estrecha proximidad a un texto 112 de función en la pantalla 102 como se muestra en la FIG. 1.

En referencia a las FIG. 1 y 2, la pantalla 102 incluye además un indicador 114 de intervalos para representar una concentración 110 del analito. El indicador 114 de intervalos está localizado opcionalmente debajo de la concentración 110 del analito. El indicador 114 de intervalos incluye una pluralidad de valores 116 para indicar si la concentración 110 del analito está dentro de un intervalo 122 normal y un elemento 118 gráfico para marcar la región del indicador 114 de intervalos en la que se encuentra la concentración 110 del analito. La pluralidad de valores 116 incluye un intervalo 120 bajo, un intervalo 122 normal y un intervalo 124 alto. Unas etiquetas de texto con los intervalos bajo, normal y alto se pueden opcionalmente colocar en estrecha proximidad al indicador 114 de intervalos de tal manera que el elemento 118 gráfico no se oculte. Por ejemplo, el texto puede colocarse debajo, encima o a los lados, a la izquierda y/o a la derecha del indicador 114 de intervalos. Los valores numéricos para los límites superior e inferior del intervalo 122 normal pueden también colocarse opcionalmente encima, debajo o a los lados a la izquierda y/o a la derecha del indicador 114 de intervalos. En una realización ejemplar en la que la concentración 110 del analito es una concentración de glucosa, los límites mínimo y máximo del intervalo 122 normal son configurables opcionalmente por el usuario (por ejemplo, el paciente o el profesional sanitario) del sistema de medición y pueden adaptarse a si la medición se toma antes o después de haber comido. Por ejemplo, los límites mínimo y máximo del intervalo normal 122 pueden ajustarse a 70 mg/dl y 110 mg/dl, respectivamente, para una medición en ayunas o los límites mínimo y máximo pueden ajustarse a 90 mg/dl y 140 mg/ml, respectivamente, para una medición después de haber comido. En otra realización, los límites mínimo y máximo se ajustan a 70 mg/ml y 140 mg/ml, respectivamente, para abarcar cualquier concentración de glucosa dentro del intervalo 122 normal independientemente de si la glucosa se mide en ayunas o habiendo comido. La pluralidad de valores 116 se representa como un continuo en el que los indicadores de intervalo se distinguen unos de otros por el color o por cambios graduales en el sombreado. En la realización mostrada en las FIG. 1 y 2, se ilustra una primera región 126 de transición entre el intervalo 120 bajo y el intervalo 122 normal y una segunda región 128 de transición entre el intervalo 122 normal y el intervalo 124 alto como un cambio gradual de color o una región gris para indicar que los límites entre los intervalos bajo, normal y alto no están bien definidos y son, por tanto, regiones de precaución. El elemento 118 gráfico puede ser una flecha o puede tener una forma triangular y puede estar colocado encima, debajo y/o ligeramente superpuesto con el indicador 114 de intervalos. La orientación del elemento 118 gráfico es tal que apunta desde la dirección general de la concentración 110 del analito mostrada en el sistema 100 de medición hasta la región del indicador 114 de intervalos en la que cae la concentración 110 del analito, dando una información contextual para el usuario del sistema 100 de medición. La concentración 110 del analito se localiza generalmente en la mitad superior de la pantalla 102. El tamaño de los caracteres de la concentración 110 del analito mostrada en la pantalla del sistema 100 de medición será tal que sea fácil de leer para los usuarios que tienen visión limitada. En una realización, el tamaño de los caracteres de la concentración 110 del analito es al menos 72. En otra realización, la concentración 110 del analito ocupa al menos el 25% del área de la pantalla. La pantalla 102 puede también mostrar opcionalmente la fecha y la hora del ensayo.

La FIG. 3 ilustra otra realización ejemplar de un indicador 130 de intervalos de acuerdo con la presente invención. El indicador 130 de intervalos incluye una barra 131 deslizante para indicar si la concentración del analito medido está dentro del intervalo 132 normal, dentro del intervalo 133 dudoso, dentro del intervalo 134 bajo o dentro del intervalo 135 alto. El intervalo 133 dudoso se localiza entre el intervalo 134 bajo y el normal 132 o entre el intervalo 132 normal y el alto 135. La barra 131 deslizante puede moverse a lo largo del indicador 130 de intervalos y puede cambiar de color, dependiendo de donde se localice la barra 131 deslizante en el indicador 130 de intervalos. En una realización, cuando la medición de la concentración del analito está dentro del intervalo 132 normal, la barra 131 deslizante es de color verde y se localiza aproximadamente en el centro del indicador 130 de intervalos. Cuando

la concentración del analito medido está en el intervalo 133 dudoso, la barra 131 deslizante puede ser de color amarillo o naranja y está localizada ligeramente a la izquierda o a la derecha del centro del indicador 130 de intervalos. La barra 131 deslizante que tiene un color azul representa el intervalo 134 bajo y se localiza en el extremo izquierdo del indicador 130 de intervalos. Cuando la barra 131 deslizante tiene color rojo y se localiza en el extremo derecho del indicador 130 de intervalos, representa el intervalo 135 alto. También se pueden utilizar otros colores para la barra 131 deslizante, para representar los intervalos normal, dudoso, bajo y alto 132, 133, 134, 135. El indicador 130 de intervalos puede incluir opcionalmente múltiples símbolos geométricos 136 (por ejemplo, círculos, cuadrados, triángulos y/o rectángulos, rellenos o blancos y/o coloreados) para representar las regiones en un indicador 130 de intervalos que no incluya la barra 131 deslizante. Se puede mostrar texto o caracteres (por ejemplo, caracteres Kanji) que señalen cuándo la concentración de un analito medida está en el intervalo 134 bajo o en el intervalo 135 alto y opcionalmente colocarlos en estrecha proximidad al indicador 130 de intervalos. Por ejemplo, el texto y/o los caracteres pueden localizarse debajo, encima o aliado derecho y/o izquierdo del indicador 130 de intervalos. En una realización ejemplar en la que la concentración del analito medida es una concentración de glucosa, los límites inferior y superior del intervalo 122 normal se pueden configurar opcionalmente por el usuario (por ejemplo, el paciente o el profesional sanitario) del sistema de medición. Por ejemplo, los límites inferior y superior del intervalo 122 normal pueden ajustarse a 70 mg/ml y 140 mg/ml, respectivamente, para englobar cualquier concentración de glucosa dentro del intervalo 132 normal independientemente de cuándo se tome la medición. El indicador 130 de intervalos está generalmente localizado en la porción inferior de la pantalla del sistema de medición debajo de la lectura de la concentración del analito.

En otra realización mostrada en las FIG. 4 y 5, un indicador 140 de intervalos representa un cambio en la concentración 142 del analito entre un valor 144 en ayunas y un valor 146 después de haber comido. El indicador 140 de intervalos incluye una pluralidad de intervalos 148 para indicar si el cambio en la concentración 142 del analito está dentro de un intervalo 150 de cambio aceptable o un intervalo 152 de cambio inaceptable. El indicador 140 de intervalos también incluye un elemento 154 gráfico para marcar una región del indicador 140 de intervalos en la que se encuentra el cambio en la concentración 142 del analito. El etiquetado con texto de los intervalos de cambio puede opcionalmente estar situado en estrecha proximidad al indicador de intervalos de tal manera que el elemento 154 gráfico no se oculte. Por ejemplo, el texto puede situarse debajo, encima o al lado izquierdo y/o derecho del indicador 114 de intervalos. Opcionalmente, también puede situarse un valor numérico para el límite superior del intervalo 150 de cambio aceptable encima o debajo del indicador 114 de intervalos. El límite superior del intervalo 150 de cambio aceptable es configurable por el usuario (por ejemplo, por el paciente o por el profesional sanitario) y generalmente oscila de aproximadamente 20 a aproximadamente 70, siendo más habitualmente de aproximadamente 50. La pluralidad de valores 148 se representa como un continuo en el que los intervalos se distinguen unos de otros por el color o por cambios graduales en la sombra. En la realización que se muestra en las FIG. 4 y 5, una región 156 de transición entre el intervalo 150 de cambio aceptable y el intervalo 152 de cambio no aceptable se representa por un cambio gradual de color o una región gris para indicar que los límites entre los intervalos de cambio no están bien definidos y son, por tanto, regiones de precaución. El elemento 154 gráfico puede ser una flecha o puede ser de forma triangular y puede localizarse arriba, abajo y/o ligeramente superpuesto al indicador 140 de intervalos. La orientación del elemento 154 gráfico es tal que apunta desde la dirección general del cambio en la concentración 142 del analito mostrado en el sistema 100 de medición hacia la región del indicador 140 de intervalos en la que se encuentra el cambio en la concentración 142 del analito.

Las siguientes secciones describirán una realización de una tira de ensayo que puede usarse con un algoritmo de acuerdo con una realización de la presente invención para calcular una concentración de glucosa sustancialmente independiente del hematocrito. La FIG. 6A es una vista en perspectiva despiezada de una tira 90 de ensayo, que incluye múltiples capas dispuestas en un sustrato 5. Estas capas pueden incluir una capa 50 conductora, una capa 16 de aislamiento, una capa 22 de reactivo, una capa 60 adhesiva, una capa 70 hidrófila, y una capa superior 80. La tira 90 de ensayo se puede fabricar en una serie de etapas en las que la capa 50 conductora, la capa 16 de aislamiento, la capa 22 de reactivo y la capa 60 adhesiva se depositan secuencialmente en el sustrato 5 usando, por ejemplo, un proceso de serigrafado como se describe en la Publicación preconcedida de Estados Unidos N° US20050096409A, y la Solicitud Internacional publicada N° W02004040948A1, W02004040290A1, W02004040287 A 1, W02004040285A2, W02004040005A 1, W02004039897 A2 y W02004039600A2. En una realización alternativa, se puede usar un proceso de inyección de tinta para depositar la capa 22 de reactivo sobre el sustrato 5. Un ejemplo del proceso de inyección de tinta se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.179.979. La capa 70 hidrófila y la capa 80 superior pueden estar disponibles en una bobina y laminarse sobre el sustrato 5. La tira 90 de ensayo tiene una porción 3 distal y una porción 4 proximal como se muestra en la FIG. 6A.

Para la tira 90 de ensayo, como la que se muestra en la fig. 6A, la capa 50 conductora incluye un electrodo 10 de referencia, un primer electrodo 12 de trabajo, un segundo electrodo 14 de trabajo, un primer contacto 13, un segundo contacto 15, un contacto 11 de referencia y una barra 17 de detección de la tira. El primer contacto 13, el segundo contacto 15 y el contacto 11 de referencia pueden adaptarse para conectarse eléctricamente al medidor 100 de ensayo. Los materiales adecuados que se pueden utilizar para la capa conductora son Au, Pd, Ir, Pt, Rh, acero inoxidable, óxido dopado de estaño, carbono y similares. En una realización, el material de la capa conductora puede ser una tinta de carbono tal como las que se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.653.918. En

otra realización, el material para la capa conductora puede ser un metal pulverizado por pulverización catódica tal como oro o paladio.

5 La capa 16 de aislamiento incluye la abertura 18 en la tira 90 de ensayo, que expone una porción del electrodo 10 de referencia, el primer electrodo 12 de trabajo, y un segundo electrodo 14 de trabajo, para que puedan humedecerse por una muestra líquida. Por ejemplo, la capa 16 de aislamiento puede ser de tinta Ercon E6110-116 Jet Black Insulayer™, que puede adquirirse en Ercon, Inc. (Waltham, Massachusetts).

10 La capa 22 de reactivo puede situarse sobre una porción de la capa 50 conductora, el sustrato 5 y la capa 16 de aislamiento como se muestra en la FIG. 6A. En una realización de la presente invención, la capa 22 de reactivo puede incluir agentes químicos tales como una enzima, un mediador que reacciona selectivamente con la glucosa y un tampón para mantener el pH deseado. Los ejemplos de enzimas adecuadas para su uso en la presente invención pueden incluir la glucosa oxidasa o la glucosa deshidrogenasa. Más específicamente, la glucosa deshidrogenasa puede tener un cofactor de pirroloquinolina quinona (abreviado como PQQ y que puede denominarse con su nombre común que es metoxatina). Los ejemplos de mediadores adecuados para su uso en la presente invención pueden incluir ferricianuro o tricloruro de rutenio hexamina ( $[\text{Ru}(\text{NH})_6]^{2+}$ ) que también puede denominarse simplemente rutenio hexamina). Durante las reacciones que se muestran en las Ecuaciones 1 y 2, puede generarse una cantidad proporcional de mediador reducido que se mide electroquímicamente para calcular una concentración de glucosa. Los ejemplos de tampones adecuados para su uso en la presente invención pueden incluir fosfato, citrato o citraconato. Se pueden encontrar ejemplos de formulaciones de reactivos o tintas adecuadas para su uso en la presente invención en las Patentes de Estados Unidos 5.708.247 y 6.046.051; y en las Solicitudes Internacionales publicadas W001/67099 y W001/73124.

25 En una realización de la presente invención, la formulación puede incluir un tampón fosfato 200 mM con un pH de aproximadamente 7, un mediador de rutenio hexamina y una actividad enzimática que varía entre aproximadamente 1500 unidades/ml y aproximadamente 8000 unidades/ml. El intervalo de actividad enzimática puede seleccionarse de forma que la corriente de glucosa no dependa del nivel de actividad enzimática en la formulación, siempre y cuando el nivel de actividad enzimática esté en el intervalo señalado anteriormente. La actividad enzimática debería ser lo suficientemente grande para asegurar que la corriente de glucosa resultante no dependa de pequeñas variaciones de la actividad enzimática. Por ejemplo, la corriente de glucosa dependerá de la cantidad de actividad enzimática en la formulación si la actividad enzimática es menor de 1500 unidades/ml. Por otro lado, pueden aparecer problemas de solubilidad con niveles de actividad enzimática mayores de 8000 unidades/ml, donde la glucosa oxidasa no puede disolverse suficientemente en la formulación. La glucosa oxidasa puede conseguirse comercialmente en Biozyme Laboratories International Limited (San Diego, California, U.S.A.). La glucosa oxidasa puede tener una actividad enzimática de aproximadamente 250 unidades/mg cuando las unidades de la actividad enzimática están basadas en un ensayo de o-dianisidina a un pH de 7 y a 25 °C.

40 Opcionalmente, la capa 22 de reactivo incluye un material de matriz que ayuda a retener la capa 22 de reactivo sobre la superficie de la capa 50 conductora en presencia de la muestra de fluido y tiene dominios tanto hidrófobo como hidrófilo. Los materiales matriz útiles incluyen arcilla hidrófila, caolín, talco, silicatos, tierra de diatomeas o sílices tales como Cab-o-Sil® TS630 o Cab-o-Sil® 530 (Cabot Corporation, Boston, USA). Aunque sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que la sílice forma una red de gel en presencia de la muestra que mantiene eficazmente el revestimiento en la superficie del electrodo. Otros materiales de matriz útiles incluyen materiales poliméricos tales como alginato sódico, polietilenglicol, óxido de polietileno, alcohol polivinílico, acetato de polivinilo, materiales de látex polimérico, polietersulfonas, polímeros de ácido acrílico y metacrílico; polímeros derivados del almidón, celulosa y otros polisacáridos naturales, poliamidas o colágeno. Un ejemplo de una composición de revestimiento útil se desvela en el Ejemplo 1 de la Patente de Estados Unidos número 5.708.247. La capa 22 de reactivo también puede incluir opcionalmente al menos un agente estabilizante tales como la albúmina, la sacarosa, la trehalosa, el manitol o la lactosa, un agente para ajustar la viscosidad tal como la hidroxietilcelulosa, un agente antiespumante tal como el OC 1500, y al menos un agente humectante tales como la polivinilpirrolidona o el acetato de polivinilo.

55 En realizaciones ejemplares de la presente invención, la capa 22 de reactivo se aplica como una capa uniforme en la superficie expuesta de los electrodos. El espesor de la capa 22 de reactivo antes de contactar con la muestra de fluido no debería exceder los 50 micrómetros y normalmente no excede de 20 micrómetros. Para proporcionar un revestimiento eficaz en la superficie del electrodo, el espesor de la capa no debería ser menor de aproximadamente 5 micrómetros y normalmente no tiene menos de aproximadamente 7 micrómetros.

