(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 552 083**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/00 (2006.01)
G01N 27/416 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2006 E 10181914 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2267150**

(54) Título: **Especies oxidables como referencia interna en soluciones de control para biosensores**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2015

(73) Titular/es:

BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)
100 Bayer Boulevard
Whippany, NJ 07981-0915, US

(72) Inventor/es:

WU, HUAN-PING

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Especies oxidables como referencia interna en soluciones de control para biosensores

Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, al campo de los dispositivos médicos.

Antecedentes de la invención

Más específicamente, la presente invención se refiere a los biosensores que se usan para medir la cantidad de analitos en fluidos corporales. A menudo se usan procedimientos ópticos para realizar dichas mediciones, pero la presente invención se refiere a mejoras en biosensores electroquímicos. Aunque el procedimiento que se describirá en el presente documento puede aplicarse a mediciones de otros analitos, incluyendo colesterol, urea, creatinina y creatina, medir la glucosa en sangre completa es de particular interés. Aunque la descripción en el presente documento hará hincapié en la aplicación de la invención para medir glucosa, debe entenderse que la invención tiene aplicaciones más amplias.

La invención se refiere a un instrumento electroquímico en el que se aplica un potencial a electrodos en contacto con una muestra biológica y reactivos. La corriente resultante se mide mientras el analito está reaccionando con los reactivos, y a continuación se correlaciona con la cantidad de un analito en la muestra. Dichos instrumentos se denominan como amperométricos, en contraste con instrumentos coulométricos que miden la carga total en culombios producida a partir de la reacción de la muestra integrando la corriente durante todo el tiempo de medición. Los instrumentos amperométricos presentan una ventaja en que dependen menos del volumen y el tiempo. No esperan a que todo el volumen del analito haya reaccionado, sino que solamente realizan mediciones del analito muestreando la velocidad de reacción en un momento predeterminado.

En la técnica se han descrito muchos diseños para dichos biosensores, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2001/0042683. Los electrodos se describen generalmente como el electrodo de trabajo y como el contraelectrodo. Los electrodos están en contacto con una capa sólida que contiene reactivos que oxidan el analito en la muestra, tales como glucosa oxidasa, y mediadores que reoxidan la enzima reducida. El propio mediador reducido es oxidado en el electrodo de trabajo, lo que produce una corriente medible. Esta corriente se usa para calcular la cantidad de glucosa en la muestra que está siendo ensayada, dado que es una medida indirecta de la oxidación de glucosa en la muestra. Las reacciones pueden describirse mediante las siguientes etapas:

$$\text{Glucosa} + E_{oxid} \rightarrow E_{red} + \text{Producto (Ácido glucónico, Gluconolactona)}$$

$$E_{red} + Med_{oxid} \rightarrow Med_{red} + E_{oxid}$$

$$Med_{red} \rightarrow Med_{oxid} + n\ e^-$$

Donde E_{oxid} y E_{red} son formas oxidada y reducida del centro redox de la enzima y Med_{oxid} y Med_{red} son las formas oxidada y reducida del mediador.

Para medir la glucosa, la enzima puede ser glucosa oxidasa y el mediador ferricianuro. La medición de otros analitos empleará enzimas y mediadores adecuados. Combinaciones típicas de enzima, mediador y analito se enumeran en la Tabla 1.

TABLA 1 Sistemas de sustratos, enzima y mediador seleccionados

Analito	Enzima	Mediador
Glucosa	Glucosa Oxidasa	Ferricianuro
Glucosa	Glucosa Deshidrogenasa	Ferricianuro
Colesterol	Colesterol Oxidasa	Ferricianuro
Lactato	Lactato Oxidasa	Ferricianuro
Ácido úrico	Uricasa	Ferricianuro
Alcohol	Alcohol Oxidasa	Fenilendiamina

Para garantizar mediciones precisas, se usan soluciones de control que contienen cantidades conocidas de glucosa para verificar que el instrumento está funcionando apropiadamente. La composición de soluciones de control ha sido el tema de una serie de patentes y publicaciones. Son representativas las patentes de Estados Unidos n.º 3.920.580; 4.572.899; 4.729.959; 5.028.542 y 5.605.837; los documentos WO 93/21928; WO 95/13535; y WO 95/13536. Aunque se han usado soluciones de control que contienen suero sanguíneo, las patentes más recientes se han referido a sustituir soluciones de control a base de suero por soluciones libres de suero, dado que las soluciones libres de suero son más uniformes y estables que las que contienen suero. La solución de control debe contener una concentración conocida de glucosa en una matriz similar a suero para determinar la precisión de tanto el biosensor

enzimático como el potencioestato. Será evidente que la composición debe ser estable durante largos periodos de almacenamiento antes de uso.

Las soluciones de control deber servir para el propósito de comprobar el funcionamiento del sistema de monitorización de glucosa, pero al mismo tiempo deben ser identificadas y separadas de las lecturas de muestras de sangre reales. Esto es porque las soluciones de control contienen cantidades conocidas de glucosa y proporcionan lecturas que no tienen ningún propósito terapéutico. Si las soluciones de control no pueden identificarse y sus respuestas separadas de las de las muestras de sangre por el medidor de ensayo, las lecturas de glucosa de las soluciones de control estarán incluidas en el historial de las mediciones de glucosa, lo que podría causar una interpretación errónea de la dolencia diabética de un paciente. O, si una solución de control sustituye a una muestra de sangre, puede ser considerado erróneamente por un facultativo que indica una necesidad de cambiar el tratamiento. Además, dado que la respuesta a la temperatura de las soluciones de control es diferentes de la de las muestras de sangre, la compensación de temperatura para mediciones realizadas a temperaturas diferentes de 25°C será menos precisa si un medidor de ensayo no puede distinguir entre muestras de sangre y soluciones de control. Por lo tanto, es altamente deseable que el sistema de monitorización de glucosa detecte e identifique automáticamente las soluciones de control para separar las lecturas de glucosa de soluciones de control de las de las muestras de sangre, y para proporcionar compensación de temperatura independiente para tanto las muestras de sangre como las soluciones de control.

Ha habido varias patentes que describen procedimientos de identificación de las soluciones de control a través de diversos mecanismos. En la patente de Estados Unidos n.º 5.723.284, se describe la medición electroquímica de glucosa en sangre. La patente '284 proponía modificar las soluciones de control, cambiando la proporción de lecturas de corriente tomadas a partir de dos periodos de oxidación separados por un periodo de reposo. El medidor reconocería que una solución de control estaba siendo medida y emprendería las acciones apropiadas para impedir que los resultados se incluyeran en los resultados de la muestra de sangre. La patente '284 también enseña que la solución de control debe estar tamponada en un intervalo de pH de 4,8 a 7,5 para ser eficaz.

Otro procedimiento de para determinar si está siendo medido el contenido de glucosa de una solución de control o una muestra de sangre se desvela en la solicitud publicada de Estados Unidos 2002/0139692A1. Se determina un índice que relaciona el descenso de corriente eléctrica con la naturaleza de la muestra que está siendo ensayada.

Las patentes de Estados Unidos n.º 5.620.579 y 5.653.863, proponían empezar el ensayo de una muestra proporcionando un pulso de potencial positivo inicial durante un corto periodo para reoxidar cualquier mediador reducido prematuramente. Dicho pulso inicial se denominó como un "periodo de desaparición".

Cuando se aplica un potencial que atraviesa el electrodo de trabajo y el contraelectrodo y se introduce una muestra líquida en el sensor, los reactivos secos son rehidratados por la muestra líquida y la corriente comienza a fluir, típicamente aumentando hasta un pico y a continuación disminuyendo durante el "periodo de desaparición", habitualmente de aproximadamente diez segundos de duración. Durante este periodo, el mediador reducido previamente se reoxida para reducir el sesgo hacia resultados elevados incorrectos. Si una cantidad completa de muestra no está presente, puede introducirse un error adicional, dado que todos los reactivos pueden no volverse disponibles para reacción o el electrodo de trabajo y el contraelectrodo podrían no estar con contacto completo con la muestra, reduciendo de este modo la corriente durante el periodo "de desaparición".

Después de que el periodo de desaparición se ha completado, se proporciona un periodo de reposo a un potencial más bajo o a potencial nulo (circuito abierto). Durante este periodo de reposo, la reacción de oxidación de la glucosa sigue teniendo lugar y el mediador se reduce. A continuación, un potencial constante se aplica de nuevo entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo y la corriente se mide durante un corto periodo, típicamente aproximadamente de dos a diez segundos. La corriente es inicialmente elevada, pero disminuye rápidamente dado que la difusión del mediador comienza ejercer el control. En un momento predeterminado, la corriente medida se usa para determinar el contenido de glucosa de la muestra.

Añadir un compuesto de referencia interna es una práctica habitual en la química analítica para proporcionar una señal de referencia cuantitativa. Este principio de trabajo se ha usado en una solicitud de patente publicada reciente No. WO 2005/078118, donde una referencia interna se añade al sistema de reactivo para conseguir cierto propósito de formulación.

En el documento WO2004/040286A1, se ha propuesto que la solución de control incluya una sustancia reductora seleccionada entre ácido úrico, bilirrubina, ácido ascórbico, azul de metileno, Bis(2-hidroxietil)iminotris(hidroximetil)metano, ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico y acetaminofeno, cambiando de este modo la proporción de lecturas de corriente tomadas de dos periodos de oxidación separados por un periodo de reposo y permitiendo que la solución de control sea identificada.

Además, el documento WO2004/040286A1 desvela un procedimiento de determinación para identificar automáticamente líquido de analito y una solución patrón para un biosensor. El biosensor comprende una parte de electrodo que incluye un contraelectrodo y un electrodo de medición formados en un sustrato aislante, y una capa de reactivo que reacciona con una solución de muestra suministrada a la parte de electrodo. Cuando una tensión es

aplicada por un aparato de medición a una parte de electrodo del biosensor, se mide un valor de corriente, determinando de este modo un analito contenido en la solución de muestra y una sustancia reductora que está contenida en la solución patrón y usada para controlar la precisión de medición del aparato de medición. Cuando se mide la solución patrón, se produce un gran cambio en una forma de onda de corriente durante el primer periodo de tiempo cuando se aplica un primer potencial debido a la sustancia reductora y una forma de onda de corriente de oxidación diferente significativa aparece cuando un segundo potencial más pequeño que el primer potencial se aplica durante un segundo periodo de tiempo, discriminando de este modo si el líquido de analito que está siendo medido es la solución patrón o la solución de muestra e identificando fácilmente el tipo de líquido de analito.

El documento Hall J.W. et al, "Automated Determination of Glucose Using Glucose Oxidase and Potassium Ferrocyanide", Analytical Biochemistry, vol. 26, n.º 1, 1968, páginas 12-17 desvela que la glucosa se determina automáticamente usando ferrocianuro potásico como reductor en el sistema de glucosa oxidasa-peroxidasa. Esta modificación elimina el problema de arrastre encontrado cuando se usa o-tolidina o o-dianisidina como reductor.

Los inventores de la presente invención han buscado un procedimiento mejorado de distinción de soluciones de control de muestras biológicas. Sus procedimientos se describen con detalle a continuación.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para distinguir una solución de control de una muestra biológica durante el funcionamiento de un medidor electroquímico a través de un índice cuantitativo tal como se describe en las reivindicaciones adjuntas. En una realización, la invención es una solución de control que incluye cantidades conocidas de glucosa, un sistema tampón con un valor de pH adecuado y un compuesto de referencia interna. El compuesto de referencia interna se añade a la solución de control para identificar la solución de control mediante el sistema de monitorización de glucosa. La invención proporciona un procedimiento de detección de la presencia del compuesto de referencia interna, cálculo del índice cuantitativo, e identificación de que una solución de control está siendo ensayada.

En una realización, el analito en la muestra biológica es glucosa en sangre completa y el mediador es ferricianuro potásico. El compuesto de referencia interna es oxidable a un potencial más elevado que el potencial requerido para oxidar el mediador, que se usa para medir la oxidación de analito. La referencia interna tiene una concentración predeterminada en la solución de control junto con una concentración predeterminada de glucosa. El mediador relacionado con glucosa y la referencia interna se oxidan selectivamente en el electrodo mediante diferentes potenciales (bajos y altos). Cuando la glucosa es el analito, el compuesto de referencia interna debe ser oxidable a un potencial de al menos 100 mV más elevado que el potencial usado para reoxidar el mediador reducido.

