

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 888**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/327** (2006.01)

**G01N 33/66** (2006.01)

**C12Q 1/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2010 E 10780059 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2437052**

54 Título: **Biosensor y uso del mismo**

30 Prioridad:

**25.05.2009 CN 200910142768**

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

**29.05.2015**

73 Titular/es:

**LEADWAY (HK) LIMITED (100.0%)  
Unit 22, 21/F, The Center, No. 99 Queen's Road  
Central, Hong Kong, HK**

72 Inventor/es:

**LIN, JINN-NAN;  
WANG, CHIA-LIN y  
ZHANG, ZIYI**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 536 888 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Biosensor y uso del mismo

**Campo de la invención**

5 Esta memoria descriptiva divulga un biosensor para analizar componentes específicos de un líquido de muestra. La presente invención se refiere a un procedimiento que usa un biosensor divulgado en el presente documento.

**Antecedentes de la invención**

10 En los últimos años, la atención médica ha cambiado drásticamente, del uso primariamente de un análisis en laboratorio clínico de las muestras a un análisis de diagnóstico inmediato en el consultorio médico o en la cama del paciente. Los biosensores enzimáticos desechables se usan con frecuencia para realizar estas pruebas rápidas. Tomando como ejemplo la prueba de la glucosa, la prueba en casa por el paciente es ahora común y es una necesidad para una atención médica integral apropiada. Para llevar a cabo una prueba en casa usando un biosensor de glucosa, el paciente diabético saja el dedo para retirar una pequeña cantidad de sangre. El paciente aplica la sangre en la tira de prueba del biosensor y el aparato medidor que acompaña al biosensor registra los datos eléctricos desde el biosensor y calcula la concentración de glucosa en la sangre del paciente en unos pocos segundos. Esta información se usa para 15 tomar decisiones sobre cuándo y cuánta insulina se debe usar.

20 Se han desarrollado varios tipos de biosensores que utilizan una catálisis específica de una enzima. Recientemente, la mayoría de los biosensores utiliza un procedimiento electroquímico, tal como un aparato medidor para medir la glucosa. Normalmente, un biosensor comprende un electrodo de ánodo y un electrodo de cátodo formados sobre un sustrato de aislamiento en el procedimiento electroquímico, y la capa de reacción se forma sobre los electrodos. Cuando se dispone una muestra dentro del biosensor, la sustancia objetivo de la muestra producirá reacciones redox en la catálisis enzimática. Los mediadores o transportadores de oxígeno se reducen. Los mediadores reducidos o los transportadores de oxígeno reducidos se oxidan debido al potencial de electrodo, liberando electrones y dando lugar a un cambio en el electrón. Este es el procedimiento electroquímico para la detección de la concentración de las sustancias en la muestra indirectamente a través de dichos cambios electrónicos. Por ejemplo, las patentes de los EE. 25 UU. N.º US 5.120.420 y US 5.320.732 para Nankai, la patente de los EE. UU. N.º US 5.141.868 para Shanks divulgan biosensores de glucosa desechables. Estos biosensores están contruidos de dos capas de plástico laminadas para separadores y de este modo se mantienen unidas. Esta estructura forma un canal capilar ventilado que extrae una muestra aplicada en el interior y sobre un área de muestra. Cuando la muestra fluye dentro del canal por flujo capilar, la muestra entra en contacto con una capa de enzima y electrodos, que detectan y opcionalmente miden un analito en 30 la muestra.

35 Para otro ejemplo, la patente de los EE. UU. N.º US 5.192.415 divulga un biosensor que comprende un electrodo de trabajo y un contraelectrodo que se forman sobre el sustrato de aislamiento, se proporciona una reacción sobre los electrodos. Se cuantifica un sustrato contenido en un líquido de muestra usando una reacción del sustrato con la enzima en el sistema de electrodos, tal como la concentración de glucosa en la muestra de sangre. Pero aunque la muestra no sea suficiente, aún se lleva a cabo el procedimiento de prueba. Por lo tanto, a menudo la muestra no puede cubrir completamente el electrodo de trabajo lo que da lugar a resultados de prueba inexactos. Con el fin de superar esta desventaja, la patente de los EE. UU. N.º US 5.582.697 divulgó un tercer electrodo para detectar si la muestra era suficiente.

40 También se divulgan biosensores que comprenden tres electrodos por los documentos EP 0 987 544 A1, US 5.650.062A y US 2003/146110 A1. El documento EP 0 987 544 A1 divulga un procedimiento para determinar la concentración de un sustrato en una solución de muestra usando un biosensor. El biosensor incluye un sistema de electrodos que tiene un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un tercer electrodo que se va a usar como electrodo de detección de sustancias interferentes. Por el uso del procedimiento del documento EP 0 987 544 A1, se pueden lograr la detección y la corrección para una sustancia interferente tal como ácido ascórbico y oxígeno. El documento 45 US 5.650.062A se refiere a un biosensor y un procedimiento para cuantificar un sustrato usando el biosensor. El biosensor tiene un sistema de electrodos que incluye un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un tercer electrodo usado para detectar una zona de unión de líquido. El documento US 5.650.062A proporciona un procedimiento que permite cuantificar un sustrato en un líquido de muestra, sin que la detección se vea afectada por la detección de la zona de unión de líquido, y un potencial en un contraelectrodo usado como referencia que no varía por una reacción de oxidación/reducción en un electrodo de trabajo. El documento EP 0 987 544 A1 divulga un biosensor en forma de una tira, que comprende, entre otros, un primer electrodo como electrodo de trabajo, un segundo electrodo como contraelectrodo, y un tercer electrodo como electrodo de referencia. El documento EP 0 987 544 A1 también divulga un procedimiento para determinar la concentración de glucosa en una muestra usando el biosensor. Los tres electrodos se usan para la medida de analitos. 50

55 Como ya se ha mencionado anteriormente, la patente de los EE. UU. N.º US 5.582.697 divulga un biosensor que comprende un tercer electrodo para detectar si la muestra de prueba es suficiente. El documento US 5.582.697 divulgó que el tercer electrodo está dispuesto más alejado de un puerto de introducción de muestra que el electrodo de trabajo y el contraelectrodo. La corriente se mide cuando la muestra alcanza el tercer electrodo, lo que indica que la muestra

ha cubierto completamente el electrodo de trabajo y el contraelectrodo. En este momento, comenzará la medida de la concentración de analitos en la muestra. Si no, se mostrará un aviso de que la muestra no es suficiente.

Sin embargo, la distancia del tercer electrodo en el documento US 5.582.697 es particularmente importante. Si el tercer electrodo está demasiado cerca, el comportamiento frontal del flujo de la muestra añadida no presentará una línea para la acción capilar durante el flujo de muestra dentro del biosensor. Si el comportamiento frontal de flujo se vuelve cóncavo o convexo, podría producirse el fenómeno de que se inicie la prueba cuando la muestra llega al tercer electrodo pero la muestra no cubre completamente el electrodo de trabajo. Si el tercero se diseña a una distancia demasiado lejana, esto podría garantizar que la muestra cubra completamente el electrodo de trabajo, pero este diseño requiere más muestras, por ejemplo, necesitará más muestra de sangre del paciente lo que dará como resultado más dolor para el paciente.

### Sumario de la invención

Con el fin de superar las desventajas anteriores, la presente invención proporciona un procedimiento para estimar si se suministra suficiente muestra, como se define en la reivindicación 1 incluyendo un biosensor que es fabricable de forma sencilla y que realiza medidas precisas.

Un biosensor usado en el procedimiento de la presente invención incluye un sustrato aislante con un sistema de electrodos, una capa de reacción que cubre al menos un electrodo del sistema de electrodos, una capa de recubrimiento y un puerto de introducción de muestra. El sistema de electrodos incluye al menos un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un tercer electrodo, en el que el tercer electrodo, que se usa para estimar si la cantidad de muestra que se va a someter a prueba es suficiente, está más cerca del puerto de introducción de muestra que el contraelectrodo y en el que el electrodo de trabajo es el contraelectrodo y el tercer electrodo. En un modo de realización, el electrodo de trabajo situado en medio es el más cercano al puerto de introducción de muestra, mientras que el contraelectrodo es el más alejado del puerto de introducción de muestra.

La presente invención proporciona un procedimiento de uso del biosensor divulgado en el presente documento para estimar si una cantidad de líquido de muestra es suficiente. El procedimiento incluye: proporcionar un biosensor que incluye un sustrato aislante con un sistema de electrodos en el mismo, una capa de reacción que cubre al menos un electrodo del sistema de electrodos, una capa de recubrimiento y un puerto de introducción de muestra, incluyendo el sistema de electrodos al menos un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un tercer electrodo usado para estimar si una cantidad de líquido de muestra que se va a someter a prueba es suficiente, en el que el tercer electrodo está más cerca del puerto de introducción de muestra que el contraelectrodo; aplicar un líquido de muestra al biosensor y detectar el valor de corriente 1 entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo y el valor de corriente 2 entre el electrodo de trabajo y el tercer electrodo; comparar los valores de la corriente 1 y la corriente 2, a continuación estimar si la cantidad del líquido de muestra suministrado es suficiente para cumplir con el requisito de la prueba. En un modo de realización, cuando el valor de la corriente 1 detectada es cero o un valor bajo extremo, quiere decir que el líquido de muestra suministrado para la prueba es insuficiente, y el aparato medidor demostrará que la prueba es inválida. El valor bajo extremo se define en experimentos específicos, tal como el valor de corriente detectado a partir de una muestra de sangre con una concentración de glucosa que es cero. En otro modo de realización, se estima comparando los valores absolutos de la corriente 1 y de la corriente 2 si la cantidad del líquido de muestra aplicado cumple suficientemente con el requisito de la prueba. En otro modo de realización, se estima comparando el sesgo del valor de corriente 1 y del valor de corriente 2 si la cantidad del líquido de muestra aplicado cumple suficientemente con el requisito de la prueba.

La presente invención proporciona además un procedimiento de uso del biosensor divulgado en el presente documento para detectar la concentración de un analito de interés en el líquido de muestra. El procedimiento incluye: aplicar un líquido de muestra a un puerto de introducción de muestra de un biosensor; insertar el biosensor en un sistema de detección eléctrico y conectar el biosensor con el sistema de detección eléctrico por medio de los conductores de conexión; detectar el valor de corriente 1 entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo y el valor de corriente 2 entre el electrodo de trabajo y el tercer electrodo; comparar los valores de la corriente 1 y la corriente 2 con un valor umbral predeterminado, si se estima que el volumen de líquido de muestra aplicado no puede cumplir con el requisito de la prueba, emitir un error de muestra insuficiente; si se estima que el volumen de líquido de muestra aplicado puede cumplir con el requisito de la prueba, el sistema de detección eléctrico emitirá la concentración del analito de interés en el líquido de muestra sometido a prueba. En un modo de realización, para comparar el sesgo, o la tasa del sesgo, entre los valores de la corriente 1 y la corriente 2, si el sesgo o la tasa del sesgo es mayor que un valor umbral predeterminado, indica que el líquido de muestra suministrado es insuficiente, y el aparato medidor emitirá una información de muestra insuficiente; si la tasa del sesgo es menor que o igual a un valor umbral predeterminado, convierte el valor de la corriente 1 detectada entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo en un porcentaje del sustrato que se va a detectar en la muestra sometida a prueba.

