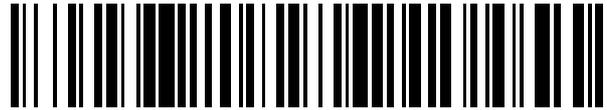


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 353**

51 Int. Cl.:

G01N 33/487 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2007 E 07824036 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 2080022**

54 Título: **Métodos para determinar una concentración de analitos usando algoritmos de procesamiento de señales**

30 Prioridad:

05.10.2006 US 850107 P

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

28.08.2015

73 Titular/es:

**LIFESCAN SCOTLAND LTD (100.0%)
BEECHWOOD PARK NORTH
INVERNESS, IV2 3ED, SCOTLAND, GB**

72 Inventor/es:

**BLYTHE, STEPHEN PATRICK;
CARDOSI, MARCO F.;
MILLS, LEANNE;
ALVAREZ-ICAZA, MANUEL;
DAY, EMMA VANESSA JAYNE;
DAY, RICHARD MICHAEL y
LEACH, CHRISTOPHER PHILIP**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 544 353 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).

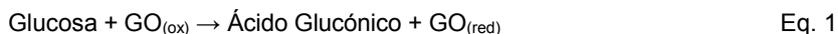
DESCRIPCIÓN

Métodos para determinar una concentración de analitos usando algoritmos de procesamiento de señales1. Prioridad

5 **[0001]** Esta solicitud reivindica los beneficios de la prioridad bajo 35 U.S.C. n° 119 a partir de la aplicación provisional S.N. 60/850, 107, presentada el 5 de octubre de 2006, facultada «MÉTODOS PARA DETERMINAR UNA CONCENTRACIÓN DE ANALITOS USANDO ALGORITMOS DE PROCESAMIENTO DE SEÑAL».

2. Descripción de técnicas relacionadas

10 **[0002]** Las tiras de test de glucosa electroquímico, como las usadas en el kit de test de la sangre entera OneTouch® Ultra®, de LifeScan, Inc., diseñadas para medir la concentración de glucosa en una muestra de sangre a partir de pacientes con diabetes. La medición de glucosa se basa en la oxidación específica de glucosa por medio de la enzima glucosa oxidasa (GO). Las reacciones que se pueden producir en una tira de test de glucosa se resumen en las siguientes ecuaciones 1 y 2



20 **[0003]** Tal y como se ilustra en la Ecuación 1, la glucosa se oxida a ácido glucónico por la forma oxidada de oxidasa de glucosa ($\text{GO}_{(\text{ox})}$). Debe tenerse en cuenta que también podría hacerse referencia a $\text{GO}_{(\text{ox})}$ como «enzima oxidada». Durante la reacción de la Ecuación 1, la enzima oxidada $\text{GO}_{(\text{ox})}$ se convierte a su estado reducido, que se denota como $\text{GO}_{(\text{red})}$ (por ejemplo, «enzima reducida»). A continuación, la enzima reducida $\text{GO}_{(\text{red})}$ se vuelve a oxidar a $\text{GO}_{(\text{ox})}$ por medio de reacción con $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (denominado mediador oxidado o ferricianida) como se ilustra en la Ecuación 2. Durante la regeneración de $\text{GO}_{(\text{red})}$ de vuelta 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 ferrocianida).

30 **[0004]** Cuando las reacciones establecidas antes se llevan a cabo con una tensión de test aplicada entre dos electrodos, podría crearse una corriente de test por la re-oxidación electromecánica del mediador reducido en la superficie del electrodo. Así, en un ambiente ideal, la cantidad de ferrocianida creada durante la reacción química descrita antes es directamente proporcional a la cantidad de glucosa de la muestra posicionada entre los electrodos y la corriente de test generada sería proporcional al contenido de glucosa de la muestra. Un mediador, como ferricianida, es un compuesto que acepta electrones a partir de una enzima como oxidasa de glucosa y a continuación dona los electrones a un electrodo. Al aumentar la concentración de glucosa de la muestra, la cantidad de mediador reducido que se forma también aumenta; de esa forma, existe una relación directa entre la corriente del test, como resultado de la re-oxidación del mediador reducido y la concentración de glucosa. En concreto, la transferencia de electrones a través de la interfaz eléctrica tiene como resultado el flujo de una corriente de test (2 moles de electrones para cada mol de glucosa que se oxida). La corriente de test resultante de la introducción de glucosa podría, por lo tanto, denominarse corriente de glucosa.

40 **[0005]** Debido a que puede ser muy importante conocer la concentración de glucosa en sangre, especialmente en personas con diabetes, se han desarrollado marcadores de test usando los principios anteriormente establecidos para permitir que una persona media pueda tomar muestras y hacer una prueba de su sangre para determinar su nivel de glucosa en cualquier momento. Los marcadores de test detectan la corriente de glucosa y los convierte a una lectura de concentración de glucosa usando un algoritmo que relaciona la corriente de test a una concentración de glucosa por medio de una fórmula matemática simple. En general, el marcador de test trabaja en conjunto con una tira de test desechable que incluye una cámara que recibe la muestra y por lo menos dos electrodos dispuestos en el interior de la cámara de recepción de la muestra además de la enzima (por ejemplo, oxidasa de glucosa) y el mediador (por ejemplo, ferricianida). El usuario se pincha el dedo u otro lugar adecuado para inducir el sangrado e introduce una muestra de sangre a la cámara de recepción de muestras, iniciando la reacción química establecida antes.

55 **[0006]** En términos electroquímicos, la función del marcador es doble. En primer lugar, proporciona una tensión de polarización (aproximadamente 400 mV en el caso de OneTouch® Ultra®) que polariza la interfaz eléctrica y permite el flujo de corriente en la superficie del electrodo que funciona por carbono. En segundo lugar, mide la corriente que fluye en el circuito externo entre el ánodo (electrodo activo) y el cátodo (electrodo de referencia). El marcador de test podría, por lo tanto, considerarse un simple sistema electromecánico que funciona en un modo de dos electrodos aunque, en la práctica, el tercer y cuarto electrodo podría usarse para facilitar la medición de glucosa y/o llevar a cabo otras funciones en el marcador de test.

60 **[0007]** En la mayor parte de las situaciones, la ecuación establecida antes se considera una aproximación suficiente de la reacción química que tiene lugar en la tira de test y el marcador de test produciendo una representación lo suficientemente exacta del contenido de glucosa de la muestra de sangre. De todas formas, en ciertas circunstancias y para determinados propósitos, podría ser positivo mejorar la exactitud de la medición. Por

ejemplo, las muestras de sangre que tienen un nivel alto de hematocrito o nivel bajo de hematocrito podrían provocar que una medición de glucosa sea inexacta.

5 **[0008]** Un nivel de hematocrito representa un porcentaje del volumen ocupado por los glóbulos rojos. En general, una muestra de hematocrito alto en sangre es más viscosa (hasta aproximadamente 10 centipoise a 70 % de hematocrito que una muestra con hematocrito bajo (aproximadamente 3 centipoise a 20 % de hematocrito). Además, una muestra de sangre con hematocrito alto tiene un contenido de oxígeno más alto que la sangre con hematocrito bajo debido al aumento concomitante de hemoglobina, que es un portador para el oxígeno. Así, el nivel de hematocrito puede influir tanto el contenido de viscosidad como de oxígeno. Como se describirá más adelante, tanto el contenido de viscosidad como de oxígeno podrían modificar la magnitud de la corriente de glucosa y a su vez provocar que la concentración de glucosa sea inexacta.

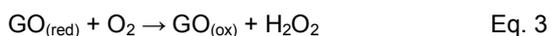
15 **[0009]** Una muestra de alto nivel de viscosidad (por ejemplo, muestra de sangre con hematocrito alto) puede provocar que la corriente de test disminuya por varios factores, como una disminución en 1) la tasa de disolución de la enzima y/o mediador, 2) la tasa de reacción de la enzima y 3) la difusión de un mediador reducido hacia el electrodo de trabajo. Una disminución de la corriente que no se basa en una disminución de la concentración de la glucosa podría provocar que se mida una concentración de glucosa inexacta.

20 **[0010]** Una tasa de disolución más lenta de la capa de reactivo puede ralentizar la reacción enzimática de la forma que se ilustra en las Ecuaciones 1 y 2 porque la enzima oxidada $GO_{(ox)}$ debe disolverse antes de poder reaccionar con la glucosa. De forma similar, la ferricianida ($Fe(CN)_6^{3-}$) debe disolverse antes de poder reaccionar con la enzima reducida $GO_{(red)}$. Si la enzima $GO_{(ox)}$ oxidada no disuelta 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 del test.

25 **[0011]** Además, la enzima oxidada $GO_{(ox)}$ reaccionará con glucosa y el medidor oxidado $Fe(CN)_6^{3-}$ más lentamente si está en una muestra de alta viscosidad en oposición a una muestra de baja viscosidad. La tasa de reacción más lenta con muestras de alta viscosidad se adscribe a una disminución general de la difusión de la masa. Tanto la enzima oxidada $GO_{(ox)}$ como la glucosa deben colisionar e interactuar entre sí para que la reacción se produzca, tal y como se ilustra en la Ecuación 1. La capacidad de la enzima oxidada $GO_{(ox)}$ y la glucosa de colisionar e interactuar entre sí se ralentiza cuando se encuentran en una muestra viscosa.

35 **[0012]** Además, el mediador reducido $Fe(CN)_6^{4-}$ se difundirá al electrodo de trabajo más lentamente cuando se disuelva en una muestra de alto nivel de viscosidad. Debido a que la corriente de test normalmente se ve limitada por la difusión del mediador reducido $Fe(CN)_6^{4-}$ al electrodo de trabajo, una muestra de alto nivel de viscosidad también atenuaría la corriente de test. En resumen, hay varios factores que provocarían que la corriente de test disminuyese cuando la muestra tenga un aumento de la viscosidad.

40 **[0013]** Un alto contenido de oxígeno podría también provocar una disminución de la corriente de test. La enzima reducida ($GO_{(red)}$) puede reducir oxígeno (O_2) a peróxido de hidrógeno de la forma ilustrada por la ecuación 3.



45 **[0014]** Como se ha indicado antes, la enzima reducida $GO_{(red)}$ también puede reducir la ferricianida ($Fe(CN)_6^{3-}$) a ferrocianida ($Fe(CN)_6^{4-}$) de la forma ilustrada en la Ecuación 2. Así, el oxígeno puede competir con la ferricianida para reaccionarse con la enzima reducida ($GO_{(red)}$). En otras palabras, si se produce la reacción de la Ecuación podría fácilmente provocar una disminución de la tasa de la reacción de la Ecuación 2. Debido a una competición de ese tipo entre la ferricianida y el oxígeno, un contenido de oxígeno más elevado provocaría que se produjese menos ferrocianida. A su vez, una disminución de la ferrocianida provocaría una disminución de la magnitud de la corriente del test. Por lo tanto, una muestra de sangre de alto contenido de oxígeno podría disminuir la corriente de test y afectar a la exactitud de la medición de test.

55 **[0015]** De esa forma, existe un gran interés en el desarrollo de métodos que reduzcan los efectos del hematocrito sobre la medición de glucosa. En ciertos protocolos, se ha usado una membrana de filtrado de sangre prefabricada que está separada de la capa de reactivo y por lo tanto reducir el efecto del hematocrito. La membrana de filtración de sangre prefabricada que está separada de la capa de reactivo puede colocarse en el electrodo de trabajo. El uso de una membrana de filtrado de sangre prefabricada independiente no es satisfactorio porque necesita una tira de test más compleja, un aumento del volumen de muestreo y un aumento del tiempo del test. La membrana de filtrado de sangre retiene una cierta cantidad de sangre que no entra en contacto con los electrodos en funcionamiento, provocando la necesidad de una mayor cantidad de muestra de sangre. Además, se hace necesaria una cantidad finita de tiempo para que la sangre se filtre por la membrana, provocando un aumento del tiempo total del test. Así, sería positivo reducir los efectos del hematocrito sin usar una membrana de filtrado de sangre prefabricada que esté separada del agente reactivo.

65 **[0016]** En las técnicas anteriores, el efecto del hematocrito podría reducirse por la aplicación de múltiples tensiones de test, como por ejemplo, una tensión de test sinusoidal. De todas formas, la aplicación de tensiones de test sinusoidal tiene como resultado una tira de test más compleja y cara. Además, la tira de test tiene que medir las

corrientes de test de forma exacta y precisa a intervalos de tiempo predeterminados. Los componentes electrónicos pueden ser caros y complicados para que una tira de test aplique tensiones de test múltiples de forma exacta y precisa.

5 [0017] Los solicitantes reconocen que sería una ventaja implantar un sistema, que use un marcador de test que aplique solo una tensión de test y una tira de test que no usa una membrana prefabricada para reducir los efectos del hematocrito. Un sistema como este sería barato y sencillo de fabricar. Más concretamente, los solicitantes reconocen que sería positivo desarrollar un algoritmo que procese matemáticamente la corriente de test obtenida usando una tensión de test de forma que pueda determinarse una concentración de glucosa exacta que reduzca los efectos del hematocrito.

10 [0018] En una técnica previa, podría determinarse una concentración de glucosa usando un algoritmo que muestree solo una pequeña proporción de la corriente de test medida que podría ser menos exacta a niveles extremos de hematocrito (por ejemplo, 0% o 70 %) que un algoritmo que use una proporción mayor de las corrientes de test medidas. Por ejemplo, un algoritmo de "corriente final", que calcula un valor de corriente media para cinco valores de corriente de test en aproximadamente 5 segundos, podría ser menos exacto que un algoritmo que use todos o casi todos los valores de corriente de test. Así, los solicitantes son conscientes de que existe una necesidad de desarrollar un algoritmo que use una mayor proporción de los valores de corriente de test para reducir sustancialmente los efectos del hematocrito.

15 [0019] EP1447660 presenta la medición de un primer conjunto de valores de corriente, derivando una constante de corrección de los mismos, aplicando una tensión y a continuación midiendo un segundo conjunto de valores de corriente para determinar una concentración de analito, que a continuación se corrige usando la constante de corrección.

20 **RESUMEN DEL INVENTO**

25 [0020] Se describe un método para determinar una concentración de analito en sangre que reduce los efectos del hematocrito usando una tira de test unida a un marcador de test. La tira de test incluye un electrodo de funcionamiento y un electrodo de referencia. El marcador de test aplica una tensión de test entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia. Cuando un usuario aplique una muestra de sangre que contenga un analito en la tira de test, el marcador de test mide un conjunto de corrientes de test durante un intervalo de tiempo de test. El marcador de test calcula un valor de correlación de analito (Y) usando las ecuaciones que se indican a continuación:

30

$$Y = \sum_{t=t_{F1}}^{t_{L1}} I(h, G, t)q(t) + \sum_{t=t_{F2}}^{t_{L2}} I(h, G, t)q(t) + \sum_{t=t_{F3}}^{t_{L3}} I(h, G, t)q(t)$$

35 [0021] donde I es el valor de la corriente de test en unidades de microamperios; h es el hematocrito en unidades de fracción; G es la concentración de glucosa en unidades de mg/dL; t es el tiempo en unidades de segundo; t_{F1} es un punto de inicio de un primer intervalo de tiempo predeterminado; t_{L1} incluye un punto temporal de finalización de un primer intervalo de tiempo predeterminado; t_{F2} es un punto de inicio de un segundo intervalo de tiempo predeterminado; t_{F3} es un punto de inicio de un tercer intervalo de tiempo predeterminado; t_{L3} incluye un punto de finalización de un tercer intervalo de tiempo predeterminado; $q(t)$ es una función de corrección donde, en una de las representaciones del invento, la función de corrección es +1 entre el punto de inicio t_{F1} y el punto de fin t_{L1} para el primer intervalo de tiempo predeterminado, -1 entre el punto de inicio t_{F2} y el punto de finalización t_{L2} para el segundo intervalo de tiempo predeterminado, y +1 entre el punto de inicio t_{F3} y el punto de finalización t_{L3} para el tercer intervalo de tiempo predeterminado. Una concentración de glucosa adecuada podría determinarse en base al valor de correlación del analito (Y).

40 [0022] Los puntos de inicio y finalización del primer, segundo y tercer intervalo de tiempo predeterminado (por ejemplo, t_{F1} , t_{L1} , t_{F2} , t_{L2} , t_{F3} y t_{L3}) y la función de corrección $q(t)$ se determinan y optimizan de forma que el valor de corrección del analito (Y) tiene entre poca y ninguna dependencia del nivel de hematocrito en sangre. Una vez se han determinado t_{F1} , t_{L1} , t_{F2} , t_{L2} , t_{F3} , t_{L3} y $q(t)$, pueden almacenarse en una porción de memoria de un marcador de test.

45 [0023] En una de las representaciones de este invento, una función de minimización de error S podría usarse para definir los términos t_{F1} , t_{L1} , t_{F2} , t_{L2} , t_{F3} y t_{L3} . La función de minimización del error S podría incluir una función de sensibilidad al contexto $a(t)$, una función de sensibilidad a la glucosa $b(t)$ y una función de sensibilidad al hematocrito $c(t)$. A continuación se muestra un ejemplo de función de minimización de un error:

50

$$S = \left[\int a(t)c(t)q(t)dt \right]^2 + \left[\int b(t)c(t)q(t)dt \right]^2 \approx 0$$

55 [0024] En una de las representaciones, la suma de la duración de un primer intervalo de tiempo predeterminado y del tercer intervalo de tiempo predeterminado no es igual al segundo intervalo de tiempo predeterminado. De todas formas, en otra representación, la suma de la duración del primer intervalo de tiempo predeterminado y del tercer

intervalo de tiempo predeterminado es igual al segundo intervalo de tiempo predeterminado, que es una forma de una transformación de Walsh-Hadamard.

5 [0025] El valor de correlación del analito (Y) podría calcularse durante el intervalo de tiempo de test en oposición a realizar el cálculo una vez que el intervalo del tiempo del test haya pasado. El marcador de test puede calcular una concentración de glucosa más eficazmente llevando a cabo los cálculos durante el intervalo de test permitiendo que la concentración de glucosa se muestre más rápidamente una vez que haya pasado el tiempo del test.

10 [0026] En otra representación de este invento, el método para determinar el punto de finalización del primer intervalo de tiempo predeterminado podría refinarse para incluir una determinación del tiempo de pico máximo a partir del conjunto de corrientes de test. El punto de finalización para el primer intervalo de tiempo predeterminado podría verse condicionado por la multiplicación del tiempo del pico máximo por un factor de calibración, donde el factor de calibración esté en un rango entre 0,5 y menos de uno.