Los compuestos de referencia interna útiles para medir la glucosa en soluciones de control incluyen cualquier especie oxidable en el electrodo a un potencial apropiado tal como compuestos organometálicos, compuestos de coordinación y compuestos de amina orgánica. La cantidad del compuesto de referencia interna usada está relacionada con la cantidad de glucosa en la solución de control. Preferentemente, la cantidad del compuesto de referencia interna se selecciona de modo que la solución de control pueda ser reconocida cuando la glucosa en la solución de control es el máximo requerido para ensayar el medidor de glucosa electroquímico. Como alternativa, la cantidad del compuesto de referencia interna puede modificarse en proporción con la cantidad de glucosa.

Comparar mediciones realizadas a potenciales bajos y altos proporciona un procedimiento para detectar el compuesto de referencia interna y, de este modo, la solución de control. Cuando el protocolo de medición emplea dos periodos separados por un periodo de reposo, las tensiones baja y alta pueden aplicarse en cualquier periodo o en ambos. Se aplica un potencial a un sensor que ha recibido la solución de control. La corriente producida a un potencial capaz de oxidar el compuesto de referencia interna se compara con la corriente producida cuando un potencial capaz de oxidar solamente el analito (por ejemplo glucosa), pero no el compuesto de referencia interna. La proporción entre las dos corrientes medidas, denominada el índice diferencia (ID), proporciona un medio para distinguir la solución de control de una muestra líquida que carece del compuesto de referencia interna.

$$ID = i_{\text{alta tensión}}/i_{\text{baja tensión}}$$

donde $i_{\text{alta tensión}}$ y $i_{\text{baja tensión}}$ son las corrientes medidas a tensiones alta y baja.
A la tensión más alta, tanto el compuesto de referencia interna como el mediador reducido se oxidan, mientras que a la tensión más baja solamente el mediador se oxida.

Un valor de ID de aproximadamente 1 indica que la muestra carece del compuesto de referencia interna y se supone que es una muestra biológica, mientras que un valor de ID significativamente mayor de 1, preferentemente al menos aproximadamente 1,5, indica que la muestra es una solución de control.

En otra realización, la invención es un compuesto de referencia interna adecuado para indicar la presencia de una solución de control que está siendo usada para ensayar la precisión de un sistema biosensor electroquímico/potencioestato. Cuando el analito es glucosa en sangre completa, el compuesto de referencia interna puede ser un compuesto organometálico oxidable, un compuesto de coordinación o una amina orgánica.

Un resultado de la presente invención es la mejora de la uniformidad de la corriente medida y la precisión del análisis resultante. Si se aplican potenciales altos y bajos durante el mismo periodo de oxidación, tales como los periodos de desaparición y de lectura usados en la oxidación de glucosa, es menos probable que factores externos, tales como el movimiento de la muestra o la temperatura ambiental afecten al índice diferencial. Múltiples lecturas de la corriente desarrollada a tensiones altas y/o bajas pueden mejorar la precisión de los resultados. Además, cuando se ha determinado la presencia de una solución de control, puede aplicarse un algoritmo de corrección de temperatura particular a la solución de control. Usando diferentes algoritmos de temperatura para la solución de control y la muestra biológica, (por ejemplo, sangre completa), los resultados clínicos se pueden mejorar y pueden asignarse valores del intervalo de control más estrechos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una vista en despiece ordenado de un biosensor.

La figura 2 es una vista en ensamblada del biosensor de la figura 1.

La figura 3 es un gráfico de potencial frente al tiempo para un periodo de desaparición.

La figura 4 es un gráfico de corriente frente al tiempo para el potencial aplicado como figura 3.

La figura 5 es un voltamograma cíclico descrito en el ejemplo 1.

La figura 6 es un voltamograma cíclico descrito en el ejemplo 2.

La figura 7 es un voltamograma cíclico descrito en el ejemplo 3.

La figura 8 es un voltamograma cíclico descrito en el ejemplo 4.

Las figuras 9A-E, ilustran secuencias de potencial descritas en el ejemplo 5.

Las figuras 10a-b son voltamogramas cíclicos descritos en el ejemplo 6.

La figura 11 es un gráfico de la corriente frente al tiempo obtenido en el ejemplo 7.

La figura 12 es un gráfico de la corriente frente al tiempo obtenido en el ejemplo 8.

Descripción detallada de los dibujos

Descripción de las realizaciones preferidas

La invención se describirá a continuación como aplicada a medir el contenido de glucosa de sangre completa, un procedimiento de importancia comercial. Sin embargo, el procedimiento de la invención presenta otras aplicaciones donde otros analitos tales como colesterol, urea, creatinina y creatina se encuentran en fluidos biológicos tales como orina, saliva y líquido intersticial, y donde se usan soluciones de control para comprobar la precisión de los medidores electroquímicos.

Biosensores electroquímicos

La presente invención no está limitada a un diseño de biosensor particular entre los muchos que han sido desvelados en la técnica. Un ejemplo de un biosensor que puede usarse se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.531.040, que se ilustra en las figuras 1 y 2.

El biosensor 10 se muestra en una vista en despiece ordenado en la figura 1. Éste comprende una base 12 aislante sobre la que se imprimen en secuencia (típicamente mediante técnicas de impresión en serigrafía), un patrón 14 conductor eléctrico, un patrón de electrodo (partes 16 y 18), un patrón 20 aislante (dieléctrico), y una capa 22 de reacción, y se completa mediante una capa 28 de cubierta. El capilar 30 formado entre la capa 28 de cubierta y la capa 22 de reactivo, proporciona una trayectoria de flujo para la muestra de ensayo de fluido. El biosensor se muestra en la figura 2 en la que todos los elementos en la base se muestran en el mismo plano.

La función de la capa 22 de reacción es realizar una reacción química con glucosa, u otro analito en la muestra de ensayo de fluido, y producir una corriente eléctrica que se mide y se correlaciona con la cantidad del analito presente. La capa 22 de reacción típicamente contiene una enzima o enzimas, y un aceptor de electrones. La enzima reacciona con el analito para producir electrones, que son transportados a la superficie del electrodo de trabajo mediante un aceptor de electrones. El aceptor de electrones, también denominado como mediador, que se reduce en respuesta a la reacción entre el analito y la enzima. La enzima en la capa de reacción puede combinarse con un polímero hidrófilo, tal como óxido de polietileno. Una enzima que puede usarse para reaccionar con glucosa es glucosa oxidasa y el mediador puede ser una sal de ferricianuro, usada con un tampón que mantiene un pH de aproximadamente 5-7. Otra enzima que puede usarse es glucosa deshidrogenasa, junto con un cofactor tal como pirroloquinolina quinona (PQQ), usada con un tampón que mantiene un pH de aproximadamente 6-8.

Las dos partes 16, 18 del patrón de electrodo proporcionan los electrodos de trabajo y contraelectrodos respectivos necesarios para determinar electroquímicamente la concentración de analito. Una característica del diseño mostrado es que el electrodo de trabajo y el contraelectrodo están configurados de modo que la parte fundamental del contraelectrodo esté ubicada aguas abajo (en términos de la dirección del flujo de fluido a lo largo de la trayectoria de flujo) de la parte expuesta del electrodo 16a de trabajo.

El subelemento 18a del contraelectrodo, sin embargo, está situado aguas arriba del elemento 16a superior del electrodo de trabajo de modo que cuando una cantidad de la muestra de fluido de ensayo (por ejemplo, una muestra de sangre completa) inadecuada para cubrir completamente al electrodo de trabajo entra en el espacio del capilar, se forma una conexión eléctrica entre el subelemento 18a del contraelectrodo y la parte expuesta del electrodo 16a de trabajo debido a la conductividad de la muestra de sangre completa. El área del contraelectrodo, sin embargo, que está disponible para contacto por la muestra de sangre completa es tan pequeña que solamente una corriente muy débil puede pasar entre los electrodos y, por lo tanto, a través del detector de corriente. Cuando la señal recibida está por debajo de cierto nivel predeterminado, el dispositivo sensor informa al usuario de que sangre insuficiente ha entrado en la cavidad del sensor y de que deber llevarse a cabo otro ensayo, o que debe añadirse más sangre. Aunque las dimensiones particulares de los electrodos no son críticas, el área del subelemento 18a del contraelectrodo es típicamente menor que aproximadamente el 10 % de la del electrodo de trabajo y, más específicamente, menor que aproximadamente el 6 %.

El electrodo de trabajo y el contraelectrodo se imprimen generalmente usando tinta para electrodos, que es generalmente de aproximadamente 14 μm (0,00055') de grosor y típicamente contiene carbono electroquímicamente activo. Los componentes de la tinta conductora pueden ser una mezcla de carbono y plata que se selecciona para proporcionar una trayectoria de resistencia poco conductora entre los electrodos y el medidor con el que están en conexión operativa mediante contacto con el patrón conductor en un extremo 26 de cola de pez del sensor. El contraelectrodo puede estar compuesto por plata/cloruro de plata aunque se prefiere carbono. Para mejorar la reproducibilidad de la lectura del medidor, el patrón dieléctrico aísla los electrodos de la muestra de ensayo de fluido excepto en un área definida cerca del centro del patrón 24 de electrodo. Con referencia a la figura 2, un área definida es importante en este tipo de determinación electroquímica dado que la corriente medida depende no solamente de la concentración de analito y el área de la capa 22 de reacción, sino también del área del electrodo 16a de trabajo que está expuesta a la muestra de ensayo que contiene analito.

Una capa 20 dieléctrica típica comprende un monómero, oligómero o polímero modificado de acrilato curado con radiación UV, y tiene aproximadamente 10 μm (0,0004') de grosor. La capa dieléctrica también puede ser curable por humedad o curable por calor. Una tapa o cubierta 28 está adaptada para coincidir con la base para formar un espacio para recibir a la muestra de ensayo de fluido en el que el contraelectrodo y el electrodo de trabajo están situados. La tapa 28 proporciona un espacio 30 cóncavo, y se forma típicamente gofrando una lámina plana de material deformable. La tapa 28 está perforada para proporcionar un orificio 32 de ventilación y unida a la base 12 en una operación de sellado. La tapa y la base pueden sellarse entre sí mediante soldadura sónica en la que la base 12 y la tapa 28 se alinean en primer lugar y a continuación se presionan entre sí entre un miembro o cuerno termosellante vibratorio y una mandíbula estacionaria. El contacto se establece solamente con las regiones planas, no gofradas de la tapa. La energía ultrasónica procedente de un cristal u otro transductor se disipa como calor en la junta polimérica que permite la unión de los materiales termoplásticos. La tapa gofrada y la base también pueden unirse usando un material adhesivo en la parte inferior de la tapa. El procedimiento de unión de la tapa y la base se describe más completamente en la patente de Estados Unidos n.º 5.798.031.

Los materiales adecuados para la base 12 aislante incluyen policarbonato, polietilenterefetalato, polímeros de vinilo y acrílicos dimensionalmente estables, y mezclas poliméricas tales como policarbonato/ polietilenterefetalato y estructuras de láminas metálicas (por ejemplo, un laminado de nylon/aluminio/cloruro de polivinilo). La tapa típicamente está fabricada a partir de un material laminado polimérico deformable tal como policarbonato, o de calidad no gofrable de polietilenterefetalato, polietilenterefetalato modificado con glicol, o una composición de lámina metálica (por ejemplo, una estructura de lámina de aluminio).

Otros diseños de sensor electroquímico pueden usarse en la presente invención. Los ejemplos de un sensor electroquímico que pueden usarse para medir las concentraciones de glucosa son los usados en los sistemas de Bayer HealthCare Ascensia™ DEX® y ELITE®. Pueden encontrarse más detalles sobre dichos sensores electroquímicos en la patente de Estados Unidos n.º 5.120.420 y la patente de Estados Unidos n.º 5.320.732. Otros sensores electroquímicos están disponibles de Matsushita Electric Industrial Company. Un ejemplo adicional de un sensor electroquímico que puede usarse es un sistema de monitorización amperométrica se desvela en la patente de Estados Unidos n.º 5.429.735.

Los sensores electroquímicos pueden estar ubicados en un instrumento de dispensado de sensores de glucemia cargado con una pluralidad de sensores o elementos de ensayos. Un ejemplo de un paquete sensor cargado en un instrumento de dispensado de sensores se desvela en la patente de Estados Unidos n.º 5.660.791.

Medición de la glucosa en sangre completa

En un biosensor típico para medir el contenido de glucosa de sangre completa, el electrodo de trabajo y el contraelectrodo están revestidos con una única capa de reactivo mediante coimpresión o codepósito. La capa de reactivo incluirá típicamente algunos polímeros y los ingredientes reactivos, es decir, una enzima que oxida la glucosa en la muestra de sangre y un mediador, es decir un compuesto redox que reoxida la enzima después de que ha sido reducida al oxidar la glucosa. El mediador reducido porta electrones desde la reacción enzimática de oxidación de glucosa al electrodo de trabajo y se reoxida en la superficie del electrodo. El diferencial de tensión aplicado entre los dos electrodos da como resultado que el mediador pasa electrones al electrodo de trabajo, creando una corriente medible que es proporcional a la cantidad de glucosa en la muestra. El biosensor también puede comprender múltiples capas de reactivo, o puede comprender diferentes capas de reactivo individuales o múltiples en cada electrodo, electrodo de trabajo y contraelectrodo.