60 En la tira 90 de ensayo, la capa 60 adhesiva incluye una primera almohadilla 24 adhesiva, una segunda almohadilla 26 adhesiva, y una tercera almohadilla 28 adhesiva como se muestra en la FIG. 6A. En una realización de la presente invención, la capa 60 adhesiva puede comprender un adhesivo de copolímero acrílico basado en agua sensible a la presión que está disponible comercialmente en Tape Specialties LTD que se localiza en Tring, Herts, Reino Unido (pieza n° A6435). La capa 60 adhesiva se dispone sobre una porción de la capa 16 de aislamiento, la capa 50 conductora, y el sustrato 5. La capa 60 adhesiva une la capa 70 hidrófila a la tira 90 de ensayo.

65

La capa 70 hidrófila incluye una porción 32 hidrófila distal y una porción 34 hidrófila proximal. En una realización, la capa 70 hidrófila es de un material de poliéster que tiene una superficie hidrófila tal como un revestimiento antivapor que está disponible comercialmente en 3M. En la tira 90 de ensayo, la capa 80 superior incluye una porción 36 transparente y una porción 38 opaca como se muestra en la FIG. 6A. La capa 80 superior se dispone sobre y adherida a la capa 70 hidrófila. Como un ejemplo no limitante, la capa 80 superior puede ser de poliéster. Debe señalarse que la porción 36 transparente se sobrepone sustancialmente a la porción 32 distal hidrófila, lo que permite al usuario confirmar visualmente que la cámara 84 de recepción de la muestra está suficientemente rellena. La porción 38 opaca ayuda al usuario a observar un alto grado de contraste entre un fluido coloreado tal como, por ejemplo, la sangre en la cámara 84 de recepción de la muestra y la porción 38 opaca de la capa 80 superior.

La FIG. 6B muestra un esquema simplificado de un sistema 100 de medición interactuando con la tira 90 de ensayo. El sistema 100 de medición incluye un conector 180 de referencia, un primer conector 182 y un segundo conector 184, respectivamente, que forman una conexión eléctrica con el contacto 11 de referencia, el primer contacto 13 y el segundo contacto 15. Los 3 conectores mencionados anteriormente son parte del conector 108 del puerto para la tira. Cuando se lleva a cabo un ensayo, una primera fuente 186 de voltaje de ensayo puede aplicar una pluralidad de voltajes de ensayo  $V_i$ ; entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia, en los que los valores de  $i$  varían de 1 a  $n$  y, más típicamente, de 1 a 5. Entonces, el sistema 100 de medición puede medir una pluralidad de corrientes de ensayo  $I_i$ ; como resultado de la pluralidad de voltajes de ensayo  $V_i$ . De forma similar, la segunda fuente 188 de voltaje de ensayo puede aplicar un voltaje de ensayo  $V_E$  entre el segundo electrodo 14 de trabajo y el electrodo 10 de referencia. Entonces, el sistema 100 de medición puede medir una corriente de ensayo  $I_E$  como resultado del voltaje de ensayo  $V_E$ . Los voltajes de ensayo  $V_i$  y  $V_E$  pueden aplicarse al primer y segundo electrodos de trabajo, respectivamente, secuencialmente o simultáneamente. Los expertos en la materia reconocerán que el electrodo de trabajo al que se aplican  $V_i$  y  $V_E$  puede cambiarse, es decir, que el  $v_i$  puede aplicarse al segundo electrodo de trabajo y  $V_E$  puede aplicarse al primer electrodo de trabajo.

En general, es deseable usar un voltaje de ensayo que sea más positivo que el voltaje redox del mediador usado en la tira de ensayo. En particular, el voltaje de ensayo debería exceder al voltaje redox en una cantidad suficiente para asegurar que la corriente de ensayo que resulte, no dependa de pequeñas variaciones en el voltaje de ensayo. Debe señalarse que un voltaje redox describe una afinidad intrínseca de un mediador para aceptar o donar electrones cuando está suficientemente cerca de un electrodo que tiene un voltaje nominal. Cuando un voltaje de ensayo sea lo suficientemente positivo con respecto al voltaje redox del mediador, el mediador se oxidará rápidamente. De hecho, el mediador se oxidará tan rápidamente a un voltaje de ensayo suficientemente positivo (es decir, voltaje de ensayo limitante) que la magnitud de la corriente de ensayo estará limitada por la difusión del mediador a la superficie del electrodo (es decir, corriente de ensayo limitante). En una realización en la que el primer electrodo 12 de trabajo es de tinta de carbono y el mediador es ferricianuro, puede ser suficiente un voltaje de ensayo de aproximadamente +400 milivoltios para actuar como voltaje de ensayo limitante. Para una realización en la que el primer electrodo 12 de trabajo es de tinta de carbono y el mediador es  $Ru^{III}(NH_3)_6$ , un voltaje de ensayo de aproximadamente +200 milivoltios puede ser suficiente para actuar como un voltaje de ensayo limitante. Puede ser evidente para un experto en la materia que otras combinaciones entre mediadores y materiales del electrodo requerirán diferentes voltajes de ensayo limitantes.

A continuación se describirán procedimientos que utilizan las tiras 90 de ensayo y el sistema 100 de medición mencionados anteriormente.

En la etapa (a) de un procedimiento para determinar una concentración de un analito (por ejemplo, glucosa) sustancialmente independiente del hematocrito, se proporcionan el sistema 100 de medición y una tira 90 de ensayo de acuerdo con realizaciones ejemplares. El sistema 100 de medición incluye un circuito electrónico que se puede usar para aplicar una pluralidad de voltajes de ensayo a la tira de ensayo y para medir la corriente que fluye a través del primer electrodo de trabajo. El sistema 100 de medición también incluye un procesador de señal con un algoritmo para el procedimiento de cálculo de la concentración de analito (por ejemplo, la concentración de glucosa) en una muestra de fluido como se desvela en el presente documento. En una realización, el analito es glucosa sanguínea y la muestra de fluido es sangre completa, o un derivado o una fracción de la misma.

La FIG. 7A es una representación gráfica de una pluralidad de voltajes de ensayo  $V_i$  aplicados a una tira 90 de ensayo de acuerdo con el procedimiento, donde los valores de  $i$  varían de 1 a 3 o más. Antes de aplicar la muestra de fluido a la tira 90 de ensayo, el sistema de medición está en modo de detección de fluido en el que se aplica un voltaje de ensayo (no mostrado) de aproximadamente 400 milivoltios entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia. En la etapa (b) del procedimiento ejemplar, se aplica la muestra de fluido a la tira 90 de ensayo en un  $t_0$  y se permite que reaccione con la capa 22 de reactivo durante un periodo de reacción  $t_R$ . La presencia de suficiente cantidad en la zona de reacción de la tira 90 de ensayo se determina por medición de la corriente que fluye a través del primer electrodo 12 de trabajo. Se determina que comienza el inicio del periodo de reacción  $t_R$  cuando la corriente que fluye a través del primer electrodo 12 de trabajo alcanza un valor deseado, típicamente aproximadamente 0,150 nanoamperios (no mostrado), punto en el que se aplica un voltaje de aproximadamente -50 milivoltios a aproximadamente +50 milivoltios, típicamente de cero milivoltios, entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia. El periodo de reacción  $t_R$  es típicamente de

aproximadamente 0 segundos a aproximadamente 5 segundos y, más típicamente, es aproximadamente de 2,5 segundos o menos. Después del periodo de reacción  $t_R$ , se aplica la pluralidad de voltajes de ensayo  $V_i$  en el procedimiento ejemplar a la tira 90 de ensayo durante un tiempo total de ensayo  $t_T$  como se muestra en la FIG. 7A. Los constituyentes de la muestra de fluido pueden variar, pero en muchas realizaciones la muestra de fluido es generalmente sangre completa o un derivado o fracción de la misma. La cantidad de muestra de fluido que se aplica a la tira de ensayo varía, pero es generalmente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 microlitros ( $\mu\text{L}$ ), típicamente de aproximadamente 0,9 a 1,6  $\mu\text{L}$ . La muestra se aplica a la tira de ensayo utilizando cualquier protocolo conveniente, tal como inyección o absorción, según convenga. Un experto habitual en la materia reconocerá que, si la tira de ensayo es una tira reactiva de fase seca, se debería proporcionar una cantidad suficiente para completar un circuito eléctrico entre el primer electrodo de trabajo y el electrodo de referencia.

La FIG. 8 es una representación gráfica de las transiciones de corriente  $A$ ; (es decir, la respuesta de la corriente eléctrica medida en nanoamperios en función del tiempo) que se miden cuando la pluralidad de voltajes de ensayo  $V_i$ ; de la FIG. 8 se aplican a la tira 90 de ensayo, donde los valores de  $i$  varían de 1 a 3 o más. Los valores de la corriente  $I_i$ ; obtenidos a partir de las transiciones de corriente  $A$ ; son generalmente indicativos de la concentración del analito en la muestra como se describirá con referencia al Ejemplo 1 posteriormente. En referencia a las FIG. 9 y 10, en la etapa (e) del procedimiento ejemplar, se aplica un primer voltaje de ensayo  $V_1$  entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia a un tiempo  $t_1$  y se mide un primer valor de corriente  $I_1$  al final o cerca del final del primer voltaje de ensayo  $V_1$  a un tiempo  $S_1$ . El primer voltaje de ensayo  $V_1$  aplicado entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia es generalmente de aproximadamente +100 milivoltios a aproximadamente +600 milivoltios o de aproximadamente 100 milivoltios negativos a aproximadamente 600 milivoltios negativos. En una realización en la cual el primer electrodo 12 de trabajo es de tinta de carbono y el mediador es ferricianuro, se utiliza un voltaje de ensayo de aproximadamente +400 milivoltios. En otra realización en la que el primer electrodo 12 de trabajo es de tinta de carbono y el mediador es tricloruro de rutenio hexamina, se utiliza un voltaje de ensayo de aproximadamente +200 milivoltios. Será evidente para un experto en la materia que otras combinaciones de mediador y material del electrodo requerirán diferentes voltajes de ensayo. La duración del primer voltaje de ensayo  $V_1$  es generalmente de aproximadamente 0,1 y 1,0 segundos y es típicamente de aproximadamente 0,5 segundos. Típicamente, el tiempo  $S$  se mide en relación al tiempo  $t_1$ . En la práctica, los valores de corriente /;son la media de una serie de mediciones obtenidas durante un corto intervalo, por ejemplo, 5 mediciones obtenidas a intervalos de 0,01 segundos empezando aproximadamente a los 0,5 segundos. Un experto habitual en la materia reconocerá que también pueden utilizarse otros intervalos.

En referencia a la figura 7A, se aplica un primer voltaje de reposo  $V_{R1}$  de aproximadamente -50 a aproximadamente +50 milivoltios, típicamente cero milivoltios, entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia. La duración del voltaje de reposo  $V_{R1}$  es generalmente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,0 segundos. Más típicamente la duración del voltaje es aproximadamente de 0,1 segundos.

En el procedimiento ejemplar, se aplica un segundo voltaje de ensayo  $V_2$  entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia en un tiempo  $t_2$  y se mide un segundo valor de corriente  $I_2$  al final o cerca del final del segundo voltaje de ensayo  $V_2$  en un tiempo  $S_2$ . El segundo voltaje de ensayo  $V_2$  aplicado entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia es generalmente de aproximadamente +100 milivoltios a aproximadamente +600 milivoltios o de aproximadamente 100 milivoltios negativos a aproximadamente 600 milivoltios negativos. En una realización en la que el primer electrodo 12 de trabajo es de tinta de carbono y el mediador es ferricianuro, se utiliza un voltaje de ensayo de aproximadamente +400 milivoltios. En otra realización en la que el primer electrodo 12 de trabajo es de tinta de carbono y el mediador es de tricloruro de rutenio hexamina, se utiliza un voltaje de ensayo de aproximadamente +200 milivoltios. Será evidente para un experto en la materia que otras combinaciones de mediador y material del electrodo requerirán diferentes voltajes de ensayo. La duración del segundo voltaje de ensayo  $V_2$  es generalmente de aproximadamente 0,1 a 1,0 segundos y es típicamente de aproximadamente 0,5 segundos. Típicamente, el tiempo  $S_2$  se mide en relación al tiempo  $t_2$ . En realizaciones ejemplares, los voltajes de ensayo  $V_1$  y  $V_2$  utilizados para obtener los valores primero y segundo de la corriente  $I_1$  e  $I_2$  tienen la misma magnitud y duración.

En el procedimiento ejemplar, se aplica un segundo voltaje de reposo  $V_{R2}$  de aproximadamente -50 a aproximadamente +50 milivoltios, típicamente cero milivoltios, entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia. La duración del voltaje de reposo  $V_{R2}$  es generalmente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,0 segundos. Más típicamente, la duración del voltaje es aproximadamente de 0,1 segundos. En realizaciones ejemplares, los voltajes de reposo  $V_{R1}$  y  $V_{R2}$  tienen la misma magnitud y duración.

En el procedimiento ejemplar, se aplica un tercer voltaje de ensayo  $V_3$  entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia en un tiempo  $t_3$  se mide un tercer valor de corriente  $I_3$  al final o cerca del final del tercer voltaje de ensayo  $V_3$  en un tiempo  $S_3$ . El tercer voltaje de ensayo aplicado entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia es generalmente de aproximadamente +100 milivoltios a aproximadamente +600 milivoltios o de aproximadamente 100 milivoltios negativos a aproximadamente 600 milivoltios negativos. En una realización en la que el primer electrodo 12 de trabajo es una tinta de carbono y el mediador es ferricianuro, se utiliza un voltaje de ensayo de aproximadamente +400 milivoltios. En otra realización en la que el primer electrodo 12 de trabajo es una tinta de carbono y el mediador es tricloruro de rutenio hexamina, se

utiliza un voltaje de ensayo de aproximadamente +200 milivoltios. Será evidente para un experto en la materia que otras combinaciones de mediador y material del electrodo requerirán diferentes voltajes de ensayo. La duración del tercer voltaje de ensayo  $V_3$  es generalmente de aproximadamente 0,1 a 1,0 segundos y es típicamente de aproximadamente 0,5 segundos. Típicamente, el tiempo  $S_3$  se mide en relación al tiempo  $t_3$ . En realizaciones ejemplares, los voltajes  $V_1$ ,  $V_2$  y  $V_3$  utilizados para obtener el primer, segundo y tercer valores de corriente  $I_1$ ,  $I_2$  e  $I_3$  tienen la misma magnitud y duración.

Las etapas anteriores pueden repetirse una o varias veces como se desee para obtener un tercer valor o valores sucesivos de corriente  $I_i$ . A modo de ilustración, se muestran en las FIG. 9 y 10 tres voltajes de ensayo  $V_1$ ,  $V_2$  y  $V_3$  con los correspondientes valores de corriente  $I_1$ ,  $I_2$  e  $I_3$ , medidos a  $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$ , pero también se podrían utilizar cuatro o más voltajes de ensayo. En realizaciones ejemplares, se utilizan cinco voltajes de ensayo. Típicamente, los tiempos  $S_i$  se miden en relación a los tiempos  $t_i$ . En una realización ejemplar, todos los voltajes de ensayo  $V_i$  son iguales, tanto en términos de magnitud como de duración. De la misma manera, todos los voltajes de reposo  $V_{Ri}$  son típicamente iguales tanto en términos de magnitud como de duración.

En una realización alternativa, se puede aplicar un voltaje de ensayo de onda que incluye un intervalo de tiempo de circuito abierto después de que el fluido se detecta en la tira 90 de ensayo. Por ejemplo, el voltaje de ensayo que se muestra en la FIG. 7B es de 400 mV durante un intervalo de tiempo de detección del fluido  $t_{FD}$ . Una vez que el sistema 100 de medición reconoce que el fluido fisiológico se ha aplicado debido, por ejemplo, a que la corriente de ensayo se ha incrementado hasta un nivel mayor que un umbral predeterminado (por ejemplo, aproximadamente 50 nanoamperios) para un intervalo de tiempo predeterminado (por ejemplo, aproximadamente 20 milisegundos), el sistema 100 de medición asigna un segundo marcador cero a un tiempo  $t_0$  y aplica un circuito abierto para un intervalo de tiempo de circuito abierto  $t_{oc}$ . Por ejemplo, como se muestra en la FIG. 7B, el intervalo de tiempo de circuito abierto  $t_{oc}$  es de aproximadamente 300 milisegundos. Tras completarse el intervalo de tiempo de circuito abierto  $t_{oc}$ , el medidor de ensayo puede aplicar una pluralidad de voltajes de ensayo que oscilan entre un voltaje de ensayo de aproximadamente 250 milivoltios durante aproximadamente 100 milisegundos y un voltaje de reposo de aproximadamente cero voltios que tiene una duración que varía de 0,05 segundos a aproximadamente 1,0 segundos.