15 [0027] En una de las representaciones, la capa reactiva podría también incluir un relleno que tenga dominios hidrofílico e hidrofóbico. El relleno podría ser sílice que ha sido modificado por tratamiento parcial de la superficie con diclorosilano metilo. La capa reactiva podría imprimirse en el electrodo de trabajo por medio de una pantalla. La pantalla podría incluir un conjunto de hilos entretreídos fijada a un marco. El conjunto de hilos entretreídos podría formar un conjunto de espacios rectangulares abiertos para permitir que la formulación pase a través de los mismos. El conjunto o de hilos entretreídos podría tener un espaciado entre hilos y un diámetro de hilo, donde espacio entre hilos se encontrase entre aproximadamente 90 hilos por centímetro y aproximadamente 120 hilos por centímetro y el diámetro de los hilos podría estar en un rango de entre aproximadamente 30 micrones y aproximadamente 50 micrones.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0028] Las características novedosas del invento se establecen más pormenorizadamente en las reivindicaciones anexas. Se podrá comprender mejor las características y ventajas del presente invento acudiendo a la descripción detallada que establece las representaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios del invento y los dibujos que las acompañan, donde:

La Figura 1 ilustra una perspectiva de vista superior desarrollada de una tira de test no ensamblada adecuada para su uso en las representaciones que se muestran a modo de ejemplo;

35 La Figura 2 ilustra una vista superior de la tira de test como se ilustra en la Figura 1 tras haberla ensamblado;

La Figura 3 ilustra una vista superior de un marcador de test adecuado para su uso con las representaciones a modo de ejemplo donde el marcador de test esté conectado a la tira de test de la Figura 1;

La Figura 4 ilustra una vista esquemática simplificada del marcador de test de la Figura 3 formando una conexión eléctrica con la tira de test de la Figura 1;

40 La Figura 5 es un gráfico que ilustra la aplicación de una tensión de test aplicada, a partir del marcador de test de la Figura 3, a la tira de test de la Figura 1, para un intervalo de test de t_r para generar una corriente de test que pueda usarse para calcular una concentración de analito de acuerdo con las representaciones a modo de ejemplo;

La Figura 6 es un gráfico que ilustra una corriente de test que es resultado la aplicación de la tensión de texto de la Figura 5 cuando se aplica una muestra de sangre a la tira de test de la Figura 1

45 La Figura 7 es un gráfico que muestra una función de la sensibilidad al contexto derivada empíricamente $a(t)$ que puede usarse para definir la función de corrección $q(t)$ de forma que la función S del error del hematocrito de la Ecuación 11 se minimiza o reduce;

La Figura 8 es un gráfico que muestra una función de sensibilidad de la glucosa derivada empíricamente $b(t)$ que puede usarse para definir la función de corrección $q(t)$ de forma que la función del error del hematocrito S de la Ecuación 11 se minimice o reduzca;

50 La Figura 9 es un gráfico que muestra una función de la sensibilidad al hematocrito derivada empíricamente $c(t)$ que puede usarse para definir la función de corrección $q(t)$ de forma que la función del error del hematocrito S de la Ecuación 11 se minimice o reduzca;

La Figura 10 es un gráfico de una función del error del hematocrito S basada en $a(t)$, $b(t)$, y $c(t)$ para calcular un punto de finalización de un primer intervalo de tiempo predeterminado t_{L1} para una función de corrección $q(t)$ con dos intervalos de tiempo predeterminados;

La Figura 11 es un gráfico que muestra una función de corrección $q(t)$ que tiene dos intervalos de tiempo predeterminados para su uso en la Ecuación 7 para su uso en la eliminación de los efectos de el hematocrito a partir de una curva de corriente de test como la que se muestra en la Figura 6;

60 La Figura 12 es un gráfico que muestra el sesgo promedio de una medición de tira de test a una medición de referencia como función del nivel de hematocrito usando el algoritmo de "corriente final" donde se inspeccionaron varias muestras de sangre con variaciones de concentraciones de glucosa y niveles de hematocrito;

La Figura 13 es un gráfico que muestra el sesgo promedio de una medición de tira de test, usando el algoritmo de la Ecuación 7, a una medición de referencia, como función del nivel de hematocrito, usando dos intervalos de tiempo predeterminados, donde se inspeccionaron varias muestras de sangre con diferentes

concentraciones de glucosa y de niveles de hematocrito, de acuerdo con una de las representaciones de este invento;

La Figura 14 es un gráfico que muestra la función de corrección $q(t)$ que tiene tres intervalos de tiempo predeterminados para su uso en la Ecuación 8 para eliminar los efectos del hematocrito a partir de una curva de corriente de test como la que se muestra en la Figura 6;

La Figura 15 es un gráfico que muestra el sesgo medio de una medición de tira de test, usando el algoritmo de la Ecuación 8, a una medición de referencia como función del nivel del hematocrito, usando tres intervalos temporales predeterminados, en los que se testaron varias muestras de sangre con varias concentraciones de glucosa y niveles de hematocrito de acuerdo con una de las representaciones de este invento;

La Figura 16 es un gráfico de una función de transformación Walsh-Hadamard $f_2(t_v)$, donde hay dos intervalos temporales predeterminados, para su uso en las Ecuaciones 14 y 16, que procesa los valores de la corriente del test para determinar una concentración de glucosa;

La Figura 17 es un gráfico de una función de transformación de Walsh-Hadamard $f_3(t_v)$, donde hay tres intervalos de tiempo predeterminados, para su uso en las Ecuaciones 14 y 15, que procesa los valores de la corriente del test para determinar una concentración de glucosa;

La Figura 18 es un gráfico de una función de transformación de Walsh-Hadamard $f_4(t_v)$, donde hay cuatro intervalos temporales predeterminados, para su uso en las Ecuaciones 14 y 15, que procesa los valores de corriente del test para determinar una concentración de glucosa;

La Figura 19 es un gráfico de una función de transformación de Walsh-Hadamard $f_5(t_v)$, donde hay cinco intervalos de tiempo predeterminados, para su uso en las Ecuaciones 14 y 15, que procesa los valores de corriente del test para determinar una concentración de glucosa;

La Figura 20 es un gráfico de una función de transformación $f_9(t_v)$, donde hay nueve intervalos de tiempo predeterminados, para su uso en las Ecuaciones 14 y 15, que procesa los valores de corriente de test para determinar una concentración de glucosa;

La Figura 21 ilustra una vista de perspectiva superior desarrollada de una tira de test no ensamblada que es una representación del presente invento

La figura 22 es una vista superior simplificada de un ensamblaje parcial de una representación de tira de test que muestra una porción distal de una capa conductiva colocada en un sustrato que tiene una matriz de microelectrodo;

La Figura 23 es una vista superior simplificada de un ensamblaje parcial de otra representación de tira de test que muestra una porción distal de una capa conductiva colocada en un sustrato que tiene una matriz de microelectrodo;

La Figura 24 es una vista de planta superior de la porción de aislamiento de la Figura 22 o la 23 que tiene varias aperturas para exponer varios microelectrodos;

La Figura 25 es un gráfico que ilustra una corriente de test que resulta de la aplicación de una tensión de test limitante cuando se aplica una muestra de sangre a una tira de test, de las Figuras 21 o 22, que tiene una matriz de microelectrodo; y

La Figura 26 es un diagrama de los valores de corriente de test de la Figura 25 donde $\frac{1}{\sqrt{t}}$ está en el eje x y $\frac{I(t)}{I_0}$ está en el eje y para calcular una pendiente para determinar el coeficiente de difusión efectiva D usando la Ecuación 17.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REPRESENTACIONES ILUSTRATIVAS DEL INVENTO

[0029] Aunque varias representaciones del presente invento se adaptan concretamente a la medición de la concentración de glucosa en la sangre, para los expertos en la materia será evidente que los métodos que se describen en este documento podrían adaptarse para disminuir el efecto del hematocrito de otros sistemas usados para la medición electroquímica de analitos. Entre los ejemplos de sistemas que podrían adaptarse para reducir el efecto del hematocrito usando el método de acuerdo con este invento se incluyen sensores electroquímicos usados para medir la concentración de lactato, etanol, colesterol, aminoácidos, colina, hemoglobina y fructosamina en sangre.

[0030] También se entenderá que este invento no se limita a corregir el hematocrito, sino que también puede ser aplicable para corregir otras situaciones donde pueda observarse una viscosidad variable o contenido de oxígeno en las muestras. La sangre puede tener un alto nivel de viscosidad por muchos otros motivos, además del hematocrito alto. Por ejemplo, una temperatura baja (por ejemplo, aproximadamente 10 °C), altas concentraciones de lípidos y/o alta concentración de proteínas también pueden provocar que una muestra de sangre se vuelva más viscosa.

[0031] Las varias representaciones del invento también son aplicables para reducir los efectos provocados por el oxígeno y/o la viscosidad de fluidos fisiológicos distintos de la sangre. Por ejemplo, los fluidos fisiológicos podrían también incluir plasma, suero, fluido intersicial y una combinación de los mismos. Debe tenerse en cuenta que no es raro que las muestras de fluidos intersiciales extraídas se mezclen parcialmente con sangre.

[0032] Las representaciones del presente invento buscan obtener un método para calcular una concentración de glucosa en sangre exacta que tenga un efecto reducido a partir del hematocrito. En una representación de este invento, se aplica una tensión única de test a una tira de test para un intervalo temporal de test. El marcador de test

- 5 mide una pluralidad de valores de corriente de test durante el intervalo temporal de test. Por lo menos, una porción del grupo de valores de corriente de test se procesan matemáticamente usando un algoritmo de las representaciones a modo de ejemplo para reducir los efectos del hematocrito y la salida de una concentración de glucosa exacta. El algoritmo de las representaciones de ejemplo puede ser sencillo de elaborar ya que no necesita un microprocesador rápido. De hecho, el algoritmo de las representaciones de ejemplo podría llevarse a cabo básicamente usando un microprocesador sencillo durante el intervalo temporal del test mientras se miden los valores de corriente del test, en oposición a iniciar el algoritmo tras haber transcurrido el intervalo temporal del test.
- 10 **[0033]** Las siguientes secciones describirán una representación de una tira de test que podrían usarse con el algoritmo propuesto de las representaciones de ejemplo para calcular una concentración de glucosa exacta con una reducción del efecto del hematocrito. La Figura 1 es una vista de perspectiva desarrollada de una tira de test 100 previamente existente, que incluye seis capas colocadas en un sustrato 5. Estas seis capas podrían ser una capa conductiva 50, una capa de aislamiento 16, una capa reactiva 22, una capa adhesiva 60, una capa hidrofílica 70 y una capa superior 80. La tira de test 100 podría fabricarse en una serie de pasos en los que la capa conductiva 50, la capa de aislamiento 16, la capa reactiva 22, la capa adhesiva 60 se depositan secuencialmente en el sustrato 5 usando, por ejemplo, un proceso de impresión serigráfica como el descrito en la Publicación de los EE. UU. Preconcesión nº US 20050096409A1 y las Solicitudes internacionales publicadas nº WO2004040948A1, WO2004040290A1, WO2004040287A1, WO2004040285A1, WO2004040005A1, WO2004039897A2 y WO2004039600A2. En una representación alternativa, podría usarse un proceso de chorro de tinta para depositar la capa reactiva 22 que se describe en la Patente de los EE. UU. Nº 6.179.979. La capa hidrofílica 70 y la capa superior 80 podría distribuirse a partir de una bobina y laminarse sobre el sustrato 5. La tira de test 100 tiene una porción distal 3 y una porción proximal 4 como se ilustra en las Figuras 1 y 2.
- 25 **[0034]** La tira de test completamente ensamblada 100, como se ilustra en la Figura 2, incluye una entrada 90 a través de la cual podría pasarse una muestra de sangre a una cámara de recepción de sangre 92. Una muestra de sangre 94 puede aplicarse a la entrada 90, como se ilustra en la Figura 3, para rellenar una cámara de recepción de muestras 92 de forma que pueda medirse la glucosa. Los extremos laterales de un primer panel adhesivo 24 y un segundo panel adhesivo 26 situado adyacente de la capa reactiva 22 cada uno de ellos definen una pared de la cámara de recepción de la muestra 92. Una porción inferior o "suelo" de la cámara de recepción de muestras 92 incluye la porción del sustrato 5, capa conductiva 50 y capa de aislamiento 16. Una porción superior o "tejado" de la cámara de recepción de muestras 92 incluye la porción hidrofílica distal 32.
- 30 **[0035]** Para la tira de test 100, como se ilustra en la Figura 1, la capa conductiva 50 incluye un electrodo de referencia 10, un primer electrodo de funcionamiento 12, un segundo electrodo de funcionamiento 14, un primer contacto 13, un segundo contacto 15, un contacto de referencia 11, un primer carril del electrodo de trabajo 8, un segundo carril de electrodo de trabajo 9, un carril de electrodo de referencia 7 y una barra de detección de tira 17. La capa conductiva podría ser un carbón impreso como el descrito en la Patente de los EE. UU nº 5.653.918. El primer contacto 13, el segundo contacto 15 y el contacto de referencia 11 podrían adaptarse para conectarse eléctricamente al marcador de test 200. El primer carril de electrodo de trabajo 8 proporciona una vía continua eléctrica a partir del primer electrodo de trabajo 12 al primer contacto 13. De forma similar, el segundo carril de electrodo de trabajo 9 proporciona una vía continua eléctrica a partir del segundo electrodo de trabajo 14 al segundo contacto 15. De forma similar, el carril del electrodo de referencia 7 proporciona una vía continua eléctrica desde el electrodo de referencia 10 al contacto de referencia 11.
- 45 **[0036]** En la Figura 1, la capa de aislamiento 16 incluye la apertura 18 que expone una porción del electrodo de referencia 10, el primer electrodo de trabajo 12 y el segundo electrodo de trabajo 14 que pueden humedecerse por medio de una muestra líquida. A modo de ejemplo, la capa de aislamiento 16 podría ser Erco E6110-116 Jet Black Insulayer™ que podría adquirirse a Ercon, Inc (Waltham, Massachusetts).
- 50 **[0037]** La capa reactiva 22 podría colocarse en una porción de la capa conductiva 50, sustrato 5 y capa de aislamiento 16 de la forma ilustrada en la Figura 1. La capa reactiva 22 podría incluir elementos químicos como una enzima y un mediador que reaccionan selectivamente con glucosa. Un ejemplo de una enzima podría ser oxidasa de glucosa y un ejemplo de un mediador podría ser ferricianida.
- 55 **[0038]** Entre los ejemplos de enzimas adecuadas para su uso con representaciones descritas en este documento podrían incluirse oxidasa de glucosa o dehidrogenasa de glucosa. Más específicamente, la dehidrogenasa de glucosa podría tener un co-factor de quinona de pirrol-quinolina (abreviado como PQQ o podría también designarse por su nombre común, que es metoxatina). Entre los ejemplos de mediadores adecuados para su uso en este invento podrían incluirse la ferricianida o tricloruro de hexamina de rutenio ($[\text{Ru}^{11}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ y también podría denominarse simplemente hexamina de rutenio). Durante las reacciones como las ilustradas en las Ecuaciones 1 y 2, puede generarse una cantidad proporcional de mediador reducido que sea medida electroquímicamente para calcular una concentración de glucosa. Pueden encontrarse ejemplos de formulaciones reactivas o tintas adecuadas para su uso en las representaciones pueden en las Patentes de los EE. UU.
- 60 **[0039]** El capa reactiva 22 podría formarse a partir de una tinta o formulación de enzima que se coloca en una capa conductiva y se seca. Una tinta o formulación de enzima normalmente contiene un líquido, como un tampón,
- 65

para dispersar y/o disolver materiales usados para la detección electroquímica de un analito como glucosa. Los tampones que podrían ser adecuados para la formulación podrían ser el fosfato, citrato y citraconato.

5 **[0040]** Una tinta de enzima que contiene un relleno que tiene tanto dominios hidrofóbicos como hidrofílicos podría colocarse en el electrodo de trabajo usando un proceso de impresión serigráfica. Un ejemplo de relleno podría ser sílice, como por ejemplo Cab-o-Sil TS 610 que está disponible comercialmente en Cabot Inc., Boston, Massachusetts. Normalmente, una pantalla sería en forma de un marco rectangular que fija un grupo de hilos entrelazados. El conjunto de hilos entrelazados forma un grupo de espacios abiertos rectangulares para permitir que la tinta de enzima pase por ellos. La densidad y el tamaño de los espacios abiertos tienen influencia sobre la cantidad de tinta de enzima que queda depositada en la capa conductiva. Las características de los hilos entrelazados que tienen influencia sobre la deposición de la tinta de enzima son el espacio entre los hilos y el diámetro de los hilos. El espacio de los hilos puede darse en un rango de entre 90 hilos por centímetro hasta aproximadamente 120 hilos por centímetro. El diámetro de los hilos podría estar en un rango entre aproximadamente 30 micrones hasta aproximadamente 50 micrones. Más específicamente, en una de las representaciones de este invento, una pantalla adecuada para impresión serigráfica de una tinta de enzima que tiene hexamina de rutenio y oxidasa de glucosa podría tener un espacio de aproximadamente 120 hilos por centímetro y un diámetro de hilos de aproximadamente 34 micrones.

20 **[0041]** Para las tiras de test 100, la capa adhesiva 60 incluye el primer panel adhesivo 24, segundo panel adhesivo 26 y tercer panel adhesivo 28 como se ilustra en la Figura 1. La capa adhesiva 60 podría incluir un adhesivo sensible a la presión de copolímero acrílico de base de agua que está disponible comercialmente en Tape Specialties LTD, ubicado en Tring, Herts, Reino Unido (nº de pieza A6435). La capa adhesiva 60 se coloca en una porción de la capa de aislamiento 16, la capa conductiva 50 y el sustrato 5. La capa adhesiva 60 une la capa hidrofílica 70 a la tira de test 100.

25 **[0042]** La capa hidrofílica 70 incluye una porción hidrofílica distal 32 y una porción hidrofílica proximal 34. La capa hidrofílica 70 podría ser un poliéster que tenga una superficie hidrofílica como una capa antiniebla disponible comercialmente en 3M.

30 **[0043]** Para la tira de test 100, la capa superior 80 incluye una porción clara 36 y una porción opaca 38 como se ilustra en la Figura 1. La capa superior 80 se coloca en y se adhiere a la capa hidrofílica 70. La capa superior 80 podría ser un poliéster. Debe tenerse en cuenta que la porción clara 36 básicamente se superpone a la porción hidrofílica distal 32 que permite que un usuario confirme visualmente que la cámara de recepción de muestras 92 esté lo suficientemente llena. La porción opaca 39 ayuda al usuario a observar un alto grado de contraste entre un fluido de color como, por ejemplo, sangre dentro de la cámara de recepción de muestras 92 y la porción opaca 38 de la capa superior 80.

40 **[0044]** La Figura 3 ilustra un marcador de test 200 adecuado para conectar a la tira de test 100. El marcador de test 200 incluye una pantalla de visualización 202, una carcasa 204, un conjunto de botones de interfaz del usuario y un puerto conector de la tira 208. El marcador de test 200 también incluye circuitos electrónicos en el interior de la carcasa 203 como una memoria 210, un microprocesador 212, componentes electrónicos para aplicar una tensión de test y también para medir un grupo de valores de corriente de test (véase 104 y 106 en la Figura 4). La porción proximal 4 de la tira de test 100 podría insertarse en el conector del puerto de la tira 208. El visualizador 202 podría mostrar una concentración de glucosa y también podría usarse para mostrar una interfaz de usuario para indicar al usuario cómo llevar a cabo el test. El conjunto de botones de interfaz 206 permite que un usuario opere el marcador de test 200 navegando a través del software de la interfaz de usuario.

50 **[0045]** La Figura 4 muestra un esquema simplificado del marcador de test 200 que interactúa con la tira de test 100. El marcador de test 200 incluye un primer conector 103, segundo conector 102, y un conector de referencia 101 que forman respectivamente una conexión eléctrica al primer contacto 13, segundo contacto 15 y contacto de referencia 11. Los tres conectores anteriormente mencionados son parte de un conector de puerto de tira 208. Cuando se lleva a cabo un test, una primera fuente de tensión de test 104 aplica una primera tensión V_1 entre el primer electrodo de trabajo 12 y el electrodo de referencia 10. Como resultado de la primera tensión de test V_1 , el marcador de test 200 podría medir una primera corriente de test I_1 . De forma similar, la segunda fuente de tensión del test 106 aplica una segunda tensión del test V_2 entre el segundo electrodo de trabajo 14 y el electrodo de referencia 10. Como resultado de la segunda tensión de test V_2 , el marcador de test 200 podría a continuación medir una segunda corriente de test I_2 . En una de las representaciones de este invento, la primera tensión de test V_1 y la segunda tensión de test V_2 podría ser aproximadamente igual a permitir que se lleve a cabo dos veces una medición de glucosa, donde la primera medición se lleva a cabo con el primer electrodo de trabajo 12 y una segunda medición se lleva a cabo con el segundo electrodo de trabajo 14. El uso de dos mediciones de glucosa puede aumentar la exactitud usando la media de los dos resultados. Para simplificar la descripción de las siguientes secciones, los algoritmos para determinar una concentración precisa de glucosa se describirán para solo un electrodo de trabajo y electrodo de referencia. Para un experto en estas técnicas será obvio que el invento no se limita a un electrodo de funcionamiento y electrodo de referencia, sino que también se pueden aplicar múltiples electrodos en funcionamiento a las representaciones a modo de ejemplo.