Tal como se ha descrito anteriormente, los sensores amperométricos aplican un potencial fijo a través de los electrodos y la corriente producida se mide durante un periodo de tiempo predeterminado, que puede ser bastante corto, digamos de 5 a 10 segundos, para corregir el sesgo que puede estar presente debido a la reducción prematura del mediador. En un sistema preferido se aplica un potencial durante dos periodos de tiempo, separados por un periodo de reposo. Un gráfico representativo del potencial frente al tiempo para el primer periodo o "de desaparición" se presenta en la figura 3. La figura 4 muestra un gráfico representativo de corriente frente al tiempo que resulta. La corriente aumenta hasta un pico mientras la muestra está rehidratando la capa de reactivo, permitiendo que las reacciones de oxidación y reducción se produzcan y a continuación disminuye a medida que la difusión comienza a ejercer el control. Después de este breve periodo, el potencial aplicado se elimina o al menos se reduce durante un periodo de reposo, mientras que la oxidación de glucosa y la reducción del mediador continúan. A continuación, el potencial se reaplica durante un segundo periodo y la corriente se mide durante el periodo "de lectura", (por ejemplo, diez segundos). Dado que el mediador reducido está presente como resultado de la oxidación concomitante de la enzima, la corriente producida inicialmente es alta, pero a continuación disminuye rápidamente y se aproxima a un estado controlado por difusión en situación de equilibrio. La corriente registrada al final del corto periodo "de lectura" se usa para determinar el contenido de glucosa de la muestra de sangre, a través de una correlación obtenida previamente entre la corriente al final del periodo de lectura y la glucosa contenida en muestras de ensayo que tienen concentraciones conocidas.

Soluciones de control

Tal como se ha descrito anteriormente, se han emprendido diversas estrategias para garantizar que una solución de control proporciona lecturas apropiadas y puede distinguirse de una muestra biológica. La presente invención emplea una especie oxidable (es decir, una referencia interna) que es oxidable solamente a tensiones más elevadas que los usados para mediciones de glucosa (u otro analito). Esto significa que a un potencial bajo adecuado para oxidar completamente el mediador relacionado con glucosa, pero no el compuesto de referencia interna, solamente se medirá la glucosa. Sin embargo, cuando el potencial es suficientemente alto para oxidar el compuesto de referencia interna añadido, tanto la glucosa como el compuesto de referencia interna se oxidarán. Aunque la glucosa se oxida al potencial más elevado, la medición realizada a una tensión más baja ya está limitada por la difusión y no depende de la cantidad total de glucosa oxidada por la enzima. Es factible, por lo tanto, añadir dichas especies de referencia interna a una solución de control y usarlas para identificar la solución como un control y no como una muestra biológica.

La diferencia entre las corrientes medidas a tensiones alta y baja puede compararse para indicar la presencia de la referencia interna característica de la solución de control. El índice diferencial (ID) siguiendo componentes de corriente relacionados con la glucosa y el compuesto de referencia interna:

$$ID = i_{\text{alta tensión}} / i_{\text{baja tensión}} = (i_{\text{ref int}} + i_{\text{glucosa}}) / i_{\text{glucosa}} = 1 + i_{\text{ref int}} / i_{\text{glucosa}}$$

donde $i_{\text{alta tensión}}$ es la corriente medida a la tensión más alta
$i_{\text{baja tensión}}$ es la corriente medida a la tensión más baja

Es lógico que, si la referencia interna no está presente (tal como en las muestras de sangre), $i_{\text{ref int}}$ debe ser cero y $i_{\text{alta tensión}}$ será sustancialmente la misma que $i_{\text{baja tensión}}$. Por lo tanto, el valor de ID se aproximará a 1. Cuando la referencia interna está presente, el valor de ID será mayor de 1, dependiendo de la cantidad del compuesto de referencia con respecto a la cantidad de glucosa. Si la cantidad de referencia interna añadida a la solución de control proporciona una corriente similar a la de la oxidación del mediador relacionado con glucosa, el valor de ID puede ser aproximadamente 2. La referencia interna puede estar incluida en una cantidad adecuada para soluciones de control correspondientes a una alta concentración de glucosa. Es típico usar varias soluciones de control correspondientes a concentración de glucosa baja, normal y elevada para ensayar un medido de glucosa. Si, por ejemplo, la cantidad de la referencia interna se selecciona de modo que el valor de ID sea 1,75 o mayor para la concentración de glucosa más elevada en la solución de control, la corriente procedente de la referencia interna será relativamente grande en comparación con la corriente para la glucosa en la solución de control con la glucosa más baja. A continuación, la misma cantidad de la referencia interna usada con una solución de control que tiene una baja concentración de glucosa proporcionará un valor aún más elevado de ID. Dichos valores de ID proporcionarán mayor confianza en la

presencia de una solución de control, en lugar de una muestra biológica, tal como sangre completa. Claramente, un índice cuantitativo tal como el valor de ID presenta una ventaja respecto a los procedimientos más cualitativos que dependen de la forma de la curva de corriente frente al tiempo en los periodos de desaparición o de lectura, según se ha sugerido en otras patentes. La adición de una referencia interna oxidada a una tensión más alta proporciona un resultado que es independiente de la reacción enzimática y la composición de la solución de control.

En una realización, la cantidad del compuesto de referencia interna añadido a la solución de control está relacionada con la cantidad de glucosa presente. Es decir, la cantidad de la referencia interna en la solución de control es proporcional a la concentración de glucosa para mantener un valor de ID aproximadamente constante. Un procedimiento es usar suficiente de la referencia interna para proporcionar un ID de aproximadamente 1,5 o superior cuando se usa la cantidad máxima de glucosa a aproximadamente 300 mg/dl. A continuación, la cantidad de la referencia interna se reduce de modo que soluciones de control que contienen concentraciones más bajas de glucosa mantengan un valor de ID de 1,5 o superior.

Añadir una referencia interna a soluciones de control hace posible distinguir fácilmente entre soluciones de control y muestras biológicas y proporciona una precisión del análisis mejorada. Compuestos de referencia interna pueden ser cualquier compuesto oxidable electroquímicamente a un potencial deseado. Es importante entender que no todos los compuestos oxidables químicamente son oxidables electroquímicamente a un potencial apropiado o a cualquier potencial oxidable. Las especies químicamente oxidables (por ejemplo, en una solución homogénea) pueden no ser oxidables electroquímicamente a un potencial apropiado, dado que debe superarse la barrera cinética de transferencia de electrones. Por lo tanto, un agente reductor mediante naturaleza química puede no ser electroquímicamente oxidable en el electrodo. Dependiendo del potencial redox del mediador en el sistema sensor de reactivo, se necesitarán compuestos de referencia interna con potenciales redox diferentes. Por ejemplo, si el mediador en el sistema de reactivo es hexaamina de rutenio (Ru(NH3)6+3), el compuesto de coordinación ferrocianuro potásico o los compuestos organometálicos ferroceno y sus derivados pueden usarse como referencia interna en la solución de control. Por otro lado, si el mediador es ferricianuro en el sistema de reactivo, entonces otros compuestos tales como Bis-Tris o 4-amino benzonitrilo puede usarse como referencia interna en la solución de control. En cada caso, el compuesto de referencia interna tendrá un potencial redox que es al menos 100 mV más elevado que el potencial redox del mediador.

Los ejemplos de los compuestos de referencia interna incluyen, aunque sin limitarse a, aminas orgánicas tales como ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico [MOPS], ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico) [HEPES], ácido 2-[-hidroxi-1,1-bis (hidroximetil)etilamino]etanosulfónico [TES], ácido 2-morfolinoetanosulfónico [MES], Bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano [Bis-Tris], 4-aminobenzonitrilo, ácido 4-aminobenzoico y 4-yodoanilina. En los ejemplos a continuación, Bis-Tris y varios otros compuestos han demostrado ser una referencia interna útil para uso en soluciones de control que contienen glucosa.

Aunque puede usarse Bis-Tris como una referencia interna, también puede servir como tampón. El pH de la solución de control es un importante factor en la reacción en la que la glucosa es oxidada por una enzima, tal como glucosa oxidasa. Para la medición de glucosa, un pH de aproximadamente 5 a 7 se prefiere cuando se usa glucosa oxidasa, mientras que un pH de aproximadamente 6-8 se prefiere cuando se usa glucosa deshidrogenasa. Se proporciona un tampón habitualmente para garantizar que la oxidación de glucosa continúa a la velocidad esperada. Una ventaja de la presente invención es que el compuesto de referencia y el tampón puedan separarse, con cada uno sirviendo para una función diferente, permitiendo de este modo la optimización de cada función (tampón y referencia interna) por separado. Los tampones pueden seleccionarse entre los compatibles con el reactivo enzimático. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitarse a, tampón de citrato y tampón de fosfato.

Los materiales poliméricos usados para imitar las propiedades fluídicas de la sangre pueden incluir óxido de polietileno, metacrilato de polihidroxietilo, polivinilpirrolidona (PVP), goma xantana, en cantidades de aproximadamente el 12 al 20 % en peso. La glucosa está típicamente presente en soluciones de control en las cantidades equivalentes a aproximadamente 30 a 400 mg/dl, un intervalo que abarca el contenido de glucosa esperado de las muestras de sangre.

Otros aditivos pueden incluir sales, tampones, colorantes, agentes antimicrobianos, polímeros, agentes espesantes, y tensioactivos.

Modo de funcionamiento de la solución de control

Será obvio que introducir un material de referencia interna oxidable a una tensión más alta que la usada para oxidar el mediador relacionado con glucosa hará necesario aplicar la tensión más alta en algún punto durante el protocolo de medición. Cuando se usan dos periodos tal como se ha descrito anteriormente, es decir periodos "de desaparición" y "de lectura", pueden usarse diversas combinaciones de saltos de potencial dentro y a través de los periodos de desaparición y de lectura para proporcionar tanto un valor de ID que identifica la solución de control como una corriente a partir de la cual podría determinarse el contenido de glucosa de la solución de control.

Podrían aplicarse tensiones tanto bajas como altas durante el periodo de desaparición para detectar la presencia de la referencia interna, mientras que solamente se usa una tensión baja durante el periodo de lectura. Esta

combinación de saltos de potencial seguiría manteniendo el principio de trabajo de tomar la proporción de la corriente desde una alta tensión con la de una baja tensión. Un cambio distinto en la corriente se observaría cuando se realiza un cambio desde una tensión baja a una tensión alta o viceversa. No es necesario que la tensión "baja" sea idéntica a la usada en el periodo de lectura para medir la glucosa. La tensión comparativa podría ser simplemente más bajo que el necesario para oxidar la referencia interna. Dado que el periodo de desaparición corresponde a un momento en el que la muestra está hidratando los reactivos, la corriente puede cambiar durante el periodo de desaparición, tal como se sugiere en el diagrama genérico de la figura 4. Por consiguiente, puede ser una ventaja realizar más de un desplazamiento entre tensiones alta y baja para garantizar que los valores de ID no resultan afectados por cambios de la disponibilidad del reactivo durante el periodo de desaparición.

En otro procedimiento alternativo, se usa una tensión alta (es decir, una que oxida la referencia interna) durante una parte del periodo de lectura. Por lo tanto, el ID puede determinarse durante el periodo de lectura midiendo las corrientes alta y baja solamente durante el periodo de lectura. Este procedimiento puede proporcionar una ventaja en que cualquier variación de la disponibilidad del reactivo observada en el periodo de desaparición es evitada. De nuevo, usar más de un desplazamiento entre tensiones baja y alta puede ser ventajoso.

En otra realización de la invención, el ciclado de potencial frecuente entre tensiones alta y baja se usa para afectar a la forma de la corriente frente al tiempo durante el periodo de lectura, que se muestra genéricamente en la figura 4. La curva típicamente muestra una rápida disminución de la corriente causada por el agotamiento del mediador reducido en y cerca de la superficie del electrodo. Por lo tanto, el contenido de glucosa total se determina mediante correlación con la corriente limitada por difusión, en lugar de medir la glucosa total en la solución de control. Es evidente que el momento seleccionado como una medida de la glucosa es importante si se tienen que obtener mediciones uniformes y precisas.