En el procedimiento ejemplar, la concentración del analito sustancialmente independiente del hematocrito en la muestra se calcula a partir del primer, segundo y tercer valores de corriente. Se ilustran procedimientos para calcular la concentración de glucosa sustancialmente independiente del hematocrito de muestras de acuerdo con esta etapa en relación a la FIG. 9 y los Ejemplos 1 y 2 que se describirán posteriormente.

La FIG. 9 ilustra una representación logarítmica típica del valor de la corriente en función del tiempo al que se mide el valor de la corriente. Usando técnicas de regresión estándar, se obtiene una línea recta L1 sobre la representación logarítmica. Se puede calcular a partir de la línea L1 un valor corregido de la corriente  $I_0$  a un tiempo  $t_1$  (correspondiente a S igual a cero segundos o  $S_0$ ). El valor corregido de la corriente  $I_0$  corresponde al valor de la corriente  $I_1$  una vez corregido con respecto al hematocrito. Si la muestra es una muestra de sangre completa, entonces  $I_0$  es generalmente insensible a la fracción del hematocrito de la muestra y, por tanto, es sustancialmente independiente del hematocrito.

EJEMPLO 1: El Procedimiento de Acuerdo con la Presente Invención se Utiliza para Determinar una Concentración de Glucosa Sustancialmente Independiente del Hematocrito en Muestras de Sangre Completa.

Los datos se obtuvieron con tiras de ensayo del mismo lote de fabricación para evitar la variabilidad entre lotes. Para los propósitos de los ensayos, se utilizaron muestras de sangre completa. Las muestras de sangre se usaron antes de transcurrieran 30 horas desde la extracción, con heparina litio como anticoagulante. Cada muestra de sangre se dividió en alícuotas y se ajustó con glucosa según se necesitara para dar a las muestras unas concentraciones de glucosa en el intervalo de 50 a 650 miligramos de glucosa por decilitro (mg/dl). La concentración de glucosa de cada alícuota se determinó usando un Analizador YSI 2300 STAT Plus Glucose & Lactate Analyzer (disponible en YSI Life Sciences, Yellow Springs, Ohio). La fracción de hematocrito  $h$  de cada alícuota se determinó también usando técnicas de centrifugación estándar y se midió como la fracción de glóbulos rojos presentes en una muestra de sangre completa. Las fracciones de hematocrito se ajustaron según se necesitaba añadiendo a las muestras glóbulos rojos o plasma sanguíneo para obtener muestras con intervalo de hematocrito de 0,20 a 0,70.

Un medidor de laboratorio se conectó a un electrodo de trabajo y al electrodo de referencia de un sensor del tipo tira de ensayo OneTouch Ultra. En las FIG. 12 y 13, respectivamente, se representa un ejemplo del procedimiento en el que se aplicó una pluralidad de voltajes de ensayo a la tira de ensayo y se midieron las transiciones de corriente resultantes de la pluralidad de voltajes de ensayo. Se aplicó inicialmente un voltaje de ensayo (no mostrado en la FIG. 10) de 400 milivoltios entre el electrodo de referencia y el primer electrodo de trabajo 10, 12. Después, se aplicó a la tira de ensayo una alícuota de sangre completa que tenía una concentración de glucosa y un hematocrito conocidos. La presencia de suficiente cantidad en la zona de reacción de la tira de ensayo se determinó por medición del flujo de la corriente a través del primer electrodo 12 de trabajo. Se determinó que comenzaba el inicio del periodo de reacción  $t_R$  cuando la corriente que fluía a través del primer electrodo 12 de

trabajo alcanzó un nivel suficiente, típicamente aproximadamente 0,150 nanoamperios (no mostrado en la FIG. 10), momento en el que se aplicó un voltaje de reposo  $V_R$  de cero milivoltios entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia. Después del periodo de reacción  $t_R$  de 2,5 segundos durante el que se permitió que la capa 22 de reactivo reaccionara con la muestra, un cronómetro del medidor de laboratorio hizo que se aplicara el primer voltaje de ensayo  $V_1$  de 400 milivoltios entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia. Al mismo tiempo se midió la transición de corriente  $A_1$  en el primer electrodo 12 de trabajo (véase la FIG. 11). Se aplicó el voltaje de ensayo  $V_1$  durante un periodo de 0,5 segundos, después de lo cual se midió el valor de la primera corriente  $I_1$ . Al final del voltaje de ensayo  $V_1$ , se aplicó un voltaje de reposo  $V_R$  de cero milivoltios entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia durante 0,1 segundos. Después de 0,1 segundos, se aplicó un segundo voltaje de ensayo  $V_2$  de 400 milivoltios durante 0,5 segundos para obtener un segundo valor de corriente  $I_2$ . El procedimiento se repitió para obtener tres valores de corriente más  $I_3$ ,  $I_4$  e  $I_5$ , correspondientes a los voltajes  $V_3$ ,  $V_4$  y  $V_5$ , respectivamente.

En referencia de nuevo a la FIG. 11, los valores de corriente  $I_1$  a  $I_5$  se obtuvieron a partir de una serie de transiciones de corriente  $A_1$  a  $A_5$ . Se midió el tiempo  $t$  al que se obtuvo cada valor de  $I_1$  a  $I_5$  en relación al inicio del primer voltaje de ensayo  $V_1$ . Los valores de corriente  $I_1$  a  $I_5$  se calcularon habitualmente a partir de las transiciones de corriente  $A_1$  a  $A_5$  inmediatamente antes de la retirada de los voltajes  $V_1$  a  $V_5$ . La FIG. 12 muestra una representación del logaritmo de base 10 del tiempo al que se mide el valor de la corriente en el eje X frente al logaritmo de base 10 de los correspondientes valores de corriente  $I_1$  a  $I_5$  en el eje Y. Usando técnicas de regresión estándar de datos, se obtuvo una línea L2 que tiene una pendiente  $m_1$  y una intersección  $c_1$  (no mostrada). El valor de corriente corregido  $I_0$ , que representa un valor corregido con respecto al hematocrito de  $I_1$ , se obtuvo usando la Ecuación 4 mostrada a continuación.

$$\log(I_0) = m_1 * \log(t) + c_1 \quad (4)$$

Donde:

$t$  es el tiempo al que se mide cada valor de corriente  $I_i$ ;

$\log(t)$  es el logaritmo de base 10 de  $t$ ; y

$\log(I_0)$  es el logaritmo de base 10 del valor de corriente corregido  $I_0$ .

El valor de corriente corregido  $I_0$  se determinó para cada muestra ensayada y así se obtuvo la representación mostrada en la FIG. 13. En el eje Y se representa el valor de corriente corregido  $I_0$  en amperios. En el eje X se representa la concentración de glucosa  $G_{ref}$  en mg/dl de las alícuotas tomadas de las mismas muestras de sangre completa como se describió anteriormente y medida con un analizador de glucosa de referencia (es decir, el YSI 2300 STAT Plus Glucose & Lactate Analyzer). Se obtuvo una línea L3 usando técnicas de regresión lineal estándar. La pendiente de la línea L3 se usa para calcular una concentración corregida de glucosa en sangre  $G_0$  en mg/dl a partir de los valores de corriente corregidos  $I_0$  de acuerdo con la Ecuación 5 mostrada a continuación.

$$G_0 = \frac{(I_0 - c_2)}{m_2} \quad (5)$$

Donde:

$G_0$  es la concentración de glucosa en sangre de la alícuota correspondiente al valor de corriente corregido  $I_0$  y es, por tanto, una concentración de glucosa sustancialmente independiente del hematocrito;

$c_2$  es el valor de la intersección obtenido a partir de la línea recta de la FIG. 13 por regresión lineal; y

$m_2$  es la pendiente de la línea mostrada en la FIG. 13.

El procedimiento también es útil para discriminar entre una muestra de sangre completa y una solución de control que se utilice para comprobar el funcionamiento apropiado del medidor. Tales soluciones de control se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.187.100 y 5.605.837. Generalmente, la pendiente de la línea L1 (como se muestra en la FIG. 9) medida usando una alícuota de una solución de control es diferente de la pendiente de la línea L1 medida usando una alícuota de sangre completa con una fracción de hematocrito entre 0,20 y 0,70. Por lo tanto, determinando la pendiente  $m_1$  de la línea L1 usando la Ecuación 6 mostrada a continuación, es posible determinar si en la tira de ensayo está presente una alícuota de sangre completa o una alícuota de solución de control.

$$m_1 = \frac{\log(I_0) - c_1}{\log(t)} \quad (6)$$

5

En la práctica, en el sistema de medición se almacena un intervalo de aceptación para la pendiente de la línea L1 para la sangre completa y para la solución de control y se muestra un mensaje de error en la pantalla del sistema de medición si la pendiente de la línea L 1 cae fuera del intervalo de aceptación para cualquier tipo de muestra.

10

15

20

25

30

35

Otra realización incluye un procedimiento para determinar la presencia de suficiente muestra de fluido en una tira de ensayo. En una realización (no reivindicada) que se muestra en las FIG. 16 y 17, tras aplicar un voltaje de ensayo directo  $V_{\text{directo}}$  en la tira 90 de ensayo y medir un valor de corriente directa /directa cerca del final del voltaje de ensayo directo  $V_{\text{directo}}$ , se aplica un voltaje inverso  $V_{\text{inverso}}$  entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia y se mide una corriente inversa  $I_{\text{inversa}}$  cerca del final del  $V_{\text{inverso}}$ . El voltaje de ensayo directo  $V_{\text{directo}}$  aplicado entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia es generalmente de aproximadamente +100 milivoltios a aproximadamente +600 milivoltios. En una realización en la que el primer electrodo 12 de trabajo es una tinta de carbono y el mediador es ferricianuro, se utiliza un voltaje de ensayo directo de aproximadamente +400 milivoltios. En otra realización en la que el primer electrodo 12 de trabajo es una tinta de carbono y el mediador es tricloruro de rutenio hexamina, se usa un voltaje de ensayo directo de aproximadamente +200 milivoltios. El voltaje de ensayo inverso  $V_{\text{inverso}}$  aplicado entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia es generalmente de aproximadamente -100 milivoltios a aproximadamente -600 milivoltios. En una realización en la que el primer electrodo 12 de trabajo es una tinta de carbono y el mediador es ferricianuro, se utiliza un voltaje de ensayo inverso de aproximadamente -400 milivoltios. En otra realización en la que el primer electrodo 12 de trabajo es una tinta de carbono y el mediador es tricloruro de rutenio hexamina, se utiliza un voltaje de ensayo inverso de aproximadamente -200 milivoltios. La duración de los voltajes de ensayo directo e inverso es generalmente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 segundos o, más típicamente, es aproximadamente de 0,5 segundos. El valor de corriente inversa  $I_{\text{inversa}}$  medido se puede usar para diagnóstico y propósitos cuantitativos para determinar, por ejemplo, si está presente suficiente cantidad en la tira para llevar a cabo el ensayo calculando la relación del valor absoluto del valor de corriente inversa  $I_{\text{inversa}}$  con respecto al valor de corriente directa  $I_{\text{directa}}$ . En muchos casos, dicha relación de corrientes  $I_{\text{inversa}}/I_{\text{directa}}$  cae dentro del intervalo esperado, típicamente de aproximadamente 2:1 para una tira de ensayo en la que el electrodo de referencia es aproximadamente dos veces el área de superficie del electrodo de trabajo, y generalmente es indicativa del funcionamiento apropiado de la tira de ensayo. En la práctica, en el sistema de medición se almacena un intervalo de aceptación para la relación de corrientes  $I_{\text{inversa}}/I_{\text{directa}}$  y si la relación de corrientes  $I_{\text{inversa}}/I_{\text{directa}}$  cae fuera del intervalo de aceptación, se muestra un mensaje de error en la pantalla del sistema de medición.

40

45

50

55

60

65

En otra realización en la que se determina la presencia de suficiente cantidad de muestra, la etapa de cálculo (h) del procedimiento ejemplar va precedida o seguida por una etapa adicional en la que se aplica una pluralidad de voltajes de ensayo inversos  $V_{\text{inverso}}$  de polaridad opuesta y sustancialmente de igual magnitud al primer, segundo y tercer voltajes de ensayo aplicados entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia. En la realización mostrada en las FIG. 18 y 19, el primer, segundo y tercer voltajes de ensayo del procedimiento ejemplar se definen como primer, segundo y tercer voltajes de ensayo directos  $V_{\text{directo1}}$ ,  $V_{\text{directo2}}$  y  $V_{\text{directo3}}$ . Después de aplicar la pluralidad de voltajes de ensayo directos  $V_{\text{directo1}}$ ,  $V_{\text{directo2}}$  y  $V_{\text{directo3}}$  entre el electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia, se aplica una pluralidad de voltajes de ensayo inversos  $V_{\text{inverso1}}$ ,  $V_{\text{inverso2}}$  y  $V_{\text{inverso3}}$  al sensor de ensayo 90. Cada uno de los voltajes de ensayo directo e inverso están separados por aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,0 segundos (típicamente aproximadamente 0,1 segundos) tiempo en el que se aplica un voltaje de reposo  $V_R$  de aproximadamente -50 a aproximadamente +50 milivoltios, y más típicamente de cero milivoltios, entre los electrodos de trabajo y de referencia. Cada uno de los voltajes de ensayo directos aplicados entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia es generalmente de aproximadamente +100 milivoltios a aproximadamente +600 milivoltios. En una realización en la que el primer electrodo 12 de trabajo es una tinta de carbono y el mediador es ferricianuro, cada uno de los voltajes de ensayo directos es de aproximadamente +400 milivoltios. En otra realización en la que el primer electrodo 12 de trabajo es una tinta de carbono y el mediador es tricloruro de rutenio hexamina, cada uno de los voltajes de ensayo directos es de aproximadamente +200 milivoltios. Cada uno de los voltajes de ensayo inversos aplicados entre el primer electrodo 12 de trabajo y el electrodo 10 de referencia es generalmente de aproximadamente -100 milivoltios a aproximadamente -600 milivoltios. En una realización en la que el primer electrodo 12 de trabajo es una tinta de carbono y el mediador es ferricianuro, cada uno de los voltajes de ensayo inversos es de aproximadamente -400 milivoltios. En otra realización en la que el primer electrodo 12 de trabajo es una tinta de carbono y el mediador es tricloruro de rutenio hexamina, cada uno de los voltajes de ensayo inversos es de aproximadamente -200 milivoltios. Al final de cada uno de los voltajes de ensayo directos aplicados a la tira de ensayo (por ejemplo, después de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 segundos o, más típicamente, aproximadamente 0,5 segundos para cada voltaje de ensayo directo), se mide un valor de corriente directa  $I_{\text{directa1}}$ ,  $I_{\text{directa2}}$  e  $I_{\text{directa3}}$ . Similarmente, al final de la aplicación de cada voltaje de ensayo inverso a la tira de ensayo (por ejemplo, después de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 segundos o, más típicamente, aproximadamente 0,5 segundos para cada voltaje de ensayo inverso), se mide un valor de corriente inversa  $I_{\text{inversa1}}$ ,  $I_{\text{inversa2}}$  e  $I_{\text{inversa3}}$ . En referencia a la FIG. 18, después se calcula una pendiente  $m_{\text{inversa}}$  a partir de una línea L4 obtenida por regresión lineal a partir de los

valores de corriente inversa representados como una función de la concentración de glucosa de la muestra de ensayo medida con un instrumento de referencia. También se calcula una pendiente  $m_{directa}$  para una línea L5 generada por regresión lineal a partir de los valores de corriente directa representados como una función de la concentración de glucosa en la muestra de ensayo medida con un instrumento de referencia. Después se calcula el valor absoluto de la relación de pendientes  $m_{inversa}/m_{directa}$  para determinar si está presente suficiente cantidad en la tira de ensayo para llevar a cabo el ensayo. En muchos casos, tales relaciones de pendiente se encuentran en un intervalo esperado, típicamente de aproximadamente 2:1 para una tira de ensayo en la que el electrodo de referencia es dos veces el área de superficie del electrodo de trabajo, y son generalmente indicativas del funcionamiento apropiado de la tira. En la práctica, en el sistema de medición se almacena un intervalo de aceptación para la relación de pendientes  $m_{inversa}/m_{directa}$  y si la relación de pendientes  $m_{inversa}/m_{directa}$  cae fuera del intervalo de aceptación, se muestra un mensaje de error en la pantalla del sistema de medición.

Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que la aplicación de un pulso negativo reduce el error de medición debido a la presencia de especies electroquímicamente activas tales como ácido ascórbico. En la Patente de Estados Unidos número 6.475.372, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad en la presente solicitud, se muestran y describen otros procedimientos para obtener información útil de diagnóstico y cuantitativa cuando se obtiene un valor de corriente por la aplicación de un voltaje constante de polaridad opuesta.

Otra realización incluye un procedimiento para determinar la concentración de un analito dependiente del hematocrito y la concentración del hematocrito en una muestra de sangre completa en el que la etapa de cálculo va precedida o seguida por una etapa adicional en la que se aplica un voltaje de ensayo constante  $V_E$  a un segundo electrodo 14 de trabajo y al electrodo 10 de referencia, como se describe en el Ejemplo 2 y se muestra en la FIG. 19. La presencia de una cantidad de muestra suficiente se detecta de manera similar a las realizaciones descritas previamente. Después se aplica el voltaje de ensayo constante  $V_E$  entre el segundo electrodo 14 de trabajo y el electrodo 10 de referencia a un nivel de aproximadamente 100 milivoltios a aproximadamente 600 milivoltios, generando una transición de corriente  $C$  (véase la FIG. 20). El voltaje de ensayo constante  $V_E$  aplicado entre el segundo electrodo 14 de trabajo y el electrodo 10 de referencia puede aplicarse al mismo tiempo que se aplica una pluralidad de voltajes de ensayo  $V_i$  al primer electrodo 12 de trabajo. El voltaje de ensayo constante  $V_E$  puede también aplicarse entre el segundo electrodo 14 de trabajo y el electrodo 10 de referencia antes o después de aplicar la pluralidad de voltajes de ensayo  $V_i$  al primer electrodo 12 de trabajo. En una realización mostrada en la FIG. 19, el voltaje de ensayo  $V_E$  se aplica a la tira 90 de ensayo antes que la pluralidad de voltajes de ensayo  $V_i$ ; por tanto,  $t_0$  es igual a  $t_1$ . Después de aplicar el voltaje de ensayo  $V_E$  a la tira de ensayo (por ejemplo, después de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 segundos o, más típicamente, aproximadamente 5 segundos), se mide un valor de corriente  $I_E$  en el segundo electrodo de trabajo (véase la FIG. 20). El valor de corriente  $I_E$  se usa entonces para calcular la concentración del analito dependiente del hematocrito. Para calcular la concentración del analito dependiente del hematocrito, se genera una curva similar a la mostrada en la FIG. 13 por ensayo de muestras de fluido (por ejemplo, sangre completa) que contienen varias concentraciones del analito y varios hematocritos y representando el valor de corriente como una función de la concentración del analito (por ejemplo, glucosa) determinada en un instrumento de referencia. Cuando se ensaya una muestra de fluido con una concentración de analito desconocida, el valor de corriente  $I_E$  se determina como se describió anteriormente y la concentración del analito se deduce de la curva de calibración almacenada en el sistema de medición.

Generalmente el valor de corriente  $I_E$  se puede representar aproximadamente por la siguiente ecuación:

$$I_E = \left( \frac{1 - kh}{1 - kh_0} \right) (m_3 G + c_3) \quad (7)$$

Donde:

$h$  es la fracción de hematocrito basada en la fracción de glóbulos rojos en la muestra de sangre completa;  
 $h_0$  es el valor del hematocrito de la muestra de sangre completa de un paciente normal (por ejemplo, 0,42);  
 $G$  es la concentración de glucosa en sangre de la muestra de sangre completa medida en miligramos/decilitro (mg/dl); y  
 $k$ ,  $m_3$  y  $c_3$  son parámetros obtenidos por técnicas de regresión estándar a partir de los datos experimentales.

La ecuación 7 muestra que el valor de corriente  $I_E$  es dependiente de la fracción del hematocrito y de la concentración de glucosa de la muestra.

Similarmente, la Ecuación 5 puede resolverse para el valor de corriente  $I_0$  sustancialmente independiente del hematocrito para obtener la siguiente ecuación:

$$I_0 = m_2 G_0 + c_2 \quad (8)$$

donde  $G_0$ ,  $m_2$  y  $c_2$  son como se han descrito anteriormente.

Como  $I_0$  generalmente no es sensible a la fracción de hematocrito, la Ecuación 8 generalmente no contiene ningún término para la fracción de hematocrito.

La Ecuación 7 y la Ecuación 8 pueden reordenarse y simplificarse para obtener la siguiente ecuación que representa la fracción del hematocrito  $h$  de la muestra como una función de los valores de corriente  $I_E$  e  $I_0$ :

$$h = K^I + \frac{(h_0 - K^I) I_E}{(K^{II} I_0 + K^{III})} \quad (11)$$

Donde:

$$K^I = \frac{1}{k} \quad (12);$$

$$K^{II} = \frac{m_3}{m_2} \quad (13);$$

$$K^{III} = c_3 - c_2 \left( \frac{m_3}{m_2} \right) \quad (14);$$

$I_E$  es el valor de corriente medido cerca del final del periodo de tiempo en el que se aplica el voltaje de ensayo constante al segundo electrodo de trabajo; e

$I_0$  es el valor de corriente  $I_1$  corregido con respecto al hematocrito medido cerca del final del periodo de tiempo en el que se aplica el primer voltaje de ensayo  $V_1$  al primer electrodo de trabajo.

Por tanto, la Ecuación 11 puede usarse para calcular la fracción del hematocrito  $h$  a partir de los valores de corriente obtenidos simultáneamente en ambos electrodos de trabajo.

En otra realización, la etapa de cálculo ( $h$ ) del procedimiento ejemplar va precedida o seguida por una etapa de comprobación de errores en la que se determina la funcionalidad de la tira de ensayo. Esta etapa de comprobación de errores determina si, por ejemplo, la tira de ensayo se ha dañado, la tira de ensayo ha sobrepasado la fecha de caducidad, se ha aplicado un voltaje incorrecto a la tira de ensayo, el voltaje se ha aplicado a la tira de ensayo durante un tiempo incorrecto, y/o la tira de ensayo no se ha llenado completamente con la muestra de fluido. La etapa de comprobación de errores también puede eliminar la necesidad de una solución de control para determinar si el sistema de medición está funcionando adecuadamente.

En la etapa de comprobación de errores, se representan cinco valores de corriente  $I_1$  a  $I_5$  en un gráfico como una función del tiempo de pulso en el que se mide el tiempo en relación al inicio del primer voltaje de ensayo (véase la FIG. 21). El sistema de medición utiliza la regresión de mínimos cuadrados para ajustar los datos de la FIG. 21 a la Ecuación 15, mostrada a continuación.

$$I_i = \alpha \sqrt{\frac{t_i}{t_1}} + \beta \left( 1 - \frac{t_i}{t_1} \right) + \eta_i \quad (15)$$

Donde:

$I_i$  es el valor de corriente medido al final o cerca del final de cada voltaje de ensayo (por ejemplo, los valores de corriente  $I_1$  a  $I_5$  descritos anteriormente) obtenidos en el tiempo de pulso  $t_i$  en el que  $i$  varía de 1 a 5; y

$\eta_1$  es un término de interferencia.

Los valores para  $\alpha$  y  $\beta$  son desconocidos inicialmente; por tanto, el sistema de medición calcula los valores estimados,  $\hat{\alpha}$  y  $\hat{\beta}$ , respectivamente, usando las ecuaciones mostradas a continuación.  $\alpha$  es un primer parámetro de forma definido por la siguiente ecuación:

$$\hat{\alpha} = \sum_{i=1}^n \lambda_i I_i \quad (16)$$

Donde:

$I_i$  es el valor de corriente medido al final o cerca del final de cada voltaje de ensayo (por ejemplo, los valores de corriente  $I_1$  a  $I_5$  descritos anteriormente) obtenido en el tiempo de pulso  $t_i$  en el que  $i$  varía de 1 a 5;

$$\lambda_i = \frac{S_{XX}Y_i - S_{XY}X_i}{\Delta} \quad (17);$$

$$X_i = 1 - \frac{t_i}{t_1} \quad (18);$$

$$Y_i = \sqrt{\frac{t_i}{t_1}} \quad (19);$$

$$S_{AB} = \sum_{i=1}^n A_i B_i \quad (20);$$

$$\Delta = S_{XX}S_{YY} - S_{XY}^2 \quad (21);$$

$\beta$  es un segundo parámetro de forma definido por la siguiente ecuación:

$$\hat{\beta} = \sum_{i=1}^n \theta_i I_i \quad (22)$$

Donde:

$$\theta_i = \frac{S_{YY}X_i - S_{XY}Y_i}{\Delta} \quad (23);$$

$$X_i = 1 - \frac{t_i}{t_1} \quad (24);$$

$$Y_i = \sqrt{\frac{I_i}{I_1}} \quad (25);$$

$$S_{AB} = \sum_{i=1}^n A_i B_i \quad (26);$$

$$\Delta = S_{xx} S_{yy} - S_{xy}^2 \quad (27).$$

Los valores de  $\lambda$  y  $\theta$  se calculan para cada uno de los cinco tiempos de pulso  $t_1$  a  $t_5$  usando las ecuaciones 17 y 23, respectivamente, y estos valores de  $\lambda$  y  $\theta$  se almacenan en una tabla de consulta en el sistema de medición. Después de la etapa de cálculo basada en el primer a tercer valores de corriente en el procedimiento ejemplar, los cinco valores de corriente  $I_1$  a  $I_5$  se sustituyen en las ecuaciones 16 y 22 junto con los valores de  $\lambda$  y  $\theta$ , respectivamente, que se eligen de la tabla de consulta para generar los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  que se ajusten mejor al valor de corriente frente a los datos de tiempo de pulso. Después se calcula una relación  $\frac{\hat{\alpha}}{\hat{\beta}}$  para hacer una comprobación de errores de la tira de ensayo y se compara con un intervalo de

relaciones  $\frac{\hat{\alpha}}{\hat{\beta}}$  de una tira de ensayo con una respuesta normal que está almacenado en el sistema de medición.

Si la relación  $\frac{\hat{\alpha}}{\hat{\beta}}$  calculada no está dentro del intervalo aceptado de respuestas normales (por ejemplo, si la

relación  $\frac{\hat{\alpha}}{\hat{\beta}}$  es de aproximadamente 4 a aproximadamente 14), el sistema de medición mostrará un mensaje de

error apropiado en la pantalla. En el sistema de medición se usa una tabla de consulta para los valores de  $\lambda$  y  $\theta$  para reducir la cantidad de memoria necesaria. En otra realización, los tiempos de pulso  $t_i$  (en vez de los valores de  $\lambda$  y  $\theta$ ) se almacenan en una tabla de consulta en el sistema de medición y se usa de nuevo una regresión de mínimos cuadrados para calcular los valores de  $\alpha$  y  $\beta$ .

La FIG. 22 ilustra las relaciones  $\frac{\hat{\alpha}}{\hat{\beta}}$  para tiras de ensayo que muestran una respuesta normal y para tiras que muestran varios errores incluyendo errores de equilibrio del voltaje (por ejemplo, aplicación de un voltaje de ensayo incorrecto a la tira de ensayo), errores de llenado de la tira, errores de tiempo (por ejemplo, aplicación del voltaje de ensayo en un tiempo erróneo) y errores debidos a causas desconocidas. Los datos

muestran que las relaciones  $\frac{\hat{\alpha}}{\hat{\beta}}$  pueden usarse para distinguir entre tiras con respuestas normales y tiras que

muestran varios errores. Como en las realizaciones anteriores, si la relación calculada  $\frac{\hat{\alpha}}{\hat{\beta}}$  está en un intervalo aceptable de respuestas normales (por ejemplo, la relación  $\frac{\hat{\alpha}}{\hat{\beta}}$  es de aproximadamente 4 a aproximadamente 14), el sistema de medición muestra un mensaje apropiado de error en la pantalla.

En otra realización, las relaciones  $\frac{\hat{\alpha}}{\hat{\beta}}$  se usan para distinguir entre las tiras de ensayo nuevas y las tiras de ensayo antiguas que han pasado la fecha de caducidad o que han sido expuestas a condiciones perjudiciales y que si se usan pueden dar resultados imprecisos o inválidos del ensayo. En la FIG. 23, se representa la

frecuencia de ocurrencia de cada valor de  $\frac{\hat{\alpha}}{\hat{\beta}}$  como un porcentaje del total de los valores determinados de  $\frac{\hat{\alpha}}{\hat{\beta}}$  como una función de la relación  $\frac{\hat{\alpha}}{\hat{\beta}}$  en forma de diagrama de barras para las tiras de ensayo nuevas (por ejemplo, grupo B) y tiras de ensayo que se dejaron a 50° C durante seis semanas (por ejemplo, grupo A). Los datos muestran que la

relación para las  $\frac{\alpha}{\beta}$  tiras de ensayo antiguas y nuevas es diferente. En la FIG. 23, por ejemplo, la relación  $\frac{\alpha}{\beta}$  para las tiras de ensayo nuevas es de aproximadamente 4 a aproximadamente 14 y la relación  $\frac{\alpha}{\beta}$  es menor de aproximadamente 4 para las tiras antiguas. Por tanto, la relación  $\frac{\alpha}{\beta}$  puede usarse para determinar si la tira de ensayo ha sobrepasado la fecha de caducidad o si la tira de ensayo se ha expuesto a condiciones perjudiciales. En la práctica, un intervalo de aceptación para la relación  $\frac{\alpha}{\beta}$  se almacenaría en el sistema de medición y se mostraría un mensaje de error en la pantalla del sistema de medición cuando la relación  $\frac{\alpha}{\beta}$  para una tira de ensayo estuviera fuera del intervalo de aceptación.

En otra realización ejemplar, las relaciones  $\frac{\alpha}{\beta}$  pueden usarse para distinguir una solución de control de la sangre completa. Los valores de corriente obtenidos después de cada voltaje de ensayo son diferentes para la sangre completa y la solución de control, lo que da diferentes valores de  $\alpha$  y calculados con las ecuaciones 15 y 21 para cada tipo de muestra. Por tanto, la relación  $\frac{\alpha}{\beta}$  será única para cada tipo de muestra. En la práctica, un intervalo de aceptación para la relación  $\frac{\alpha}{\beta}$  debería almacenarse en el sistema de medición para las muestras de control y de sangre completa y se mostraría un mensaje de error en la pantalla del sistema medidor si la relación  $\frac{\alpha}{\beta}$  estuviera fuera del intervalo de aceptación para cualquier tipo de muestra. Como ejemplo no limitante, la relación  $\frac{\alpha}{\beta}$  para una muestra de sangre completa puede ser de aproximadamente 4 a aproximadamente 14 y la relación  $\frac{\alpha}{\beta}$  para una solución de control puede ser mayor de aproximadamente 14.

La FIG. 24 ilustra una vista en perspectiva desde arriba despiezada de una tira 500 de ensayo sin ensamblar, que puede usarse con los algoritmos descritos. La tira 500 de ensayo incluye una capa 501 conductora, una capa 570 de reactivo, y una cinta 81 superior. La tira 500 de ensayo también incluye una porción 576 distal, una porción 578 proximal, y dos laterales 574. La capa 80 superior incluye una porción 36 transparente y una porción 38 opaca. Por tanto, la tira 500 de ensayo tiene la ventaja de eliminar la etapa de impresión de una capa de aislamiento para definir sustancialmente el área electroactiva para un primer electrodo 546 de trabajo, un segundo electrodo 548 de trabajo, y un electrodo 544 de referencia.

En una realización alternativa de la presente invención, puede usarse una tira 300 de ensayo que tiene un primer electrodo 306 de trabajo en forma de una matriz 310 de microelectrodos como se muestra en la FIG. 25. En general, la matriz 310 de microelectrodos mejorará los efectos de la difusión radial causando un incremento en la densidad de corriente medida (corriente por área unitaria del electrodo de trabajo). Debido al aumento de la difusión radial, la aplicación de un voltaje de ensayo limitante a la matriz 310 de microelectrodos puede producir una corriente de ensayo para conseguir un valor de estado estacionario distinto de cero independiente del tiempo. Por el contrario, la aplicación de un voltaje de ensayo limitante a un electrodo que no sea un microelectrodo dará como resultado una corriente de ensayo que se aproxime a cero según el tiempo avanza. Debido a que el valor de estado estacionario es independiente del tiempo para una matriz 310 de microelectrodos, se puede calcular un coeficiente de difusión eficaz del mediador en la muestra de sangre. A su vez, el coeficiente de difusión eficaz puede usarse como una entrada en un algoritmo para reducir los efectos del hematocrito.