[0046] La Figura 5 es un gráfico que muestra una tensión de test que podría aplicarse por un marcador de test 200 a una tira de test 100 para un intervalo temporal de test t_T , que comienza cuando la tira de test 100 detecta fluido fisiológico. En la Figura 5, la tensión del test que se muestra es 400 mV. Como se ilustra en la Figura 5, antes de que se aplique el fluido fisiológico, el marcador de test 200 está en un modo de detección de fluido en el que la tensión de detección de fluido podría ser de 400 mV. Para alguien que conozca estas técnicas será obvio que la tensión de test y la tensión de detección de fluido podrían ser diferentes. En la Figura 5, el marcador de test está en un modo de detección de fluido durante el intervalo temporal de detección t_{FD} antes de la detección del fluido fisiológico en el tiempo T_0 . En el modo de detección de fluido, el marcador de test 200 determina cuándo se aplica un fluido a la entrada 90 y se arrastra a la cámara de recepción de muestras 92 de forma que el fluido empape tanto el primer electrodo de trabajo 12 como el electrodo de referencia 10. Es necesario tener en cuenta que el primer electrodo de trabajo 12 y el electrodo de referencia se cortocircuitan en efecto cuando el fluido fisiológico cubre contiguamente tanto el primer electrodo de trabajo 12 como el electrodo de referencia 10. Una vez que el marcador de test 200 haya reconocido que el fluido fisiológico se haya aplicado por causa de, por ejemplo, un aumento suficiente en la corriente de test medida, el marcador de test 200 asigna un segundo marcador cero en el momento de t_0 e inicia el intervalo temporal del test t_T . Por ejemplo, como se muestra en la Figura 5, el intervalo temporal de test t_T podría ser de aproximadamente 5,4 segundos. Al finalizar el intervalo temporal del test t_T , se retira la tensión del test.

[0047] En general, es deseable usar una tensión de test que es más positiva que una tensión redox del mediador usado en la tira de test. En concreto, la tensión de test debería superar la tensión redox en una cantidad suficiente para permitir que la corriente de test resultante no dependa de pequeñas variaciones en la tensión del test. Hay que tener en cuenta que una tensión redox describe una afinidad intrínseca del mediador para aceptar o donar electrones cuando estén lo suficientemente cerca del electrodo que tenga una tensión nominal. Cuando una tensión de test es suficientemente positiva a respecto de la tensión de redox del mediador, el mediador se oxidará rápidamente. De hecho, el mediador se oxidará tan rápidamente a una tensión de test lo suficientemente positiva (por ejemplo, tensión de test limitante) como para que la magnitud de la corriente de test se vea limitada por la difusión del mediador a la superficie del electrodo (por ejemplo, corriente de test limitante). Para una representación en la que el primer electrodo de trabajo 12 sea una tinta de carbono y el mediador sea ferricianida, una tensión de test de aproximadamente +400 mV podría ser suficiente para actuar como tensión de test limitante. Para una representación donde el primer electrodo de trabajo 12 sea una tinta de carbono y el mediador sea $\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6$, una tensión de test de aproximadamente +250 mV podría ser suficiente para actuar como tensión de test limitante. Alguien que conozca estas técnicas entenderá fácilmente que otras combinaciones de material mediador y electrodo necesitarán diferentes tensiones de test limitantes.

[0048] Un marcador de test que está designado para aplicar una tensión de test limitante puede tener alguna variación en la tensión de test aplicada sin afectar a la magnitud de la corriente de test limitante. Es deseable que un marcador de test aplique una tensión de test limitante porque el marcador de test puede fabricarse con componentes electrónicos relativamente baratos porque no es necesario controlar estrictamente la tensión de test. En resumen, un marcador de test que aplique una tensión de test limitante puede medir sólidamente una concentración de glucosa de forma exacta y precisa usando componentes de bajo coste.

[0049] La Figura 6 es un gráfico que muestra la corriente de test generada por la tira de test 100 durante el intervalo temporal de test t_T . En general, la corriente de test aumenta rápidamente cuando la tira de test 100 se empapa inicialmente con el fluido fisiológico y a continuación forma un pico en el momento de pico máximo t_p . Tras el pico máximo, la corriente de test disminuye gradualmente. Como se ha indicado antes, la magnitud global de las corrientes de test disminuirá con el aumento de los niveles de hematocrito. Además, la magnitud global de las corrientes de test aumentará con el aumento de la concentración de glucosa. El momento de pico máximo t_p se espera que aumente con el aumento de los niveles de hematocrito, provocando que la forma global de la corriente de test como función de tiempo cambie por el nivel de hematocrito. En resumen, tanto la concentración de glucosa como el nivel de hematocrito tendrán efecto sobre la magnitud de las corrientes de test y la forma de la curva de la corriente de test durante el intervalo temporal del test haciendo que sea difícil medir la concentración de glucosa de forma exacta de forma independiente del hematocrito.

[0050] Para ayudar a definir un nuevo algoritmo que usa una proporción mayor de la corriente de test medida, se desarrolló un modelo de ecuación para predecir los valores de corriente de test medidos a partir de una tira de test. Uno de los objetivos de crear el modelo de ecuación fue para definir las variables de entrada que afectan a la magnitud de la corriente de test y la relación matemática entre las variables de entrada. En una representación del modelo de ecuación, dichas variables de entrada podrían incluir el hematocrito h , la concentración de glucosa G , y el tiempo t . Definiendo matemáticamente el efecto del hematocrito en la magnitud de la corriente de test, es posible adaptar una función de corrección para retirar el efecto del hematocrito.

[0051] Para desarrollar el modelo de ecuación para un tipo concreto de tira de test (por ejemplo, tira de test 100 de la forma ilustrada en las Figuras 1 y 2), podría llevarse a cabo un experimento usando varios lotes de tiras de test y muestras de test de sangre. Una tira de test es un conjunto de tiras que proporcionan corrientes de test que tienen básicamente la misma magnitud y forma cuando se inspeccionan con múltiples muestras de sangre que tengan la misma concentración de glucosa y nivel de hematocrito. Normalmente, las tiras de test realizadas durante una única serie o día se segregarán en un único lote.

[0052] Las muestras de sangre que se usan para llevar a cabo los test antes descritos podrían tener un nivel de hematocrito en un rango de, por ejemplo, aproximadamente 20 % hasta aproximadamente 70 % y una concentración de glucosa en plasma entre, por ejemplo, de aproximadamente 40 mg/dL hasta aproximadamente 730 mg/dL. Para que una muestra de sangre tenga una concentración de glucosa y un nivel de hematocrito concretos, podrían testarse múltiples tiras de test a partir del mismo lote y grabarse los resultados. A modo de ejemplo, podrían testarse ocho tiras de test de cada lote usando sangre que tenga una concentración de glucosa y un nivel de hematocrito pre-determinados. El test podría entonces repetirse para varias muestras de sangre más que tengan varias concentraciones de glucosa y niveles de hematocrito.

[0053] Tras recoger las curvas de corriente de test reales para varios lotes de tiras de test que se testaron con varias muestras de sangre, podría desarrollarse un modelo de ecuación para predecir la magnitud de una curva de corriente de test media basada en una concentración de glucosa y un nivel de hematocrito concretos con un tipo concreto de tira de test (por ejemplo, tira de test 100 de la Figura 1). Por ejemplo, la Ecuación 4 muestra un modelo de ecuación para predecir el valor de la corriente de test I como función del hematocrito h , glucosa G , y tiempo t para un tipo concreto de tira de test. Una ecuación como, por ejemplo, la Ecuación 4 podría derivarse empíricamente de los valores de corriente de test previamente medidos recogidos para varios lotes de tiras de test que se testaron con varias variaciones de concentración de glucosa y de niveles de hematocrito.

$$I(h, G, t) = [1 - c(t)h][a(t) + b(t)G] \quad \text{Eq. 4}$$

[0054] El término $I(h, G, t)$ es el valor de corriente de test estimado en unidades de microamperios; h es el nivel de hematocrito en unidades de una fracción; G es la concentración de glucosa en unidades de mg/dL; t es el tiempo en unidades de segundo; $c(t)$ es la sensibilidad del hematocrito como función de tiempo; $a(t)$ es la sensibilidad al medio como función de tiempo; y $b(t)$ es la sensibilidad a la glucosa como función de tiempo.

[0055] Una vez que se ha seleccionado un formato de modelo de ecuación, el modelo de ecuación podría optimizarse para predecir de forma efectiva las corrientes de test medidas para un tipo concreto de tira de test. Por ejemplo, en la Ecuación 4, las tres funciones $a(t)$, $b(t)$ y $c(t)$ podrían derivarse usando los datos anteriormente descritos donde los valores de la tira de test real a partir de varios lotes de tiras de test se testaron con varias muestras de sangre con varias concentraciones de glucosa y niveles de glucosa conocidos. Las tres funciones ($a(t)$, $b(t)$ y $c(t)$) podrían cada una de ellas definirse como una serie de valores de mejor ajuste usando regresión no lineal para cada uno de los puntos temporales del test individual, como se muestra en las Figuras de la 7 a la 9.

[0056] Tras definir los valores de mejores ajustes para las tres funciones $a(t)$, $b(t)$ y $c(t)$ usando un grupo concreto de lotes de tiras de test, la Ecuación 4 podría entonces comprobarse testando un grupo diferente de lotes de tiras de test usando varias muestras de sangre que tengan concentraciones de glucosa y niveles de hematocrito conocidos tal y como se ha descrito. Por ejemplo, los valores de corriente de test medidos para el diferente grupo de lotes de tiras de test podría demostrarse que básicamente concuerdan con los valores estimados de corriente de test que usan la Ecuación 4.

[0057] Un modelo de ecuación (Ecuación 4) podría estimar la respuesta media a la corriente de test para un tipo concreto de tira de test cuando se conocen el nivel de hematocrito, la concentración de glucosa y el tiempo. Debido a que el modelo de ecuación podría no estimar la respuesta a la corriente de test en una forma lo suficientemente exacta durante el intervalo temporal de test completo t_T , una porción del intervalo temporal del test t_i podría definirse en el que el modelo de ecuación sea lo suficientemente exacto. Por ejemplo, el modelo de ecuación podría estimar la corriente de test dentro de aproximadamente un 80 % o más de la corriente de test medida durante un intervalo de tiempo entre aproximadamente 0,1 segundos y 5 segundos. Así, en un escenario como ese, los valores de corriente de test estimados, usando la Ecuación 4, deberían calcularse únicamente para tiempos de test entre aproximadamente 0,1 segundos cuando se desarrolle un algoritmo para eliminar los efectos del hematocrito. Por motivos obvios, si la Ecuación 4 no puede estimar de forma exacta la magnitud de los valores de corriente de test para un intervalo temporal concreto, entonces no tendría sentido usar corrientes de test en ese intervalo temporal para eliminar los efectos del hematocrito. Para desarrollar un algoritmo eficaz para reducir los efectos del hematocrito, es deseable que la ecuación modelo estime la respuesta a la corriente de test de forma lo suficientemente exacta en prácticamente todo el intervalo temporal del test t_T .

[0058] Una vez se han modificado matemáticamente los valores de corriente de test de forma que cuenten la contribución del hematocrito como función de tiempo (véase $c(t)$), ahora es posible determinar empíricamente una función de corrección $q(t)$ que podría eliminar o atenuar la contribución del hematocrito. Así, la corriente de test estimada $I(h, G, t)$ podría multiplicarse por una función de corrección $q(t)$ para eliminar los efectos del hematocrito. En una de las representaciones de este invento, la Ecuación 5 muestra que la función de corrección $q(t)$ podría multiplicarse por una función de corriente de test $I(h, G, t)$ para proporcionar una función de correlación de analito $y(t)$.

$$y(t) = I(h, G, t)q(t) \quad \text{Eq. 5}$$

[0059] Véase que el cálculo de la función de correlación del analito $y(t)$ es un paso intermedio usado para el cálculo del valor de correlación del analito (Y) como se muestra en la Ecuación 6. La función de correlación del analito $y(t)$ podría integrarse durante un intervalo predeterminado en el que la ecuación modelo es capaz de estimar los valores de corriente de test de forma exacta. Por ejemplo, el intervalo de tiempo predeterminado podría estar entre aproximadamente 0,1 segundo y aproximadamente 5 segundos para producir un valor de corrección de analito (Y) como se muestra en la ecuación 6.

$$Y = \int y(t)dt = \int I(t)q(t)dt \quad \text{Eq. 6}$$

[0060] El valor de correlación del analito (Y) es un número proporcional a una concentración exacta de glucosa con un efecto del hematocrito reducido. Por ejemplo, una concentración de glucosa podría calcularse restando un valor del medio a partir del valor de correlación del analito (Y) y a continuación dividiéndolo por una curva de calibración. Las siguientes secciones en primer lugar describirán la función de corrección $q(t)$ en más detalle y a continuación describirán una función de error del hematocrito S y su uso para definir los términos pertenecientes a la función de corrección $q(t)$.

[0061] En una de las representaciones de este invento, $q(t)$ podría estar en forma de una función de paso que tenga una amplitud de +1 o -1. En otra representación de este invento, $q(t)$ podría estar en forma de una función de paso que tenga una amplitud de +1, 0 o -1. Por ejemplo, $q(t)$ podría ser +1 durante un primer intervalo predeterminado de tiempo y -1 durante un segundo intervalo predeterminado de tiempo (véase la Figura 11). También es posible que $q(t)$ sea -1 por un primer intervalo de tiempo predeterminado y +1 durante un segundo intervalo predeterminado de tiempo. Además, también es posible que un tercer intervalo predeterminado de tiempo o más intervalos predeterminados de tiempo se puedan usar para definir $q(t)$ (por ejemplo, un cuarto, quinto, sexto, etc). Este invento no debería limitarse únicamente a +1, 0 o -1 en el sentido de que debería ser obvio para un experto en estas técnicas que también se podrían usar otras amplitudes, escaladas a los valores adecuados. De todas formas, usar solo +1, 0 o -1 tiene una ventaja porque simplifica la cantidad de potencia del microprocesador que se necesita para llevar a cabo el cálculo. Si el coste de la potencia del microprocesador no fuese un problema o si hubiese una fuente de potencia del microprocesador de fácil acceso, podrían usarse valores distintos de +1, 0 o -1.

[0062] En una de las representaciones de este invento, el valor de correlación del analito (Y) podría definirse por la Ecuación 7, que usa dos intervalos temporales predeterminados:

$$Y = \sum_{t=t_{F1}}^{t_{L1}} I(h, G, t)q(t) + \sum_{t=t_{F2}}^{t_{L2}} I(h, G, t)q(t) \quad \text{Eq. 7}$$

Donde t_{F1} es un punto de inicio para un primer intervalo de tiempo predeterminado; t_{L1} es un punto final de un primer intervalo predeterminado de tiempo; t_{F2} es un punto de inicio de un segundo intervalo de tiempo predeterminado; t_{L2} es un punto de fin de un segundo intervalo de tiempo predeterminado; y $q(t)$ es una función de corrección, donde en una representación del invento, la función de corrección es +1 entre el punto de inicio t_{F1} y el punto de fin t_{L1} para el primer intervalo de tiempo predeterminado, y -1 entre el punto de inicio t_{F2} y el punto de fin t_{L2} para el segundo intervalo de tiempo predeterminado.

[0063] En otra representación de este invento, el valor de correlación del analito (Y) podría definirse por la Ecuación 8, que usa tres intervalos de tiempo predeterminados

$$Y = \sum_{t=t_{F1}}^{t_{L1}} I(h, G, t)q(t) + \sum_{t=t_{F2}}^{t_{L2}} I(h, G, t)q(t) + \sum_{t=t_{F3}}^{t_{L3}} I(h, G, t)q(t) \quad \text{Eq. 8}$$

[0064] La Ecuación 8 es similar a la Ecuación 7 excepto porque hay un tercer intervalo de tiempo predeterminado donde t_{F3} es un punto de inicio de un tercer intervalo de tiempo predeterminado; t_{L3} es un punto de fin de un tercer intervalo de tiempo predeterminado; y $q(t)$ es una función de corrección, donde en una representación del invento la función de corrección es +1 entre el punto de inicio t_{F1} y el punto de fin t_{L1} durante el primer intervalo de tiempo predeterminado, -1 entre el punto de inicio t_{F2} y el punto de fin t_{L2} durante el segundo intervalo de tiempo predeterminado, y +1 entre el punto de inicio t_{F3} y el punto de fin t_{L3} durante el tercer intervalo de tiempo predeterminado (véase la Figura 14). Los puntos de inicio y de fin del primer, segundo y tercer intervalo de tiempo predeterminado (t_{F1} , t_{L1} , t_{F2} , t_{F3} y t_{L3}) y la función de corrección $q(t)$ se determinan y optimizan de forma que el valor de corrección del analito tenga (Y) entre poca y ninguna dependencia del nivel de hematocrito en sangre.

[0065] Es importante resaltar que las representaciones a modo de ejemplo como las descritas en la Ecuaciones 7 y 8 también incluyen funciones equivalentes matemáticamente que llevan a cabo prácticamente los mismos pasos. Para la representación en la que la función de corrección $q(t)$ es solo +1 o -1, el microprocesador puede llevar a cabo un paso de adición donde $q(t)$ sea +1 o un paso de sustracción donde $q(t)$ sea -1. Al llevar a cabo solo adición o sustracción, en oposición a la multiplicación, el microprocesador no necesita el aumento de la funcionalidad necesario para llevar a cabo una operación de coma flotante.

5 [0066] Una representación equivalente matemáticamente de este invento, que es un método, puede aplicarse a las Ecuaciones 7 y 8. La representación se aplica a la Ecuación 7 para determinar una concentración de analito podría incluir la aplicación de una tensión de test entre un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia. El marcador de test podría medir un conjunto de corrientes de test donde se aplique sangre que contenga glucosa a la tira de test. Una primera porción del conjunto de corrientes de test podría añadirse durante un primer intervalo de tiempo predeterminado para formar un primer total. A continuación, cada uno de los valores de la corriente de test dentro de una segunda porción podría restarse del primer total para formar un segundo total. Una concentración de glucosa con un efecto reducido de hematocrito podría ahora calcularse en base al segundo total.

10 [0067] Otra representación equivalente matemáticamente, que es un método, para llevar a cabo la función de las Ecuaciones 7 y 8 usa la ley distributiva de las matemáticas que establece que el número de un producto y la suma de otros dos números (por ejemplo, $A \times (B+C)$) es igual que la suma de los productos del número y cada uno de los sumandos originales (por ejemplo, $(A \times B) + (A \times C)$). En una de las representaciones de este invento, un método para determinar una concentración de analito incluye aplicar una tensión de test entre un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia. El marcador de test podría medir un conjunto de valores de corriente de test cuando se aplique una muestra de sangre que contenga glucosa a una tira de test. Puede calcularse un primer total de las corrientes de test en un primer intervalo de tiempo predeterminado. A continuación, el primer total se multiplica por un primer factor de corrección. Un segundo total de las corrientes de test puede calcularse durante un segundo intervalo de tiempo predeterminado. A continuación, el segundo total se multiplica por un segundo factor de corrección. El primer total y el segundo total podrían sumarse para formar un agregado. El agregado podría entonces correlacionarse a la concentración de analito. En esta representación del invento, el primer y segundo factor de corrección no tienen necesariamente que ser iguales a +1 o -1.