Las ventajas de la presente invención incluyen: ya que el tercer electrodo, que se usa para estimar si el líquido de muestra suministrado es suficiente, está más cerca del puerto de introducción de muestra que el contraelectrodo, cuando la cantidad de la muestra aplicada no puede cumplir con el requisito de prueba predeterminado, el sesgo del parámetro eléctrico entre los dos grupos de circuitos de electrodo es muy grande, es mucho más fácil que se reconozca por el sistema de detección eléctrico con menos error. Por tanto, al cambiar entre los dos grupos de

5 circuitos eléctricos, y comparar los parámetros eléctricos de los dos grupos de circuitos eléctricos, se puede estimar de forma más sensible y precisa si la cantidad del líquido de muestra aplicado cumple con el requisito de la prueba, haciendo que, de este modo, los resultados de la prueba sean más precisos. Además, al usar los parámetros eléctricos de los dos grupos de circuitos eléctricos para estimar la cantidad del líquido de muestra aplicado y el tiempo para iniciar una prueba, se puede acortar eficazmente la distancia entre los electrodos, y por tanto, acortar el trayecto que el líquido de muestra viaja en el biosensor. De este modo, se requiere menos líquido de muestra y provoca menos dolor a los probadores y acorta eficazmente el tiempo de prueba y se emite el resultado de la prueba más rápidamente.

### Descripción de los dibujos

- La fig. 1 es una vista en despiece del biosensor usado en el procedimiento de la presente invención.
- 10 La fig. 2 es una vista esquemática del biosensor usado en el procedimiento de la presente invención.
- La fig. 3 es una vista en plano esquemática del recubrimiento con muestra de los electrodos, mientras la muestra aplicada no puede alcanzar el contraelectrodo.
- La fig. 4 es una vista en plano esquemática del recubrimiento con muestra de los electrodos, mientras la muestra aplicada cubre parcialmente el contraelectrodo.
- 15 La fig. 5 es una vista en plano esquemática del recubrimiento con muestra de los electrodos, mientras la cantidad del líquido de muestra aplicado es suficiente.
- La fig. 6 es un gráfico que muestra los cambios en la corriente de respuesta cuando la concentración de glucosa es de 60 mg/dl.
- 20 La fig. 7 es un gráfico que muestra los cambios en la corriente de respuesta cuando la concentración de glucosa es de 120 mg/dl.
- La fig. 8 es un gráfico que muestra los cambios en la corriente de respuesta cuando la concentración de glucosa es de 280 mg/dl.
- La fig. 9 es un gráfico que muestra los cambios en la corriente de respuesta cuando la concentración de glucosa es de 500 mg/dl.
- 25 La fig. 10 es un gráfico que muestra los cambios en la corriente de respuesta sometida a prueba cambiando la metodología de prueba cuando la concentración de glucosa es de 110 mg/dl.
- La fig. 11 es un gráfico que muestra los cambios en la corriente de respuesta sometida a prueba cambiando la metodología de prueba cuando la concentración de glucosa es de 380 mg/dl.
- 30 La fig. 12 es un gráfico analítico con precisión de la concentración de glucosa detectada por un biosensor usado en el procedimiento de la presente invención.

### Descripción detallada de los modos de realización

Un biosensor 100 usado en el procedimiento de la presente invención incluye un sustrato aislante 210 con un sistema de electrodos en el mismo, una capa de reacción 310 situada al menos sobre un electrodo de trabajo 103 del sistema de electrodos, una capa de recubrimiento 225 y un puerto de introducción de muestra 224. Los elementos anteriores se pueden laminar conjuntamente o se pueden pegar con pegamento. El biosensor 100 también se puede formar por impresión en el sustrato.

En referencia a la fig. 1, el sustrato aislante 210 incluye un sistema de electrodos usados para detectar la existencia o concentración de analitos de interés en el líquido de muestra. El sistema de electrodos tiene al menos tres electrodos y un número correspondiente de conductos de electrodo, pero también puede tener más de tres electrodos y un número correspondiente de conductos de electrodo. El sustrato 210 se puede formar de una variedad de materiales, tales como carbono, poliestireno, policarbonato, resina de poli(cloruro de vinilo), y poliéster. En un modo de realización, la capa de base se construye de poli(tereftalato de etileno) (PET). El grosor es de 3-10 mil, por ejemplo, una tira de PET de 5 mil de grosor (mil, mil, unidad de longitud, 1 mil equivale a una milésima parte de pulgada, es decir, 0,0254 mm) proporciona un soporte apropiado, como lo hace una película blanca de PET de 14 mil. Por supuesto, muchos grosores diferentes también funcionarán bien en la invención. El sustrato proporciona un soporte para recibir los electrodos y los cables de electrodo.

En un modo de realización particular, los electrodos y cables de electrodo se imprimen en el sustrato aislante. Se pueden usar Ag/AgCl, tintas de carbono (grafito), paladio, oro, platino, iridio, óxido de indio dopado con estaño, acero inoxidable, y otros materiales conductores adecuados. Los electrodos y cables de electrodo se pueden producir con el mismo material o diferentes materiales. El grafito es muy adecuado para fabricar electrodos por sus grandes poros y buena adsorbabilidad. Los electrodos también se pueden fabricar por la combinación de estos materiales. Por ejemplo, una parte del electrodo utiliza un material, mientras que la otra parte del electrodo utiliza el otro material.

Como se ilustra en las fig. 1 y 2, el sistema de electrodos del sustrato aislante incluye un electrodo de trabajo 103, un contraelectrodo 105 y un tercer electrodo 107 para estimar si una cantidad del líquido de muestra suministrado que se va a someter a prueba es suficiente. El tercer electrodo 107 está más cerca del puerto de introducción de muestra que el contraelectrodo 105. En un modo de realización, el tercer electrodo 107 es el más cercano al puerto de introducción de muestra 224, y el contraelectrodo 105 es el más alejado del puerto de introducción de muestra 224, y el electrodo de trabajo 103 está situado entre el contraelectrodo 105 y el tercer electrodo 107. En otro modo de realización, el electrodo de trabajo 103 es el más cercano al puerto de introducción de muestra 224, el contraelectrodo 105 es el más alejado del puerto de introducción de muestra 224, y el tercer electrodo 107 está situado entre el electrodo de trabajo 103 y el contraelectrodo 105. Pero el electrodo de trabajo 103 no se puede situar más alejado del puerto de introducción de muestra. El sustrato aislante 210 incluye además conductos de electrodo 221 con conductos de conexión 223 en un extremo de los conductos de electrodo 221. Los conductos de conexión 223 se usan para conectar el biosensor con un sistema de detección eléctrico. El sistema de detección eléctrico detecta, por medio de los conductos de conexión, la corriente producida por la reacción en el biosensor y calcula la existencia o concentración del analito de interés en el líquido de muestra. La capa aislante 215 cubre el sistema de electrodos pero deja un orificio en un extremo frontal del mismo sobre el sistema de electrodos. La capa de reacción 310 se sitúa en el orificio en la capa aislante y cubre el sistema de electrodos, por tanto forma un sitio de reacción.

La capa de reacción 310 se sitúa en al menos uno de los electrodos, pero también puede cubrir dos o todos los electrodos. La capa de reacción contiene uno o más reactivos para medir la presencia o concentración de un analito de interés en la muestra de fluido. En un modo de realización, la capa de reacción contiene una oxidorreductasa y un aceptor de electrones, para analizar la muestra y generar una sustancia a través de la reacción que es detectable por el sistema de electrodos.

En un modo de realización, existe una capa de separación 220 entre la capa aislante 215 y la capa de recubrimiento 225. La capa de separación 220 tiene un puerto de introducción de muestra 224 en un área correspondiente sobre la capa de reacción. La capa de separación se puede formar de materiales adhesivos.

En un modo de realización, el analito de interés es la glucosa presente en sangre. En este modo de realización, la capa de reacción puede incluir glucosa oxidorreductasa y los transportadores para el transporte de electrones. Los reactivos también pueden incluir un aglutinante. En un modo de realización, el aglutinante es hidroxietilcelulosa (HEC). Este aglutinante es hidrófilo y también se puede usar para mezclar con la muestra de sangre que se recibe de modo que se establece una célula electroquímica en un periodo de segundos. También se pueden usar otros materiales como aglutinante, por ejemplo, hidroximetilcelulosa e hidroxipropilcelulosa. También se puede incluir un estabilizador en la formulación de reactivo. En un modo de realización, se puede incluir polietilenglicol (PEG). El PEG también puede facilitar una respuesta rápida en el ensayo. En otros modos de realización diversos, la capa de reacción también puede contener mediadores, tensioactivos, estabilizantes y polímeros, y cualquier otro reactivo que sea útil para realizar el ensayo.

Por el uso del procedimiento de la presente invención, se puede medir cualquier analito que se pueda medir por un procedimiento electroquímico. Por ejemplo, glucosa, lactato, urea, bicarbonato, ácido 3-hidroxibutírico (3-HBA), aminoácidos (por ejemplo, L-glutamato, aspartato, L-lisina), amonio, sodio, calcio, oligoelementos metálicos y cualquier otro analito para el que se pueda diseñar un ensayo electroquímico. Los reactivos en la capa de reacción se cambiarán, por supuesto, a los apropiados para someter a prueba el analito de interés. Cuando 3-HBA es el analito, se pueden incluir en la capa de reacción mediadores tales como  $K_3Fe(CN)_6$ , ferroceno, hexacianoferrato y enzimas tales como 3-HBA deshidrogenasa y diaforasa, y el cofactor NAD.

Usando los dispositivos se puede analizar cualquier muestra de fluido de muestra o muestra fluidizada. Los ejemplos de fluidos de muestra que se pueden someter a prueba incluyen sangre completa, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, orina y saliva. También se pueden someter a prueba muestras clínicas, muestras biológicas y muestras ambientales, tanto si se suministran como fluidos o si se han de licuar antes del análisis. El fluido de muestra también puede ser un tampón, o una solución o suspensión que contiene un material biológico sólido o gaseoso.

Los biosensores divulgados en el presente documento y los procedimientos de la invención se pueden usar para detectar cualitativa o cuantitativamente cualquier analito o enzima. Por ejemplo, el analito que se va a someter a ensayo puede ser macromoléculas tales como péptidos, proteínas, por ejemplo, anticuerpos o receptores, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, vitaminas, oligosacáridos, carbohidratos, lípidos o moléculas pequeñas, o un complejo de los mismos. Las proteínas o péptidos ejemplares incluyen enzimas, proteínas de transporte tales como canales y bombas iónicas, proteínas nutrientes o de almacenamiento, proteínas contráctiles o móviles tales como actinas y miosinas, proteínas estructurales, proteínas de defensa o proteínas reguladoras tales como anticuerpos, hormonas y factores de crecimiento. Los ácidos nucleicos ejemplares incluyen ADN, tales como ADN-A, -B o -Z, y ARN tales como ARNm, ARNt y ARNr. Los ácidos nucleicos pueden ser ácidos nucleicos mono-, bi- o tricatenarios. Las vitaminas ejemplares incluyen vitaminas solubles en agua tales como tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina, biotina, folato, vitamina B12 y ácido ascórbico, y vitaminas solubles en grasas tales como vitamina A, vitamina D, vitamina E y vitamina K. Los lípidos ejemplares incluyen triacilgliceroles tales como triestearina, tripalmitina y trioleína, ceras, fosfoglicéridos tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y cardiolipina, esfingolípidos tales como esfingomielina, cerebrosidos y gangliósidos, esteroides tales como colesterol y estigmasterol y ésteres de ácidos grasos de esteroides. Los ácidos grasos pueden ser ácidos grasos

saturados tales como ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico y ácido lignocérico, o pueden ser ácidos grasos insaturados tales como ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y ácido araquidónico.