La FIG. 25 ilustra la porción 302 distal de una tira 300 de ensayo que está parcialmente ensamblada. La capa conductora es visible a través de la abertura 18 de la capa 16 de aislamiento. La capa conductora reviste al sustrato 5 e incluye un primer electrodo 306 de trabajo, un segundo electrodo 308 de trabajo y un electrodo 304 de referencia. El primer electrodo 306 de trabajo está en forma de matriz 310 de microelectrodos que incluye una pluralidad de microelectrodos 320.

En la FIG. 26 se muestra otra realización de una tira 400 de ensayo que tiene una matriz de microelectrodos. La tira 400 de ensayo difiere de la tira 300 de ensayo en que la tira 400 de ensayo tiene un primer electrodo 406 de trabajo localizado por encima de un electrodo 404 de referencia y un electrodo 412 que detecta el llenado. El primer electrodo 406 de trabajo está en forma de una matriz 410 de microelectrodos que incluye una pluralidad de microelectrodos 420. En una geometría alternativa para la tira 400 de ensayo, el electrodo 406 de trabajo puede estar aguas abajo del electrodo 404 de referencia.

La FIG. 27 es una vista en sección transversal a través de la matriz 310 de microelectrodos en el primer electrodo 306 de trabajo de la FIG. 25, que muestra que la porción 330 de aislamiento está dispuesta sobre el primer electrodo 306 de trabajo. De esta forma, en esta realización, la porción 330 de aislamiento se imprime en la misma etapa que la impresión de la capa 16 de aislamiento. La porción 330 de aislamiento de corte con láser para exponer una pluralidad de microelectrodos 320 con forma de disco puede entonces formar una matriz 310 de microelectrodos.

En otra realización, la porción 330 de aislamiento se dispone sobre el primer electrodo 306 de trabajo en una etapa separada de la impresión de la capa 16 de aislamiento. La porción 330 de aislamiento puede disponerse sobre y unida al primer electrodo 306 de trabajo por procesos tales como soldadura ultrasónica, serigrafiado, o por el uso de un adhesivo. En esta realización, los agujeros de la porción 330 de aislamiento se pueden formar antes o después de la adhesión de la porción 330 de aislamiento al primer electrodo 306 de trabajo.

La capa 22 de reactivo puede disponerse en la porción 32 hidrófila distal como se muestra en la FIG. 25. Como alternativa, la capa 22 de reactivo se puede colocar sobre la porción 330 de aislamiento como se muestra en la FIG. 26.

Para que la matriz 310 de microelectrodos tenga un efecto de mejora debido a la difusión radial, la porción 330 de aislamiento debería tener unas dimensiones apropiadas. En un aspecto, la porción 330 de aislamiento puede tener una altura H que es de aproximadamente 5 micrómetros o menos. Es necesario que la porción 330 de aislamiento sea lo suficientemente delgada para que permita la difusión radial. Si la porción 330 de aislamiento fuera mucho mayor de 5 micrómetros, entonces la porción 330 de aislamiento interferiría con la difusión radial y de hecho promovería una difusión planar.

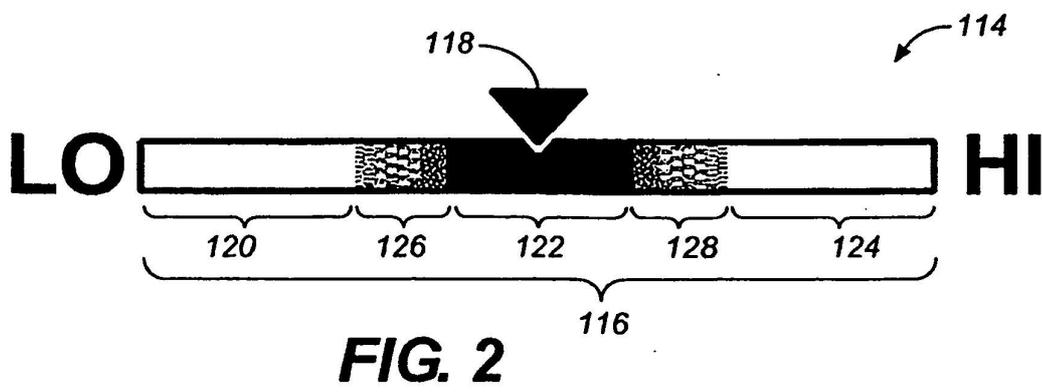
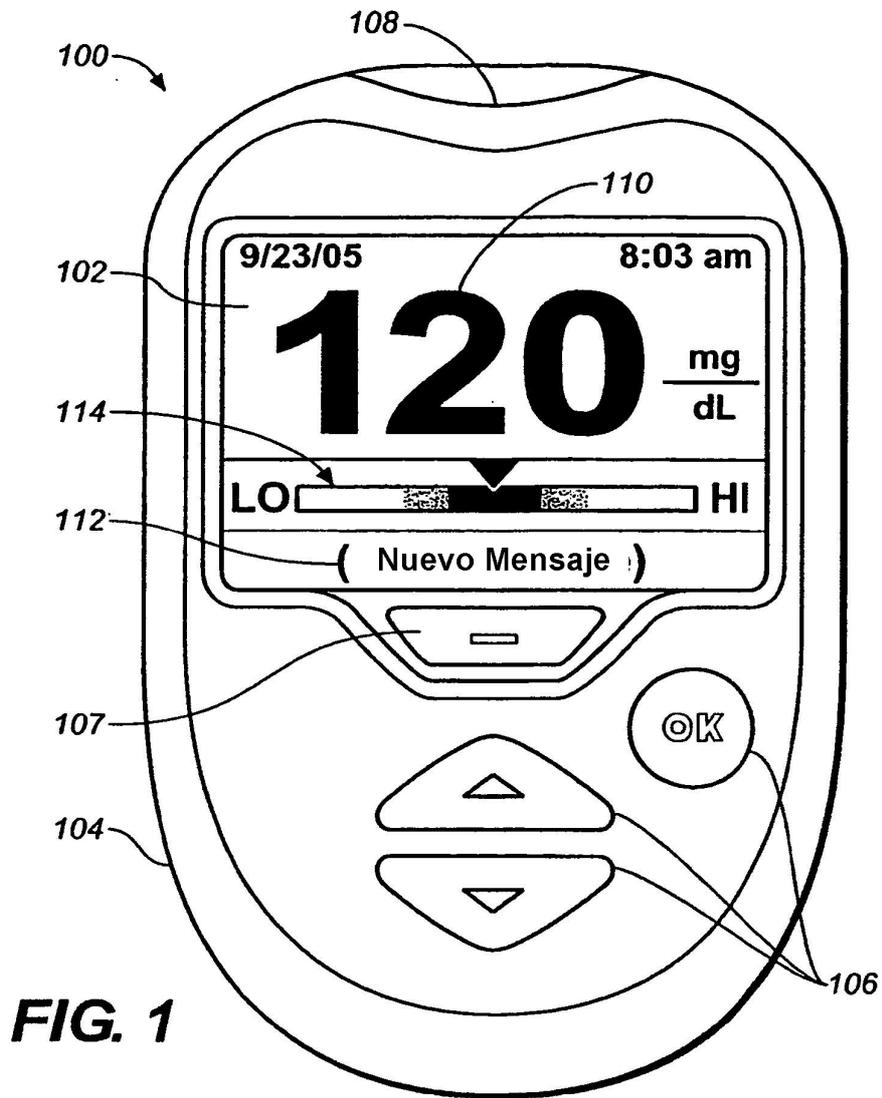
En otro aspecto, cada microelectrodo 320 debe estar suficientemente separado de los demás para impedir que el primer microelectrodo compita con un segundo microelectrodo adyacente por el mediador oxidante. Cada microelectrodo 320 puede estar separado por una distancia B que varía de aproximadamente 5 veces a aproximadamente 10 veces el diámetro del microelectrodo 320. En una realización como la que se muestra en la FIG. 27, cada microelectrodo 320 puede estar separado uniformemente por toda la porción 330 de aislamiento, donde un microelectrodo puede tener seis microelectrodos cerca que forman un modelo hexagonal.

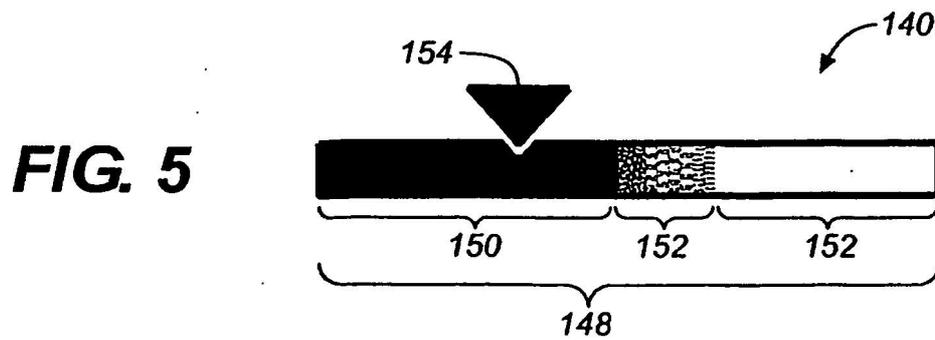
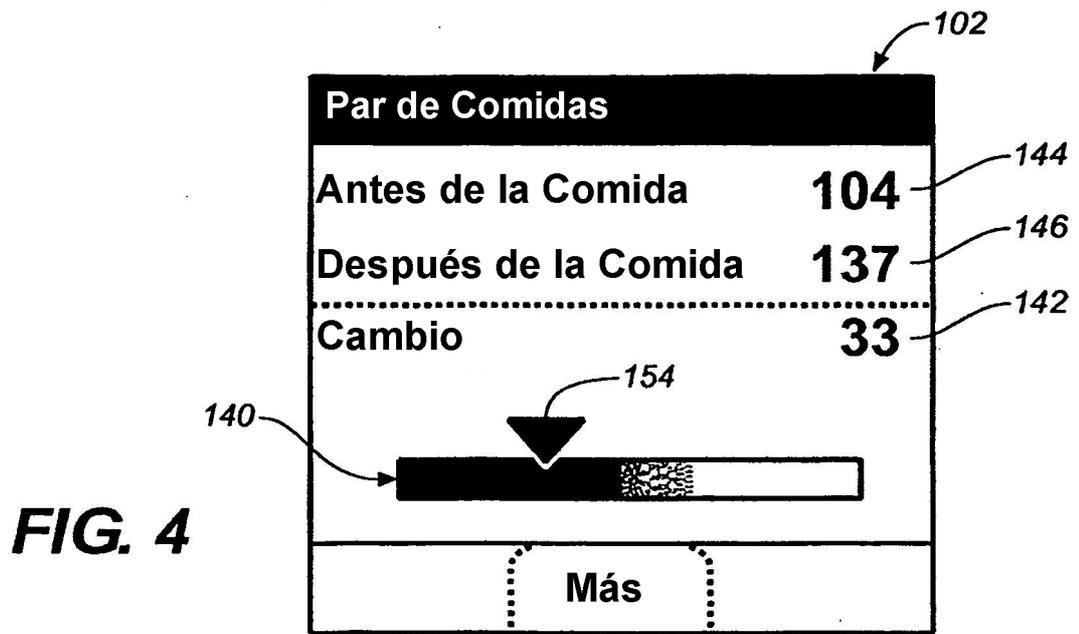
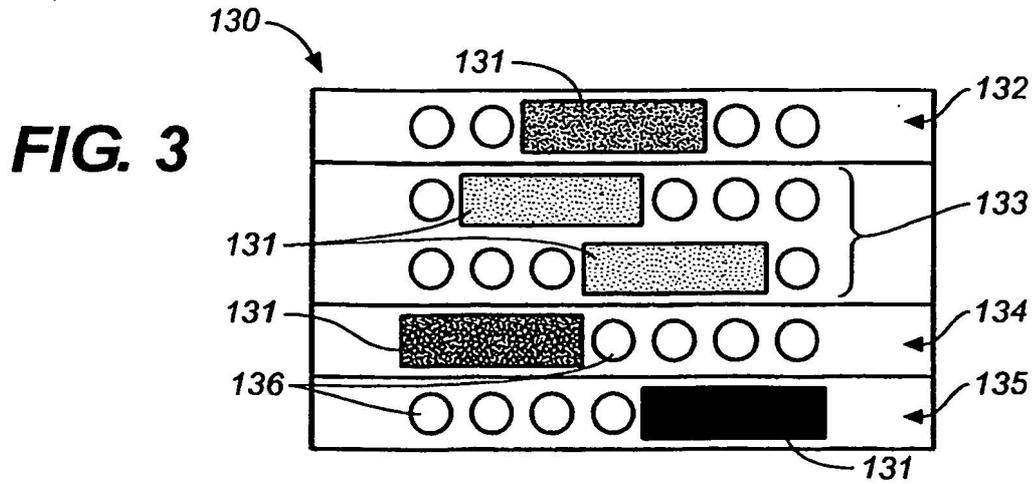
En otro aspecto, cada microelectrodo 320 debe ser lo suficientemente pequeño para que la proporción de la corriente de ensayo atribuida a la difusión radial sea mayor que la proporción de la corriente de ensayo atribuida a la difusión planar. El microelectrodo 320 puede estar en forma de un círculo con un diámetro A que varía de aproximadamente 3 micrómetros a aproximadamente 20 micrómetros.

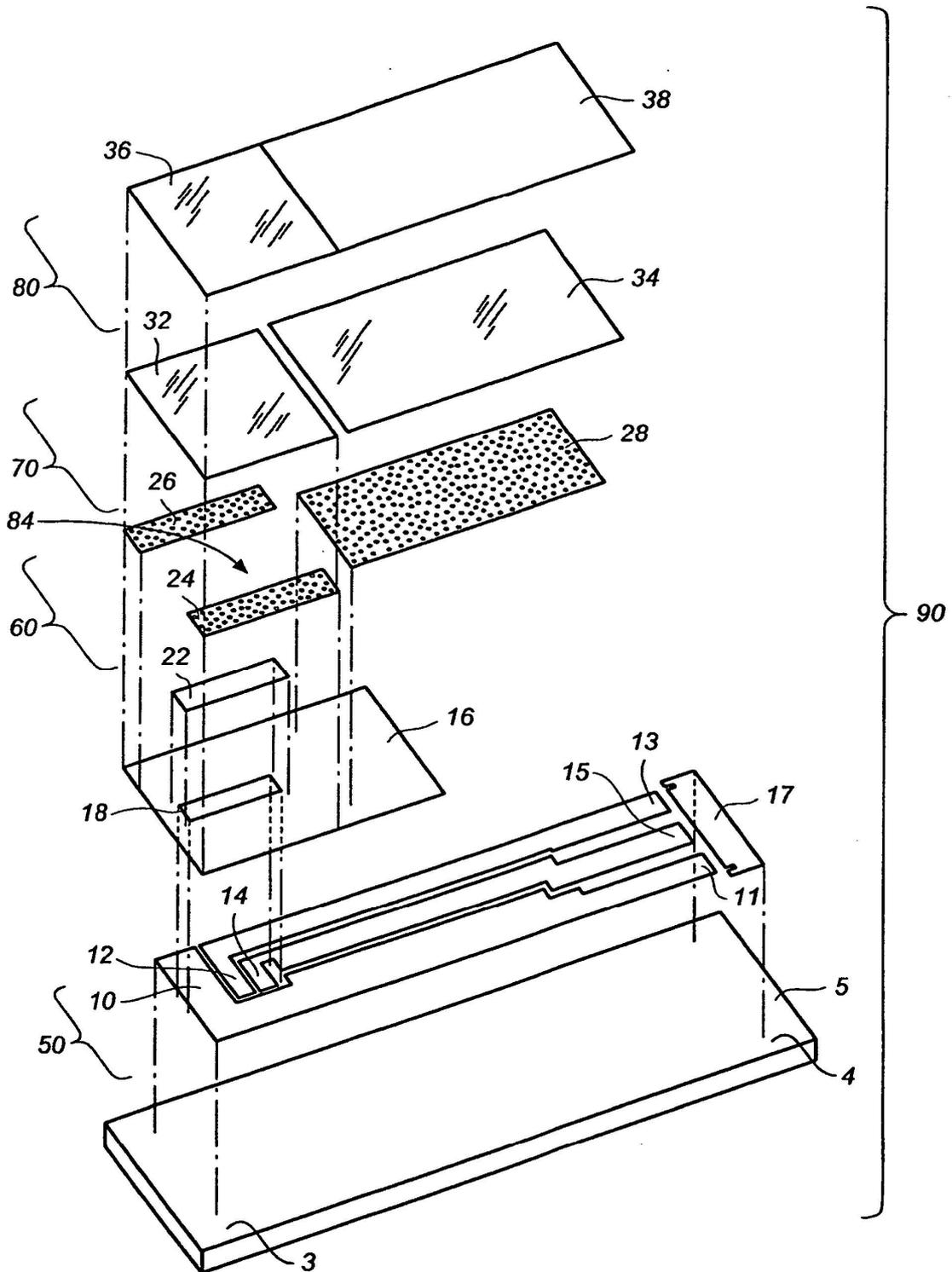
En una realización alternativa de la presente invención, puede usarse una tira de ensayo en la que se ha empleado un proceso de corte con láser para mejorar la precisión y exactitud de la medición de la concentración del analito. El proceso de corte con láser en una capa conductora permite que la definición del borde del área del electrodo esté mejor controlada que con otros procesos tales como el serigrafiado. Por ejemplo, la resolución del serigrafiado puede estar limitada por el tamaño de las aberturas en la pantalla para imprimir una capa de reactivo. Cuando se usa serigrafiado para definir el patrón del electrodo, un borde de la capa conductora puede estar dentado debido a la granularidad causada por la pluralidad de aberturas en la pantalla. Además, como se describirá más adelante, un patrón de corte con láser en la capa conductora puede usarse para definir sustancialmente el área del electrodo sin necesidad de una capa de aislamiento o una capa adhesiva.