25 [0068] En una representación de este invento, es necesario calcular un número de intervalos de tiempo predeterminados y una duración para cada uno de los intervalos de tiempo predeterminados para definir la función de corrección $q(t)$. Para simplificar, sería deseable usar el número mínimo de intervalos de tiempo predeterminados para conseguir un algoritmo que produce una concentración de glucosa suficientemente exacta usando una tira de test. En una representación, podría asumirse inicialmente que el número de intervalos temporales predeterminados se establece en dos y entonces la duración de los intervalos de tiempo predeterminados podría cambiarse sistemáticamente hasta que se pueda producir un conjunto globalmente exacto de concentraciones de glucosa. La función de corrección $q(t)$ podría optimizarse para proporcionar concentraciones de glucosa exactas determinando el sesgo global de la concentración de glucosa comparando el % de sesgo entre la concentración de glucosa encontrada en una tira de test y el método de referencia. Si dos intervalos de tiempo predeterminados no se demuestra que hacen el algoritmo lo suficientemente exacto, a continuación podrían añadirse más intervalos de tiempo predeterminados a la función de corrección $q(t)$.

40 [0069] Las secciones previas han descrito posibles representaciones de la función de corrección $q(t)$. De todas formas, una función de corrección $q(t)$ podría necesitar ser optimizada de forma que se reduzcan los efectos del hematocrito. Por ejemplo, la función de corrección $q(t)$ de la Ecuación 7 necesita que los términos t_{F1} , t_{L1} , t_{F2} y t_{L2} que están incluidos dentro de la función de corrección $q(t)$, se defina de forma que se reduzcan los efectos del hematocrito. A continuación se describirá un proceso para derivar una función de error del hematocrito S basado en la ecuación modelo (Ecuación 4) para ayudar a definir los términos incluidos en la función de corrección $q(t)$.

45 [0070] Como primera parte del proceso para derivar una función de error del hematocrito S , las Ecuaciones 4 y 6 podrían combinarse para formar la Ecuación 9.

$$Y = \int y(t)dt = \int [1 - c(t)h] [a(t) + b(t)G] q(t)dt \quad \text{Eq. 9}$$

50 [0071] En segundo lugar, la Ecuación 9 podría reorganizarse para obtener la Ecuación 10 como se ilustra a continuación.

$$Y = \int a(t)q(t)dt - h \int a(t)c(t)q(t)dt + G \int b(t)q(t)dt - hG \int b(t)c(t)q(t)dt \quad \text{Eq. 10}$$

55 [0072] Debe tenerse en cuenta que solo la segunda y la cuarta integral de la Ecuación 10 tienen un término de hematocrito. Así, como tercera parte de este proceso, la función de error del hematocrito S incorpora la segunda y cuarta integral que podrían minimizarse para llegar aproximadamente a cero o el valor más pequeño posible, como se muestra en la Ecuación 11, para reducir los efectos del hematocrito. La Ecuación 11 podría entonces usarse para determinar la función de corrección $q(t)$ que reduce los efectos del hematocrito.

60

$$S = \left[\int a(t)c(t)q(t)dt \right] + \left[\int b(t)c(t)q(t)dt \right] \approx 0 \quad \text{Eq. 11}$$

65 [0073] Como se ha descrito antes, las funciones $a(t)$, $b(t)$ y $c(t)$ se determinaron empíricamente usando las corrientes de test medidas a partir de un gran número de tiras de test. Por lo tanto, en base a las tiras de test testadas previamente usadas para definir $a(t)$, $b(t)$ y $c(t)$, la función de corrección $q(t)$ puede definirse en términos del número de intervalos predeterminados de tiempo, y también en relación con los puntos de inicio y de fin de los intervalos de tiempo predeterminados.

[0074] Como primera representación para usar la Ecuación 11, puede asumirse que $q(t)$ tiene dos intervalos temporales predeterminados. Puede llevarse a cabo una minimización de S puede llevarse a cabo variando el punto de fin del primer intervalo predeterminado de tiempo t_{L1} como se ilustra en la Figura 10. Debe tenerse en cuenta que en este caso, el punto de fin de primer intervalo de tiempo predeterminado t_{L1} debería ser de aproximadamente 1,5 segundos.

[0075] La Figura 11 muestra otra representación de la función de corrección $q(t)$ que tiene dos intervalos temporales predeterminados. Para minimizar la función del error del hematocrito S , el primer intervalo predeterminado de tiempo se determinó que tendría un punto de inicio t_{F1} a aproximadamente 0,1 segundos y un punto de fin t_{L1} a aproximadamente 1,5 segundos; y el segundo intervalo de tiempo predeterminado tendría un punto de inicio t_{F2} a aproximadamente 5 segundos. Como se ilustra en la Figura 11, la función de corrección es +1 para el primer intervalo de tiempo predeterminado y -1 para el segundo intervalo de tiempo predeterminado.

[0076] A continuación se describe un método en el que se evalúa la exactitud de un algoritmo como por ejemplo, para reducir los efectos del hematocrito. Se testaron varias tiras de test 100 con marcador de test 200 usando la tensión de test como se ilustra en la Figura 5. Para cada tira de test 100, se midió una corriente de test durante el intervalo temporal de test t_T y se guardó en una porción de memoria del marcador de test 200. Las muestras de sangre testadas tenían un nivel de hematocrito en un rango de entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 70 % y una concentración de glucosa en un rango entre aproximadamente 40 mg/dL y 750 mg/dL. Las corrientes de test transitorias se procesaron a continuación usando un algoritmo para convertir los valores de test transitorios a una concentración de glucosa.

[0077] Puede usarse un sesgo a un método de referencia para comparar el algoritmo usando el valor de "corriente final" o la función de corrección $q(t)$. Los valores de "corriente final" y los valores de correlación de analito (Y) pueden convertirse a una concentración de glucosa usando una curva simple e interceptar valores que se asignan al lote de la tira de test. Las concentraciones de glucosa resultantes pueden a continuación compararse con un método de referencia para calcular un sesgo.

[0078] La exactitud de una medición de concentración de glucosa llevada a cabo con una tira de test podría evaluarse con un % de sesgo a respecto de una concentración medida con un instrumento de referencia estándar de laboratorio (por ejemplo, el analizador de glucosa de Yellow Springs). La Ecuación 12 muestra cómo se puede determinar un % de sesgo.

$$\% \text{ de sesgo} = \left[\frac{[G]_{ts} - [G]_{ref}}{[G]_{ref}} \right] \times 100 \quad \text{Eq. 12}$$

[0079] El término $[G]_{ts}$ es la concentración de glucosa medida con una tira de test y $[G]_{ref}$ es la concentración de glucosa medida con un instrumento de referencia de laboratorio estándar. Cuando se inspeccione un número lo suficientemente grande de tiras de test, podría considerarse que un sistema es "exacto" si tiene una medición mayor o igual al 95 % de la tira de test en un rango preferible de aproximadamente +/- 20 % de sesgo a respecto del valor de medición de referencia, más preferiblemente el rango sería de un sesgo de aproximadamente +/- 10 % a respecto del valor de medición de referencia y todavía más preferiblemente el rango sería de un sesgo de aproximadamente +/- 5 % a respecto del valor de medición de referencia. En base a los datos usados en las Figuras 12, 13 y 15, se encontró que la variación en los sesgos aumenta con el aumento de la concentración de glucosa (datos no mostrados). Por lo tanto, se usó un enfoque de unidad mixta para evaluar la exactitud. Por ejemplo, se evaluaron las concentraciones de menos o igual a 100 mg/dL como sesgo absoluto, como se ilustra en la Ecuación 13, y concentraciones de glucosa mayores de 100 mg/dL se evaluaron como % de sesgo, como se ilustra en la Ecuación 12.

$$\text{sesgo absoluto} = [G]_{ts} - [G]_{ref} \quad \text{Eq. 13}$$

[0080] La Figura 12 muestra el sesgo global al método de referencia, como función del hematocrito, cuando se use el algoritmo de "corriente final". En la Figura 12, los sesgos de tira de test inspeccionados en un rango de concentraciones de glucosa se promediaron conjuntamente para un nivel de hematocrito concreto. La Figura 12 muestra que hay una dependencia lineal sustancial del hematocrito donde el sesgo se va haciendo cada vez más negativo al aumentar el hematocrito. En la Figura 12, el sesgo está en un rango de entre +15 % al 20 % de hematocrito hasta aproximadamente -30 % al 70 del hematocrito. La figura 13 muestra el sesgo global a respecto del método de referencia como función del hematocrito cuando se use la función de corrección $q(t)$ que tiene dos intervalos de tiempo predeterminados. Aunque el sesgo de la Figura 13 sigue mostrando una dependencia del nivel de hematocrito, es sustancialmente menor que la dependencia del hematocrito ilustrada en la Figura 12. En la Figura 13, el sesgo está en un rango de aproximadamente +15 % a aproximadamente un 20 % del hematocrito hasta aproximadamente -20 % a un 70 % del hematocrito. Así, el uso de la función de corrección $q(t)$ ilustrado en la Figura 11 es una mejora a respecto del algoritmo de "corriente final" de las técnicas anteriores.

[0081] En una de las representaciones de este invento, la función de corrección $q(t)$ puede adaptarse para que tenga tres intervalos de tiempo predeterminados en lugar de solo un intervalo de tiempo predeterminado para mejorar más la corrección del hematocrito. La Figura 14 muestra una representación a modo de ejemplo de la función de corrección $q(t)$ que tiene tres intervalos de tiempo predeterminados. La duración de cada uno de los tres intervalos de tiempo predeterminados se mejoró para minimizar el efecto global del hematocrito. Para minimizar la función de error del hematocrito S (véase la Ecuación 11), se determinó que el primer intervalo predeterminado de tiempo tuviese un primer punto de inicio t_{F1} a aproximadamente 0,1 segundos y un punto de fin t_{L1} a aproximadamente 1 segundo; se determinó que el segundo intervalo de tiempo predeterminado tendría un punto de inicio t_{F2} a aproximadamente 1 segundo y un punto de fin t_{L2} a aproximadamente 3,6 segundos; y se determinó que el tercer intervalo de tiempo predeterminado tendría un punto de inicio t_{F3} a aproximadamente 3,6 segundos y un punto de fin t_{L3} a aproximadamente 5 segundos. Como se ilustra en la Figura 14, la función de corrección es -1 para el primer intervalo de tiempo predeterminado, +1 para el segundo intervalo de tiempo predeterminado y -1 para el tercer intervalo de tiempo predeterminado.

[0082] La Figura 15 muestra el sesgo global a respecto del método de referencia como función del hematocrito cuando se use la función de corrección $q(t)$ que tiene tres intervalos de tiempo predeterminados. Como se puede ver en la Figura 15, el sesgo se encuentra en un rango de aproximadamente +7 % a aproximadamente -13 % sobre el rango de niveles de hematocrito inspeccionados. Así, la función de corrección $q(t)$, como se ilustra en la Figura 14, usando tres intervalos de tiempo predeterminados es una mejora a respecto de la función de corrección $q(t)$, como se ilustra en la Figura 13 que usa dos intervalos predeterminados de tiempo.

[0083] Para alguien experto en estas técnicas sería evidente que se pueden usar más de tres intervalos de tiempo predeterminado en la función de corrección $q(t)$ para reducir el efecto del hematocrito. De todas formas, existen una posibilidad de sobre corregir la corriente de test y hacer el algoritmo menos exacto si se implementan demasiados intervalos de tiempo predeterminados.

[0084] En una representación alternativa de este invento, la función de corrección $q(t)$ puede producirse en forma de una función de transformación Walsh-Hadamard (WHT). Una función WHT puede ser una onda cuadrada que tenga una frecuencia predeterminada y una amplitud predeterminada. Por ejemplo, la función de corrección $q(t)$ de la Ecuación 7 puede darse en forma de una función WHT $f_2(t)$ si el primer intervalo de tiempo predeterminado fuese igual al segundo intervalo de tiempo predeterminado como se ilustra en la Figura 16. El subíndice 2 representa el número de intervalos de tiempo predeterminados. Para una función WHT $f_2(t)$, la duración del primer intervalo de tiempo predeterminado debe ser aproximadamente igual a la duración del segundo intervalo de tiempo predeterminado.

[0085] En otro ejemplo, la función de corrección $q(t)$ de la Ecuación 8 podría darse en la forma de una función WHT $f_3(t)$ si la suma de la duración del primer intervalo predeterminado de tiempo y el tercer intervalo predeterminado de tiempo fuese igual a la duración del segundo intervalo de tiempo predeterminado como se ilustra en la Figura 17. En otras palabras, la duración del primer intervalo de tiempo predeterminado debe ser igual a la duración del tercer intervalo de tiempo predeterminado; y la duración del segundo intervalo de tiempo predeterminado debe ser igual a dos veces la duración del primer o el tercer intervalo de tiempo predeterminado.

[0086] Un valor medio de WHT C_x podría calcularse para determinar una concentración de glucosa como se ilustra en la Ecuación 14.

$$C_x = \frac{1}{z} \sum_{v=1}^z I(h, G, t_v) f_x(t_v) \quad \text{Eq. 14}$$

[0087] El valor medio de WHT C_x se calcula a partir de una función WHT $f_x(t_v)$ que tiene x intervalos de tiempo predeterminados. El término t_v representa un incremento temporal en el que se calcula la magnitud de una corriente de test. El término z representa el número total de incrementos temporales que se usan para calcular el valor medio de WHT. Las Figuras entre la 16 y la 20 son ejemplos de funciones WHT en las que el número de intervalos de tiempo predeterminados son 2, 3, 4, 5 o 9.

[0088] En una representación de este invento, puede usarse un conjunto de valores medios WHT C_x puede usarse para calcular una concentración de glucosa $[G]_s$ como se muestra en la Ecuación 15 con un efecto reducido del hematocrito.

$$[G]_s = \beta_0 + \sum_{x=1}^d \beta_x C_x \quad \text{Eq. 15}$$

[0089] El término β_0 es un término de calibración del medio y β_x es otro término de calibración que permite que se use un factor de peso para adaptar varios valores medios de WHT C_x para el objeto de reducir los efectos del hematocrito. El término d es el número de las funciones WHT que se usan para calcular la concentración de glucosa.

Un grupo de términos de calibración (β_0 y β_x 's) puede derivarse testando un grupo de muestras de sangre que tienen un rango de concentraciones de glucosa y niveles de hematocrito con un lote concreto de tiras de test. Las corrientes de test medidas con las tiras de test del lote de tiras pueden usarse para determinar el conjunto optimizado de términos de calibración (β_0 y β_x 's) que minimiza el sesgo global a respecto de una medición de glucosa de referencia estandarizada. En resumen, las funciones de WHT proporcionan una herramienta escalable para reducir los efectos del hematocrito usando un número suficiente de valores medios WHT C_x 's y términos de calibración (β_0 y β_x 's).

[0090] En una representación alternativa del invento, el método para determinar una concentración exacta de glucosa con un efecto reducido a partir de hematocritos podría mejorarse también determinando un tiempo de pico máximo t_p para definir la duración del primer intervalo de tiempo predeterminado. En contraste con las representaciones antes descritas, no se fija el primer intervalo de tiempo predeterminado, pero en lugar de eso es adaptativo donde podría cambiar para cada tira de test que se inspecciona.

[0091] Por ejemplo, el marcador de test 200 podría calcular el tiempo de pico máximo t_p para una tira de test que se inspecciona con sangre. En esta representación, la memoria 210 y un microprocesador 212 de la tira de test 200 pueden calcular un tiempo de pico máximo t_p obteniendo el valor de corriente de test mayor magnitud obtenido a partir del intervalo de tiempo t_T . En otra representación, la memoria y el microprocesador del marcador de test 200 puede calcular un tiempo de pico máximo t_p encontrando un máximo local. Tras determinar el tiempo de pico máximo t_p , puede usarse la Ecuación 16 para determinar un punto final del primer intervalo de tiempo predeterminado t_{L1} .

$$t_{L1} = t_p \times \omega \quad \text{Eq. 16}$$

[0092] El término ω es otro término de calibración que puede usarse para calibrar un lote concreto de tiras e test. En una representación de este invento ω podría ser menos de uno y más que aproximadamente 0,5. Debe tenerse en cuenta que definiendo ω para ser menos de uno, el tiempo de pico máximo t_p no estará dentro del primer intervalo de tiempo predeterminado. Por ejemplo, la función WHT $f_3(t_p)$ o $f_4(t_p)$ (véanse las Figuras 17 y 18) podría modificarse de forma que el último punto del primer intervalo de tiempo predeterminado se establezca a t_{L1} . Además, la función de corrección $q(t)$ también podría modificarse de forma que el punto de fin del primer intervalo de tiempo predeterminado se establezca a t_{L1} como se define en la Ecuación 16. En resumen, el uso del algoritmo del tiempo de pico máximo, como se describe en la Ecuación 16, puede usarse para reducir más los efectos del hematocrito cuando se use en conjunto con uno de los algoritmos previamente descritos en las Ecuaciones 7, 8 o 15.

[0093] En una representación de este invento que usa un intervalo de tiempo predeterminado adaptativo donde haya tres intervalos de tiempo predeterminados, la duración del segundo intervalo de tiempo predeterminado puede definirse que es igual a dos veces la duración del primer intervalo de tiempo predeterminado. Además, la duración de primer intervalo de tiempo predeterminado podría ser aproximadamente igual a la duración del primer intervalo de tiempo predeterminado. En esta representación, el intervalo de tiempo de test t_T podría variar ya que el tiempo de pico máximo t_p es probable que cambie dependiendo del nivel de hematocrito en sangre. Como se ha mencionado antes, la sangre con alto nivel de hematocrito provoca que el tiempo de pico máximo t_p aumente y la sangre con hematocrito bajo provoque el tiempo de pico máximo t_p disminuya.

[0094] En una representación alternativa de este invento, podría usarse una tira de test 300 que tenga un primer electrodo de trabajo 300 en forma de una matriz de microelectrodo 310 como se ilustra en la Figura 22. En general, la matriz de microelectrodo 310 mejorará los efectos de la difusión radial provocando un aumento en la densidad de corriente medida (corriente por área de unidad del electrodo de trabajo). La difusión radial se refiere al flujo del mediador reducido que se difunde al primer electrodo de trabajo 300 en forma no perpendicular a respecto de un plano de un primer electrodo de trabajo 300. En contraste, la difusión planar se refiere al flujo del mediador reducido que se difunde al primer electrodo de trabajo 300 en una forma aproximadamente perpendicular a respecto de un plano del primer electrodo de trabajo 300. Como resultado de la difusión radial mejorada, la aplicación de una tensión de test limitante a la matriz de microelectrodo 310 puede provocar que una corriente de test consiga un valor de estado constante que no sea cero que depende del tiempo. En contraste, la aplicación de una tensión de test limitante a un no-microelectrodo tendrá como resultado una corriente de test que se aproxime al cero al progresar el tiempo. Debido a que el valor de estado constante es independiente del tiempo para una matriz de microelectrodo 310, podría calcularse un coeficiente de difusión efectiva del mediador en la muestra de sangre. A su vez, el coeficiente de difusión efectiva puede usarse como entrada en un algoritmo para reducir los efectos del hematocrito.

[0095] Una vista superior simplificada de un ensamblaje parcial de una tira de test 300 muestra una porción distal 302 de una capa conductiva colocada en un sustrato 5 como se ilustra en la Figura 22. La capa conductiva incluye un primer electrodo de trabajo 306, un segundo electrodo de trabajo 308 y un electrodo de referencia 304. El primer electrodo de trabajo 306 está en forma de una matriz de microelectrodo 301, que incluye un grupo de microelectrodos 320. Muchas de las capas de la tira de test 100, como se ilustra en la Figura 1, podrían usarse para

la tira de test 300, como la capa de aislamiento 16, la capa reactiva 22, la capa adhesiva 60, la capa hidrofílica 70 y la capa superior 80.