5 El analito o enzima que se va a detectar puede ser un marcador para una ruta biológica, una fase del ciclo celular, un tipo de célula, un tipo de tejido, un tipo de órgano, una fase de desarrollo, un tipo o fase de enfermedad, trastorno o infección, o fármaco u otros tratamientos. Los tejidos ejemplares incluyen tejidos conjuntivo, epitelial, muscular o nervioso. Los órganos ejemplares incluyen un órgano accesorio del ojo, órgano anuloespiral, órgano auditivo, órgano de Chievitz, órgano periventricular, órgano de Corti, órgano crítico, órgano del esmalte, órgano específico, órgano genital femenino externo, órgano genital masculino externo, órgano flotante, corpúsculo de Ruffini, órgano genital, 10 órgano tendinoso de Golgi, órgano gustativo, órgano auditivo, órgano genital femenino interno, órgano genital masculino interno, órgano intromitente, órgano de Jacobson, órgano neurohemal, órgano neurotendinoso, órgano olfativo, órgano otolítico, órgano ptósico, órgano de Rosenmuller, órganos de los sentidos, órgano del olfato, órgano espiral, órgano subcomisural, órgano subfornical, órgano supernumerario, órgano táctil, órgano afectado, órgano del gusto, órgano del tacto, órgano urinario, órgano vascular de la lámina terminal, órgano vestibular, órgano 15 vestibulococlear, órgano vestigial, órgano de la visión, órgano visual, órgano vomeronasal, órgano flotante, órgano de Weber y órgano de Zuckerkandl. Los órganos animales internos ejemplares incluyen cerebro, pulmón, hígado, bazo, médula ósea, timo, corazón, linfa, sangre, hueso, cartílago, páncreas, riñón, vesícula biliar, estómago, intestino, testículos, ovario, útero, recto, sistema nervioso, glándula, vasos sanguíneos internos. Las enfermedades o trastornos ejemplares incluyen neoplasma (neoplasia), cánceres, enfermedades o trastornos del sistema inmunitario, 20 enfermedades o trastornos de metabolismo, enfermedades o trastornos de músculo y hueso, enfermedades o trastornos del sistema nervioso, enfermedades o trastornos de señales, enfermedades o trastornos de transportadores.

En un modo de realización, al menos la superficie interna de la capa de recubrimiento 225 se forma por el material hidrófilo. La capa de recubrimiento tiene una ventilación 226, que permite la comunicación de aire entre la cámara de reacción y el exterior del dispositivo. La ventilación puede ser una ranura, pero en otros modos de realización, la ventilación puede ser cualquier forma que permita el paso de aire de la cámara de reacción fuera del dispositivo. La ventilación puede estar situada por encima de la capa espaciadora. En algunos modos de realización, la capa de recubrimiento puede ser una tinta dieléctrica, que se puede imprimir sobre el biosensor. La capa de recubrimiento también puede contener un adhesivo para fijarla a la capa protectora hidrófoba (si está presente), a la capa de aislamiento 215 y al sustrato. 25 30

En un modo de realización, la actual invención implica un procedimiento de uso del biosensor anterior para estimar si el líquido de muestra suministrado que se va a someter a prueba es suficiente. Durante la prueba de un líquido de muestra, después de insertar el biosensor en un sistema de detección eléctrico, aplicar el líquido de muestra en el puerto de introducción de muestra 224, el líquido de muestra se introduce en el sistema de electrodos del biosensor por acción por capilaridad o por otro modo, y reacciona con los reactivos en la capa de reacción. 35

Debido a las diferentes cantidades de líquido de muestra que se aplican, existen varias condiciones de que el líquido de muestra se mueva en el biosensor. Si la cantidad del líquido de muestra aplicado no cumple con el requisito de la prueba, dentro del tiempo de prueba predeterminado, el líquido de muestra 10 no puede alcanzar el contraelectrodo (como se indica en la fig. 3) o sólo cubre una parte del contraelectrodo (como se indica en la fig. 4). Bajo una condición de este tipo, sucederá que la cantidad de líquido de muestra aplicada sobre el electrodo de trabajo no puede lograr el requisito de recubrimiento del área para la prueba, por lo tanto hace que el resultado de la prueba sea erróneo. Si el líquido de muestra aplicado es suficiente, como se indica en la fig. 5, el líquido de muestra 10 cubre totalmente el contraelectrodo que es el más alejado del puerto de aplicación de muestra, bajo una condición de este tipo, el líquido de muestra debe cubrir todo el área del contraelectrodo para la prueba. 40

En un modo de realización, cuando el líquido de muestra aplicado es muy malo, el líquido de muestra no puede alcanzar el contraelectrodo 105. Cuando se aplica un voltaje entre el electrodo de trabajo 103 y el contraelectrodo 105, la corriente detectada es cero, y el sistema de prueba eléctrico demostrará una prueba errónea e informará al operario de que se aplica líquido de muestra insuficiente. 45

En otro modo de realización, cuando el líquido de muestra aplicado sólo puede cubrir una parte del contraelectrodo 105, entonces el tercer electrodo 107, que está más cerca del puerto de aplicación de muestra que el contraelectrodo 105, se habrá cubierto totalmente por el líquido de muestra. La tasa de reacción entre el electrodo de trabajo 103 y el tercer electrodo 107 se ha vuelto la mayor, pero la tasa de reacción entre el electrodo de trabajo 103 y el contraelectrodo 105 puede que no se haya vuelto la mayor. Por lo tanto, si el líquido de muestra es insuficiente, cuando se detecta la corriente 1 (II) entre el electrodo de trabajo 103 y el contraelectrodo 105, el área que el líquido de muestra cubre el contraelectrodo es insuficiente para hacer que la tasa de reacción final en el electrodo de trabajo sea la tasa de reacción mayor, por lo tanto, el producto intermedio se acumula sobre el electrodo de trabajo. Si el tercer electrodo está totalmente cubierto por el líquido de muestra, cuando el voltaje se cambia al electrodo de trabajo 103 y al tercer electrodo 107 para someter a prueba la corriente 2 (12), la reacción final sobre el electrodo de trabajo será la mayor, más el producto intermedio acumulado durante la prueba de la corriente II, lo que hace que el valor de corriente (12) real entre el electrodo de trabajo y el tercer electrodo se incremente obviamente en comparación con el valor de corriente entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo antes del cambio. Por tanto, cuando se cambia de detectar 50 55 60

el valor de corriente 1 (I1) entre el electrodo de trabajo 103 y el contraelectrodo 105 a detectar el valor de corriente 2 (I2) entre el electrodo de trabajo 103 y el tercer electrodo 107, los dos valores de corriente (I1 y I2) presentan un cambio obvio, en otras palabras, el valor de corriente I2 es obviamente mayor que el valor de corriente I1. En un modo de realización, cuando el sesgo absoluto entre el valor de corriente I1 y el valor de corriente I2 es mayor que un valor umbral predeterminado, el sistema de detección eléctrico emite un mensaje de que el líquido de muestra aplicado es insuficiente. En otro modo de realización, cuando la tasa de sesgo absoluto entre el valor de corriente I1 y el valor de corriente I2 es mayor que un valor umbral predeterminado, el sistema de detección eléctrico emite un mensaje de que el líquido de muestra aplicado es insuficiente.

En otro modo de realización, si el líquido de muestra aplicado es suficiente, dentro de un tiempo predeterminado, el líquido de muestra cubre un área suficiente en el contraelectrodo 105, por tanto, el área que el líquido de muestra cubre en el electrodo de trabajo también logra el requisito de la prueba. En esta condición, la tasa de reacción entre el electrodo de trabajo 103 y el contraelectrodo 105 se vuelve la mayor, y el valor de corriente I1 detectado iguala al valor de corriente I2 entre el electrodo de trabajo 103 y el tercer electrodo 107, o el sesgo es muy pequeño. Si el sesgo absoluto, o la tasa de sesgo absoluto, entre el valor de corriente I1 y el valor de corriente I2 es más pequeño que un valor umbral predeterminado, el sistema de detección eléctrico estima que la cantidad del líquido de muestra aplicado sobre el biosensor cumple con el requisito de la prueba.

Se pueden adoptar muchos procedimientos para comparar el valor de corriente 1 y el valor de corriente 2, realizando de este modo un juicio de si la cantidad del líquido de muestra aplicado es suficiente. En un modo de realización, dentro de un tiempo predeterminado para la estimación, si el líquido de muestra para la prueba no puede alcanzar el contraelectrodo 105 o el líquido de muestra cubre sólo una pequeña parte del contraelectrodo 105, el valor de corriente 1 es cero o extremadamente bajo, a continuación emite un juicio de que el líquido de muestra suministrado es insuficiente.

En otro modo de realización, dentro de un tiempo predeterminado para la valoración, se calcula el sesgo absoluto A entre el valor de corriente 1 (I1) y el valor de corriente 2 (I2) por la fórmula I, y se compara el sesgo absoluto A con el valor umbral predeterminado, estimando de este modo si el líquido de muestra aplicado es suficiente. Cuando el sesgo absoluto es mayor que el valor umbral predeterminado, se estima que la cantidad de líquido de muestra aplicado no puede cumplir con el requisito de la prueba. En un modo de realización, el valor umbral predeterminado es de 10. Cuando el sesgo absoluto A es mayor que 10, se estima que el líquido de muestra suministrado es insuficiente.

En un modo de realización, dentro de un tiempo predeterminado para la valoración, se realiza un juicio comparando la tasa de sesgo absoluto de los dos valores de corriente con un valor umbral predeterminado. La tasa de sesgo absoluto se obtiene por la fórmula II. En otras palabras, la tasa de sesgo absoluto B se obtiene realizando el sesgo absoluto del valor de corriente 1 y el valor de corriente 2 y realizando el sesgo absoluto dividido entre el valor de corriente 1 o bien el valor de corriente 2. Cuando la tasa de sesgo absoluto es mayor que el valor umbral predeterminado, se estima que la cantidad de líquido de muestra no puede satisfacer con el requisito de la prueba, y el sistema de detección eléctrico emite un mensaje de funcionamiento erróneo. Cuando la tasa de sesgo absoluto es menor que el valor umbral predeterminado, se estima que la cantidad de líquido de muestra puede satisfacer con el requisito de la prueba, y el sistema de detección eléctrico emite de forma precisa la concentración del analito de interés. En un modo de realización, el valor umbral predeterminado es de un 5 %. Cuando la tasa de sesgo absoluto B es mayor que un 5 %, se estima que el líquido de muestra suministrado es insuficiente. De acuerdo con diferentes sistemas de detección, el valor umbral predeterminado puede ser de un 30 %, 20 % o un 10 % et al.

$$A = |I1 - I2| \quad \text{Fórmula I}$$

$$B = \frac{|I1 - I2|}{I1} \times 100\% \quad \text{o} \quad B = \frac{|I1 - I2|}{I2} \quad \text{Fórmula II}$$

Los valores umbrales predeterminados, como parámetro contrastivo, se obtienen por una serie de experimentos durante el diseño del producto. En un modo de realización, se seleccionan varias de los líquidos de muestra con diferentes concentraciones del analito de interés, y se realizan las pruebas de las concentraciones del analito de interés con diferentes formulaciones de reactivos, diferentes temperaturas y diferentes sustancias interferentes. Cuando las cantidades de líquido de muestra son suficientes, los experimentos obtendrán una serie de sesgos entre los valores de corriente 1 y los valores de corriente 2, o las tasas de sesgos entre los valores de corriente 1 y los valores de corriente 2, que se marcan por A1, A2... An. Cuando las cantidades de líquido de muestra son insuficientes, los experimentos obtendrán una serie de sesgos entre los valores de corriente 1 y los valores de corriente 2, o tasas de sesgos entre los valores de corriente 1 y los valores de corriente 2, que se marcan por B1, B2... Bn. Por el procedimiento de estadística de probabilidad, los valores umbrales predeterminados están limitados dentro del intervalo mayor que el más grande en A y menor que el más pequeño en B. Comúnmente, las selecciones de valores umbrales predeterminados apropiados depende de la variabilidad inherente de los procedimientos de la prueba, las precisiones que los diseñadores esperan y los requisitos legales et al. Diferentes sistemas de reacción y diferentes procedimientos de medida pueden obtener diferentes valores umbrales predeterminados adaptados para dichos sistemas de reacción.