En general, soluciones de control de la invención contendrán un compuesto que puede oxidarse electroquímicamente a un potencial mayor que la necesaria para oxidar glucosa. Dado que la oxidación del mediador relacionado con la glucosa (por ejemplo, ferricianuro potásico) requiere un potencial de 200 mV con respecto al potencial en el contraelectrodo de ferricianuro, el potencial de oxidación para el compuesto de referencia interna debe ser al menos 400 mV con respecto al mismo contraelectrodo. Por ejemplo, usando Bis-Tris como referencia, el potencial de oxidación es de aproximadamente 600 mV si el contraelectrodo está soportado por la reducción de ferricianuro. Otros ejemplos incluyen 4-aminobenzonitril, ácido 4-aminobenzoico, 4-yodoanilina, que también puede oxidarse en un intervalo de potencial de + 400 a + 600 mV con respecto al potencial en el contraelectrodo soportado por la reducción del ferricianuro.

Un procedimiento de examen del efecto de añadir una referencia interna a soluciones de control es usar voltametría cíclica. En lugar de aplicar un potencial fijo, se usa un potencial variable, barriendo de negativo a positivo con respecto al contraelectrodo. Los siguientes ejemplos ilustran el concepto y la aplicación de referencia interna y su procedimiento para auto-detección de soluciones de control.

Ejemplo 1

Una solución acuosa que contenía NaCl 50 mM se comparó con otra solución que contenía NaCl 50 mM y Bis-Tris 50 mM como referencia interna. Un segundo conjunto de muestras que contenían la misma composición, pero que incluían 350 mg/dl de glucosa, se ensayaron. No se incluyó ninguna enzima o mediador, de modo que la oxidación de glucosa no se producía. La figura 5 muestra la corriente frente al potencial a medida que la diferencia de potencial se ciclaba entre -400 mV y +1200 mV a 25 mV/s frente a un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata usando la estación de trabajo electroquímico de CH Instrument Co. Puede verse que la corriente no empezaba a fluir entre los electrodos hasta que se alcanzaba una diferencia de potencial de +600 mV. Para las muestras que no contenían Bis-Tris, la corriente de oxidación es sustancialmente cero durante todo el intervalo de potencial. Por otro lado, cuando Bis-Tris estaba presente, había una corriente significativa a +800 mV, comenzando a aproximadamente +600 mV. Puede concluirse que la oxidación de Bis-Tris es la misma con y sin glucosa presente cuando no hay enzima ni mediador presentes. Cuando se comparan las corrientes voltamétricas a + 800 mV entre voltamogramas con y sin Bis-Tris en la figura 5, las soluciones que contienen Bis-Tris 50 mM fueron distinguidas claramente.

Ejemplo 2

En este ejemplo, se repitieron los ensayos del ejemplo 1, tal como se muestra en la figura 6, excepto que el contraelectrodo era carbono con una capa de ferricianuro potásico, en lugar del contraelectrodo de $Ag/AgCl_2$ usado en el ejemplo 1. La oxidación de Bis-Tris no resulta afectada por la presencia o ausencia de glucosa, cuando enzimas y mediadores no están incluidos. Sin embargo, la corriente de oxidación comienza a aumentar después de +400 mV y alcanza una magnitud significativa a +600 mV. Por lo tanto, en comparación con las características voltamétricas en la figura 5, las corrientes de fondo siguen siendo sustancialmente nulas sin la referencia interna. La única diferencia es el aumento de la corriente de oxidación a un potencial más bajo. Esta diferencia se debe completamente al diferente contraelectrodo. Es significativo que no hay corriente de oxidación por debajo de +400 mV. Por lo tanto, puede verse que Bis-Tris se distingue claramente de la oxidación de glucosa, que comienza justo por encima de potencial nulo, tal como se verá en el siguiente ejemplo.

Ejemplo 3

Los ejemplos 1 y 2 mostrados en las figuras 5 y 6 muestran la presencia de la referencia interna (Bis-Tris) en soluciones con o sin glucosa, pero en ausencia de la glucosa oxidasa y el mediador necesario para detectar la presencia de glucosa. En el ejemplo mostrado en la figura 7, se usaron las soluciones de los ejemplos 1 y 2, pero glucosa oxidasa y ferricianuro potásico (mediador) están incluidos, de modo que cuando la glucosa está presente, se oxida como como en sensores de glucosa electroquímicos. Comparando la figura 7 con la figura 6, las características voltamétricas tal como se ven en los voltamogramas cíclicos (patrones de corriente frente a potencial) difieren significativamente. Los picos de corriente de oxidación que se producen aproximadamente a cero voltios indican que la glucosa está siendo oxidada. Cuando nada de glucosa estaba presente, solamente se produjo una pequeña corriente dado que el potencial se movía por encima de 0 mV debido a cierta actividad de fondo. Cuando 350 mg/dl de glucosa están presentes, se produce una cantidad significativa de corriente con los picos característicos por encima y por debajo de 0 mV. Se alcanzó un estado de situación de equilibrio a aproximadamente +400 mV, que podría usarse para correlacionar con la cantidad de glucosa presente. A niveles de glucosa tanto de 0 como de 350 mg/dl, las corrientes de oxidación antes de 400 mV son iguales con y sin la adición del compuesto de referencia interna. Cuando el potencial alcanza +600 mV, la corriente observada con soluciones que contienen Bis-Tris siempre es más alta que aquellas sin Bis-Tris, ya sea la concentración de glucosa 0 ó 350 mg/dl. Por lo tanto, la solución de control que contiene el compuesto de referencia interna puede identificarse.

Ejemplo 4

Se usó Bis-Tris como compuesto de referencia en los ejemplos 1-3. En este ejemplo, se muestran varios compuestos de referencia interna más. La figura 8 muestra voltamogramas cíclicos de tres compuestos de referencia interna adicionales, ácido 4-aminobenzoico, 4-aminobenzonitrilo y 4-yodoanilina. Estos tres voltamogramas cíclicos se obtuvieron de las tiras sensoras de glucosa comerciales de Ascensia AUTODISC® (DEX). Se añadieron tres especies de referencia interna individualmente a una solución equivalente de control de polímero de PVP al 20 - 24 %, pH 5 - 5,5 en tampón de citrato, pero sin glucosa. La concentración de ácido 4-aminobenzoico, 4-aminobenzonitrilo y 4-yodoanilina eran, cada una, 50 mM. Puede verse a partir de la figura 8 que mientras que los primeros picos de oxidación justo después de cero voltios son sustancialmente idénticos, las corrientes después de +0,3 voltios difieren dependiendo del compuesto de referencia interna incluido. En la figura 8, el potencial entre 0,1 V y 0,3 V se considera como potencial bajo que se usa para medir glucosa oxidando el mediador solamente. El potencial comenzando en +0,4 voltios hasta +0,8 voltios se considera el potencial alto responsable de oxidar tanto el mediador como la referencia interna. En la región de potencial de +0,3 a +0,8 voltios, todas las corrientes son más altas cuando una referencia interna estaba presente que cuando no se añadió ninguna referencia interna a la solución de control.

Ejemplo 5

Hay muchas maneras de combinar potenciales altos y bajos para oxidar y medir la referencia interna para detectar la presencia de una solución de control mientras se sigue midiendo la concentración de glucosa. Las figuras 9A-E muestran algunas de las secuencias de potencial (formas de onda) para combinar potenciales altos y bajos. En cada caso un periodo "de desaparición" viene seguido por un periodo de espera y a continuación un periodo "de lectura" tal como se ha descrito anteriormente. La figura 9A muestra una secuencia de potencial con la tensión alta en el periodo de desaparición y la tensión baja en el periodo de lectura, que es equivalente a la simple secuencia de potencial Desaparición-Espera-Lectura. La figura 9B muestra una secuencia de potencial de acuerdo con la presente invención con la tensión baja en la primera mitad del periodo de desaparición seguido por una tensión alta en el mismo periodo de desaparición. En la figura 9C, una secuencia de potencial con la tensión alta en la primera mitad del periodo de desaparición que viene seguido por una tensión baja en el mismo periodo de desaparición. La figura 9D muestra una secuencia de potencial con la tensión alta en la primera mitad del periodo de lectura seguido por una tensión baja en el mismo periodo de lectura. En la figura 9E, se muestra una secuencia de potencial de acuerdo con la presente invención con la tensión baja en la primera mitad del periodo de lectura seguido por una tensión alta en el mismo periodo de lectura.

Ejemplo 6

Las figuras 10a-b ilustran el efecto de incrementar la concentración de la referencia interna, en este caso Bis-Tris. En la figura 10a, una solución equivalente de control (es decir, sin glucosa) que contiene NaCl 50 mM muestra el efecto de incrementar la concentración de referencia interna desde 0 a 50 mM y hasta 100 mM de Bis-Tris (con NaCl 100 mM). La presencia de Bis-Tris es claramente visible e incrementar su concentración incrementa adicionalmente la corriente a +600 mV. En la figura 10b, 350 mg/dl de glucosa están presentes en la solución de control de la misma composición, tal como se indica mediante los grandes picos justo por encima de 0 mV. Dado que la corriente de glucosa sigue siendo notable a aproximadamente +600 mV, detectar la presencia de Bis-Tris requiere una mayor cantidad que cuando no está presente glucosa. Por lo tanto, la concentración de la referencia interna debe ser tal que una clara indicación de su presencia pueda detectarse cuando la solución de control contiene una alta concentración de glucosa. A continuación, cuando la solución de control contiene una concentración de glucosa más baja, la presencia de la referencia interna será aún más evidente.

Ejemplo 7

Para este ejemplo, se realizaron ensayos comparando soluciones de control con y sin Bis-Tris añadido como referencia interna y una muestra de sangre completa. En los tres casos, las muestras fueron tiras reactivas comerciales Ascensia AUTODISC®. La secuencia de ensayo fue aplicar un potencial de +400 mV durante 4 segundos, a continuación +600 mV durante 4 segundos, reposo en circuito abierto (sin aplicar potencial al electrodo) durante 5 segundos, y a continuación aplicar +200 mV durante 5 segundos. Los perfiles de corriente para los tres tipos de muestras se muestran en la figura 11. El índice diferencial (ID) se calculó para dos comparaciones. Caso I-a: la corriente medida a 8 segundos del periodo de desaparición se compara con la corriente a 4 segundos del periodo de desaparición. Caso I-b: la corriente medida a 8 segundos del periodo de desaparición se compara con la corriente a 2 segundos del periodo de lectura. No se añadió glucosa a la solución de ensayo de NaCl 100 mM y Bis-Tris 100 mM o a la muestra de sangre completa. El caso I-a es equivalente a la secuencia de la figura 9B, mientras que el caso I-b es equivalente a la figura 9A. Los valores de ID y los cambios relativos de los valores de ID de estos ensayos se muestran en la Tabla 2. En ambos casos, el valor de ID de la solución de control con la referencia interna Bis-Tris es del orden del 500 % de los valores de ID encontrados cuando la solución de control y la sangre completa no contenían referencia interna. Estos resultados indican que la solución de control con la referencia interna puede detectarse fácilmente, en comparación con una solución de control o sangre completa que carece del compuesto de referencia.

Tabla 2 Valores de ID y % de cambio de los valores de ID a glucosa 0

	Solución de ensayo		
	Con Bis-Tris	Sin Bis-Tris	Sangre completa
B8/B4, ID (Caso I-a)	5,5	0,8	0,8
Desv. típica	0,6	0,1	0,08
% de C.V.	11,4	10,1	10,0
% de cambio frente a referencia interna	-	563	603
B8/R2, ID (Caso I-b)	10,7	1,7	1,8
Desv. típica	1,5	0,23	0,13
% de C.V.	14,1	13,6	7,5
% de cambio frente a referencia interna	-	522	503

Ejemplo 8

Los ensayos del ejemplo 7 se repitieron, pero la solución de control contenía 350 mg/dl de glucosa y la muestra de sangre completa 400 mg/dl de glucosa. Se usó la misma secuencia de potencial para este ensayo. Los perfiles de corriente típicos para las tres muestras se muestran en la figura 12 para concentraciones de glucosa elevadas. Los valores de ID y el cambio relativo de los valores de ID se describen en la tabla 3. Los valores de ID en la tabla 2 para los casos II-a y II-b son los mismos que en el ejemplo 7 y también lo son los cambios relativos de los valores de ID con la referencia interna respecto a aquellos sin la referencia interna y las muestras de sangre completa. Para la elevada concentración de glucosa a 350 mg/dl, el valor de ID para la solución de control con la referencia interna es del orden del 100 % más elevado que el de las muestras de sangre completa. Esta diferencia de ID garantiza que la solución de control con una referencia interna pueda distinguirse de una solución de control que carece de la referencia interna y la muestra de sangre completa.