5 **[0096]** Otra representación de una matriz de microelectrodo se muestra en la tira de test 400 de la Figura 23. La tira de test 400 se diferencia de la tira de test 300 en que la tira de test 400 tiene el primer electrodo de trabajo 406 situado en dirección ascendente a respecto del electrodo de referencia 404 y también tiene un electrodo de detección de llenado 412. La capa conductiva incluye un primer electrodo de trabajo 406, un electrodo de detección de llenado 412 y un electrodo de referencia 404. El primer electrodo de trabajo 406 está en forma de una matriz de microelectrodo 410 que incluye un conjunto de microelectrodos 420. Muchas de las capas de la tira de test 100, como las ilustradas en la Figura 1, podrían usarse para la tira de test 400, como la capa de aislamiento 16, la capa reactiva 22, la capa adhesiva 60, la capa hidrofílica 70 y la capa superior 80.

10 **[0097]** En otra representación, la porción de aislamiento 330 es un elemento separado de la capa de aislamiento 16 de la Figura 1. En esta representación, la porción de aislamiento 330 se coloca en el primer electrodo de trabajo 306 en un paso independiente de la impresión de la capa de aislamiento 16. La porción de aislamiento 330 podría colocarse sobre y unida al primer electrodo de trabajo 306 por procesos como soldadura por ultrasonidos, impresión serigráfica o por medio del uso de un adhesivo. En esta representación, los orificios de la porción de aislamiento 330 podrían formarse antes o después de adherir la porción de aislamiento 330 al primer electrodo de trabajo 306.

15 **[0098]** Para que la matriz del microelectrodo 310 tenga un efecto mejorado debido a la difusión radial, la porción de aislamiento 330 debería tener las dimensiones apropiadas. En un aspecto, la porción de aislamiento 330 podría tener una altura **H** de aproximadamente 5 micrones o menos. Es necesario que la porción de aislamiento 330 sea lo suficientemente fina como para permitir la difusión radial. Si la porción de aislamiento 330 fuese mucho mayor de 5 micrones, entonces la porción de aislamiento 330 interferiría con la difusión radial y en realidad promovería la difusión planar.

20 **[0099]** En otro aspecto, cada microelectrodo 320 debería espaciarse a suficiente distancia unos de los otros como para evitar que un primer microelectrodo compita con un segundo microelectrodo adyacente por el mediador de oxidación. Cada microelectrodo 320 podría espaciarse con una distancia **B** en un rango de entre aproximadamente 5 veces a aproximadamente 10 veces el diámetro del microelectrodo 320. En una representación como la ilustrada en la Figura 24, cada microelectrodo 320 podría espaciarse uniformemente a lo largo de la porción de aislamiento 330, donde un microelectrodo podría tener seis microelectrodos contiguos que forman una forma hexagonal.

25 **[0100]** En otro aspecto, cada microelectrodo 320 debería ser lo suficientemente pequeño como para que la proporción de la corriente de test adscrita a la difusión radial sea mayor que la proporción de la corriente de test adscrita a la difusión planar. El microelectrodo 320 podría estar en forma de un círculo que tenga un diámetro en un rango entre 3 micrones y 20 micrones.

30 **[0101]** En una representación alternativa de este invento, puede usarse una tira de test que tiene una lanza integrada (elemento de penetración) que simplifica el proceso de extracción de la sangre y aplicación de la sangre extraída a la tira de test. En lugar de lanzar la piel de un usuario con un instrumento de lanza, expresar la sangre y dosificar la sangre a la tira de test, el usuario ahora puede simplemente iniciar la tira de test con la lanza integrada para extraer la muestra de sangre seguida del llenado automático de la tira de test. Se pueden encontrar otras descripciones de tiras de test con una lanceta integrada en la anteriormente mencionada Solicitud Internacional n° PCT/GB01/05634 y Solicitud de Patente de los EE. UU. N° 10/143.399. Además, el elemento de penetración 602 puede fabricarse, por ejemplo, por medio de una técnica de estampación de matriz progresiva, como la presentada en las anteriormente mencionadas Solicitud Internacional N° PCT/GB01/05634 y la Solicitud de Patente de los EE. UU. N° 10/143399.

35 **[0102]** En una representación alternativa de este invento, puede usarse una tira de test que usa un proceso de ablación de láser mejorando la exactitud y la precisión de la concentración de analito medida. El proceso de ablación de láser en una capa conductiva permite un mejor control del área del electrodo que con otros procesos como la impresión serigráfica. Por ejemplo, la resolución de la impresión serigráfica podría verse por el tamaño de las aberturas de la pantalla para imprimir una capa reactiva. Cuando se use la impresión serigráfica para definir el patrón del electrodo, uno de los extremos de la capa conductiva podría ser irregular debido a la granularidad provocada por el grupo de aberturas de la pantalla. Además, como se describirá más adelante, un patrón de ablación de láser en la capa conductiva podría usarse para definir básicamente el área del electrodo sin necesidad de una capa de aislamiento o adhesiva.

40 **[0103]** La Figura 21 ilustra una vista de perspectiva superior desarrollada de una tira de test no ensamblada 500, que podría usarse con los algoritmos propuestos de las representaciones propuestas. La tira de test 500 incluye una capa conductiva 501, una capa reactiva 570 y una cinta superior 81. La tira de test 500 tiene una porción distal 576, una porción proximal 578 y dos lados 574.

45 **[0104]** En una representación de este invento, los algoritmos como se describen en las Ecuaciones 7, 8, 15 y 16 podrían usarse con una tira de test que no sea de microelectrodo (100 y 500) y también con tiras de test de matriz de

microelectrodo (300 y 400). Más adelante se describirá otro algoritmo que podría aplicarse solo a microelectrodos y más concretamente a matrices de microelectrodo, donde la corriente de test consiga un valor de estado constante debido a una proporción más alta de difusión radial.

[0105] Para una matriz de microelectrodo que tenga un conjunto de microelectrodos de forma de disco al que se aplique una tensión de test limitante, la siguiente ecuación estima una proporción de un valor de corriente de test a un valor de corriente de estado constante.

$$\frac{I(t)}{I_{ss}} = 1 + \left(\frac{2r_d}{\pi\sqrt{\pi D t}} \right) \quad \text{Eq. 17}$$

[0106] El término I_{ss} es el valor de corriente de estado constante, r_d es el radio de un microelectrodo de disco 320 en unidades de centímetros, D es el coeficiente de difusión efectiva en unidades de cm^2/s . El coeficiente de difusión efectiva D tiene en cuenta la difusión del mediador en una muestra de sangre que tenga una capa de reactivo disuelto. En general, el coeficiente de difusión efectiva D debería disminuir con el aumento de los niveles de hematocrito. De esa forma, el coeficiente de difusión efectiva D depende del nivel de hematocrito y puede usarse en un algoritmo para disminuir los efectos del hematocrito. A continuación se describirá cómo calcular el coeficiente de difusión efectiva D y a continuación aplicar el coeficiente de difusión efectiva D para calcular una concentración de glucosa.

[0107] La Figura 25 es un gráfico que ilustra una corriente de test, que es el resultado de la aplicación de una tensión de test limitante cuando se aplica una muestra de sangre a una tira de test 300 que tenga un matriz de microelectrodo. Debe tenerse en cuenta que la corriente de test se aproxima a un valor de corriente de estado constante al progresar el tiempo. Usando la Ecuación 17, el coeficiente de difusión efectiva D podría estimarse graficando los valores $\frac{I(t)}{I_{ss}}$ en el eje Y y $\frac{1}{\sqrt{t}}$ en el eje x como se ilustra en la Figura 26. La curva resultante de la porción lineal de la línea podría entonces calcularse y convertirse a un coeficiente de difusión efectiva D .

[0108] En una representación, el coeficiente de difusión efectiva D podría usarse con la Ecuación 18 para estimar la concentración de mediador reducido C_{red} (por ejemplo, concentración de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$).

$$C_{red} = \frac{I_{ss}}{4nFD r_d} \quad \text{Eq. 18}$$

[0109] El término n es el número de electrones intercambiados por molécula mediadora reducida y F es la constante de Faraday. A su vez, C_{red} puede usarse para estimar la concentración de glucosa. Por ejemplo, si asumimos una relación lineal entre C_{red} y la concentración de glucosa, podría restarse una intercepción de calibración de C_{red} seguida de una división con una curva de calibración para producir una concentración de glucosa estimada. En resumen, las Ecuaciones 17 y 18 permiten que se calculen las concentraciones de glucosa con un efecto reducido del hematocrito cuando se usan matrices de microelectrodo como se ilustra en las tiras de test 300 y 400.

[0110] En una representación, solo un algoritmo seleccionado a partir de las Ecuaciones 7, 8, 15, 16, 17 y 18 podría usarse para calcular una concentración de glucosa. En otra representación, podrían usarse dos o más algoritmos juntos para calcular una concentración de glucosa basada en los mismos valores de corriente de test a partir de un electrodo de trabajo. Las dos o más concentraciones de glucosa podrían promediarse conjuntamente para aumentar la exactitud general.

[0111] En otra representación, la tira de test 300, como se ilustra en la Figura 22, podría usar dos electrodos en funcionamiento donde un primer algoritmo use los valores de corriente de test del primer electrodo de trabajo 306 y un segundo algoritmo use los valores de corriente de test del segundo electrodo de trabajo 308. Debe tenerse en cuenta que para la tira de test 300 ese primer electrodo de trabajo 306 está en forma de una matriz de microelectrodo 310. En una representación, el primer algoritmo podría basarse en las Ecuaciones 17 y 18, la segunda representación podría basarse en la Ecuación 8. Por lo tanto, por medio del uso de dos algoritmos separados, podría calcularse una concentración de glucosa más exacta promediando conjuntamente las concentraciones de glucosa a partir de los dos algoritmos separados.

EJEMPLO

[0112] La capa reactiva se formuló en forma de tinta de enzima adecuada para la impresión serigráfica de la siguiente forma: 100 mL de 200 mM de tampón de fosfato acuoso se ajustó a pH 7. Se formó una mezcla añadiendo 5 g de celulosa de hidroxietilo (HEC), 1 g de poli(acetato de vinilo de pirrolidona de vinilo) (PVP-VA S-630), 0,5 ml de DC 1500 Dow Corning antiespuma a 100 ml de tampón de fosfato y se mezcló por homogeneización. Se dejó la mezcla durante la noche para permitir que las burbujas de aire se dispersasen y a continuación se usó como solución madre para la formulación de la tinta de enzima. A continuación, se añadieron gradualmente a mano 7,5 gramos de Cab-o-Sil TS610 a la mezcla hasta que se añadió aproximadamente 4/5 de la cantidad total de Cab-o-Sil TS610. El resto de Cab-o-Sil TS610 se añadió con la mezcla por homogeneización. La mezcla se osciló a

continuación durante 12 horas. A continuación se añadieron aproximadamente 10-50 gramos pero preferiblemente 18 g de hexamina de rutenio ($[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$) y se mezclaron por homogeneización hasta que se disolvieron. Finalmente, se añadió aproximadamente 2,8 g de preparación de enzima de oxidasa de glucosa (250 Unidades/mg) y a continuación se mezcló cuidadosamente en la solución. La formulación resultante estaba lista para impresión o

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar una concentración de glucosa usando una tira de test que tenga un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia, el método incluye:

aplicar una tensión de test entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia;
 medir una pluralidad de corrientes de test cuando se aplique a la tira de test una muestra de sangre que contenga glucosa;
 calcular un valor de correlación de glucosa (Y) usando una ecuación que es

$$Y = \sum_{t_{F1}}^{t_{L1}} I(h, G, t)q(t) + \sum_{t_{F2}}^{t_{L2}} I(h, G, t)q(t)$$

donde t_{F1} es un punto de inicio de un primer intervalo de tiempo predeterminado, t_{L1} es un punto de fin de un primer intervalo de tiempo predeterminado, t_{F2} es un punto de inicio de un segundo intervalo de tiempo predeterminado, t_{L2} es un punto de fin de un segundo intervalo de tiempo predeterminado, $I(t)$ es una corriente como función del hematocrito h , glucosa G y tiempo t , $q(t)$ es una función de corrección del tiempo t ,

donde los puntos temporales de inicio y de fin de los intervalos de tiempo se determinan y optimizan para reducir los efectos del hematocrito; y
 calcular la concentración de glucosa en base al valor de correlación de glucosa (Y).

2. El método de la Reivindicación 1, donde:

$q(t)$ sea igual a un primer factor de corrección entre t_{F1} y t_{L1} ; y
 $q(t)$ sea igual a un segundo factor de corrección entre t_{F2} y t_{L2} ;

3. El método de la Reivindicación 2, donde el segundo factor de corrección incluya aproximadamente lo mismo que el primer factor de corrección multiplicado por -1.

4. El método de la Reivindicación 1, donde $q(t)$ es +1 para el primer intervalo de tiempo predeterminado y -1 para el segundo intervalo de tiempo predeterminado.

5. Un método para determinar una concentración de glucosa usando una tira de test que tenga un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia, el método incluye:

Aplicar una tensión de test entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia;
 Medir una pluralidad de corrientes de test durante un intervalo de tiempo de test tras aplicar una muestra de sangre que contenga glucosa a la tira de test;
 Calcular un valor de correlación de glucosa (Y) usando una ecuación que es:

$$Y = \sum_{t_{F1}}^{t_{L1}} I(h, G, t)q(t) + \sum_{t_{F2}}^{t_{L2}} I(h, G, t)q(t) + \sum_{t_{F3}}^{t_{L3}} I(h, G, t)q(t)$$

donde t_{F1} es un punto de inicio de un primer intervalo de tiempo predeterminado, t_{L1} es un punto de fin de un primer intervalo predeterminado de tiempo, t_{F2} es un punto de inicio de un segundo intervalo de tiempo predeterminado, t_{L2} es un punto de fin de un segundo intervalo de tiempo predeterminado, $I(t)$ es una corriente como función de un hematocrito h , glucosa G y tiempo t , $q(t)$ es una función de corrección del tiempo t ,

donde los puntos temporales de inicio y de fin de los intervalos de tiempo se condicionan y optimizan para reducir los efectos del hematocrito; y
 calcular de la concentración de glucosa en base al valor de correlación de la glucosa (Y).

6. El método de la Reivindicación 5, donde el método también incluya el paso de calcular el punto de fin y el punto de inicio del primer intervalo de tiempo predeterminado, el segundo intervalo de tiempo predeterminado y el tercer intervalo de tiempo predeterminado (t_{F1} , t_{L1} , t_{F2} , t_{L2} , t_{F3} y t_{L3}) usando una función de minimización del error S , donde la función de minimización del error S se basa en una función de sensibilidad del entorno $a(t)$, función de sensibilidad de la glucosa $b(t)$ y función de sensibilidad del hematocrito $c(t)$.

7. El método de la reivindicación 6, donde la función de minimización del error S es

$$S = \left[\int a(t)c(t)q(t)dt \right]^2 + \left[\int b(t)c(t)q(t)dt \right]^2 \approx 0$$

8. El método de la Reivindicación 5, donde una suma de la duración del primer intervalo de tiempo predeterminado y del tercer intervalo de tiempo predeterminado no es igual al segundo intervalo de tiempo predeterminado.

5 9. El método de la Reivindicación 5, donde una suma de la duración del primer intervalo de tiempo predeterminado y del tercer intervalo de tiempo predeterminado es igual al segundo intervalo de tiempo predeterminado.

10 10. El método de la Reivindicación 5, donde el valor de correlación de glucosa (Y) se calcula durante el intervalo de tiempo del test, donde un microprocesador del marcador de test puede calcular la concentración de glucosa más rápidamente que si el marcador calcula el valor de correlación de glucosa (Y) tras el intervalo de tiempo del test.

11. El método de la Reivindicación 5 incluyendo además:

determinar un tiempo de pico máximo a partir del conjunto de corrientes de test;
 15 determinar un punto de fin de un primer intervalo de tiempo predeterminado multiplicando el tiempo de pico máximo por un factor de calibración.

12. El método de la Reivindicación 11, donde el factor de calibración esté en un rango entre 0,5 y aproximadamente menos de uno.

20 13. El método de la Reivindicación 5, que incluya también la impresión de la formulación en el electrodo de trabajo por medio de una pantalla que fije un grupo de hilos entrelazados, el grupo de hilos entrelazados define un conjunto de espacios rectangulares abiertos para permitir que la formulación los atraviese. El grupo de hilos entrelazados tiene un espaciado entre los hilos y un diámetro de los hilos, donde el espaciado entre hilos está en un rango entre aproximadamente 90 hilos por centímetro y aproximadamente 120 hilos por centímetro y el diámetro de los hilos podría estar en un rango entre aproximadamente 30 micrones y aproximadamente 50 micrones.

14. Un sistema para determinar una concentración de glucosa, que incluye:

un marcador de test y
 30 una tira de test que incluye un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia en el que la tira de test se configura de forma que esté insertado en el marcador de test de forma que el marcador de test aplique una tensión de test entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia y determina un grupo de corrientes de test durante un intervalo de tiempo tras la aplicación de una muestra de sangre que contenga glucosa a la tira de test para determinar una concentración de glucosa basa en un valor de correlación de la glucosa (Y), donde el valor de correlación de la glucosa (Y) se define por una ecuación que es

$$Y = \sum_{t_{F1}}^{t_{L1}} I(h, G, t)q(t) + \sum_{t_{F2}}^{t_{L2}} I(h, G, t)q(t) + \sum_{t_{F3}}^{t_{L3}} I(h, G, t)q(t)$$

40 donde t_{F1} es un punto de inicio de un primer intervalo de tiempo predeterminado, t_{L1} es un punto de fin de un primer intervalo de tiempo predeterminado, t_{F2} es un punto de inicio de un segundo intervalo de tiempo predeterminado, t_{L2} es un punto de fin de un segundo intervalo de tiempo predeterminado, t_{F3} es un punto de inicio de un tercer intervalo de tiempo predeterminado, t_{L3} es un punto de fin de un tercer intervalo de tiempo predeterminado, $I(t)$ es una corriente como función del hematocrito h , glucosa G y tiempo t , $q(t)$ es una función de corrección del tiempo t ,

45 donde el punto de inicio y de fin de los intervalos de tiempo se determinan y optimizan por el sistema para reducir los efectos del hematocrito.