**Reivindicaciones**

- 5 1. Un procedimiento para detectar la presencia de cantidad suficiente de una muestra de fluido depositada en una tira de ensayo que tiene un electrodo de referencia y un electrodo de trabajo, en el que el electrodo de trabajo está recubierto con una capa de reactivo, el procedimiento comprendiendo:
- 10 aplicar un voltaje de ensayo directo entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo y medir un valor de corriente directo cerca del extremo del voltaje de ensayo directo, en el que el voltaje de ensayo directo comprende de 100 milivoltios a 600 milivoltios;
- 15 aplicar un voltaje de ensayo inverso de polaridad opuesta y sustancialmente igual magnitud al voltaje de ensayo directo y medir un valor de corriente inverso cerca del extremo del voltaje de ensayo inverso, el voltaje de ensayo inverso siendo de 100 milivoltios negativos a 600 milivoltios negativos; calcular una proporción del valor de corriente inverso con el valor de corriente directo; y determinar si la proporción del valor de corriente inverso con el valor de corriente directo está dentro de un intervalo de aceptación, el intervalo de aceptación siendo sustancialmente igual a dos cuando el electrodo de referencia comprende alrededor de dos veces el área de superficie del electrodo de trabajo.
- 20 2. El procedimiento de la Reivindicación 1, en el que la duración del voltaje de ensayo directo varía de alrededor de 0,1 a alrededor de 1,0 segundos; la magnitud del voltaje de ensayo directo comprende alrededor de 400 milivoltios; el valor de corriente directo se mide de alrededor de 0,1 a alrededor de 1,0 segundos después de que el voltaje de ensayo directo se haya aplicado a la tira de ensayo; la duración del voltaje de ensayo inverso varía de alrededor de 0,1 a alrededor de 1,0 segundos; la magnitud del voltaje de ensayo inverso comprende alrededor de 400 milivoltios; y el valor de corriente inversa se mide a alrededor de 0,1 a alrededor de 1,0 segundos después de que el voltaje de ensayo inverso se haya aplicado a la tira de ensayo.
- 25 3. El procedimiento de la Reivindicación 2, en el que el electrodo de trabajo comprende una pluralidad de microelectrodos formados de oro.
- 30 4. El procedimiento de la Reivindicación 2, en el que la capa de reactivo comprende un enzima, un mediador y una solución tampón en la que el mediador comprende rutenio hexamina.
- 35 5. El procedimiento de la Reivindicación 1, comprendiendo además:
- representar el primer, segundo y tercer valores de corriente inversa como una función de una concentración de analitos como se ha medido en un instrumento de referencia y calcular una pendiente  $m_{inversa}$  de la línea de regresión lineal obtenida de la misma;
- representar el primer, segundo y tercer valores de corriente directa como una función de la concentración de analitos como se ha medido en un instrumento de referencia y calcular una pendiente  $m_{directa}$  de la línea de regresión lineal obtenida de la misma;
- 40 calcular una proporción de  $m_{inversa}$  con  $m_{directa}$ ; y determinar si la proporción de  $m_{inversa}$  con  $m_{directa}$  está dentro del intervalo de aceptación, el intervalo de aceptación siendo sustancialmente igual a dos cuando el electrodo de referencia comprende alrededor de dos veces el área de superficie del electrodo de trabajo, el primer, segundo y tercer voltajes de ensayo directos y el primer, segundo y tercer voltajes de ensayo inversos son de igual magnitud y duración y el primer, segundo, tercer y cuarto voltajes de ensayo son de igual magnitud y duración.
- 45 6. El método de la reivindicación 5, en el que la duración del voltaje de ensayo directo varía de alrededor de 0,1 a alrededor de 1,0 segundos; la magnitud del voltaje de ensayo directo comprende alrededor de 400 milivoltios; el valor de corriente directo se mide de alrededor de 0,1 a alrededor de 1,0 segundos después de que el voltaje de ensayo directo se ha aplicado a la tira de ensayo; la duración del voltaje de ensayo inverso varía de alrededor de 0,1 a alrededor de 1,0 segundos; la magnitud del voltaje de ensayo inverso comprende alrededor de 400 milivoltios; y el valor de la corriente inversa se mide de alrededor de 0,1 a alrededor de 1,0 segundos después de que el voltaje de ensayo inverso se ha aplicado a la tira de ensayo.
- 50 7. El método de la Reivindicación 6, en el que la capa de reactivo comprende un enzima, un mediador y una solución tampón en la que el mediador es cloruro de rutenio hexamina.
- 55
- 60
- 65

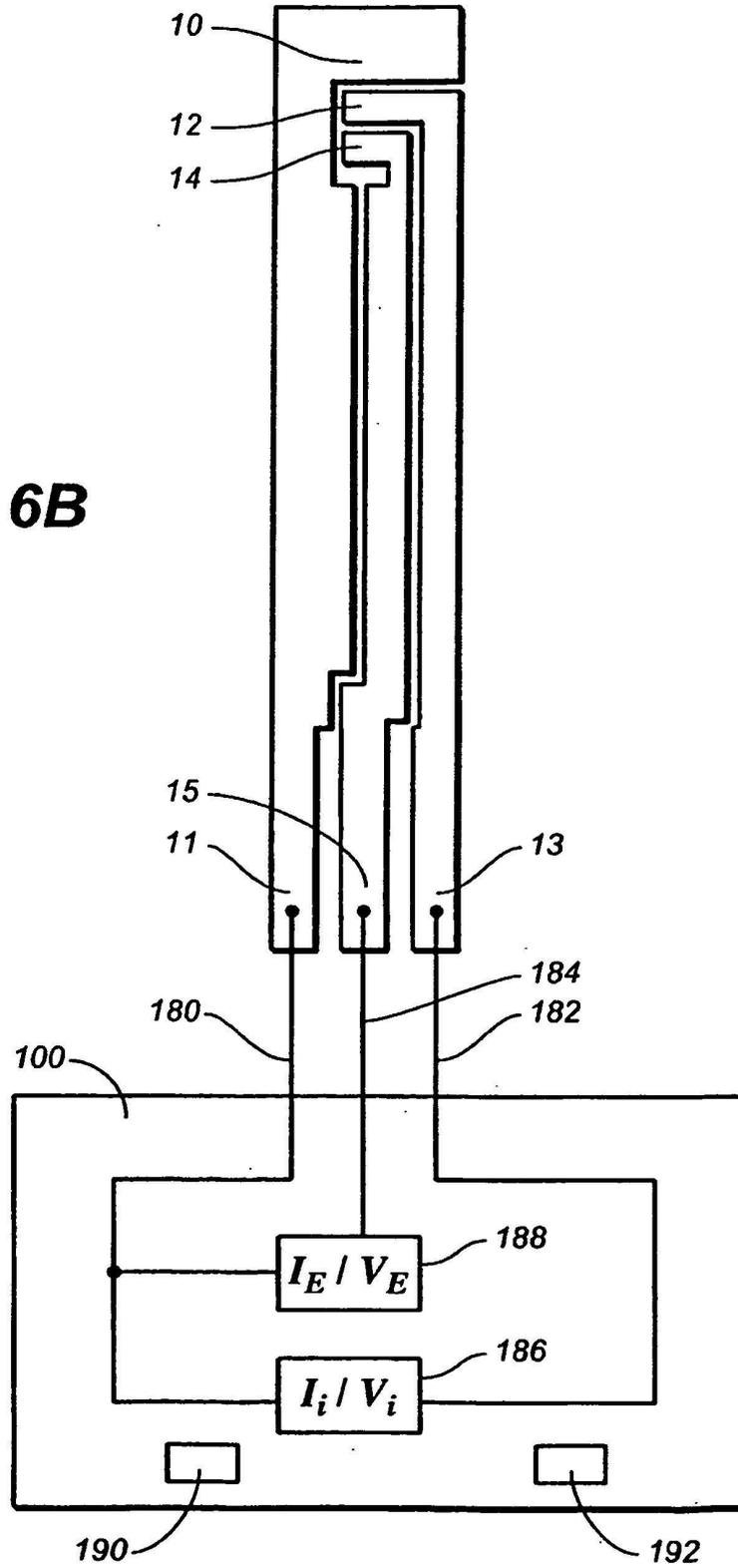


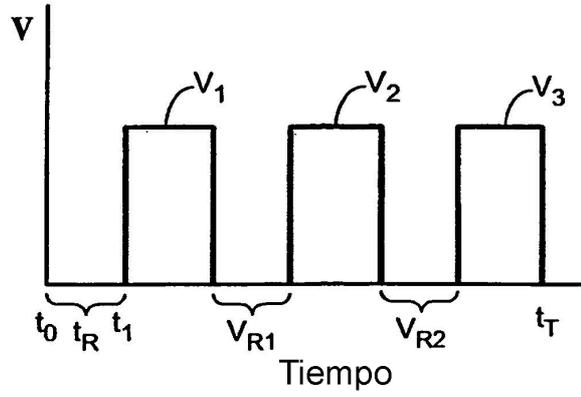




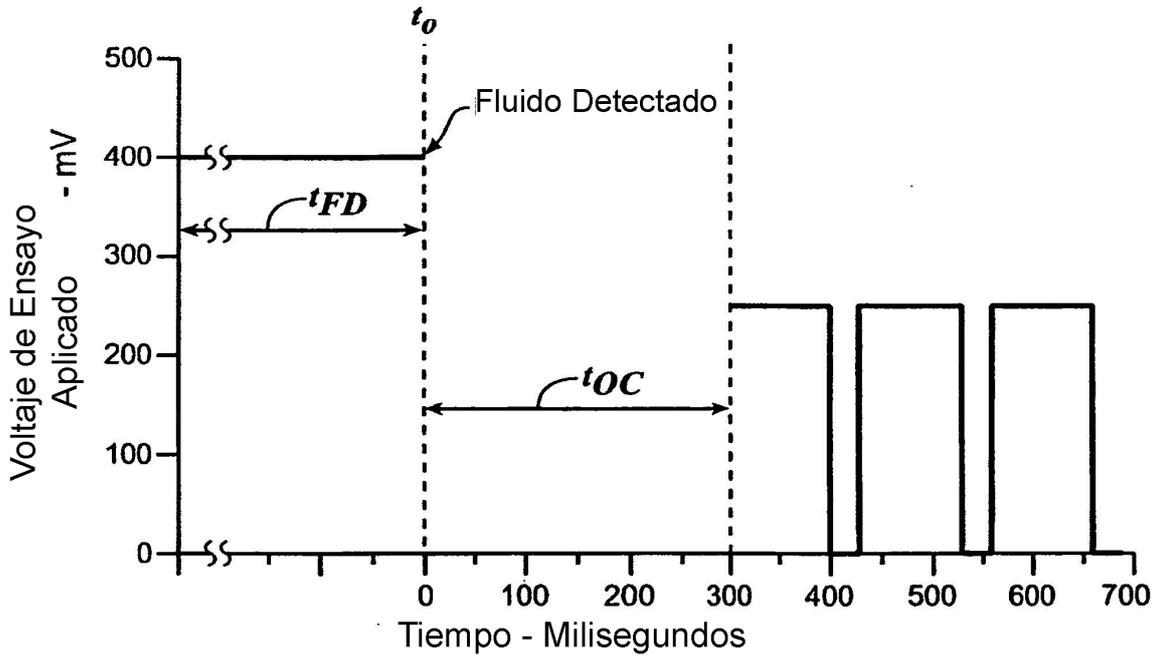
**FIG. 6A** (ESTADO DE LA TECNICA)