En un modo de realización, dentro del tiempo predeterminado, el valor de corriente 1 y el valor de corriente 2 sólo se pueden comparar una vez. En otro modo de realización, dentro del tiempo predeterminado, el valor de corriente 1 y el valor de corriente 2 se pueden comparar varias de las veces. Dentro del tiempo predeterminado, cuando se estima que la cantidad de líquido de muestra en el electrodo de trabajo ya ha satisfecho el requisito de la prueba, se completa la comparación y se emitirá la concentración de analito de interés en el líquido de muestra.

La presente memoria descriptiva divulga además un procedimiento de estimación de si la muestra suministrada de líquido es suficiente, que incluye: proporcionar un biosensor; aplicar un líquido de muestra al biosensor; aplicar un voltaje entre el electrodo de trabajo (103) y el contraelectrodo (105), medir el parámetro eléctrico 1 entre el electrodo de trabajo (103) y el contraelectrodo (105); apagar la conexión de circuito eléctrico entre el electrodo de trabajo (103) y el contraelectrodo (105); aplicar un voltaje entre el electrodo de trabajo (103) y el tercer electrodo (107), medir el parámetro eléctrico 2 entre el electrodo de trabajo (103) y el tercer electrodo (107); calcular el parámetro 1 y el parámetro 2, y compararlos con el valor umbral predeterminado, a continuación, estimar si la cantidad de líquido de muestra suministrado satisface el requisito de la prueba o no. También se divulga en el presente documento un procedimiento en el que se aplica el voltaje entre el electrodo de trabajo (103) y el tercer electrodo (107), y se detecta el parámetro eléctrico 2 entre el electrodo de trabajo (103) y el tercer electrodo (107). Después de apagar la conexión eléctrica entre el electrodo de trabajo (103) y el tercer electrodo (107), se aplica un voltaje entre el electrodo de trabajo (103) y el contraelectrodo (105), y se detecta el parámetro eléctrico 1 entre el electrodo de trabajo (103) y el contraelectrodo (105). Los voltajes de detección tienen diferentes valores en base a la diferente media electrónica, tales como 0,25 V, 0,4 V o 0,6 V et al.

### Ejemplo de referencia 1

Una prueba de verificación para estimar si el líquido de muestra con diferentes concentraciones de glucosa se aplica de forma suficiente.

Se procesa una prueba aplicando muestras de sangre, que tienen concentraciones de glucosa de 60 mg/dl, 120 mg/dl, 280 mg/dl, 500 mg/dl, respectivamente, dentro de biosensores como se divulga en el presente documento. Para cada concentración de glucosa, 10 grupos de muestras de sangre tienen una cantidad suficiente y pueden cumplir con el requisito de la prueba mientras que otros 10 grupos de muestras de sangre tienen una cantidad insuficiente y no pueden cumplir con el requisito de la prueba. Los resultados de la prueba se muestran en las tablas 1-4 y las fig. 6-9. Los resultados de la prueba indican que, cuando la cantidad de líquido de muestra es suficiente, los valores de corriente 1 y 2 respectivamente tomados en el segundo 5,0 y en el segundo 5,1 tienen muy poco sesgo, que tiene una tasa diferente menor que un 5 %, y el diagrama entre el segundo 5,0 y el segundo 5,1 casi no presenta cambios. Sin embargo, cuando la cantidad de líquido de muestra no puede cumplir con el requisito de la prueba, los valores de corriente 1 y 2, respectivamente tomados en el segundo 5,0 y segundo 5,1, tienen un sesgo muy grande, que tiene una tasa de sesgo absoluto mayor que un 30 % o incluso infinito, y el diagrama entre el segundo 5,0 y el segundo 5,1 presenta un pico pronunciado obvio. Los resultados de la prueba indican que, usando el valor de corriente 1 y el valor de corriente 2 producidos por el biosensor divulgado en el presente documento, y comparando el valor de corriente 1 y el valor de corriente 2, se puede reflejar bien si la cantidad de líquido de muestra aplicado es suficiente o no, y el resultado no se verá afectado por la concentración de glucosa en el líquido de muestra, por lo tanto tiene una buena estabilidad.

Tabla 1

Concentración de glucosa (mg/dl)	Volumen de líquido de muestra aplicado	Valor de corriente 1 tomado del electrodo de trabajo o del contraelectrodo (sometido a prueba en el segundo 5)	Valor de corriente 2 tomado del electrodo de trabajo o del tercer electrodo (sometido a prueba en el segundo 5,1)	(Sesgo)	(% sesgo)
60	insuficiente	0	19	19	infinito
60	insuficiente	0	3	3	infinito
60	insuficiente	0	1	1	infinito
60	insuficiente	0	10	10	infinito
60	insuficiente	0	5	5	infinito
60	insuficiente	0	6	6	infinito
60	insuficiente	0	2	2	infinito
60	insuficiente	1	0	-1	-100,0 %



(Continuación)

Concentración de glucosa (mg/dl)	Volumen de líquido de muestra aplicado	Valor de corriente 1 tomado del electrodo de trabajo o del contraelectrodo (sometido a prueba en el segundo 5)	Valor de corriente 2 tomado del electrodo de trabajo o del tercer electrodo (sometido a prueba en el segundo 5,1)	(Sesgo)	(% sesgo)
60	insuficiente	0	6	6	infinito
60	insuficiente	0	3	3	infinito
60	suficiente	156	159	3	1,9 %
60	suficiente	155	158	3	1,9 %
60	suficiente	156	159	3	1,9 %
60	suficiente	152	155	3	2,0 %
60	suficiente	153	156	3	2,0 %
60	suficiente	153	156	3	2,0 %
60	suficiente	153	155	2	1,3 %
60	suficiente	153	154	1	0,7 %
60	suficiente	152	154	2	1,3 %
60	suficiente	151	153	2	1,3 %

Tabla 2

Concentración de glucosa (mg/dl)	Volumen de líquido de muestra aplicado	Valor de corriente 1 tomado del electrodo de trabajo o del contraelectrodo (sometido a prueba en el segundo 5)	Valor de corriente 2 tomado del electrodo de trabajo o del tercer electrodo (sometido a prueba en el segundo 5,1)	(Sesgo)	(% sesgo)
120	insuficiente	0	1	1	infinito
120	insuficiente	0	2	2	infinito
120	insuficiente	1	179	178	17800,0 %
120	insuficiente	0	106	106	infinito
120	insuficiente	0	3	3	infinito
120	insuficiente	0	28	28	infinito
120	insuficiente	0	2	2	infinito
120	insuficiente	1	17	16	1600,0 %
120	insuficiente	0	813	813	infinito
120	insuficiente	0	339	339	infinito
120	suficiente	282	288	6	2,1 %
120	suficiente	290	296	6	2,1 %
120	suficiente	288	293	5	1,7 %
120	suficiente	289	294	5	1,7 %
120	suficiente	282	287	5	1,8 %
120	suficiente	285	291	6	2,1 %
120	suficiente	279	285	6	2,2 %
120	suficiente	286	291	5	1,7 %
120	suficiente	280	284	4	1,4 %
120	suficiente	278	282	4	1,4 %

Tabla 3

Concentración de glucosa (mg/dl)	Volumen de líquido de muestra aplicado	Valor de corriente 1 tomado del electrodo de trabajo o del contraelectrodo (sometido a prueba en el segundo 5,0)	Valor de corriente 2 tomado del electrodo de trabajo o del tercer electrodo (sometido a prueba en el segundo 5,1)	(Sesgo)	(% sesgo)
280	insuficiente	1	4	3	300,0 %
280	insuficiente	0	0	0	infinito
280	insuficiente	0	370	370	infinito
280	insuficiente	0	132	132	infinito
280	insuficiente	0	1	1	infinito
280	insuficiente	0	1	1	infinito
280	insuficiente	0	1	1	infinito
280	insuficiente	0	1	1	infinito
280	insuficiente	0	1	1	infinito
280	insuficiente	0	528	528	infinito
280	suficiente	521	533	12	2,3 %
280	suficiente	527	539	12	2,3 %
280	suficiente	511	523	12	2,3 %
280	suficiente	518	530	12	2,3 %
280	suficiente	515	528	13	2,5 %
280	suficiente	505	517	12	2,4 %
280	suficiente	512	524	12	2,3 %
280	suficiente	506	518	12	2,4 %
280	suficiente	512	525	13	2,5 %
280	suficiente	496	510	14	2,8 %

Tabla 4

Concentración de glucosa (mg/dl)	Volumen de líquido de muestra aplicado	Valor de corriente 1 tomado del electrodo de trabajo o del contraelectrodo (sometido a prueba en el segundo 5)	Valor de corriente 2 tomado del electrodo de trabajo o del tercer electrodo (sometido a prueba en el segundo 5,1)	(Sesgo)	(% sesgo)
500	insuficiente	0	0	0	infinito
500	insuficiente	0	2130	2130	infinito
500	insuficiente	1	1	0	0,0 %
500	insuficiente	0	9	9	infinito
500	insuficiente	0	0	0	infinito
500	insuficiente	0	538	538	infinito
500	insuficiente	0	2960	2960	infinito
500	insuficiente	0	3653	3653	infinito
500	insuficiente	0	3895	3895	infinito
500	insuficiente	0	1683	1683	infinito
500	suficiente	893	930	37	4,1 %
500	suficiente	887	926	39	4,4 %

(Continuación)

Concentración de glucosa (mg/dl)	Volumen de líquido de muestra aplicado	Valor de corriente 1 tomado del electrodo de trabajo o del contraelectrodo (sometido a prueba en el segundo 5)	Valor de corriente 2 tomado del electrodo de trabajo o del tercer electrodo (sometido a prueba en el segundo 5,1)	(Sesgo)	(% sesgo)
500	suficiente	881	920	39	4,4 %
500	suficiente	881	915	34	3,9 %
500	suficiente	904	942	38	4,2 %
500	suficiente	908	940	32	3,5 %
500	suficiente	899	931	32	3,6 %
500	suficiente	900	932	32	3,6 %
500	suficiente	887	924	37	4,2 %
500	suficiente	889	922	33	3,7 %

5 También se divulga en el presente documento un procedimiento en el que el valor de corriente 1 y el valor de corriente 2 se someten a prueba de forma circular y se comparan tan pronto como se aplica el líquido de muestra. Cuando la comparación del valor de corriente 1 y el valor de corriente 2 coincide con el valor umbral predeterminado que indica que la cantidad de líquido de muestra suministrado es suficiente, la comparación del valor de corriente 1 y el valor de corriente 2 se detiene. De inmediato, se detecta la concentración del analito de interés en el líquido de muestra, y se emite una concentración precisa del analito de interés. Por el contrario, dentro del tiempo predeterminado, cuando la comparación del valor de corriente 1 y el valor de corriente 2 no coincide con el valor umbral predeterminado que indica que la cantidad de líquido de muestra aplicado es suficiente, el aparato medidor eléctrico emite un mensaje de cantidad de líquido de muestra insuficiente. El tiempo predeterminado es de 5 segundos, 10 segundos o cualquier otro tiempo apropiado.