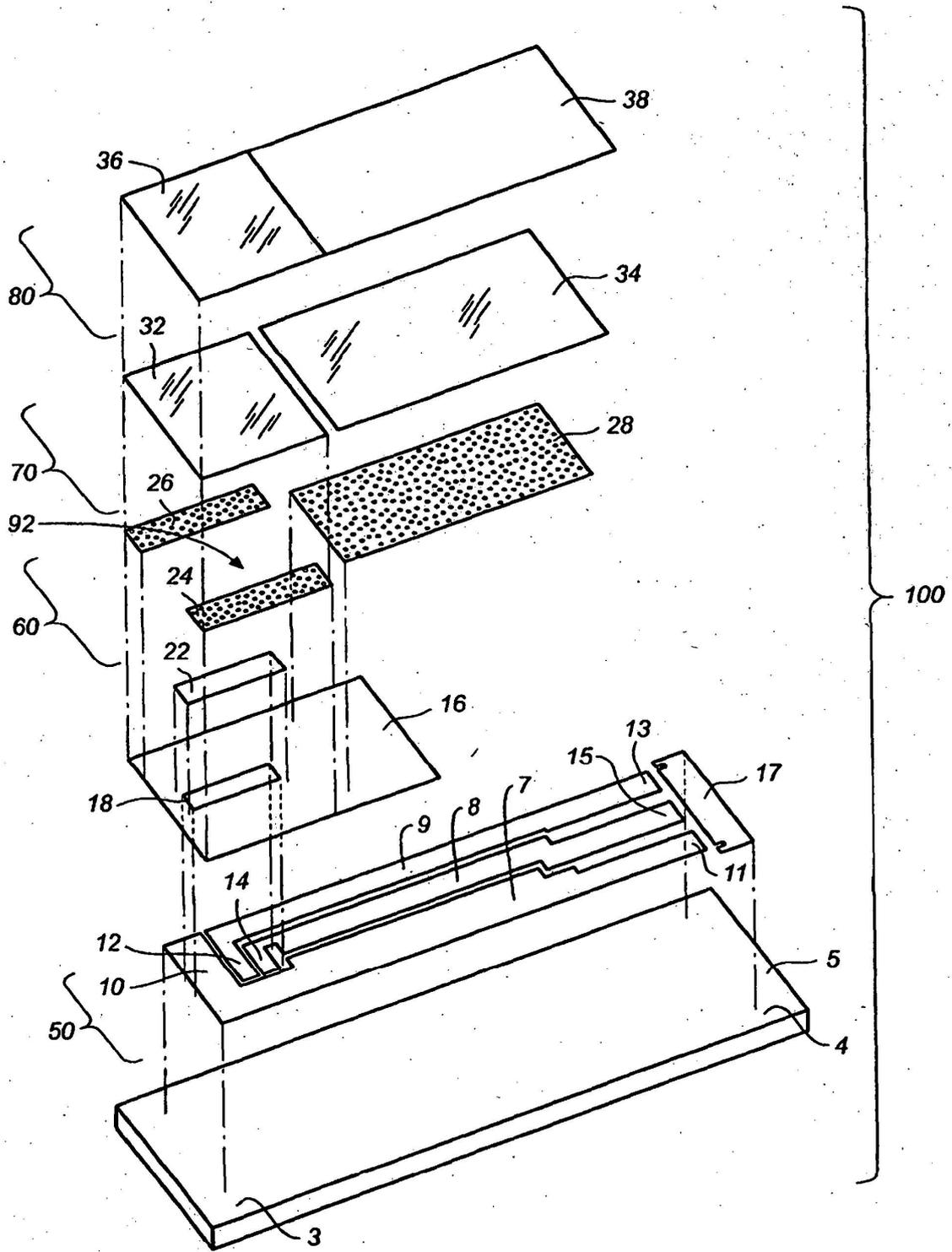


FIG. 1
(ESTADO DE LA TECNICA)

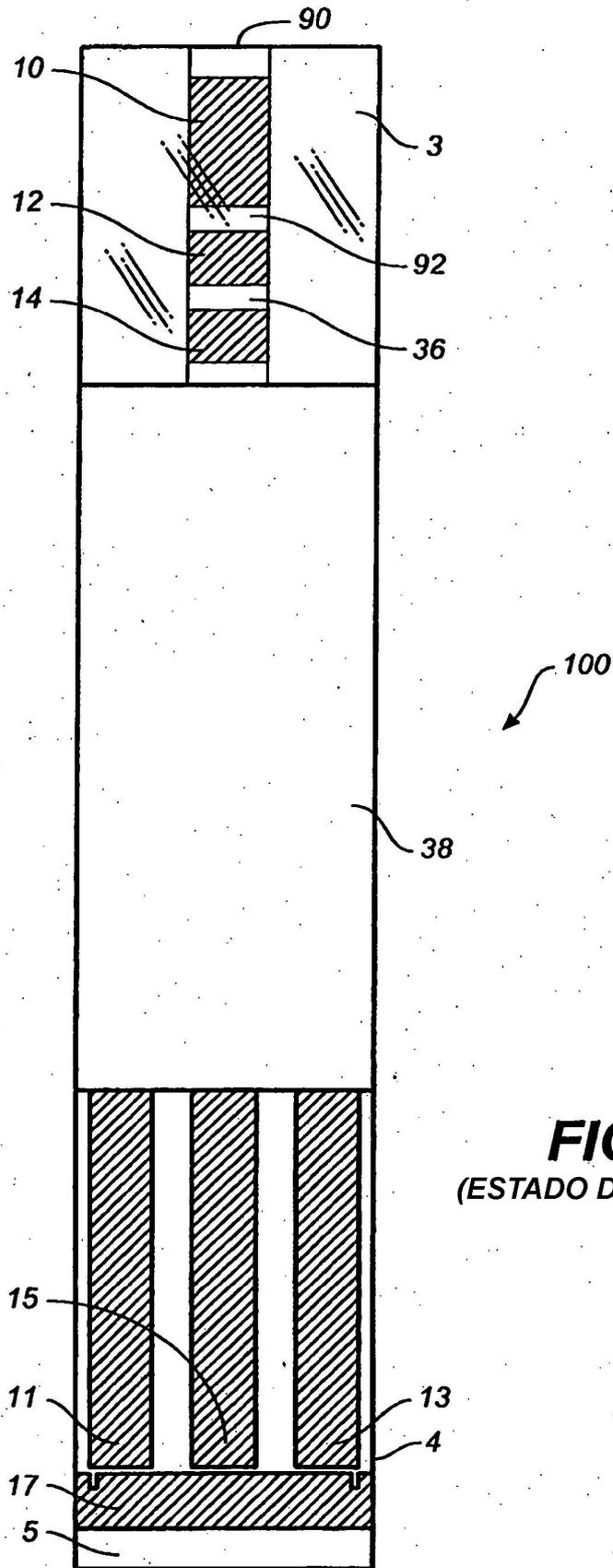


FIG. 2
(ESTADO DE LA TECNICA)