**FIG. 6B**

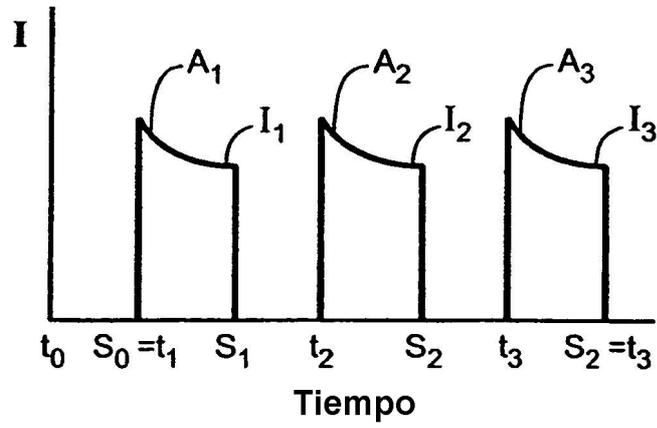




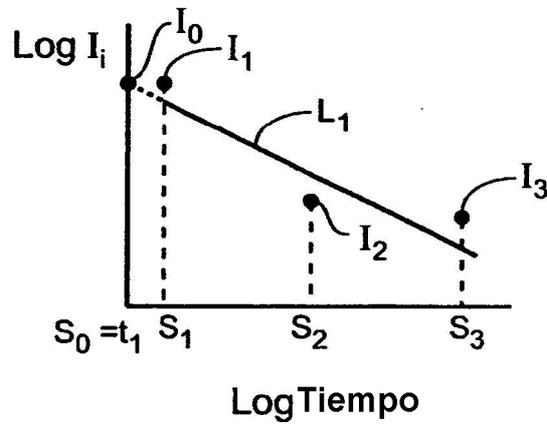
**FIG. 7A**



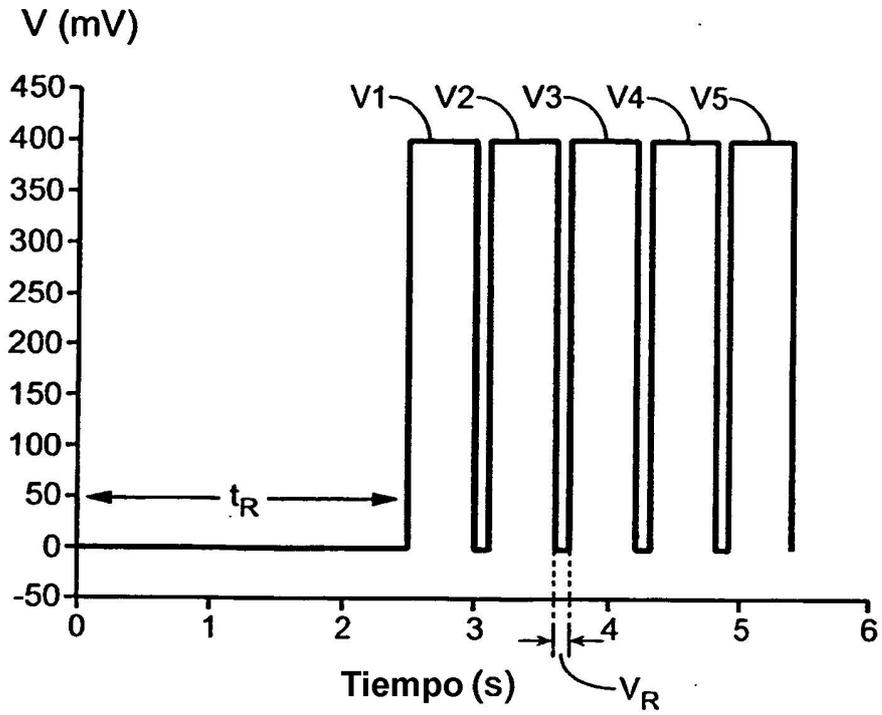
**FIG. 7B**



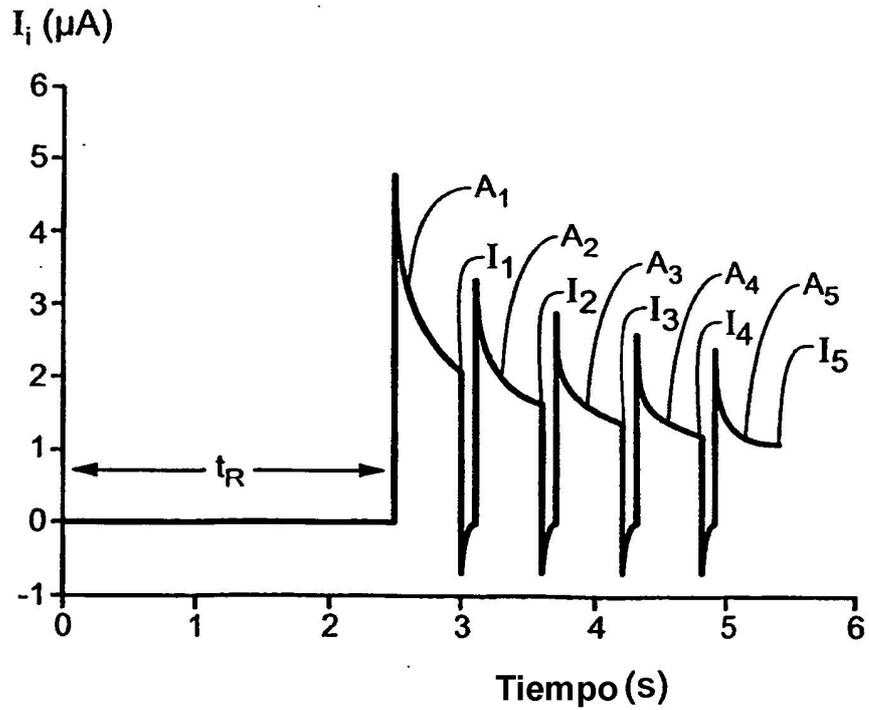
**FIG. 8**



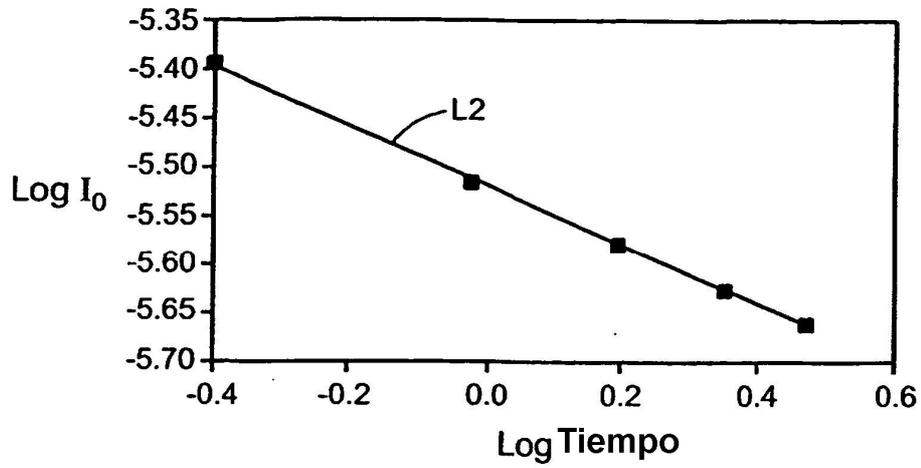
**FIG. 9**



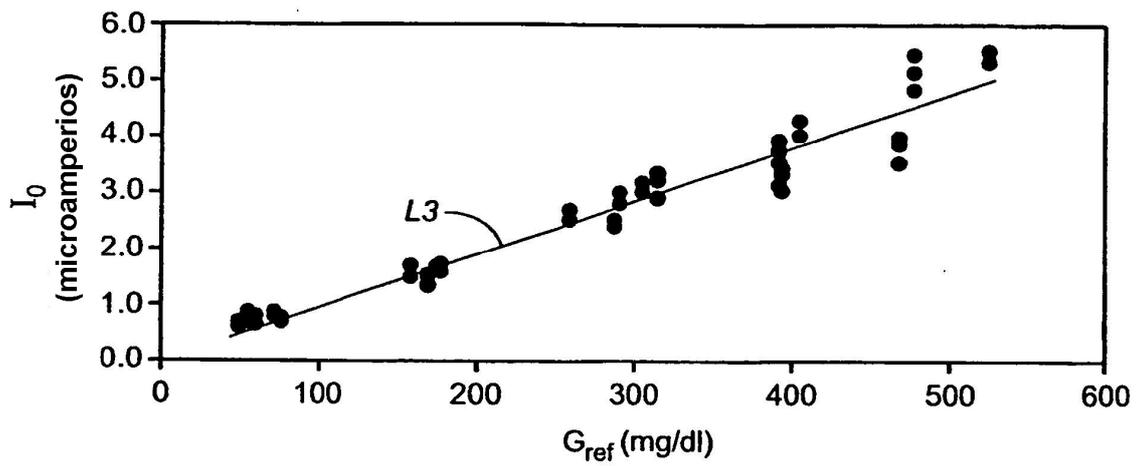
**FIG. 10**



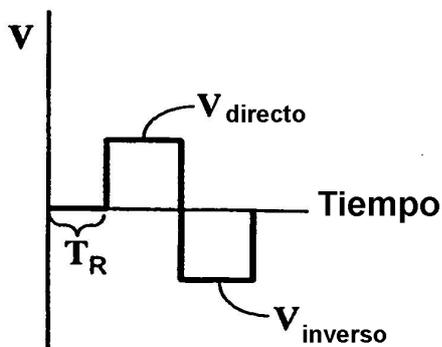
**FIG. 11**



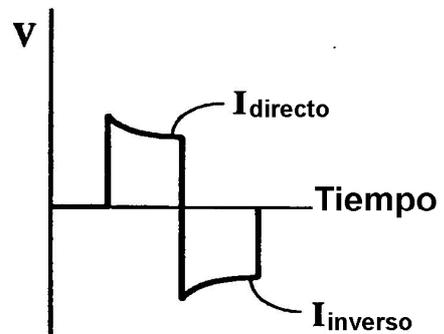
**FIG. 12**



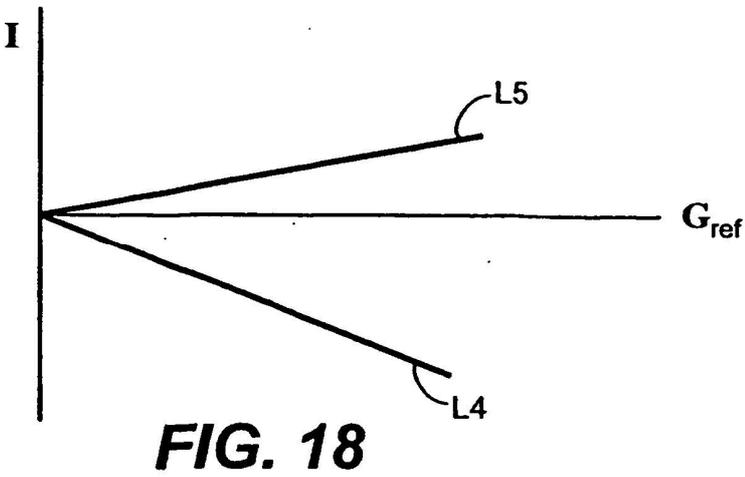
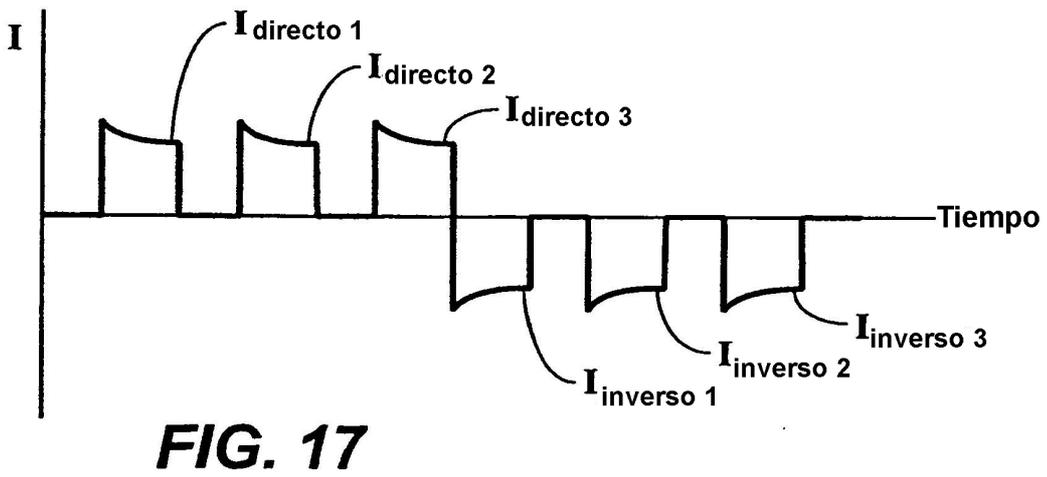
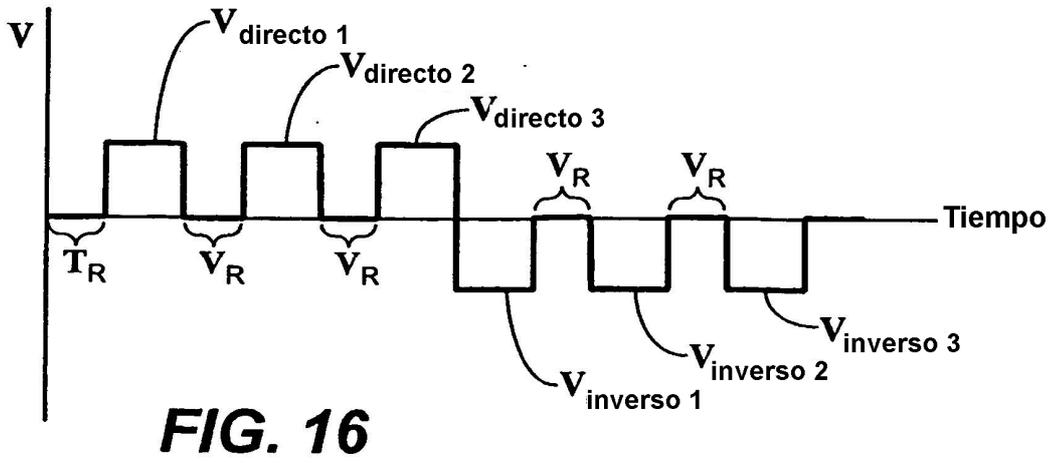
**FIG. 13**