### Ejemplo ilustrativo 2

Una prueba de verificación para estimar si los líquidos de muestras con diferentes concentraciones de glucosa se aplican de forma suficiente por un procedimiento de prueba circular.

15 Se procesa una prueba aplicando muestras de sangre, que tienen concentraciones de glucosa de 110 mg/dl, 380 mg/dl, respectivamente, dentro de un biosensor divulgado en el presente documento. Los resultados de la prueba se muestran en la tabla 5 y en la fig. 10. Para comparar respectivamente los valores de corriente 1 tomados en el segundo 1,0, en el segundo 3,0 y en el segundo 5,0 con los valores de corriente 2 tomados en consecuencia en el segundo 1,1, en el segundo 3,1 y en el segundo 5,1. El parámetro para estimar si la cantidad de líquido de muestra es suficiente se fija en un 10 %. Cuando la tasa de sesgo absoluto entre el valor de corriente 1 y el valor de corriente 2 es menor de un 10 %, se estima que la cantidad de líquido de muestra es suficiente, de lo contrario, se estima que la cantidad de líquido de muestra es insuficiente. Los resultados de la prueba indican que, dentro del tiempo predeterminado, cuando las cantidades de líquido de muestra son suficientes, la tasa de sesgo absoluto en el punto de tiempo de la prueba es menor que un 10 %. Dentro del tiempo predeterminado, si la tasa de sesgo de corriente absoluto en el punto de tiempo de la prueba es mayor que el parámetro predeterminado, indica que las cantidades de líquido de muestra son insuficientes.

Tabla 5

Concentración de glucosa (mg/dl)	Volumen de líquido de muestra	Valor de corriente 1 de muestra (1,0S)	Valor de corriente 2 de muestra (1,1S)	Sesgo	% tasa de sesgo	Valor de corriente 1 de muestra (3,0S)	Valor de corriente 2 de muestra (3,1S)	Sesgo	% tasa de sesgo	Valor de corriente 1 de muestra (5,0S)	Valor de corriente 2 de muestra (5,1S)	Sesgo	% tasa de sesgo
110	SU*	436	432	-4	-0,9 %	324	323	-1	-0,3 %	289	289	0	0,0 %
110	SU	444	434	-10	-2,3 %	365	364	-1	-0,3 %	315	313	-2	-0,6 %
110	SU	485	473	-12	-2,5 %	347	346	-1	-0,3 %	306	305	-1	-0,3 %
110	SU	490	477	-13	-2,7 %	352	350	-2	-0,6 %	314	312	-2	-0,6 %
110	SU	437	430	-7	-1,6 %	330	325	-5	-1,5 %	299	294	-5	-1,7 %
110	SU	501	488	-13	-2,6 %	358	356	-2	-0,6 %	315	314	-1	-0,3 %
110	SU	488	477	-11	-2,3 %	351	350	-1	-0,3 %	312	312	0	0,0 %
110	SU	472	461	-11	-2,3 %	340	339	-1	-0,3 %	309	310	1	0,3 %
110	SU	485	476	-9	-1,9 %	363	363	0	0,0 %	325	324	-1	-0,3 %
110	SU	477	465	-12	-2,5 %	341	338	-3	-0,9 %	296	295	-1	-0,3 %
110	INS*	0	75	75	INF*	0	45	45	INF	0	40	40	INF
110	INS	0	417	417	INF	0	264	264	INF	0	229	229	INF
110	INS	0	637	637	INF	0	373	373	INF	0	306	306	INF
110	INS	1	1180	1179	117900,0 %	1	631	630	63000,0 %	1	511	510	51000,0 %
110	INS	1	650	649	64900,0 %	1	375	374	37400,0 %	1	320	319	31900,0 %
110	INS	0	942	942	INF	0	512	512	INF	0	419	419	INF
110	INS	0	560	560	INF	0	352	352	INF	0	292	292	INF
110	INS	1	1225	1224	122400,0 %	0	658	658	INF	1	543	542	54200,0 %
110	INS	0	562	562	INF	0	305	305	INF	0	247	247	INF
110	INS	0	1088	1088	INF	0	585	585	INF	0	481	481	INF
380	SU	396	1385	-11	-0,8 %	940	932	-8	-0,9 %	788	786	-2	-0,3 %
380	SU	502	1473	-29	-1,9 %	1011	1000	-11	-1,1 %	848	844	-4	-0,5 %
380	SU	514	1476	-38	-2,5 %	986	975	-11	-1,1 %	837	829	-8	-1,0 %
380	SU	1590	1552	-38	-2,4 %	1010	999	-11	-1,1 %	836	832	-4	-0,5 %
380	SU	1518	1487	-31	-2,0 %	969	959	-10	-1,0 %	801	797	-4	-0,5 %
380	SU	1622	1584	-38	-2,3 %	1012	1007	-5	-0,5 %	843	843	0	0,0 %
380	SU	1597	1560	-37	-2,3 %	1024	1015	-9	-0,9 %	861	857	-4	-0,5 %
380	SU	1464	1432	-32	-2,2 %	1020	1018	-2	-0,2 %	897	897	0	0,0 %
380	SU	1532	1497	-35	-2,3 %	992	982	-10	-1,0 %	840	837	-3	-0,4 %
380	SU	1443	1412	-31	-2,1 %	1043	1028	-15	-1,4 %	868	860	-8	-0,9 %
380	SU	1337	1521	184	13,8 %	877	915	38	4,3 %	745	772	27	3,6 %
380	SU	1537	1692	155	10,1 %	913	952	39	4,3 %	779	808	29	3,7 %

(Continuación)

Concentración de glucosa (mg/dl)	Volumen de líquido de muestra	Valor de corriente 1 de muestra (1,0S)	Valor de corriente 2 de muestra (1,1S)	Sesgo	% tasa de sesgo	Valor de corriente 1 de muestra (3,0S)	Valor de corriente 2 de muestra (3,1S)	Sesgo	% tasa de sesgo	Valor de corriente 1 de muestra (5,0S)	Valor de corriente 2 de muestra (5,1S)	Sesgo	% tasa de sesgo
380	INS	0	694	694	INF	0	367	367	INF	0	283	283	INF
380	INS	0	2873	2873	INF	0	1579	1579	INF	0	1254	1254	INF
380	INS	0	3925	3925	INF	0	2449	2449	INF	1	1961	1960	196000,0 %
380	INS	3	3932	3929	130966,7 %	12	2842	2830	23583,3 %	30	2268	2238	7460,0 %
380	INS	0	1996	1996	INF	0	1040	1040	INF	0	847	847	INF
380	INS	0	2964	2964	INF	0	1625	1625	INF	0	1300	1300	INF
380	INS	0	2251	2251	INF	0	1214	1214	INF	0	964	964	INF
380	INS	0	3582	3582	INF	0	2028	2028	INF	1	1666	1665	166500,0 %

\* SU: suficiente, INS: insuficiente INF: infinito

El intervalo de tiempo para cambiar la prueba del valor de corriente 2 a la prueba del valor de corriente 1 se controla en 1 segundo, y preferentemente es de 0,1 segundos.

- 5 También se divulga en el presente documento un procedimiento de uso del biosensor divulgado en el presente documento para detectar la concentración de un analito en el líquido de muestra. El procedimiento incluye: insertar el biosensor en un sistema de detección eléctrico y conectar el biosensor con el sistema de detección eléctrico por medio de los conductores de conexión; aplicar un líquido de muestra con analito de interés a un puerto de introducción de muestra 224 del biosensor; detectar el valor de corriente 1 entre el electrodo de trabajo 103 y el contraelectrodo 105 y el valor de corriente 2 entre el electrodo de trabajo 103 y el tercer electrodo 107; comparar el valor de corriente 1 y el valor de corriente 2, si se estima que el volumen de muestra aplicada es insuficiente, el sistema de detección eléctrico emite un error de líquido de muestra insuficiente y una prueba inválida; si se estima que la cantidad de líquido de muestra aplicado puede cumplir con el requisito de la prueba, el sistema de detección eléctrico convertirá el valor de corriente entre el electrodo de trabajo 103 y el contraelectrodo en la concentración de un analito de interés en el líquido de muestra sometido a prueba.

### Ejemplo de referencia 3

Resultado de la prueba usando el biosensor divulgado en el presente documento para someter a prueba la concentración de glucosa en sangre.

- 20 Encender un glucosímetro (por ejemplo el glucosímetro ON CALL™ proporcionado por Acon company), y mantener el aparato medidor en un estado de prueba. Insertar el biosensor divulgado en el presente documento en el aparato medidor, y someter a prueba varias de las muestras de sangre con diferentes concentraciones de glucosa, respectivamente. Los resultados de la prueba se muestran en la tabla 6 y en la fig. 11.

Tabla 6

Concentración real de glucosa (mg/dl)	24,9	54,8	110,7	219,6	339,2	551,6
Concentración estándar de glucosa (mg/dl)	24,3	53,6	102,4	206,1	318,3	521,4

El experimento indica que la prueba con un biosensor divulgado en el presente documento tiene una alta precisión.

- 25 Los expertos en la técnica relativa a la presente invención pueden realizar muchos cambios en base a la divulgación de la presente invención, todos los cambios pertenecen al contenido de la presente invención. Por ejemplo, la invención

se puede usar en la prueba de un analito de interés en cualquier líquido de muestra, y el analito de interés puede ser cualquier sustancia además de glucosa. Además, los parámetros de la presente invención tomados entre el electrodo de trabajo 103 y el contraelectrodo 105 o el electrodo de trabajo 103 y el tercer electrodo 107 no están limitados al valor de corriente o al valor de corriente de muestra. El valor umbral predeterminado en los modos de realización anteriores puede ser cualquier valor apropiado.