Tabla 3 Valores de ID y % de cambios del valor de ID a glucosa elevada

	Solución de ensayo		
	Con Bis-Tris	Sin Bis-Tris	Sangre completa
B8/B4, ID (Caso II-a)	2,3	1,2	1,0
Desv. típica	0,26	0,13	0,07
% de C.V.	11,6	11,0	7,0
% de cambio frente a referencia interna	-	96	127
B8/R2, ID (Caso II-b)	1,7	0,9	0,9
Desv. típica	0,09	0,03	0,03
% de C.V.	5,5	3,9	3,1
% de cambio frente a referencia interna	-	95	78

Protocolos para ensayar la solución de control

La comparación de las corrientes producidas durante los periodos de desaparición y de lectura podría realizarse de muchas maneras. Algunas secuencias de ensayo se ilustran en el ejemplo 5 y la figura 9. En la alternativa más sencilla, se realiza una medición al potencial necesario para oxidar el compuesto de referencia interna y se realiza otra medición al potencial más bajo usado para oxidar el analito. A continuación, se calcula el índice diferencial y, en base a los resultados, el medidor electroquímico comunica que una solución de control o que una muestra biológica está siendo ensayada. Preferentemente, la primera medición se realiza durante la parte tardía del periodo de desaparición y la segunda durante el periodo de lectura, pero ambas mediciones podrían tomarse durante el periodo de desaparición o durante el periodo de lectura. El periodo de tiempo requerido para obtener lecturas de corriente podría modificarse, por ejemplo entre aproximadamente 1 y 10 segundos. Sin embargo, siempre que las lecturas de corriente sean suficientemente largas para representan apropiadamente la presencia del compuesto de referencia interna o la glucosa, puede usarse cualquier periodo de tiempo.

Para fiabilidad adicional en los resultados, puede usarse más de un periodo para los potenciales tanto alto como bajo. Es decir, el potencial para oxidar la referencia interna, digamos +600 mV para Bis-Tris, y el potencial para oxidar glucosa, digamos +200-400 mV pueden aplicarse más de una vez durante el periodo de desaparición o el periodo de lectura.

También es factible aplicar potenciales que son más elevados de lo requerido para la oxidación del analito o la referencia interna. Es decir, si el potencial de oxidación para el mediador de glucosa es +200 mV, por ejemplo, entonces podría usarse un potencial de +200 mV y superior con el límite estando en el potencial al que se oxida la referencia interna.

En una realización, se usan múltiples variaciones en los potenciales aplicados para proporcionar una indicación más uniforme de la diferencia entre la corriente medida a potenciales altos y bajos. Además, ciclar los potenciales presenta la ventaja de suavizar las curvas de corriente frente al tiempo y mejorar la precisión. Por ejemplo, el potencial aplicado puede ciclarse entre los valores alto y bajo cada 1 segundo durante los periodos de desaparición y/o de lectura.

Aunque la invención es susceptible a diversas modificaciones y formas alternativas, se muestran realizaciones específicas a modo de ejemplo en los dibujos y se describen con detalle. Debe entenderse, sin embargo, que no se pretende limitar la invención a las formas particulares desveladas, más bien al contrario, la intención es abarcar todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que están dentro del alcance de la invención, tal como se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para distinguir una solución de control de una muestra biológica durante la operación de un sensor electroquímico, midiendo el sensor electroquímico la cantidad de un analito, comprendiendo el procedimiento las acciones de:

proporcionar una solución de control que incluye un compuesto de referencia interna, un tampón y una cantidad predeterminada de analito, teniendo dicho compuesto de referencia interna un potencial mayor que el potencial necesario para medir la oxidación de dicho analito, siendo dicho compuesto de referencia interna diferente de dicho tampón;
proporcionar un sensor (10) electroquímico que tiene un electrodo (16) de trabajo, un contraelectrodo (18) y al menos un reactivo (22);
introducir dicha solución de control en el sensor electroquímico;
aplicar un primer potencial a dicho sensor electroquímico suficiente para oxidar dicho analito e insuficiente para oxidar dicho compuesto de referencia interna, y medir la primera corriente eléctrica resultante;
después de aplicar el primer potencial, aplicar un segundo potencial a dicho sensor electroquímico, siendo dicho segundo potencial suficiente para oxidar dicho analito y dicho compuesto de referencia interna, y medir la segunda corriente eléctrica resultante;
en respuesta a que la proporción de la segunda corriente eléctrica respecto a la primera corriente eléctrica es suficientemente mayor que 1, determinar que está presente una solución de control, y
en respuesta a que la proporción de la segunda corriente eléctrica respecto a la primera corriente eléctrica es de aproximadamente 1, determinar que está presente una muestra biológica.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho analito es glucosa.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra biológica.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la muestra biológica es sangre completa.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto de referencia interna es un compuesto organometálico oxidable, un compuesto de coordinación o un compuesto de amina orgánica.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el compuesto de referencia interna es un compuesto de amina orgánica.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el compuesto de amina orgánica es ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico, ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N^1-(2-etanosulfónico), ácido 2-[(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etilamino]etanosulfónico, ácido 2-morfolinoetanosulfónico, bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano [Bis-Tris], 4-aminobenzonitrilo, ácido 4-aminobenzoico o 4-yodoanilina.

8. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el compuesto de referencia interna es un compuesto organometálico oxidable.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el compuesto organometálico oxidable es ferroceno o un derivado de ferroceno.

10. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el compuesto de referencia interna es un compuesto de coordinación.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el compuesto de coordinación es ferrocianuro potásico.

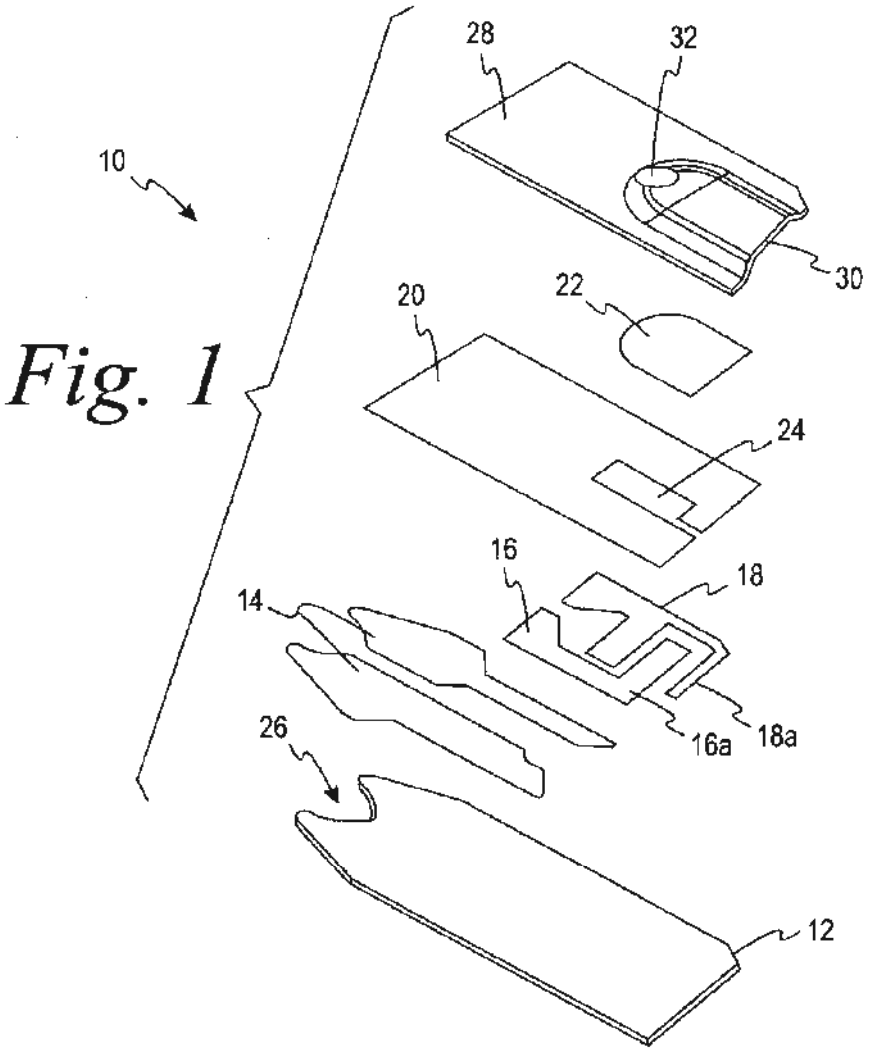
10
28
32
30
20
22
24
16
18
14
16a
18a
26
12

Fig. 1

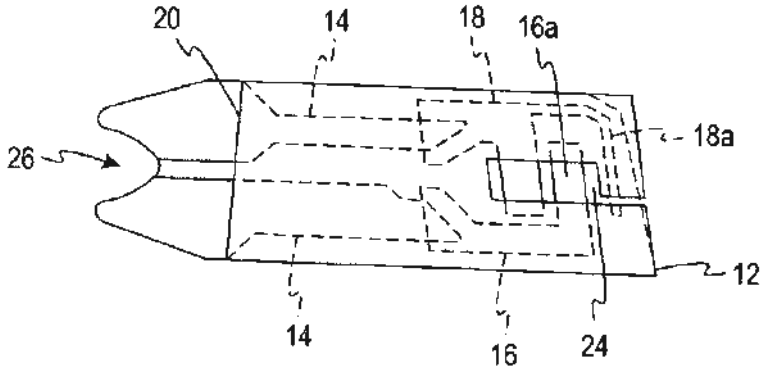
20
14
18
16a
18a
26
12
14
16
24

Fig. 2

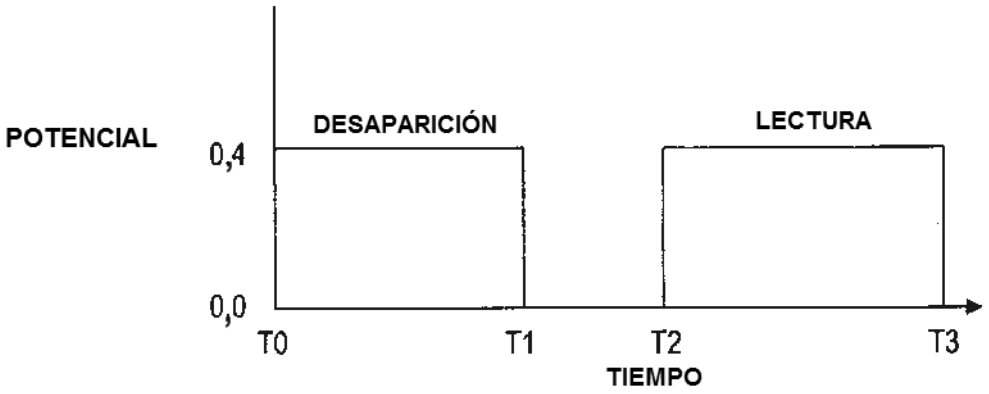
POTENCIAL
DESAPARICIÓN
LECTURA
0,4
0,0
T0
T1
T2
T3
TIEMPO