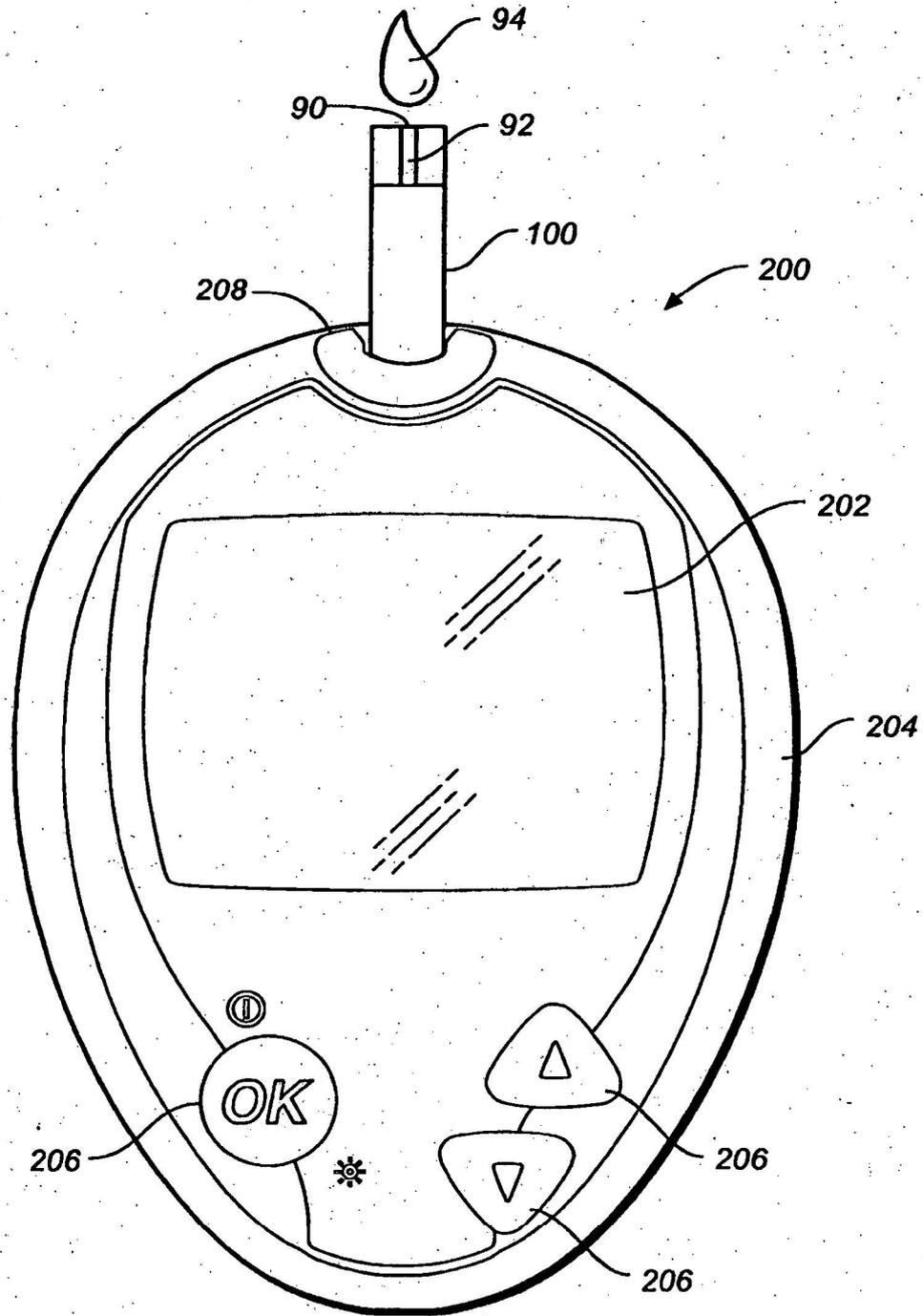


FIG. 3

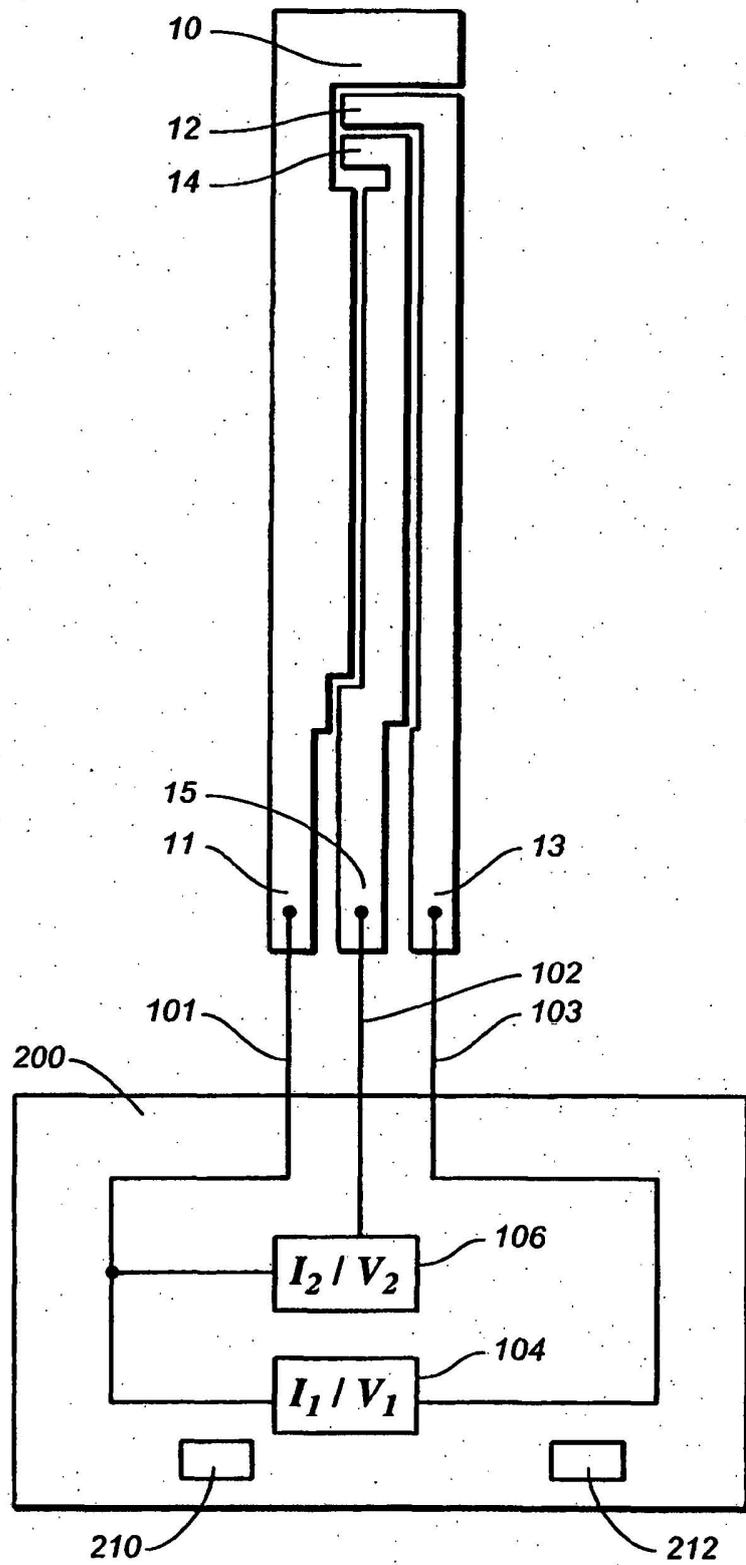


FIG. 4

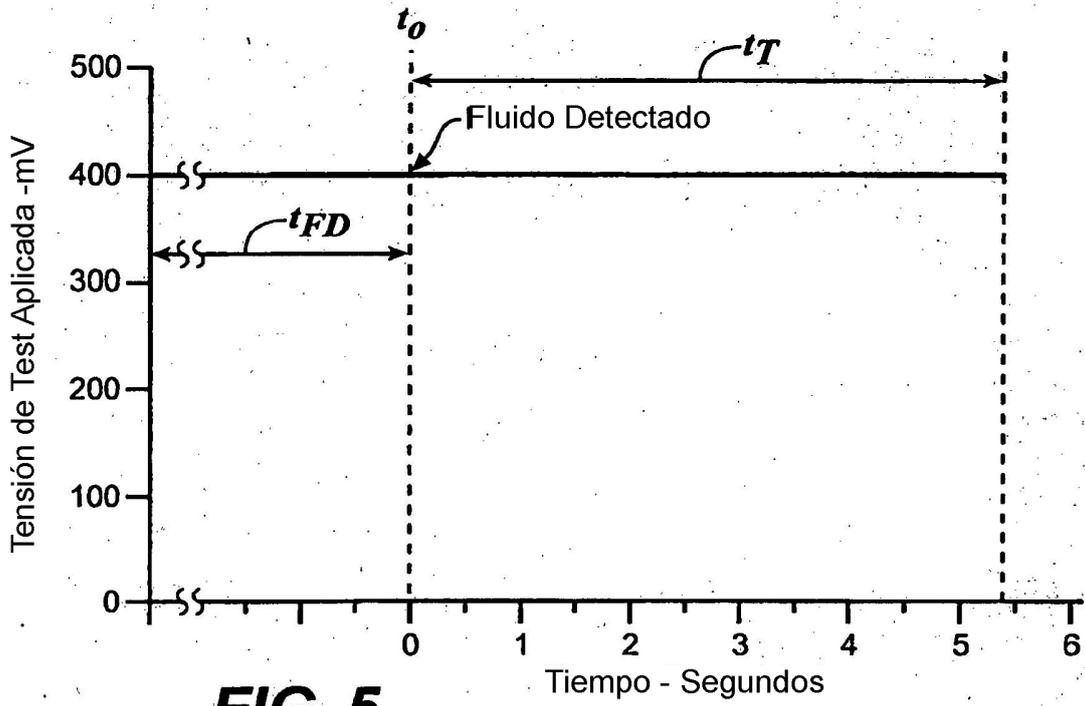


FIG. 5

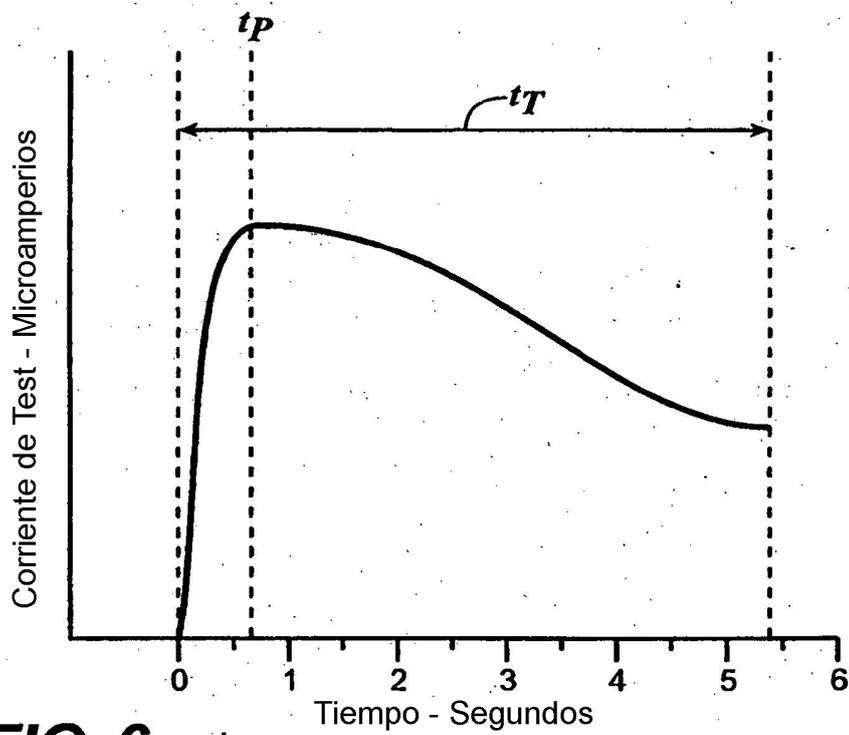


FIG. 6

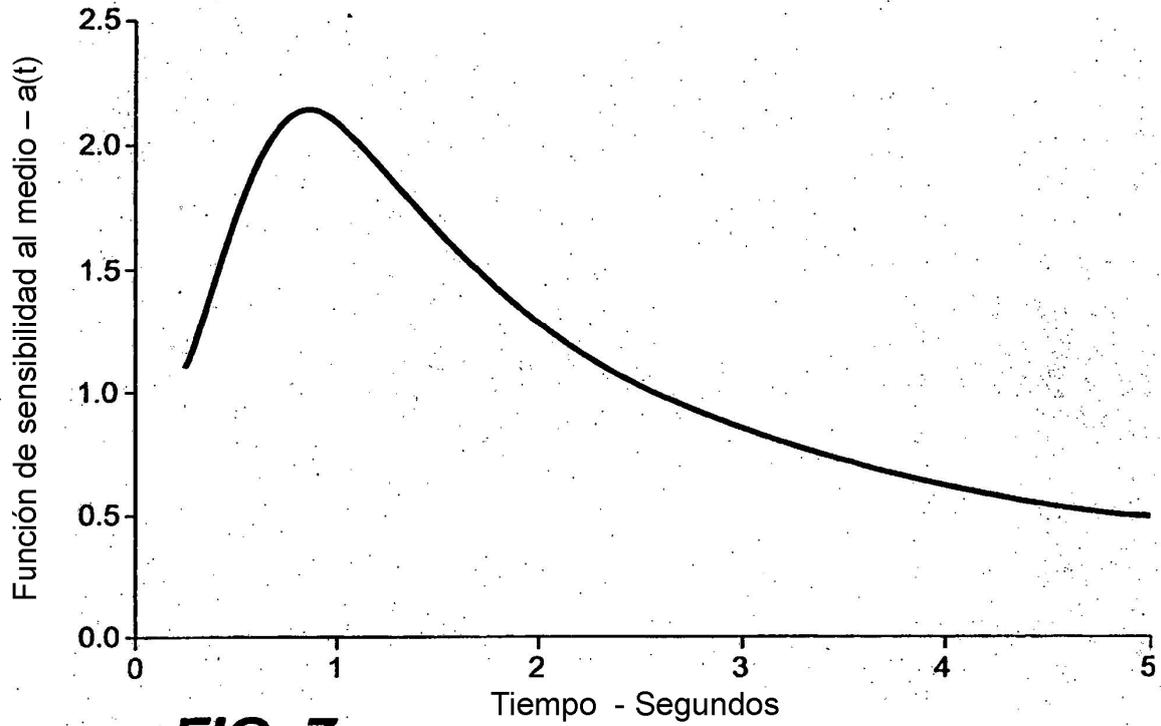


FIG. 7

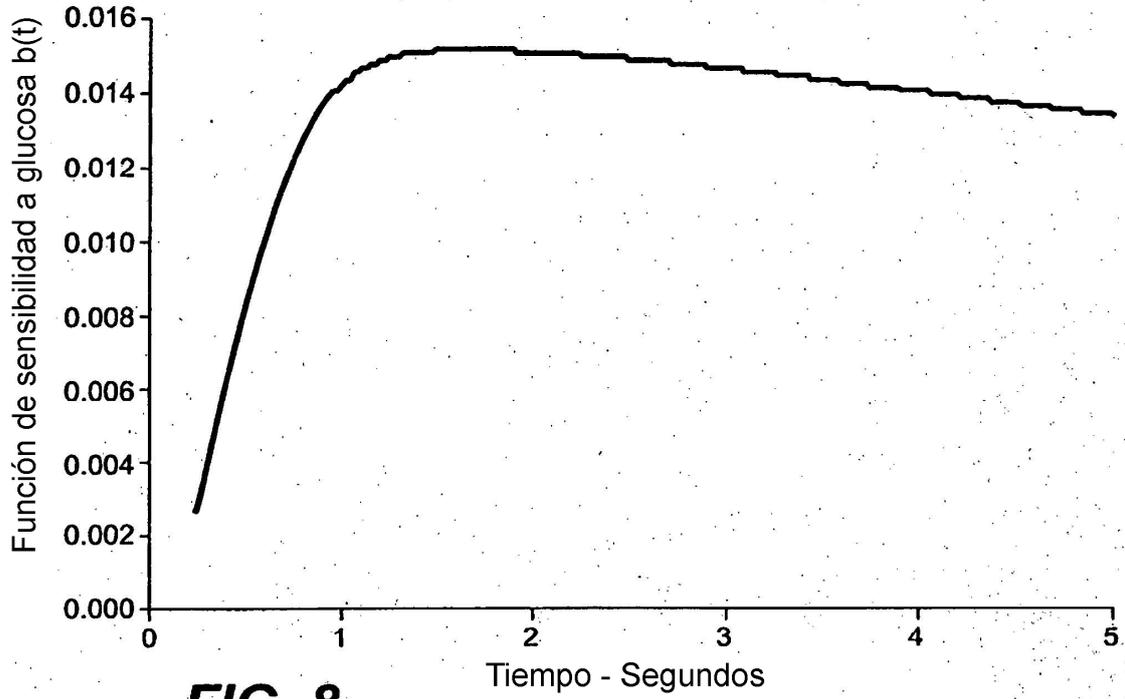


FIG. 8

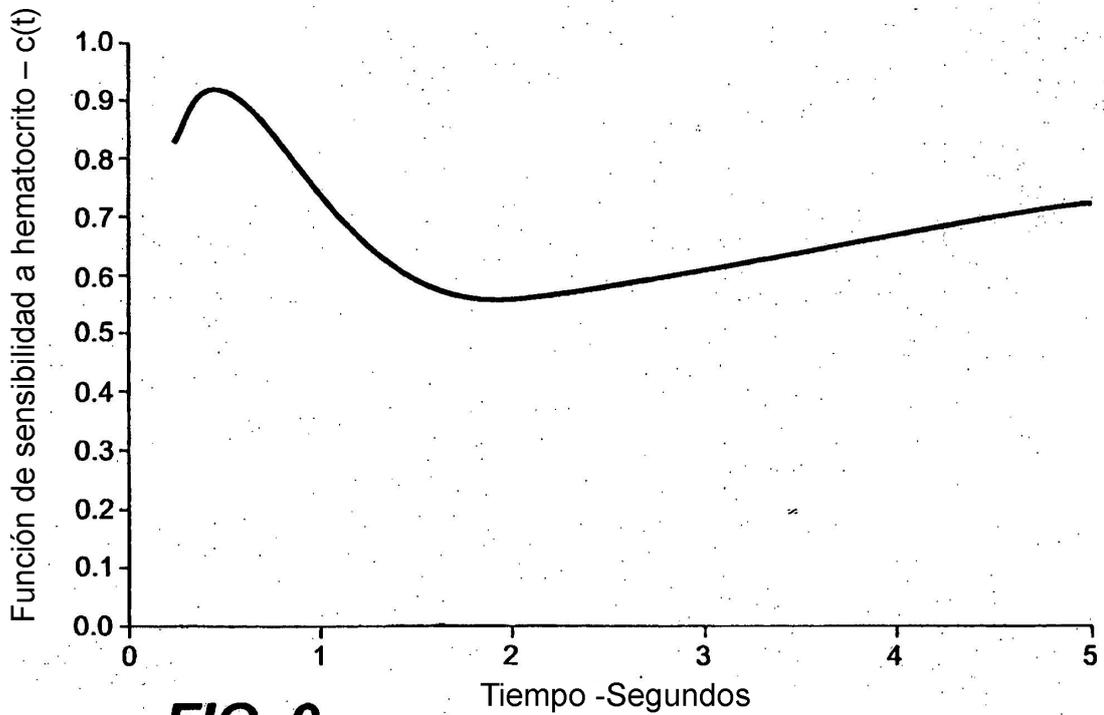
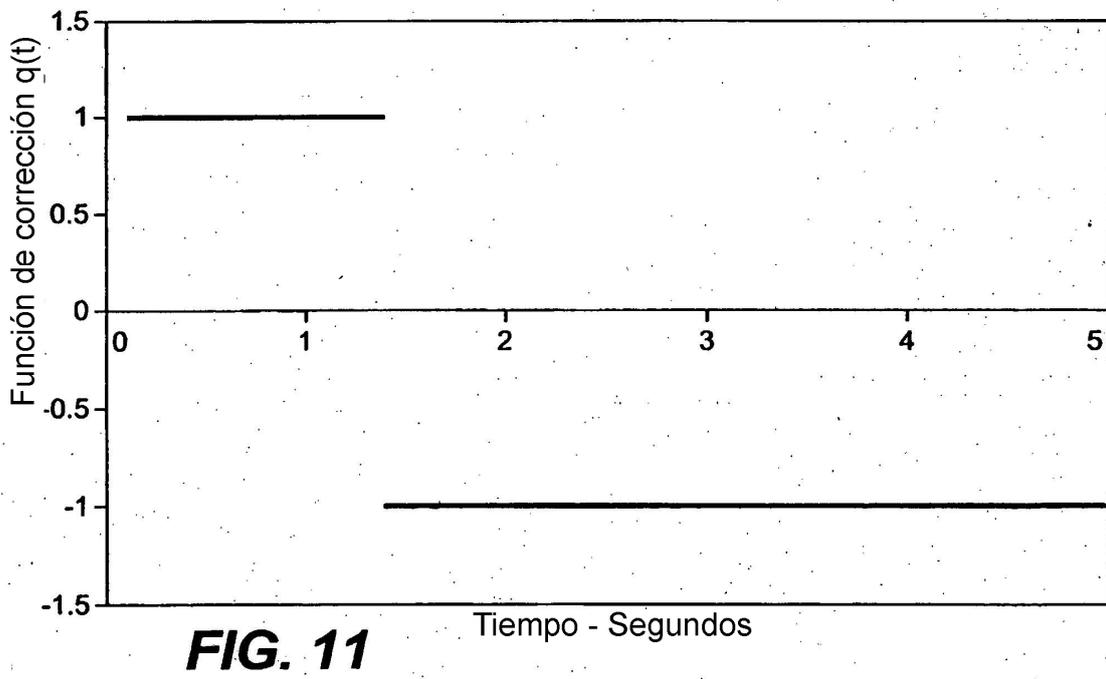
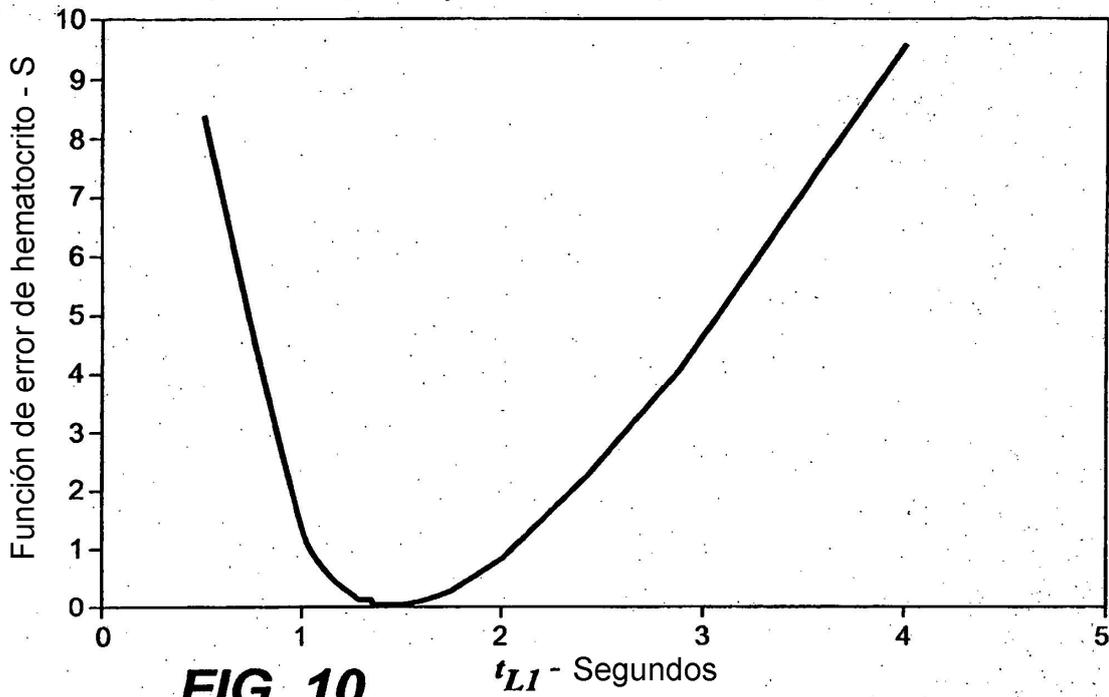