5

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de estimación de si se suministra muestra suficiente, que incluye:  
 proporcionar un biosensor,  
 en el que el biosensor incluye un sustrato aislante, una capa de reacción, una capa de recubrimiento y un puerto de introducción de muestra, teniendo el sustrato aislante un sistema de electrodos en una superficie del mismo, incluyendo el sistema de electrodos al menos un electrodo de trabajo (103), un contraelectrodo (105) y un tercer electrodo (107), cubriendo la capa de reacción al menos el electrodo de trabajo (103), en el que el tercer electrodo (107), que se usa para estimar si el líquido de muestra que se va a someter a prueba se suministra de forma suficiente, está más cerca del puerto de introducción de muestra que el contraelectrodo (105) y en el que el electrodo de trabajo (103) está situado entre el contraelectrodo (105) y el tercer electrodo (107);  
 aplicar un líquido de muestra al biosensor;  
 aplicar un voltaje entre el electrodo de trabajo (103) y el tercer electrodo (107), medir el parámetro eléctrico 1 entre el electrodo de trabajo (103) y el contraelectrodo (105);  
 apagar el circuito eléctrico que conecta el electrodo de trabajo (103) y el contraelectrodo (105);  
 aplicar un voltaje entre el electrodo de trabajo (103) y el tercer electrodo (107), medir el parámetro eléctrico 2 entre el electrodo de trabajo (103) y el tercer electrodo (107);  
 calcular el parámetro 1 y el parámetro 2, y compararlos con el valor umbral predeterminado, a continuación, estimar si el líquido de muestra suministrado es suficiente o no.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la capa de recubrimiento del biosensor está por encima del sistema de electrodos y se forma una separación entre la capa de recubrimiento y el sustrato aislante, formando de este modo el puerto de introducción de muestra.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los parámetros eléctricos son valores de corriente.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que para calcular el sesgo absoluto del valor de corriente 1 y el valor de corriente 2 y para comparar el sesgo absoluto con el valor umbral predeterminado;  
 si el sesgo absoluto es mayor que el valor umbral predeterminado, entonces se estima que el líquido de muestra suministrado no puede cumplir con el requisito de la prueba;  
 si el sesgo absoluto es menor que el valor umbral predeterminado, entonces se estima que el líquido de muestra suministrado puede cumplir con el requisito de la prueba.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que para calcular la tasa de sesgo absoluto entre el valor de corriente 1 y el valor de corriente 2, y para comparar la tasa de sesgo absoluto con el valor umbral predeterminado;  
 si la tasa de sesgo absoluto es mayor que el valor umbral predeterminado, entonces se estima que el líquido de muestra suministrado no puede cumplir con el requisito de la prueba  
 si la tasa de sesgo absoluto es menor que el valor umbral predeterminado, entonces se estima que el líquido de muestra suministrado puede cumplir con el requisito de la prueba.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el parámetro eléctrico 1 y el parámetro eléctrico 2 se detectan dentro de un tiempo predeterminado.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que los parámetros eléctricos son valores de corriente, dentro del tiempo predeterminado, si la comparación del valor de corriente 1 y el valor de corriente 2 no coincide con la condición predeterminada de que el líquido de muestra es suficiente, entonces se emite un mensaje de error de líquido de muestra insuficiente; si la comparación del valor de corriente 1 y el valor de corriente 2 coincide con la condición predeterminada de que el líquido de muestra es suficiente, entonces se detiene la comparación y se emite un mensaje de líquido de muestra suficiente.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos una superficie interna de la capa de recubrimiento del biosensor está formada por un material hidrófilo.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la capa de reacción del biosensor incluye oxidorreductasa y mediator de electrones.

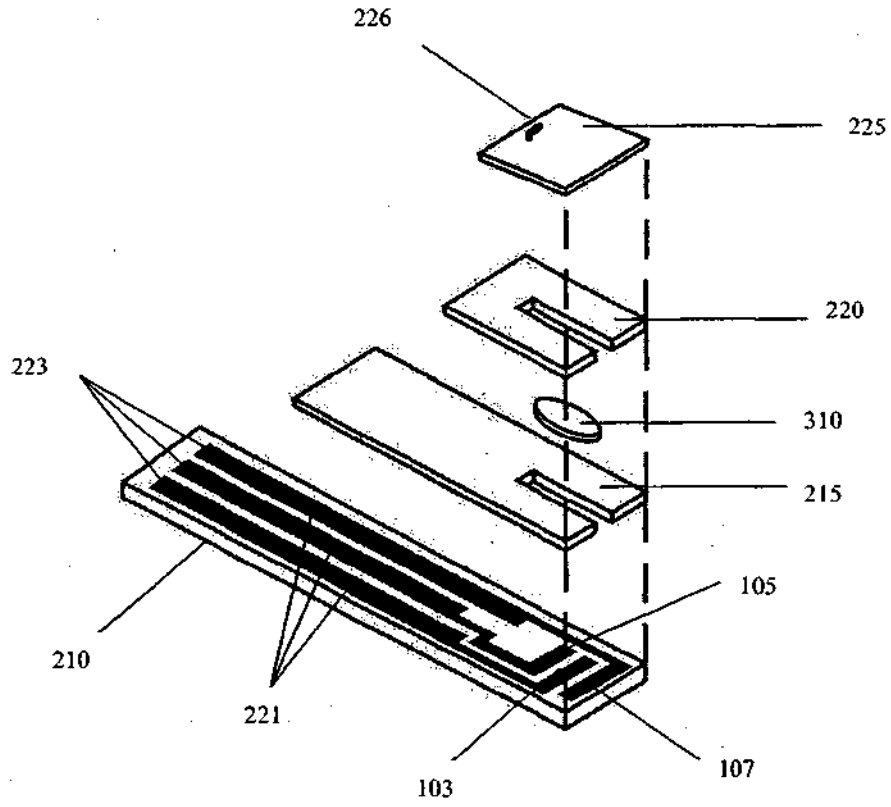


FIG. 1



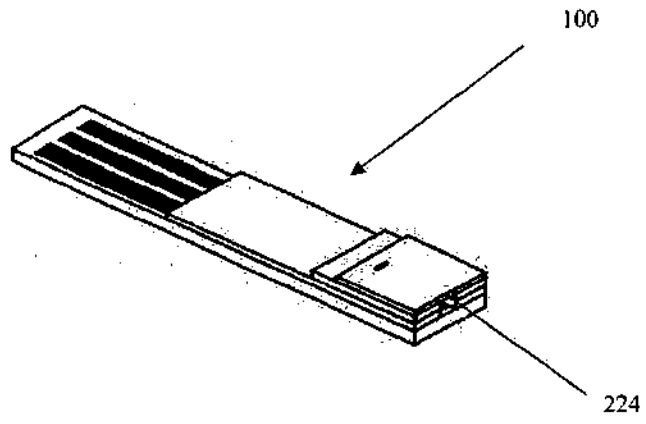


FIG. 2

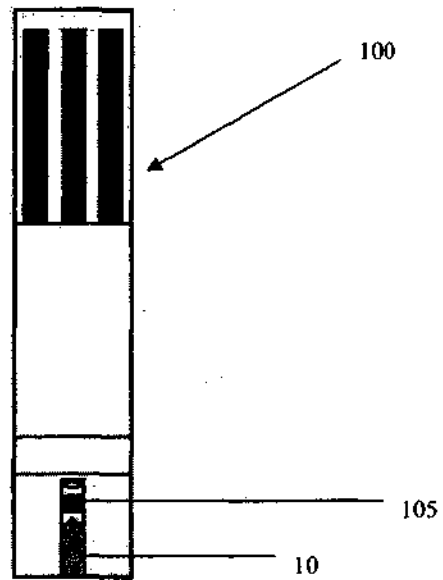


FIG. 3

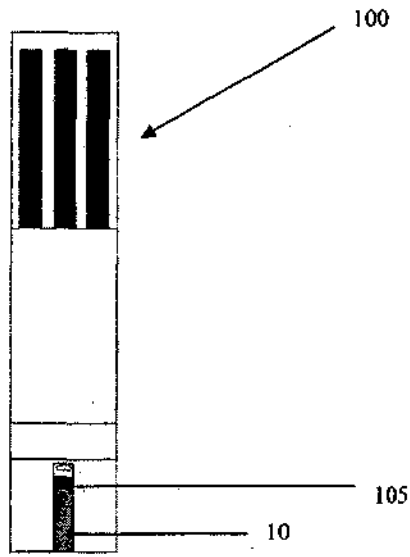


FIG. 4

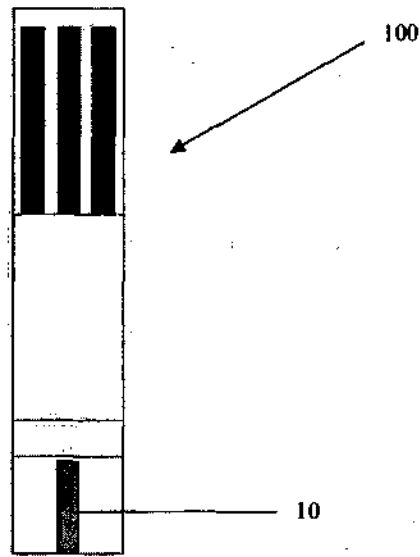


FIG. 5

Curva de valor de corriente (la concentración de glucosa es de 60 mg/dl)  
 0~5,0 segundos: valor de corriente tomado del electrodo de trabajo y el contraelectrodo  
 5,1~5,5 segundos: valor de corriente tomado del electrodo de trabajo y el tercer electrodo

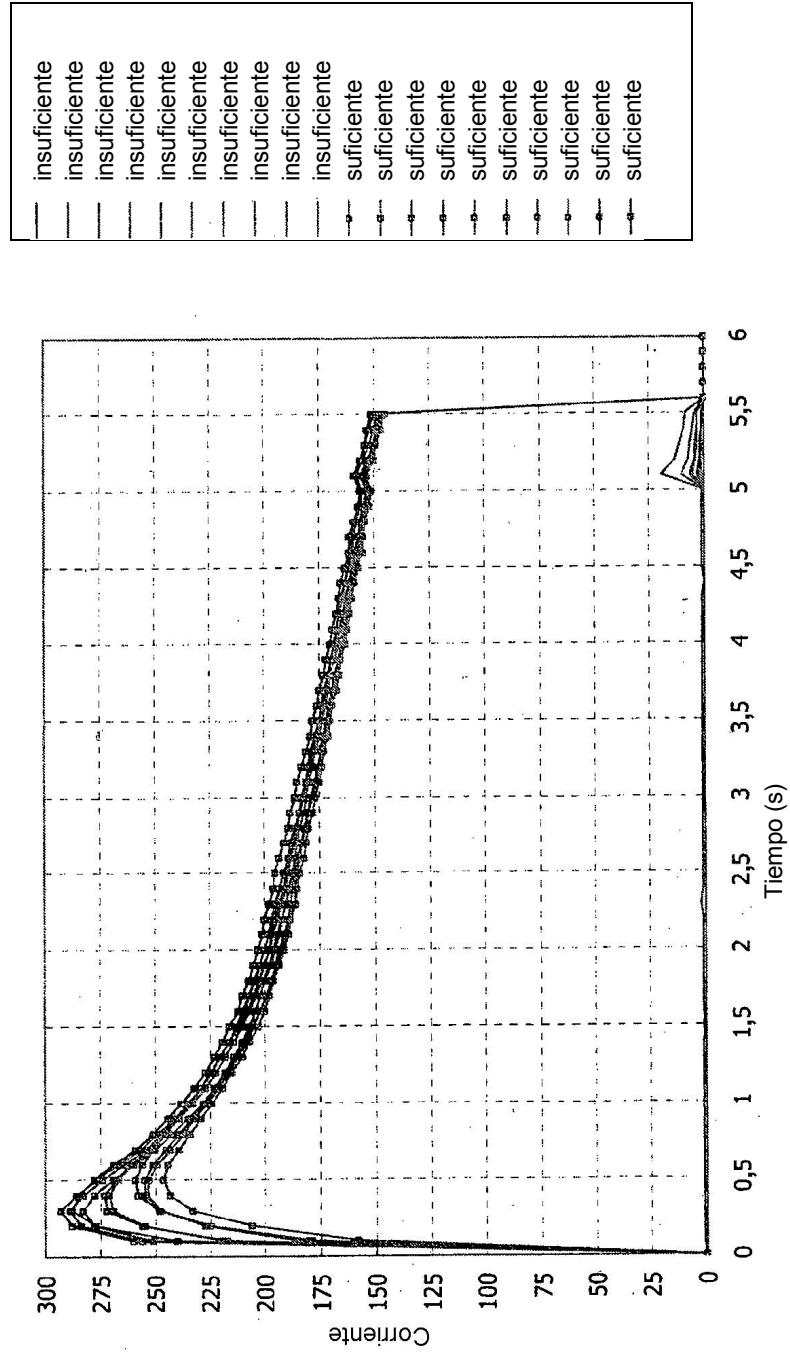


FIG. 6

Curva de valor de corriente (la concentración de glucosa es de 120mg/dl)  
 0~5,0 segundos: valor de corriente tomado del electrodo de trabajo y el contraelectrodo  
 5,1~5,5 segundos: valor de corriente tomado del electrodo de trabajo y el tercer electrodo