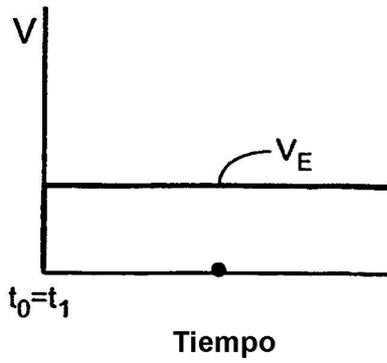


**FIG. 14**

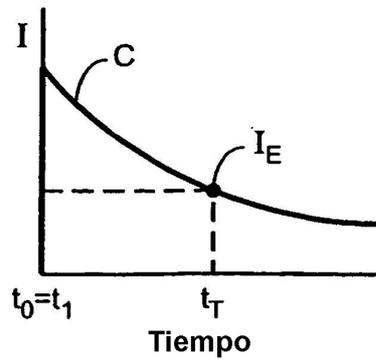


**FIG. 15**

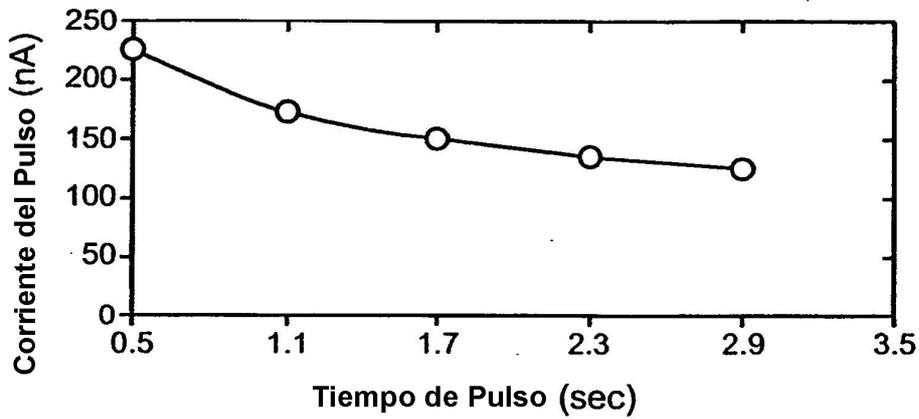




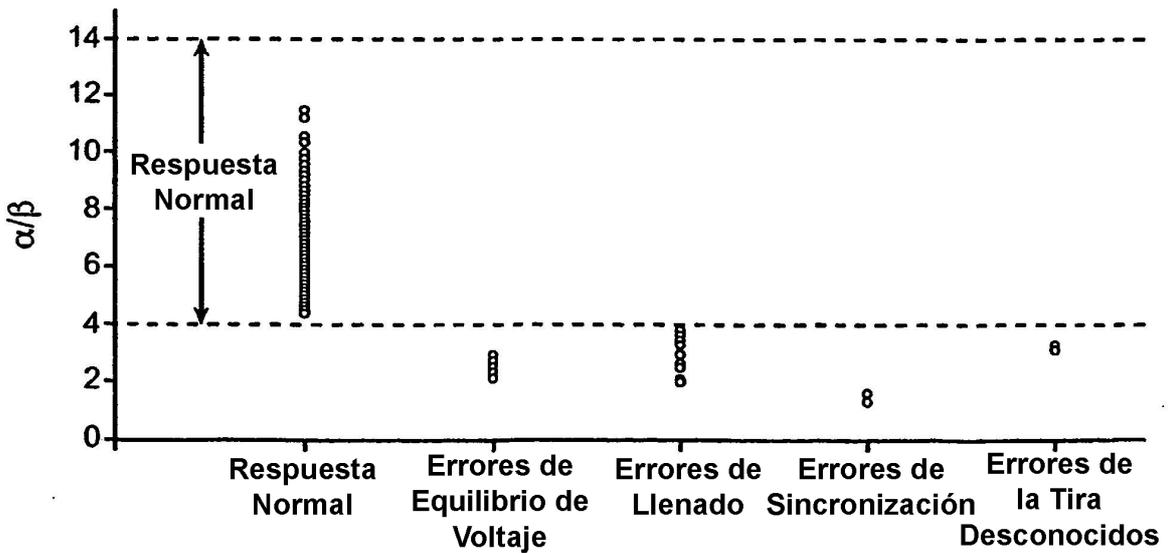
**FIG. 19**



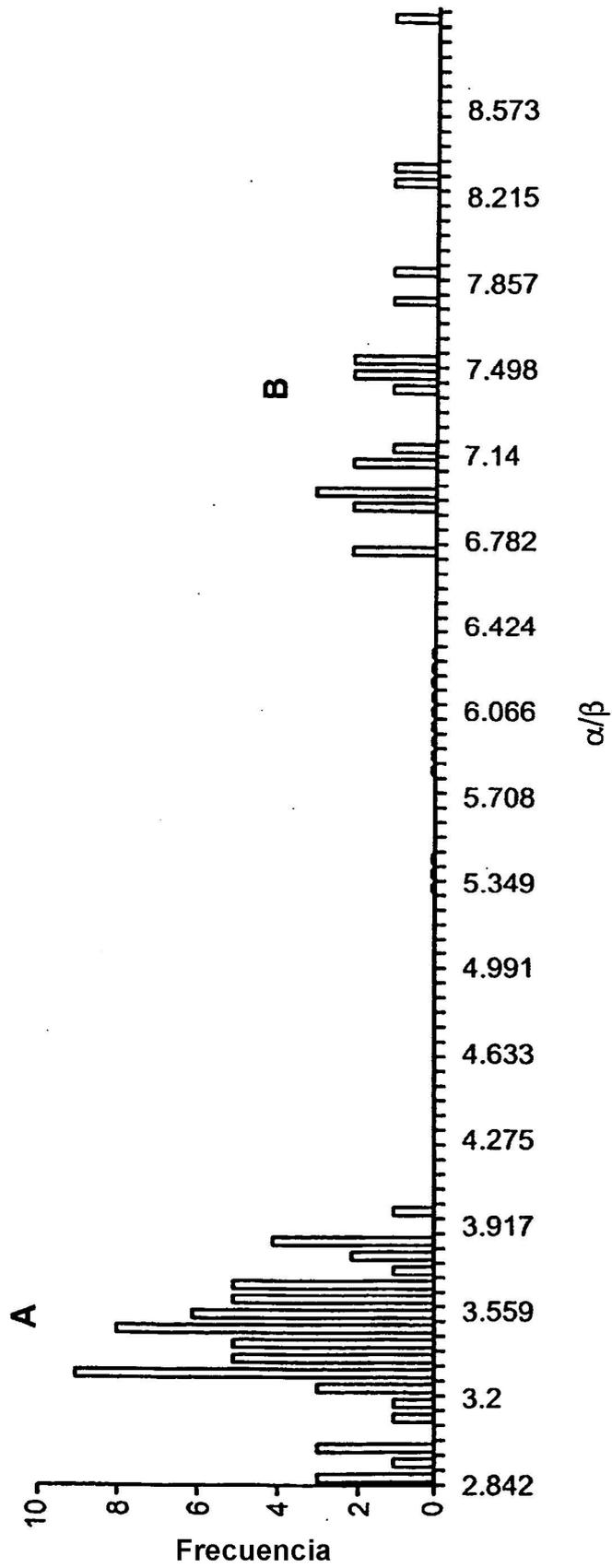
**FIG. 20**



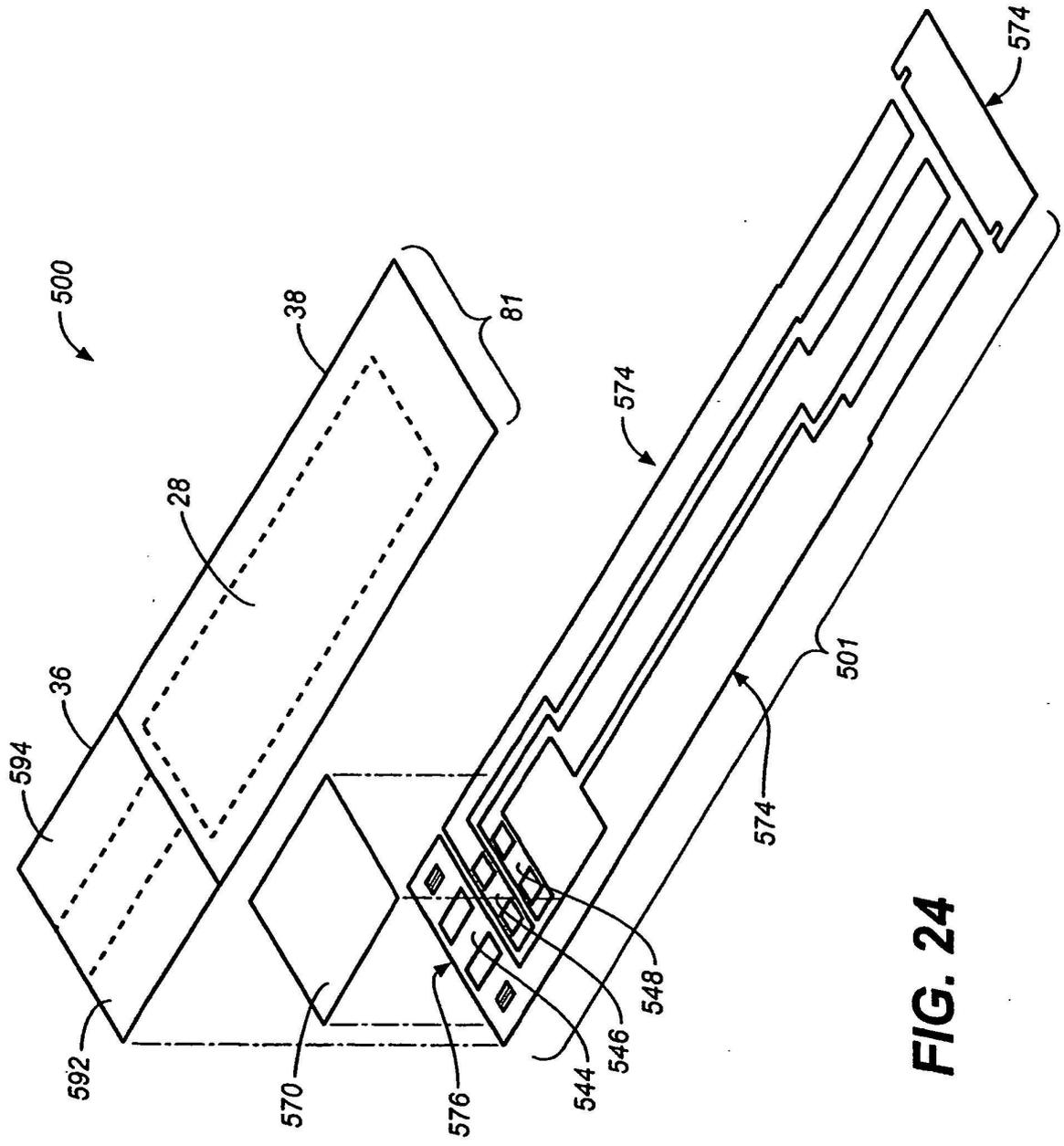
**FIG. 21**



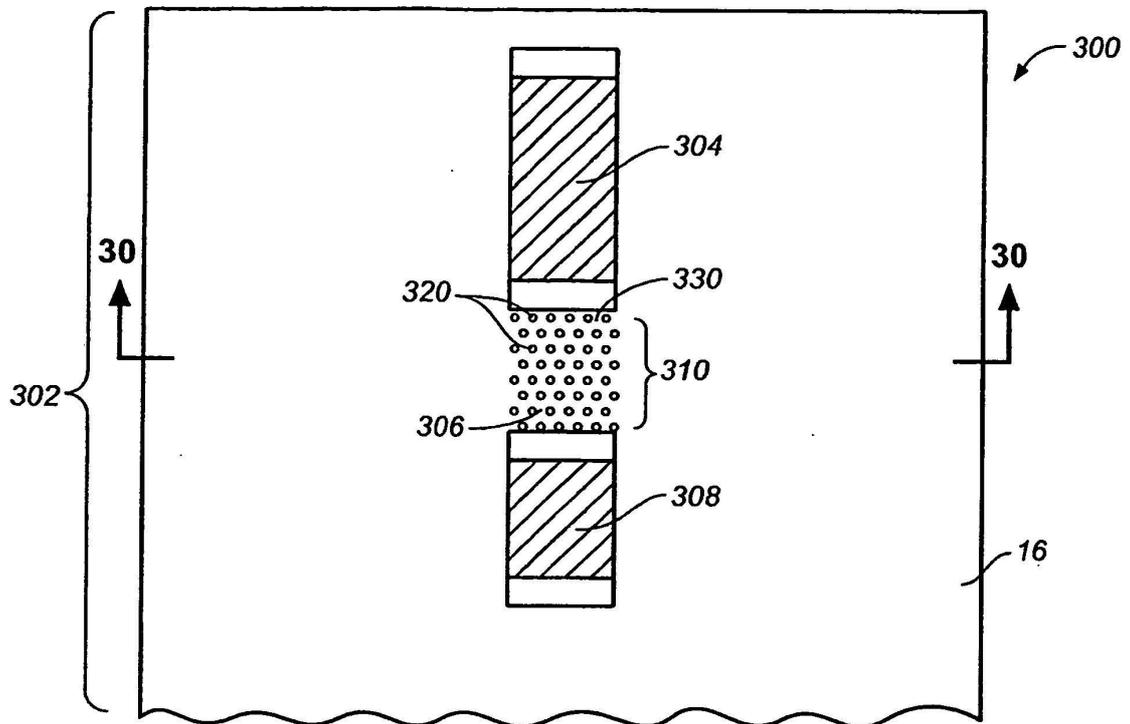
**FIG. 22**



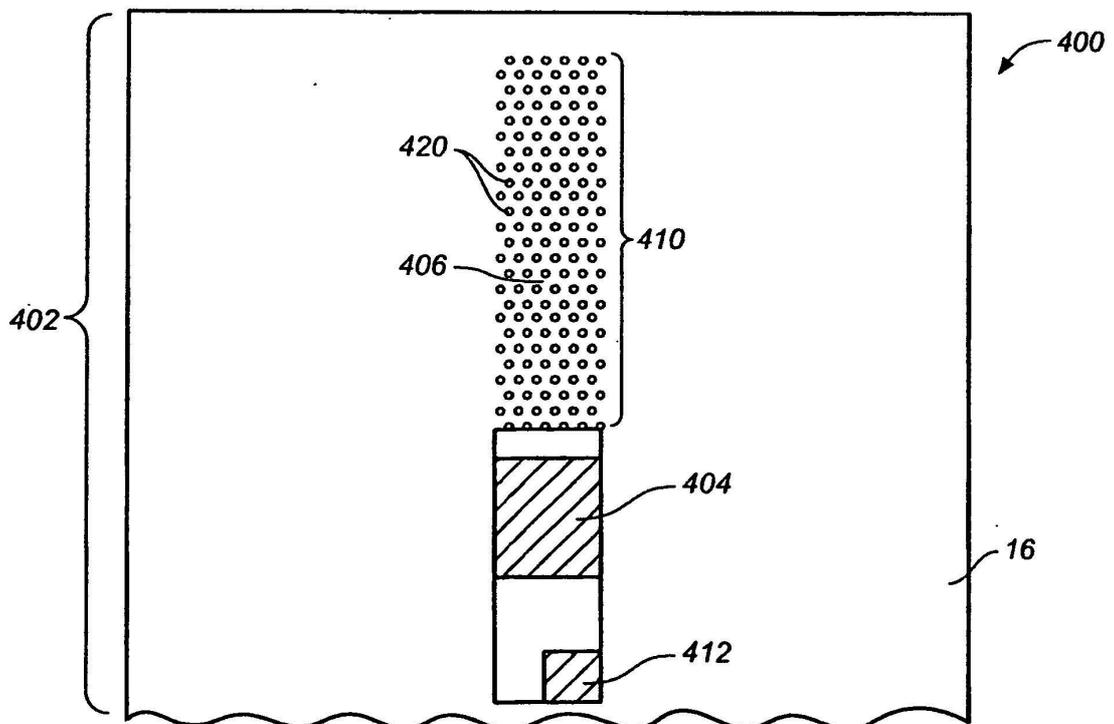
**FIG. 23**



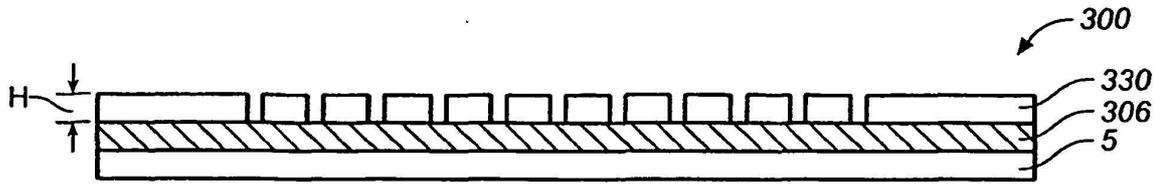
**FIG. 24**



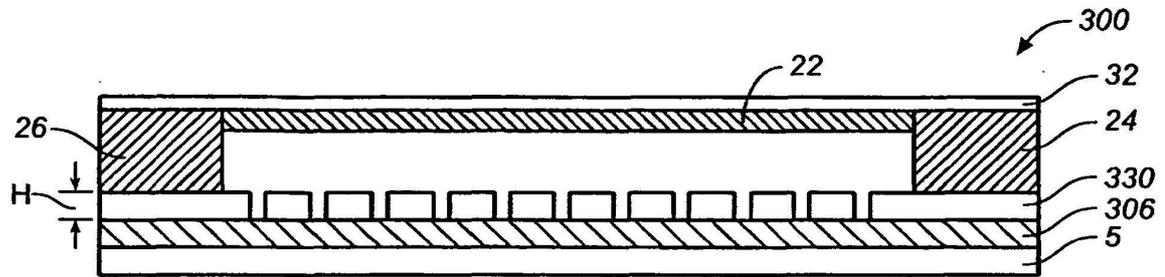
**FIG. 25**



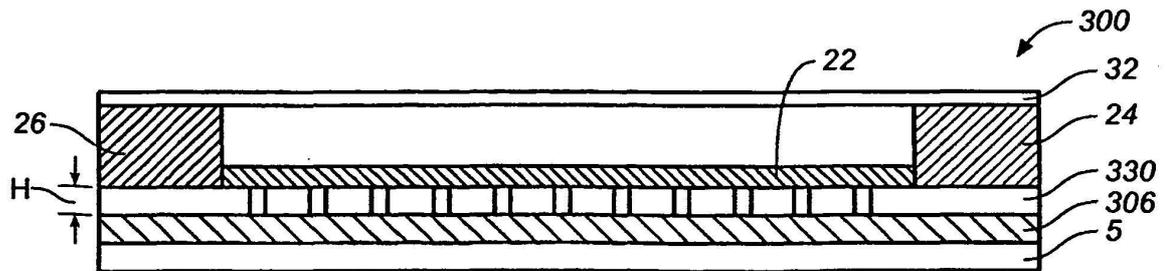
**FIG. 26**



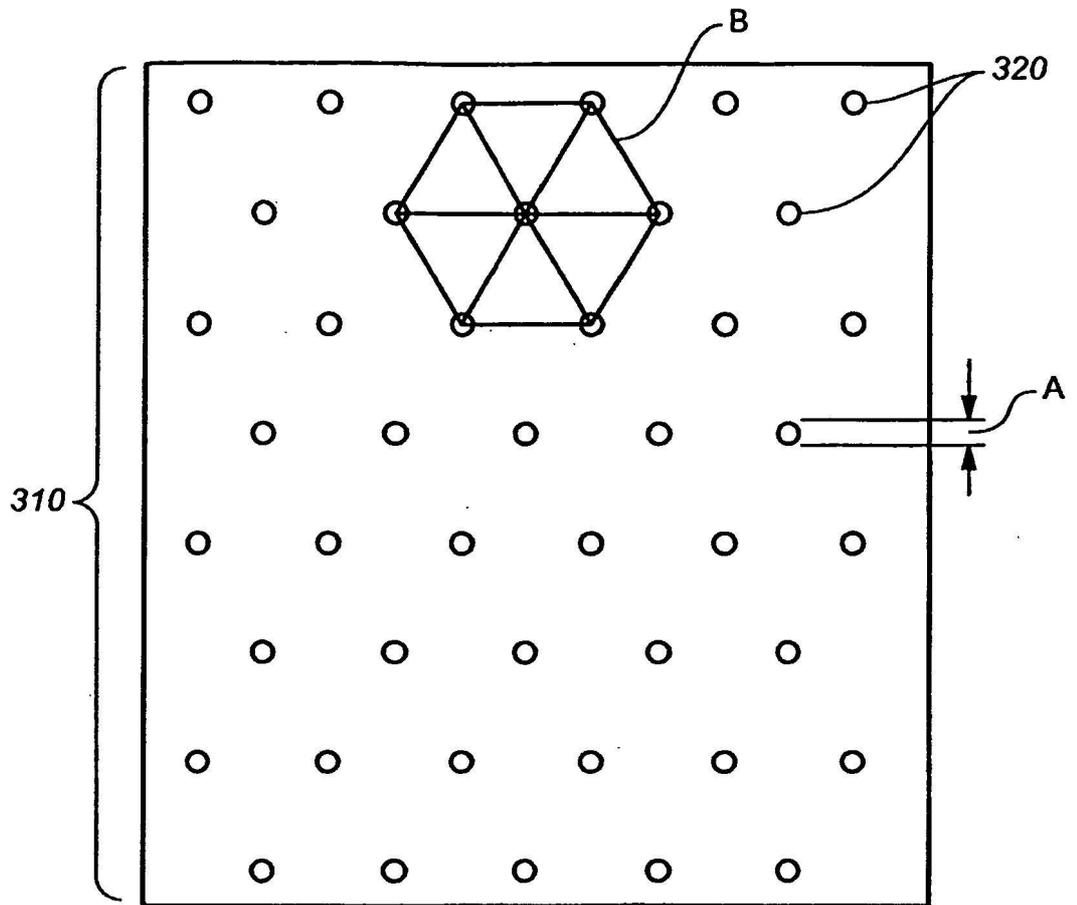
**FIG. 27**



**FIG. 28**



**FIG. 29**



**FIG. 30**