Fig. 3

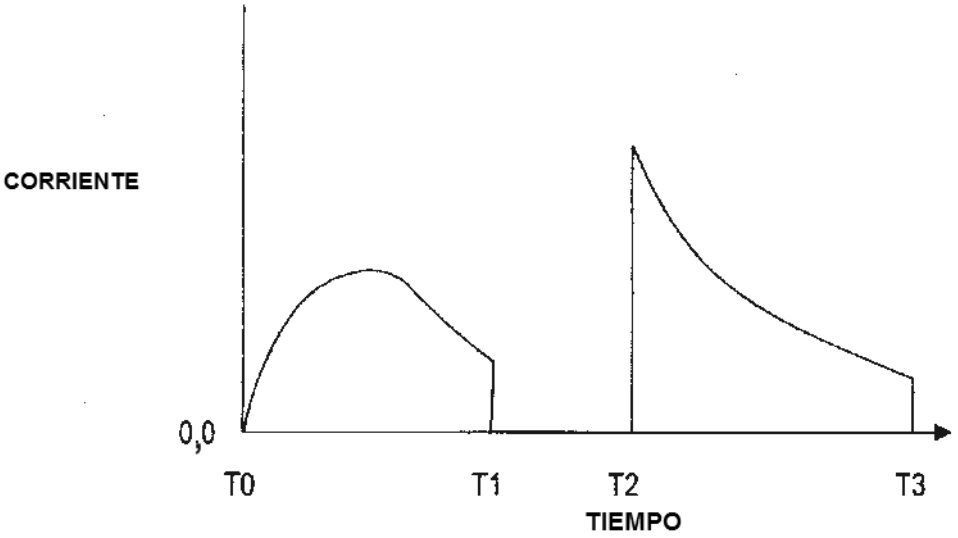
CORRIENTE
0,0
T0
T1
T2
T3
TIEMPO

Fig. 4

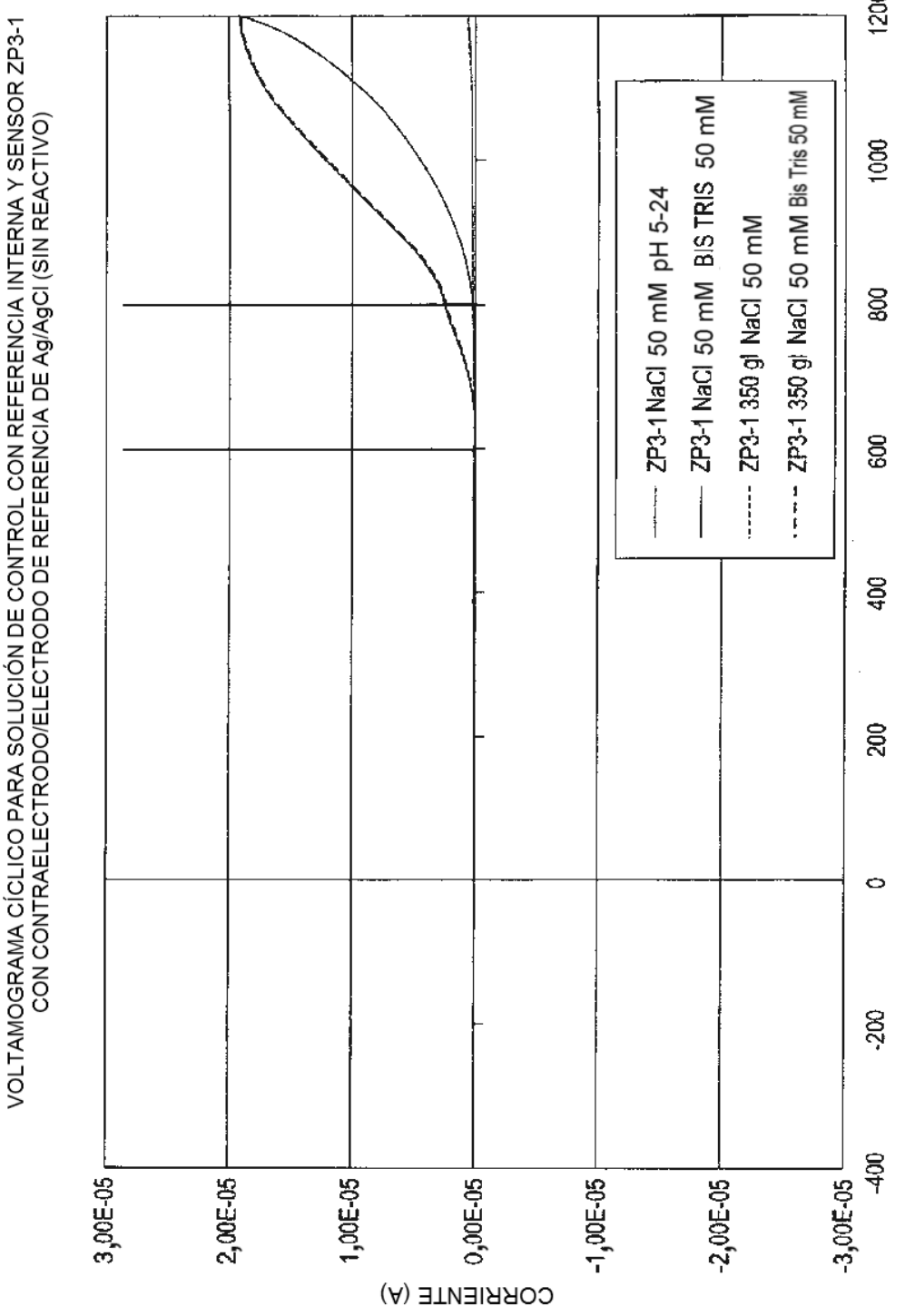
VOLTAMOGRAMA CÍCLICO PARA SOLUCIÓN DE CONTROL CON REFERENCIA INTERNA Y SENSOR ZP3-1
CON CONTRAELECTRODO/ELECTRODO DE REFERENCIA DE Ag/AgCl (SIN REACTIVO)
CORRIENTE (A)
3,00E-05
2,00E-05
1,00E-05
0,00E-05
-1,00E-05
-2,00E-05
-3,00E-05
-400
-200
0
200
400
600
800
1000
1200
POTENCIAL (Mv) FRENTE A Ag/AgCl
ZP3-1 NaCl 50 mM pH 5-24
ZP3-1 NaCl 50 mM BIS TRIS 50 mM
ZP3-1 350 g/ NaCl 50 mM
ZP3-1 350 g/ NaCl 50 mM Bis Tris 50 mM

Fig. 5

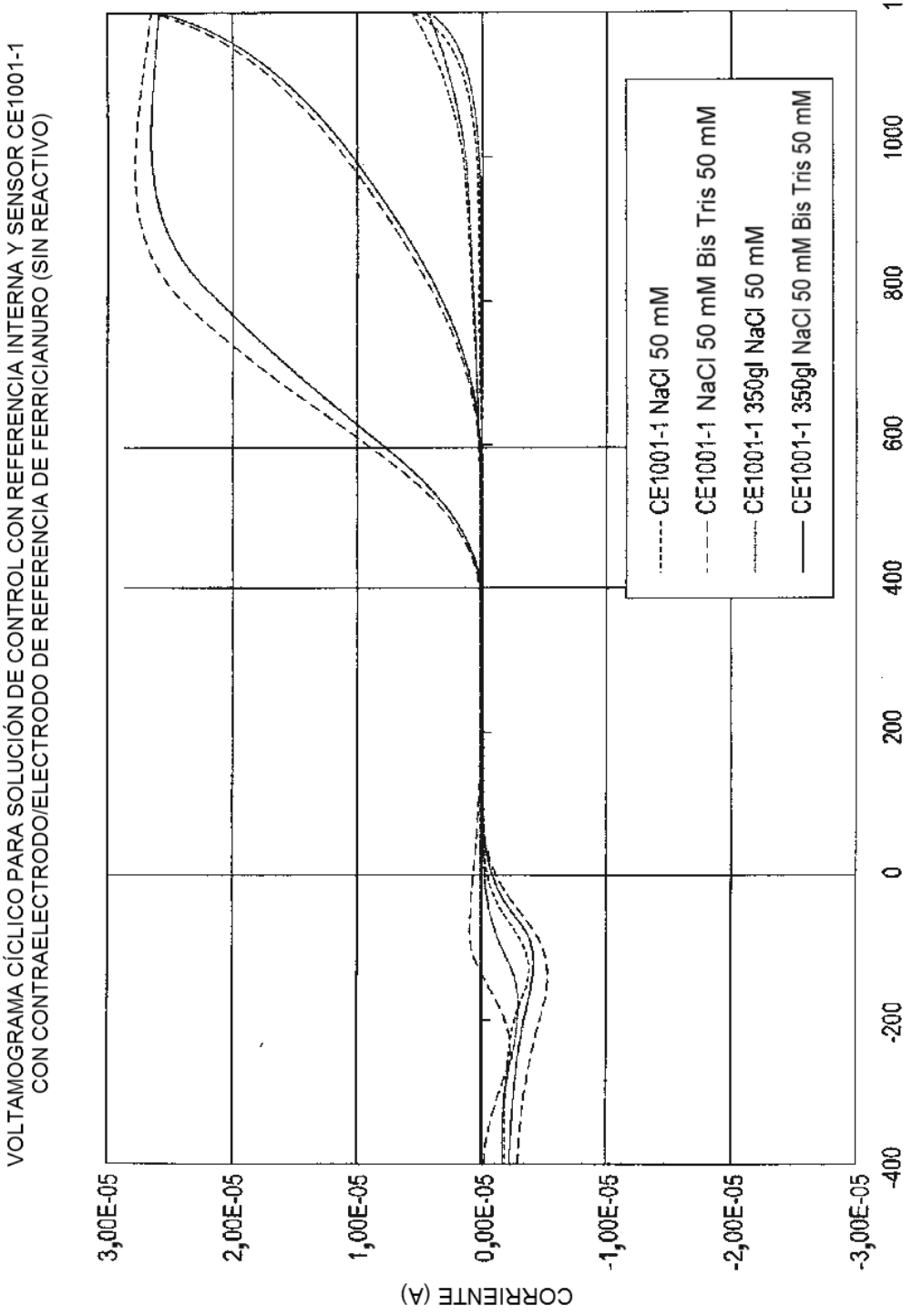
VOLTAMOGRAMA CÍCLICO PARA SOLUCIÓN DE CONTROL CON REFERENCIA INTERNA Y SENSOR CE1001-1
CON CONTRAELECTRODO/ELECTRODO DE REFERENCIA DE FERRICIANURO (SIN REACTIVO)
CORRIENTE (A)
3,00E-05
2,00E-05
1,00E-05
0,00E-05
-1,00E-05
-2,00E-05
-3,00E-05
-400
-200
0
200
400
600
800
1000
1200
POTENCIAL (Mv) FRENTE A FERRICIANURO
CE1001-1 NaCl 50 mM
CE1001-1 NaCl 50 mM Bis Tris 50 mM
CE1001-1 350gl NaCl 50 mM
CE1001-1 350gl NaCl 50 mM Bis Tris 50 mM

Fig. 6

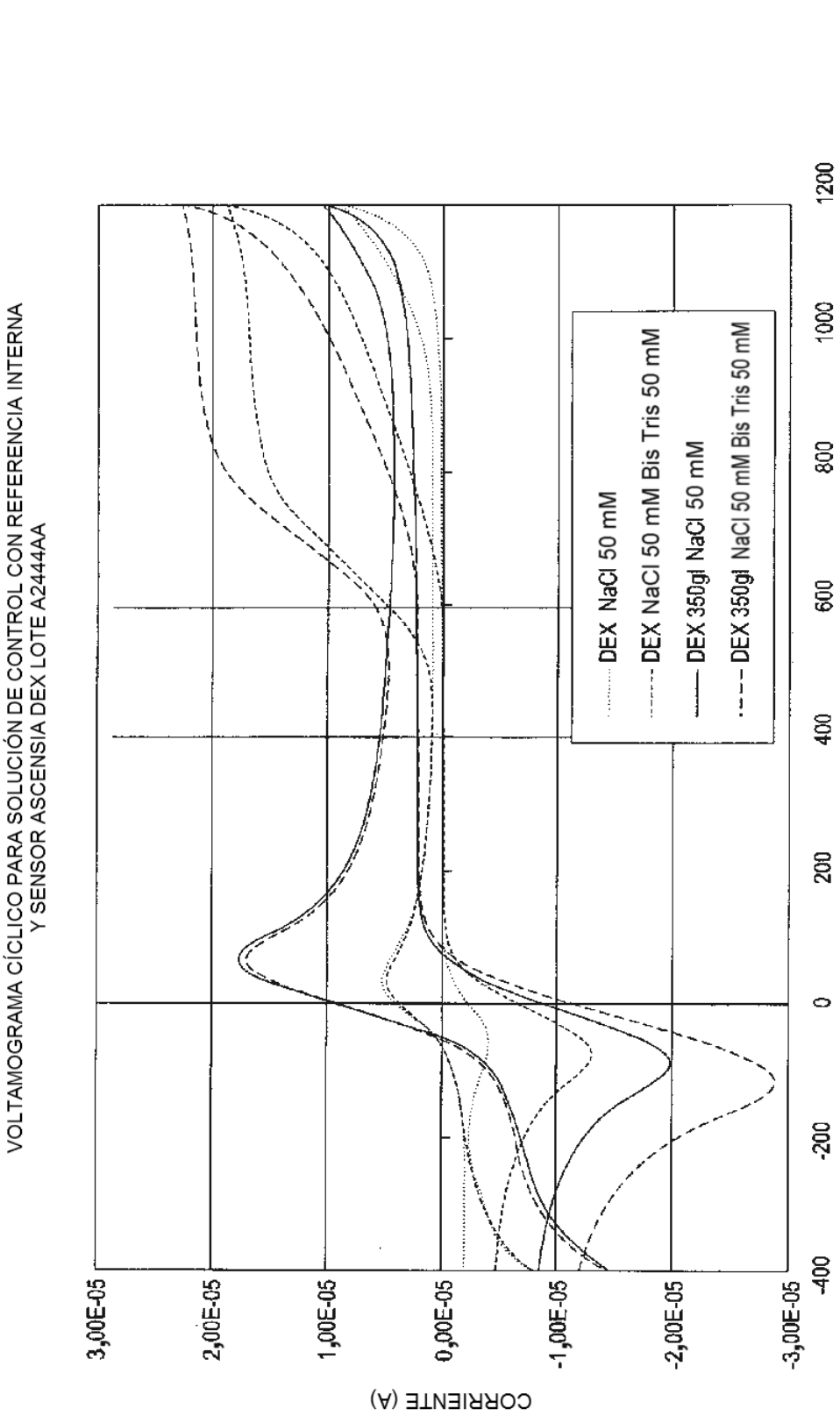
VOLTAMOGRAMA CÍCLICO PARA SOLUCIÓN DE CONTROL CON REFERENCIA INTERNA
Y SENSOR ASCENSIA DEX LOTE A2444AA
CORRIENTE (A)
3,00E-05
2,00E-05
1,00E-05
0,00E-05
-1,00E-05
-2,00E-05
-3,00E-05
-400
-200
0
200
400
600
800
1000
1200
POTENCIAL (mV) FRENTE A FERRICIANURO
DEX NaCl 50 mM
DEX NaCl 50 mM Bis Tris 50 mM
DEX 350gl NaCl 50 mM
DEX 350gl NaCl 50 mM Bis Tris 50 mM