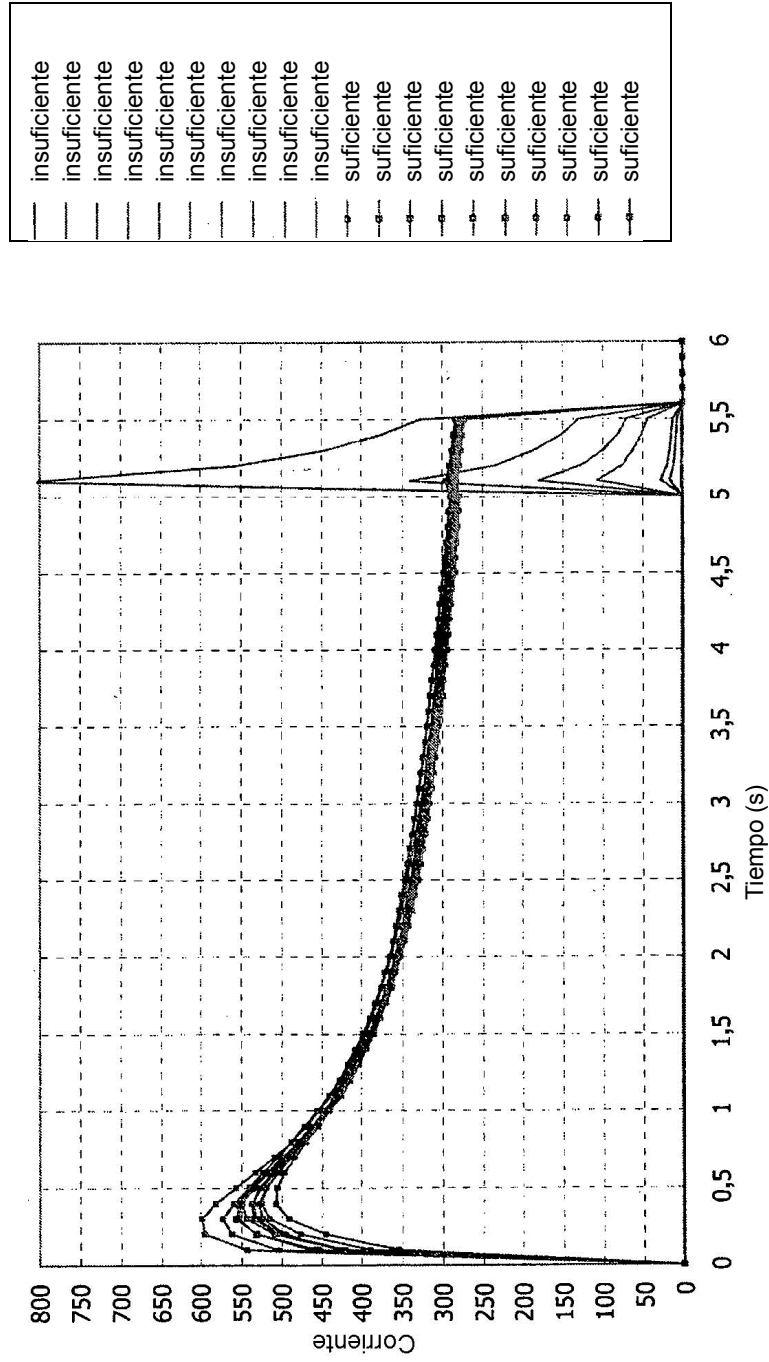


FIG. 7

Curva de valor de corriente (la concentración de glucosa es de 280mg/dl)  
 0~5,0 segundos: valor de corriente tomado del electrodo de trabajo y el contraelectrodo  
 5,1~5,5 segundos: valor de corriente tomado del electrodo de trabajo y el tercer electrodo

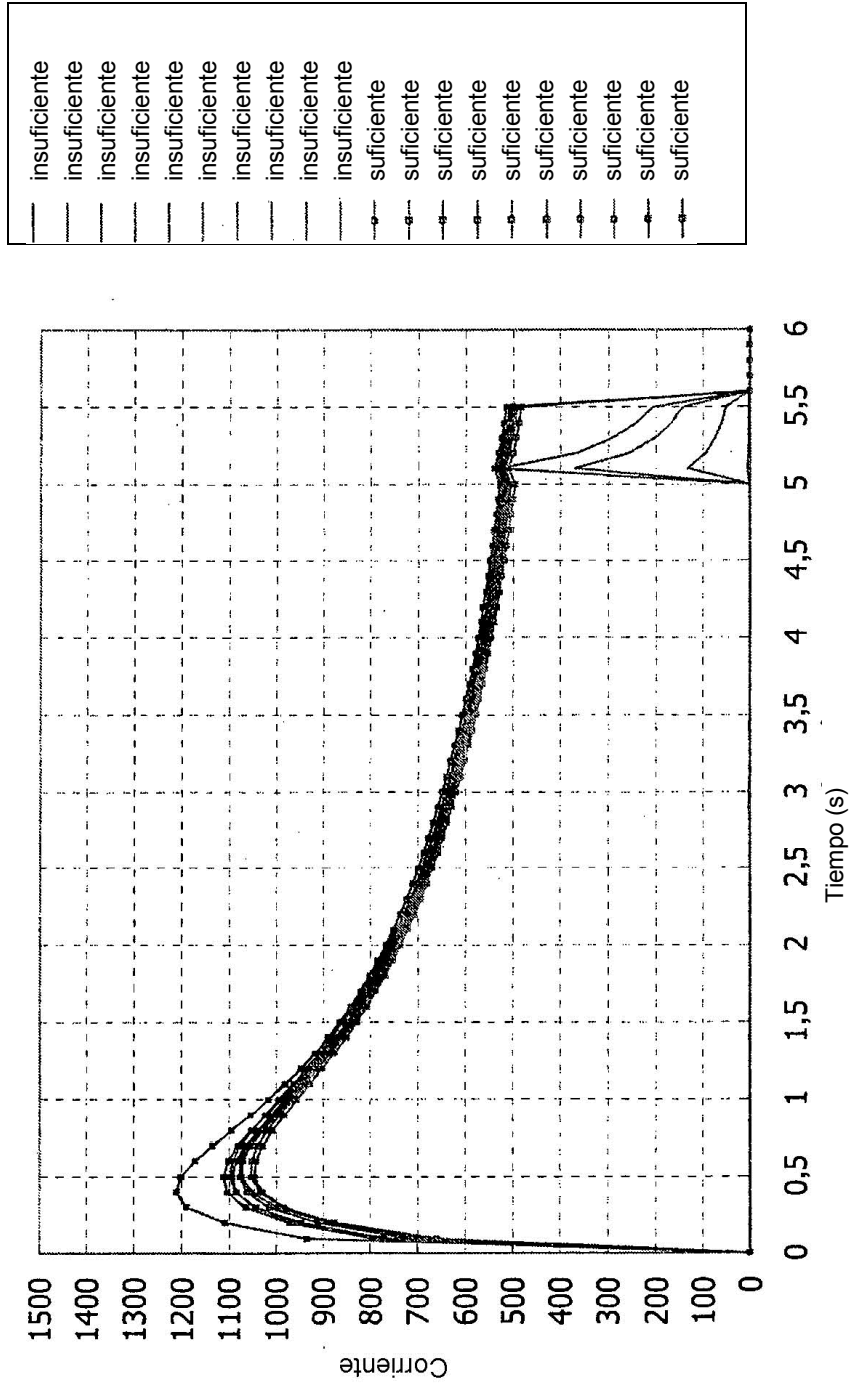


FIG. 8

Curva de valor de corriente (la concentración de glucosa es de 500mg/dl)  
0~5,0 segundos: valor de corriente tomado del electrodo de trabajo y el contraelectrodo  
5,1~5,5 segundos: valor de corriente tomado del electrodo de trabajo y el tercer electrodo