FIG. 9



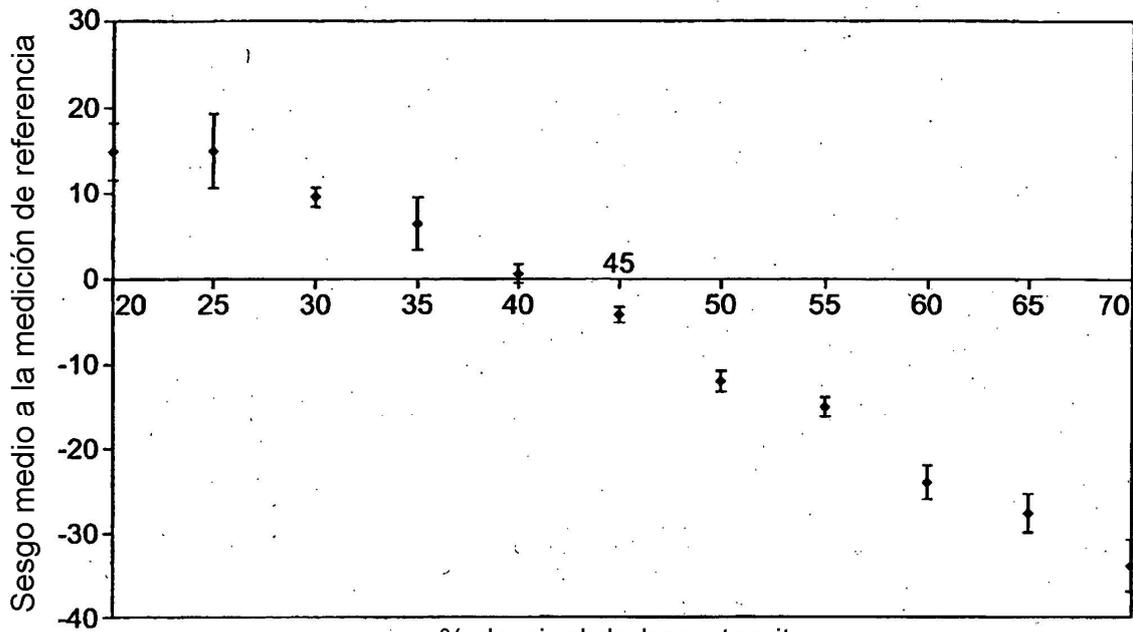


FIG. 12 % de nivel de hematocrito

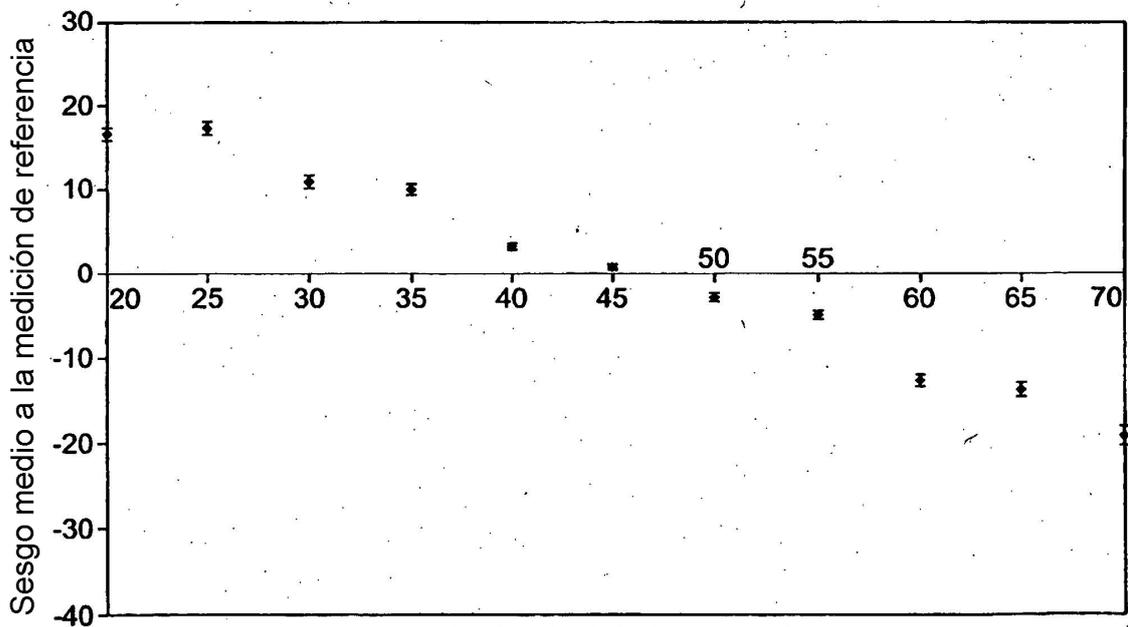


FIG. 13 % de nivel de hematocrito

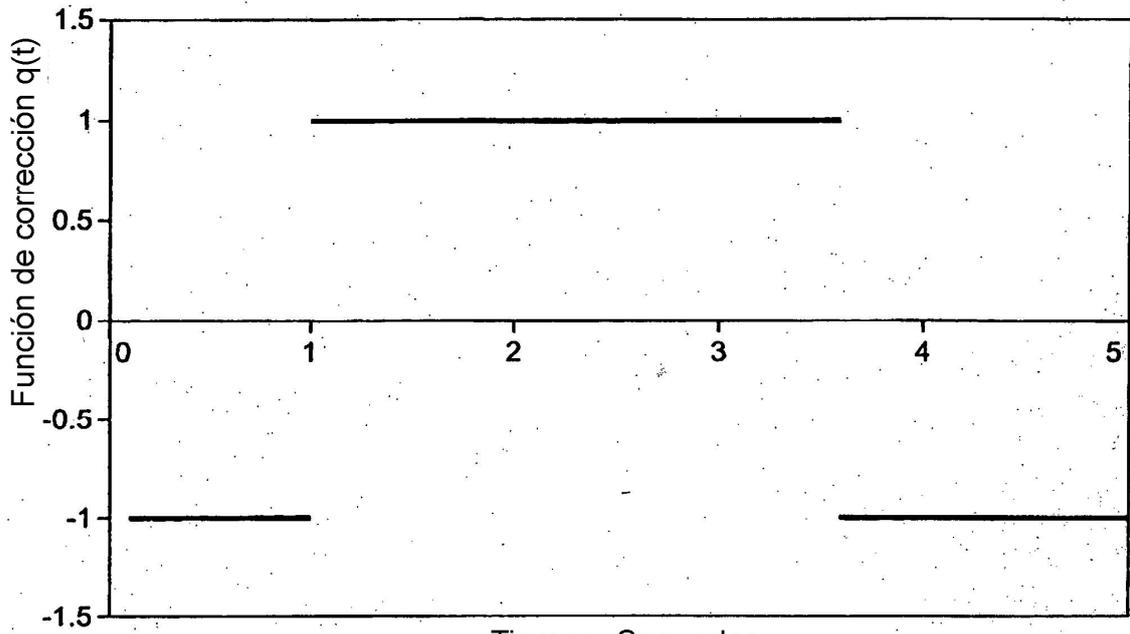


FIG. 14

Tiempo -Segundos

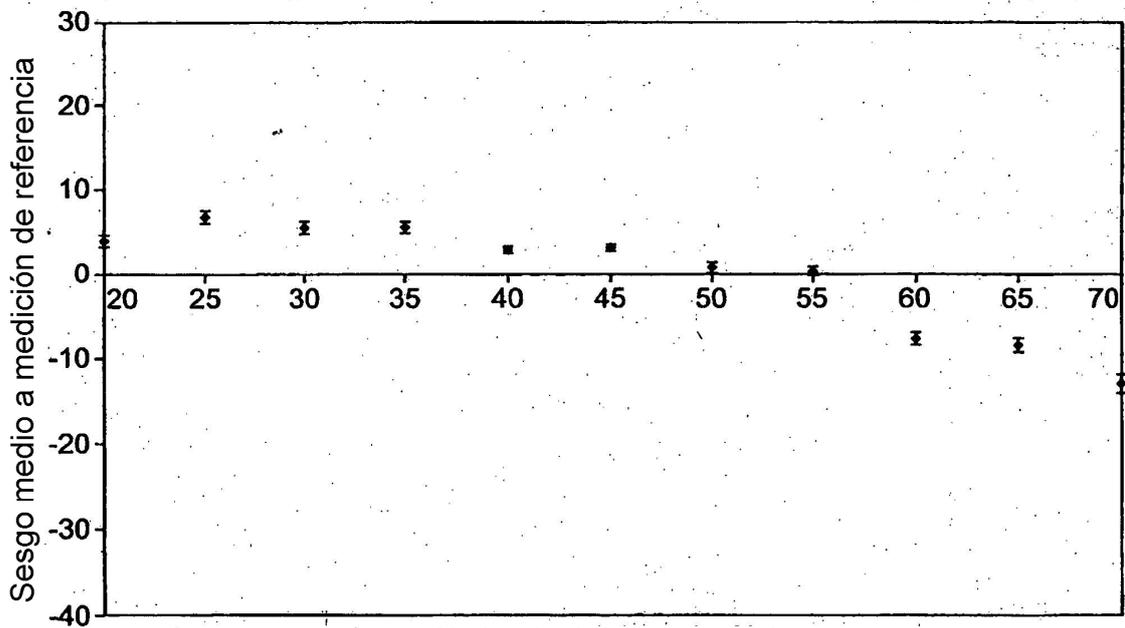


FIG. 15

% de nivel de hematocrito

FIG. 16

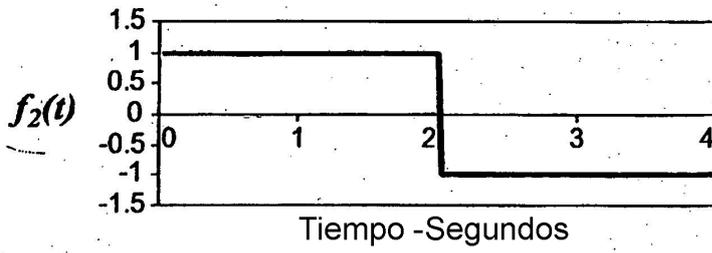


FIG. 17

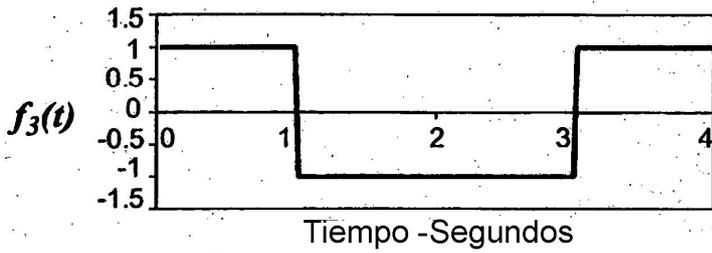


FIG. 18

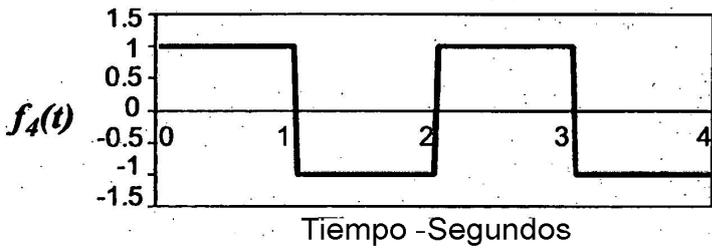


FIG. 19

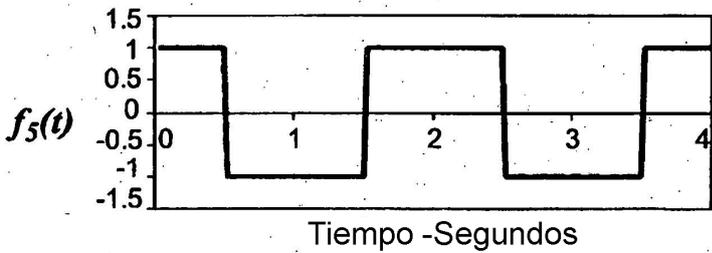
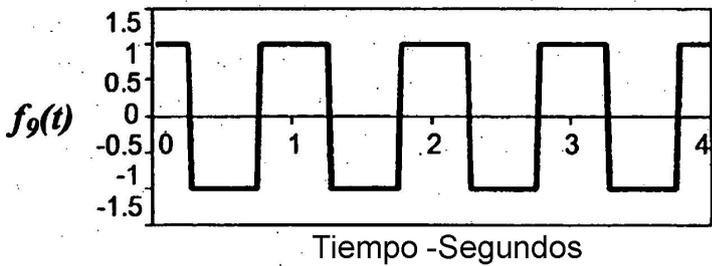


FIG. 20



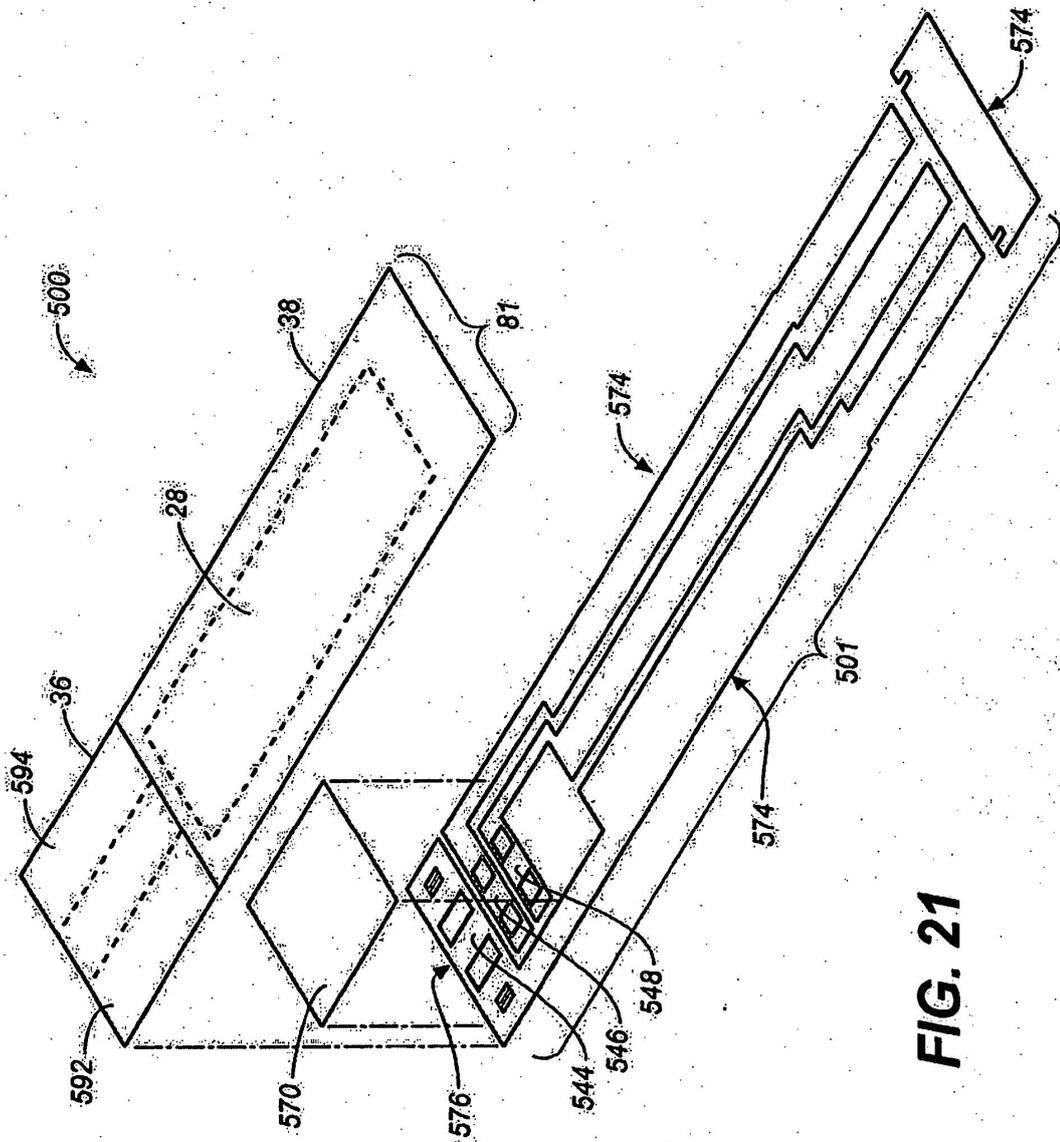


FIG. 21

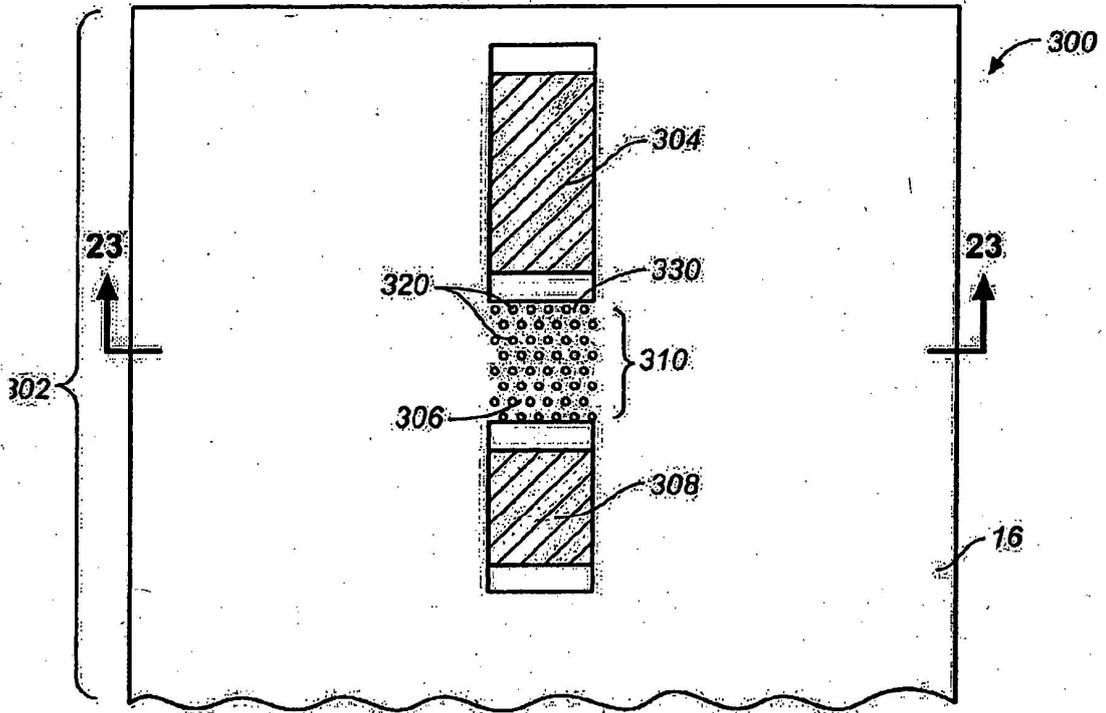


FIG. 22

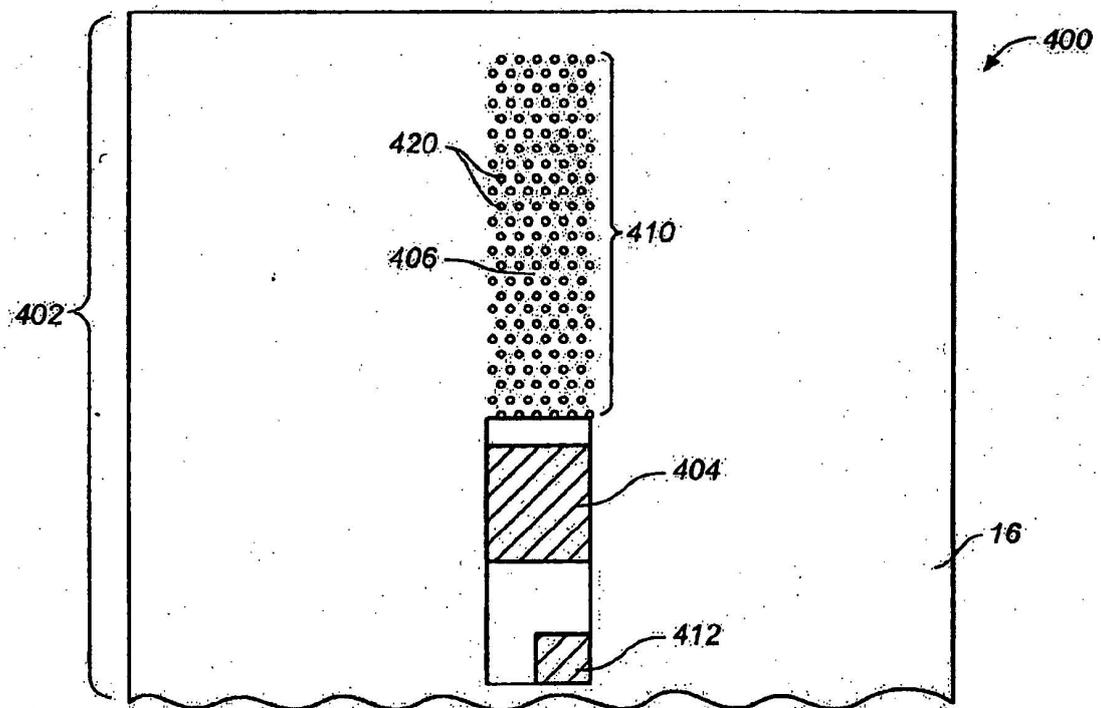


FIG. 23

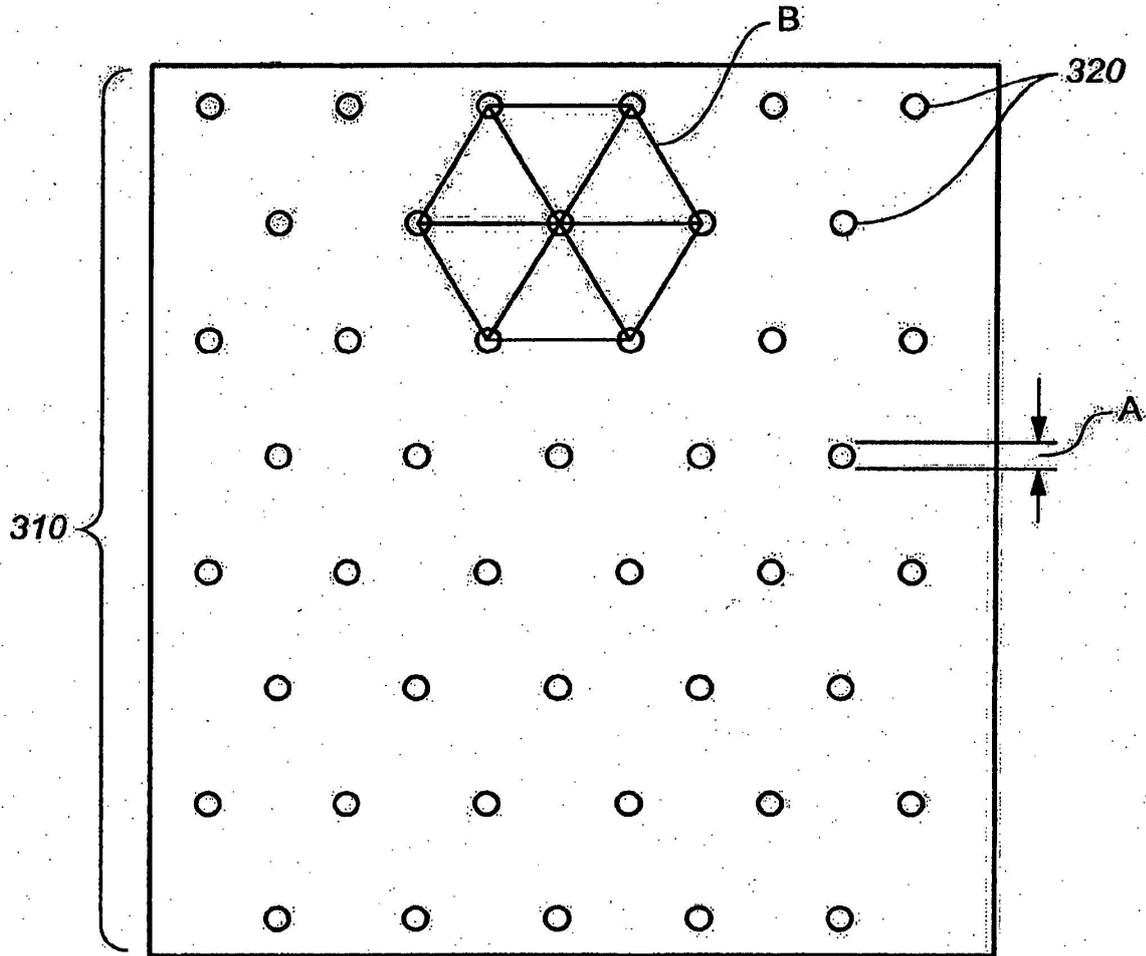


FIG. 24

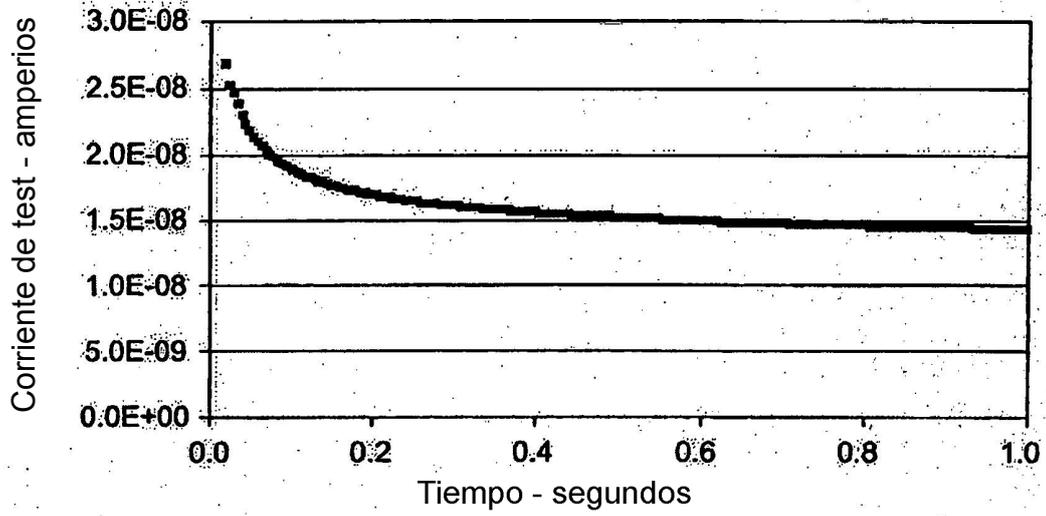


FIG. 25

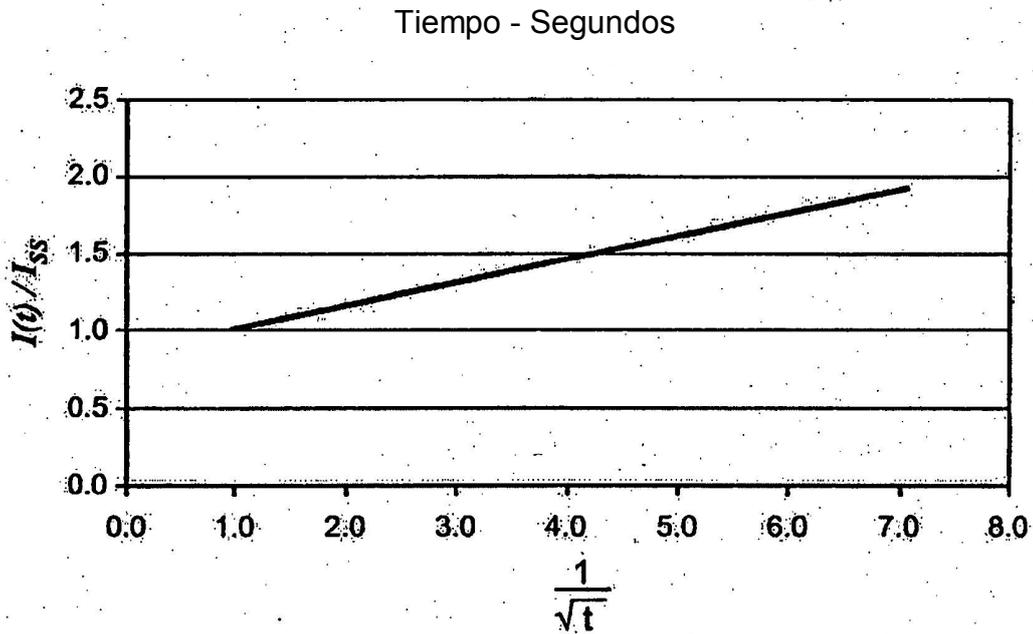


FIG. 26