Fig. 7

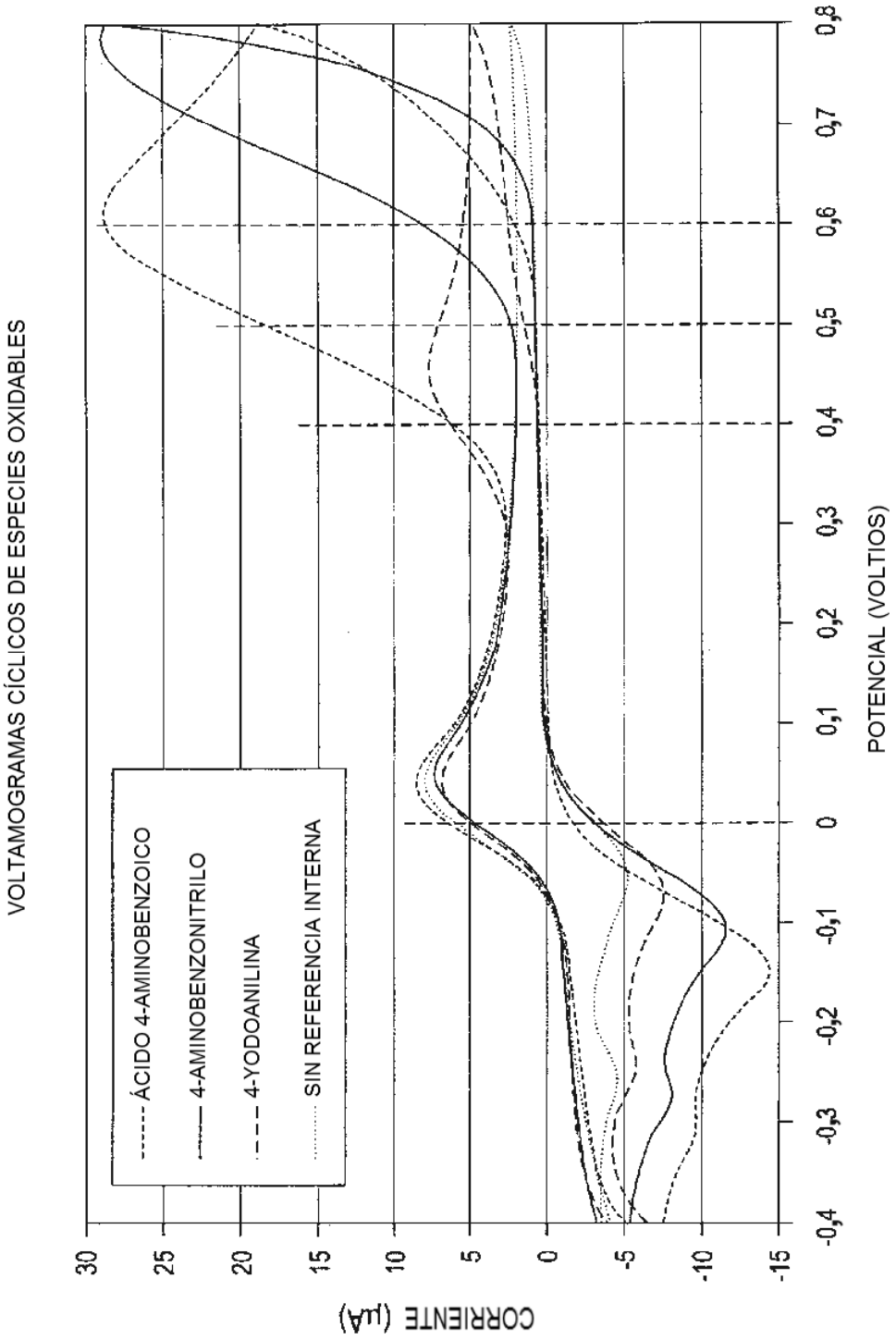
VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DE ESPECIES OXIDABLES
ÁCIDO 4-AMINOBENZOICO
4-AMINOBENZONITRILO
4-YODOANILINA
SIN REFERENCIA INTERNA
CORRIENTE (μA)
POTENCIAL (VOLTIOS)
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-0,4
-0,3
-0,2
-0,1
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8

Fig. 8

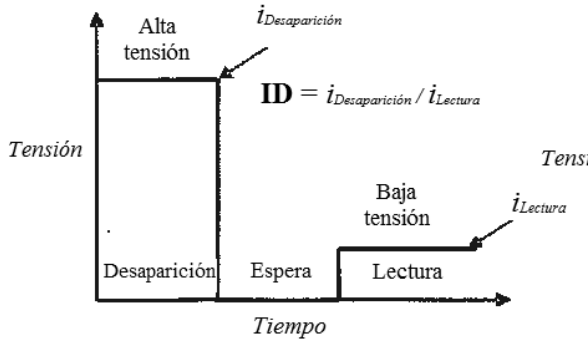

Fig. 9a

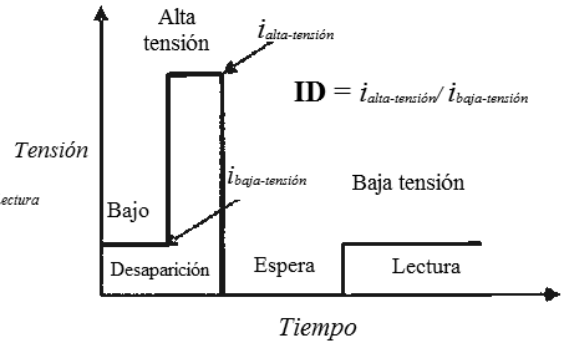

Fig. 9b

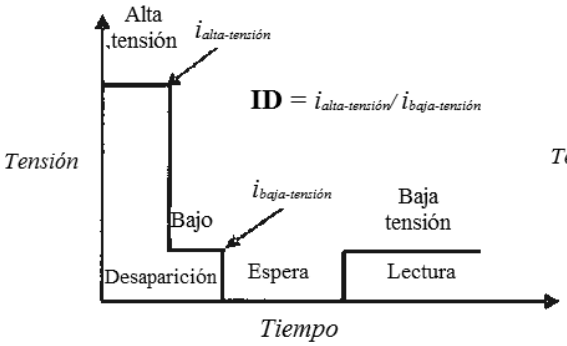

Fig. 9c

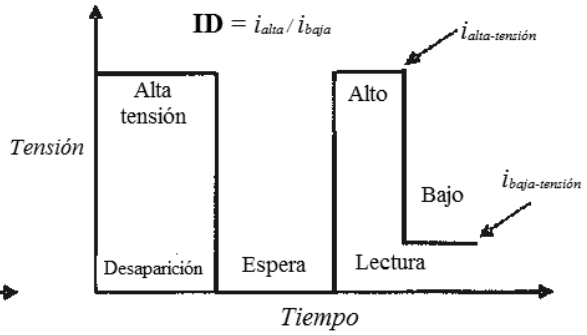

Fig. 9d

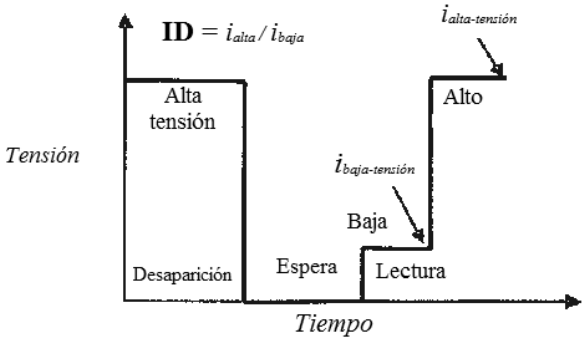

Fig. 9e

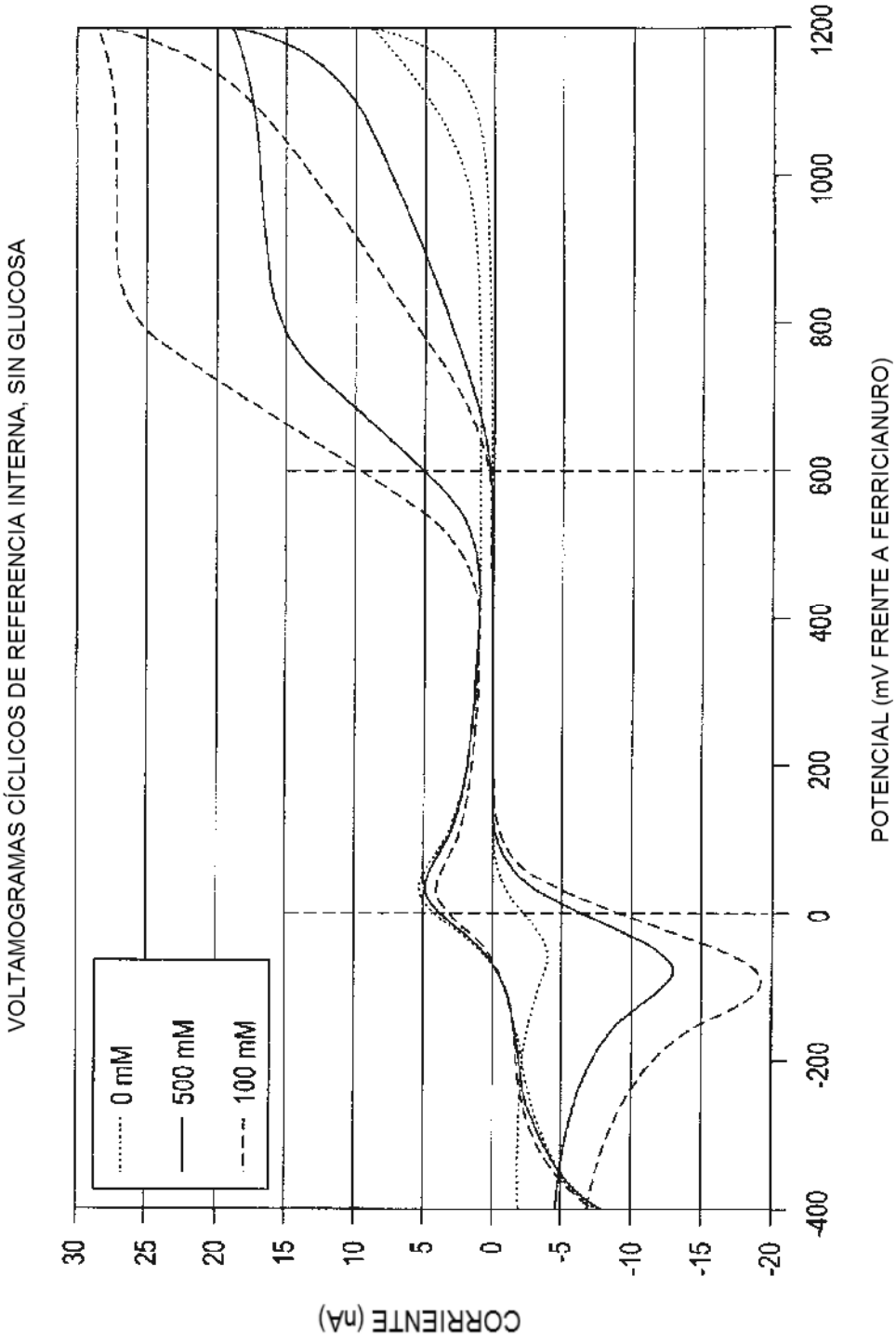
VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DE REFERENCIA INTERNA, SIN GLUCOSA
0 mM
500 mM
100 mM
CORRIENTE (nA)
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-400
-200
0
200
400
600
800
1000
1200
POTENCIAL (mV FRENTE A FERRICIANURO)