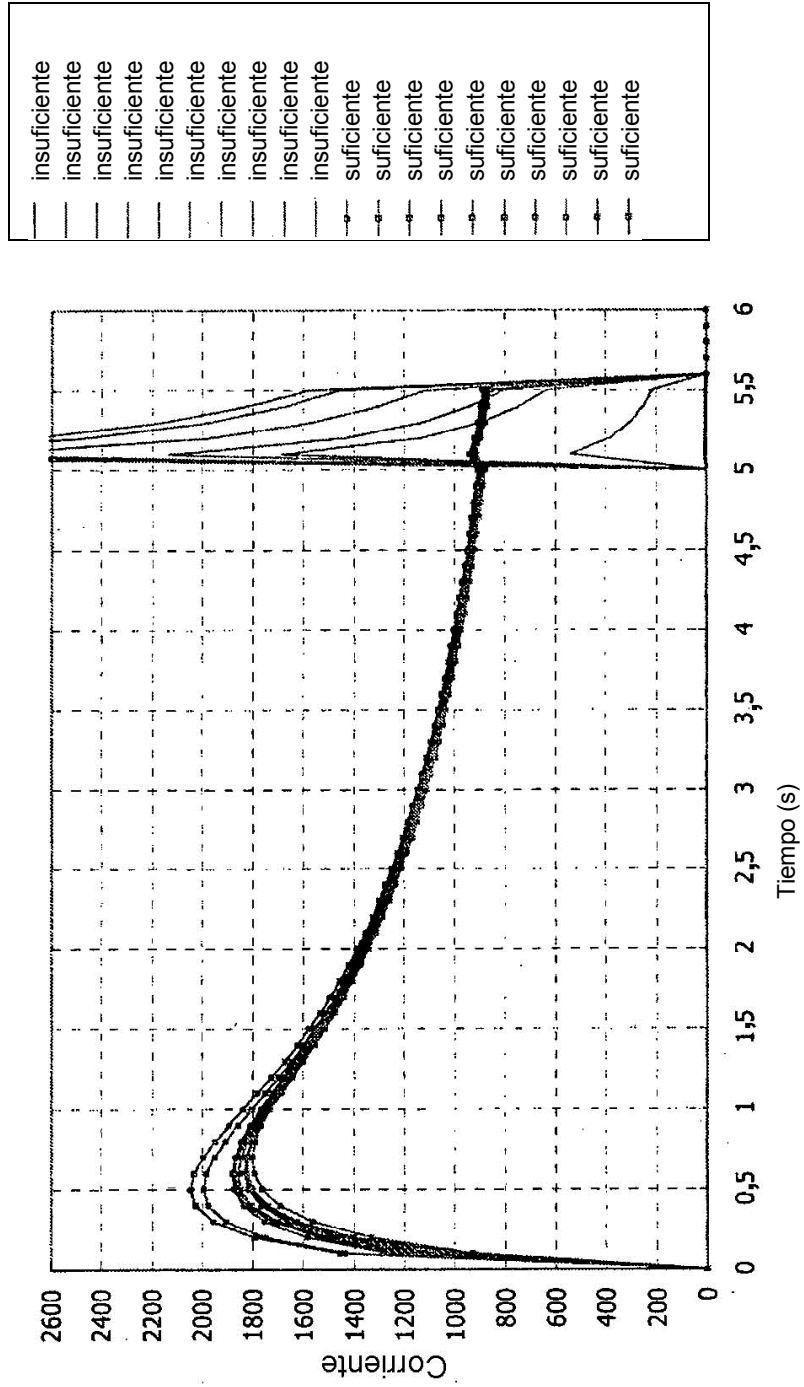


FIG. 9

Curva de valor de corriente (la concentración de glucosa es de 110 mg/dl)  
 valor de corriente del electrodo de trabajo y el contraelectrodo a: 0,1~1, 2,1~3, 4,1~5, 6,1~7, 8,1~9 (s)  
 y valor de corriente a: 1,1~2, 3,1~4, 5,1~6, 7,1~8, 9,1~10 (s)

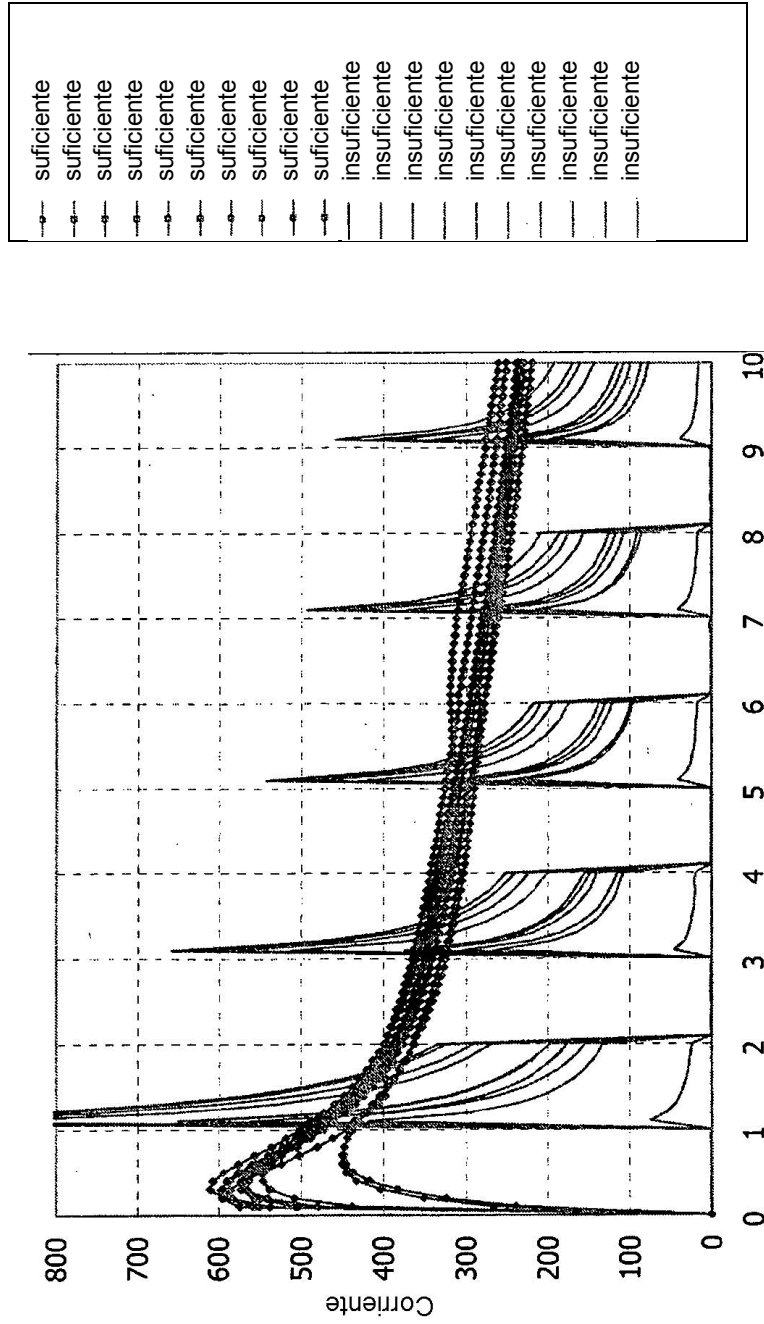


FIG. 10

Curva de valor de corriente (la concentración de glucosa es de 380 mg/dl)  
 valor de corriente del electrodo de trabajo y el contraelectrodo a: 0, 1~1, 2, 1~3, 4, 1~5, 6, 1~7, 8, 1~9 (s) y  
 valor de corriente a: 1, 1~2, 3, 1~4, 5, 1~6, 7, 1~8, 9, 1~10 (s)

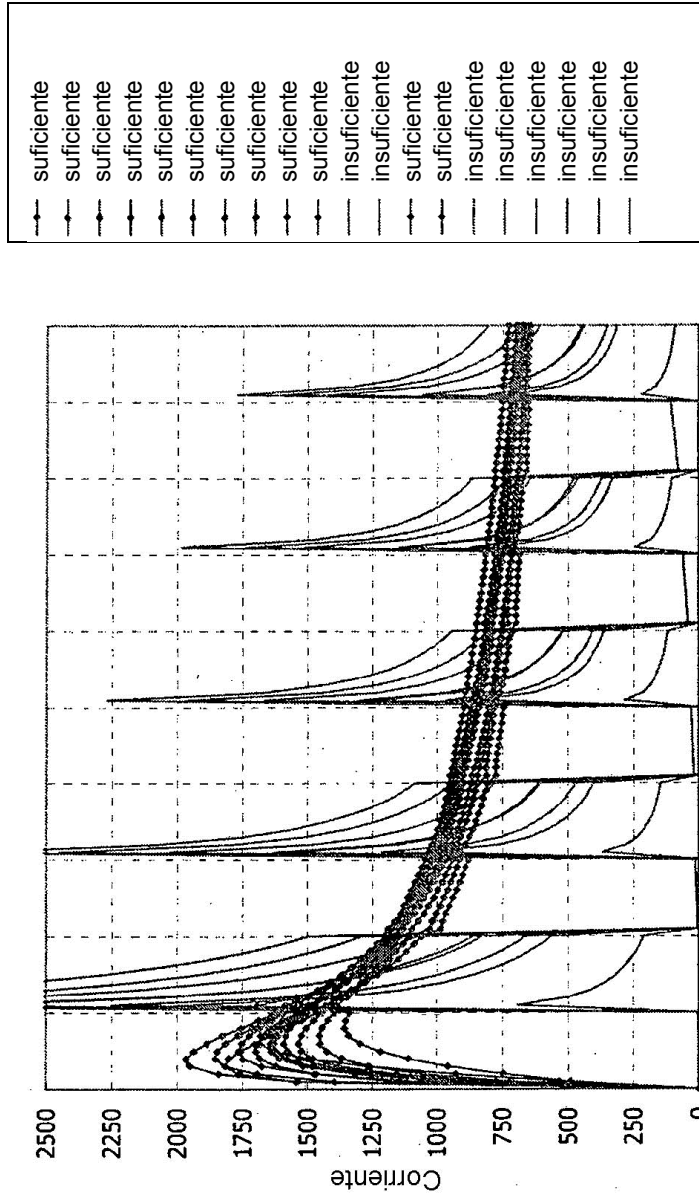


FIG. 11



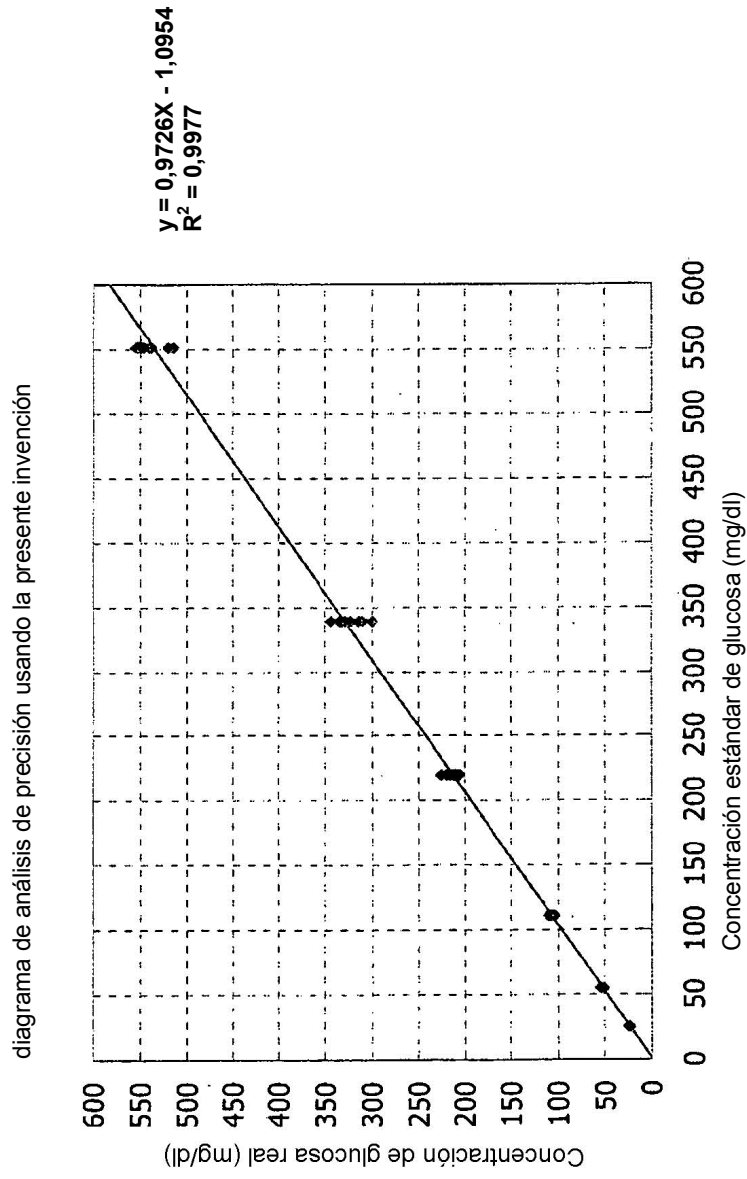


FIG. 12