Fig. 10a

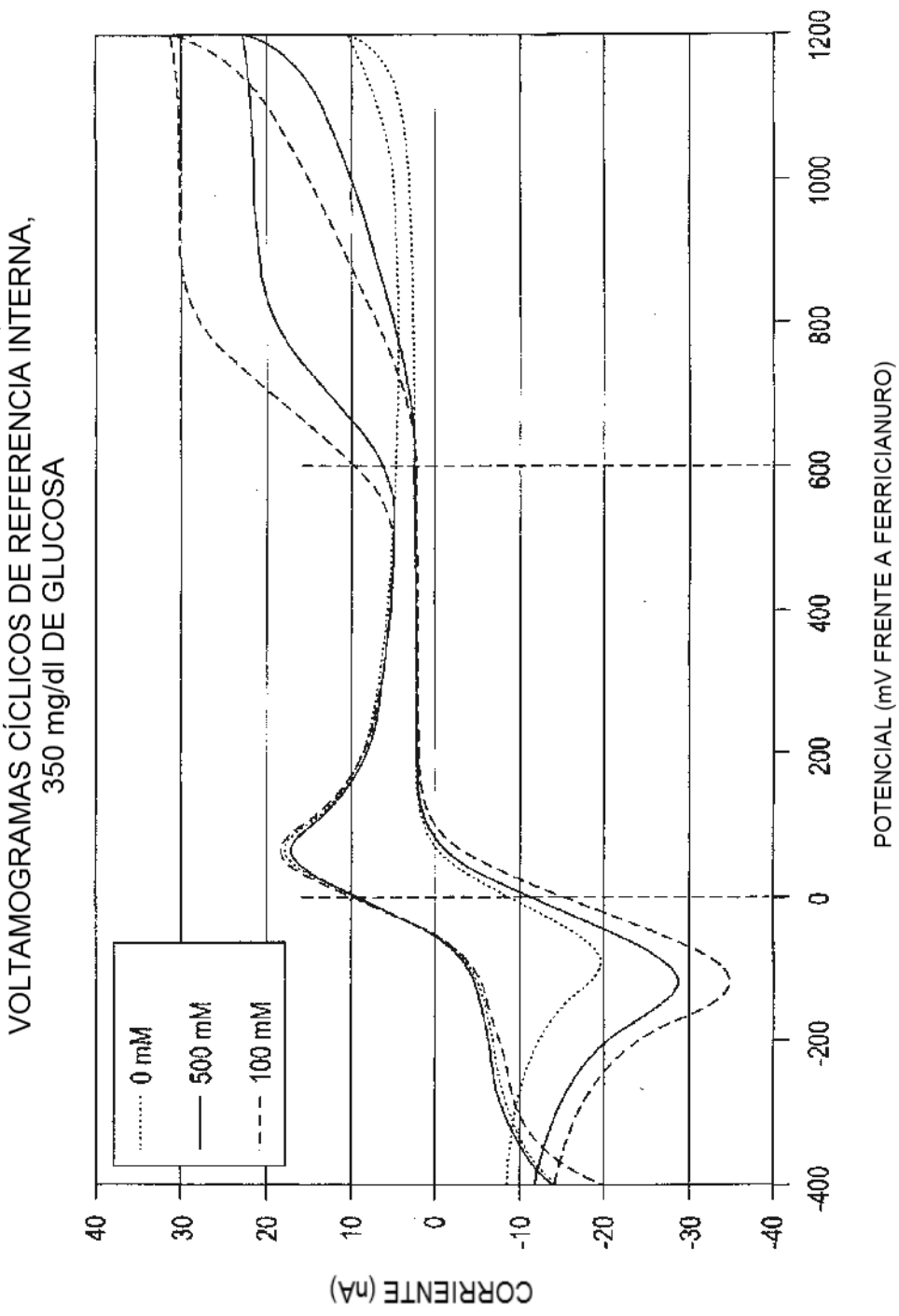
VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DE REFERENCIA INTERNA,
350 mg/dl DE GLUCOSA
0 mM
500 mM
100 mM
CORRIENTE (nA)
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-400
-200
0
200
400
600
800
1000
1200
POTENCIAL (mV FRENTE A FERRICIANURO)

Fig. 10b

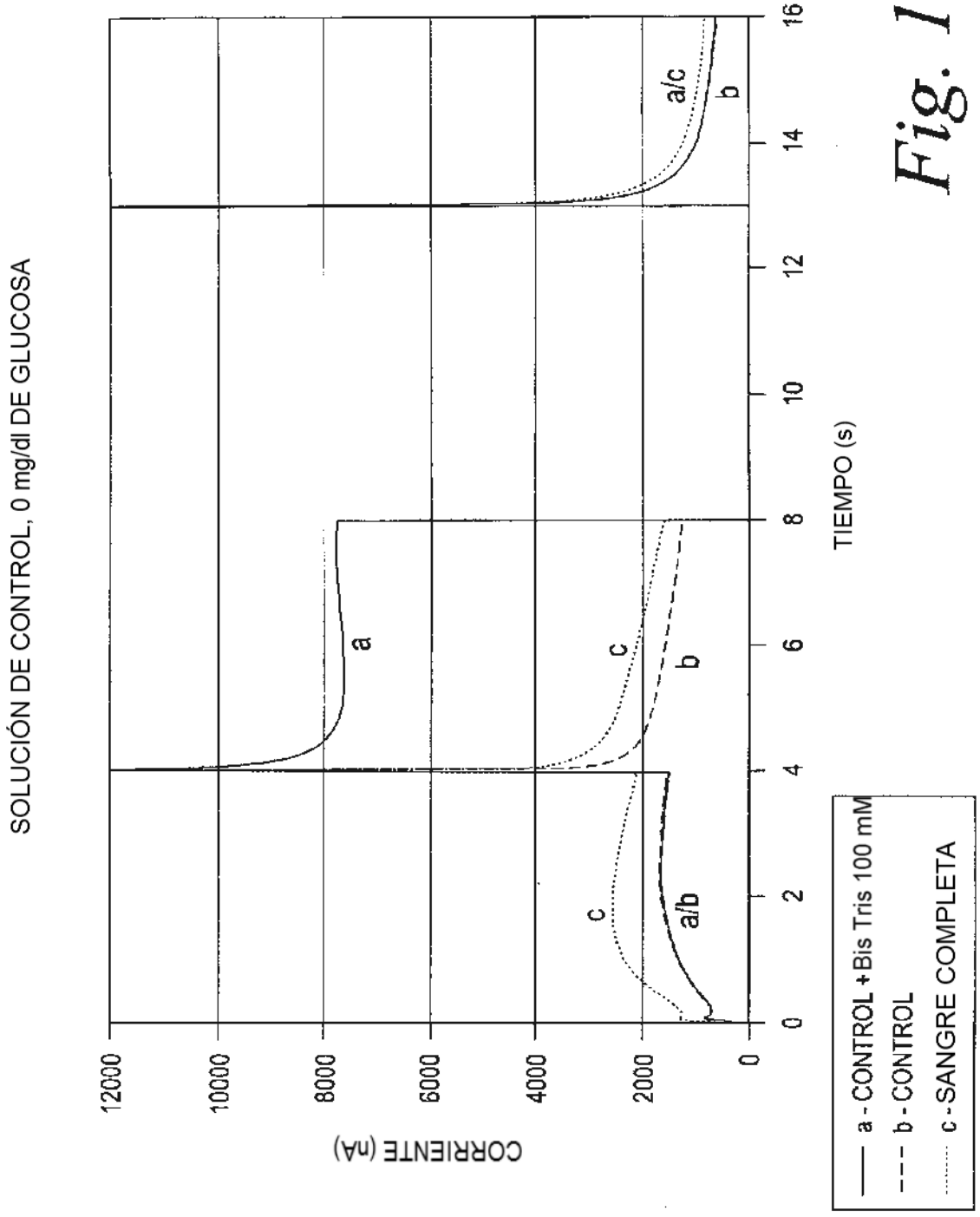
SOLUCIÓN DE CONTROL, 0 mg/dl DE GLUCOSA
CORRIENTE (nA)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
TIEMPO (s)
a
b
c
a/b
a/c
a - CONTROL + Bis Tris 100 mM
b - CONTROL
c - SANGRE COMPLETA

Fig. 11

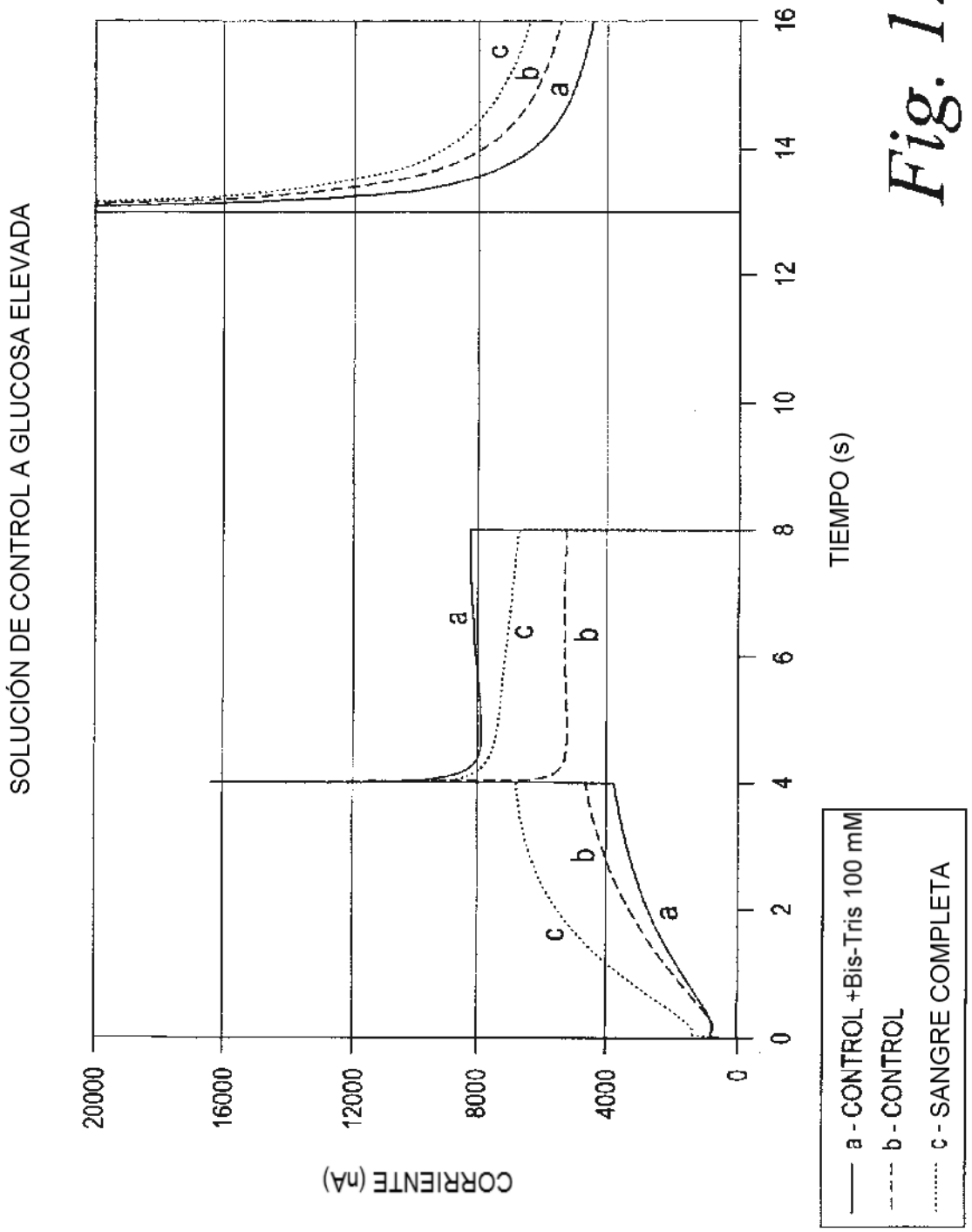
SOLUCIÓN DE CONTROL A GLUCOSA ELEVADA
CORRIENTE (nA)
20000
16000
12000
8000
4000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
TIEMPO (s)
a
b
c
a - CONTROL +Bis-Tris 100 mM
b - CONTROL
c - SANGRE COMPLETA

Fig. 12