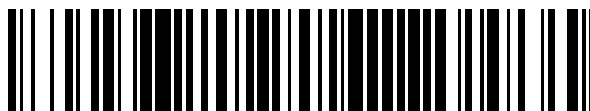


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 267**

51 Int. Cl.:

G01N 27/49 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2008** **E 08253148 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017** **EP 2042865**

54 Título: **Sistemas y métodos para discriminar solución de control de una muestra fisiológica**

30 Prioridad:

28.09.2007 US 976083 P

16.09.2008 US 211484

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

27.07.2017

73 Titular/es:

LIFESCAN, INC. (100.0%)

1000 GIBRALTAR DRIVE

MILPITAS, CA 95035-6301, US

72 Inventor/es:

CHATELIER, RONALD C. y

HODGES, ALASTAIR MCINDOE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 627 267 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

Sistemas y métodos para discriminar solución de control de una muestra fisiológica**Campo**

5 El sistema y método que aquí se proporcionan se refieren al campo de pruebas médicas, en particular la detección de la presencia y/o concentración de un analito o analitos en una muestras (por ejemplo, sangre).

Contexto

10 La determinación de concentración de analito en fluidos fisiológico (por ejemplo, sangre o productos derivados de sangre como plasma) tiene cada vez más importancia en la sociedad actual. Tales ensayos encuentran uso en una variedad de aplicaciones y escenarios, incluyendo pruebas en laboratorios clínicos, pruebas domésticas, etc., donde los resultados de tales pruebas juegan un papel prominente en el diagnóstico y tratamiento de una
15 variedad de condiciones de enfermedad. Los analitos de interés incluyen glucosa para el tratamiento de diabetes, colesterol para controlar condiciones cardiovasculares, y similares.

Un método común para ensayos de determinación de concentración de analito se basa en electroquímica. En tales métodos, una muestra líquida acuosa se coloca en una cámara de reacción de muestra en una célula electroquímica compuesta por al menos dos electrodos, esto es, un electrodo de referencia y un electrodo de
20 trabajo, donde los electrodos tienen una impedancia que los hace adecuados para medición amperométrica y colorimétrica. El componente que se analizará se deja reaccionar con un reactivo para formar una sustancia oxidable (o reducible) en una cantidad proporcional a la concentración de analito. La cantidad de la sustancia oxidable (o reducible) presente se estima después electroquímicamente y se relaciona con la concentración de analito en la muestra.

25 Un dispositivo automatizado, por ejemplo, un medidor de pruebas electroquímicas, se emplea típicamente para determinar la concentración del analito en la muestra. Muchos medidores de pruebas permiten ventajosamente que una concentración de analito, y normalmente una pluralidad de concentraciones de analitos, se almacenen en la memoria del medidor. Esta característica proporciona al usuario la habilidad para revisar los niveles de
30 concentración de analitos durante un periodo de tiempo, a menudo tiempos como una media de niveles de analito recogidos previamente, donde tal media se realiza de acuerdo con un algoritmo asociado con el medidor. Sin embargo, para asegurar que el sistema esté funcionando adecuadamente, el usuario realizará ocasionalmente una prueba usando un fluido de control en lugar de la muestra de sangre. Tales fluidos de control (también referidos como soluciones de control) son generalmente soluciones acuosas que tiene una concentración conocida de
35 glucosa. El usuario puede realizar una prueba con la solución de control y comparar los resultados mostrados con la concentración conocida para determinar si el sistema está funcionando adecuadamente. Sin embargo, una vez que se realiza la prueba de solución de control, la concentración de glucosa del fluido de control se almacena en la memoria del medidor. Así, cuando un usuario busca revisar pruebas anteriores y/o la concentración media de resultados de pruebas previas, los resultados pueden desviarse para la concentración del nivel de analito del fluido de control.

40 Por consiguiente, es deseable ser capaz de distinguir soluciones de control y fluidos de muestra durante una prueba. Una opción es marcar manualmente los fluidos como control o fluidos de pruebas. Sin embargo, sería preferible el marcado automático ya que minimiza la interacción del usuario y aumenta la facilidad de uso.

45 Así, hay un continuado interés en el desarrollo de métodos y dispositivos nuevos para su uso en la determinación de concentraciones de analito en una muestra. Sería de particular interés el desarrollo de tales métodos y dispositivos que incluyan la habilidad para marcar automáticamente una muestra como un fluido de control o fluido de prueba para almacenar o excluir las mediciones como corresponda. Sería de particular interés el
50 desarrollo de tales métodos que sean adecuados para su uso con ensayos de determinación de concentración de analito con base electroquímica.

Resumen

55 La presente invención proporciona un método para distinguir entre una muestra acuosa que no es sangre (por ejemplo, una solución de control) y una muestra de sangre de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

60 Varias características de la presente divulgación se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Puede obtenerse una mejor comprensión de tales características mediante referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas y no limitativas y los dibujos acompañantes, en particular a las Figuras 12 a 15, de las cuales:

65 La FIG. 1A es una vista en perspectiva de una tira de ensayo montada ejemplar;

La FIG. 1B es una vista en perspectiva de despiece de la tira de ensayo de la FIG. 1A;

La FIG. 1C es una vista en perspectiva ampliada de una parte proximal de la tira de ensayo de la FIG. 1A;

5 La FIG. 2 es una vista inferior en planta de la tira de ensayo de la FIG. 1A;

La FIG. 3 es una vista lateral en planta de la tira de ensayo de la FIG. 1A;

10 La FIG. 4 es una vista superior en planta de la tira de ensayo de la FIG. 1A;

La FIG. 4B es una vista lateral parcial ampliada de la parte proximal de la tira de ensayo consistente con las flechas 4A-4A de la FIG. 4A;

15 La FIG. 5 es un esquema simplificado que muestra un medidor de prueba que se conecta eléctricamente con partes de la tira de ensayo;

La FIG. 6 muestra un ejemplo de una onda potencial donde el medidor de prueba aplica una serie de potenciales de circuito abierto y potenciales de prueba para intervalos prescritos de tiempo;

20 La FIG. 7 muestra una corriente transitoria generada por el medidor de prueba que está probando la tira de ensayo con la onda potencial de la FIG. 6 con una muestra de solución de control (SC, línea de puntos) y muestra de sangre (SA, línea continua).

25 La FIG. 8 muestra la suma de valores de corriente en 0,2 y 0,5 segundos para una solución de control, plasma, una muestra de sangre con 48% hematocrito, y una muestra de sangre con 77% hematocrito cuando se aplicó un potencial de 20 mV;

30 La FIG. 9 es una vista ampliada de la FIG. 7 que muestra una primera corriente de prueba transitoria y una segunda corriente de prueba transitoria para solución de control (SC) y sangre (SA);

35 La FIG. 10 es una gráfica que muestra una relación no lineal entre el porcentaje de sustrato consumido y el índice de reacción residual para muestras de sangre que tienen varios niveles de hematocrito y para solución de control (diamantes = 25% hematocrito en sangre, cuadrados = 42% sangre, triángulos = 60% hematocrito en sangre, x = solución de control);

La FIG. 11 es una gráfica que muestra una relación entre un índice de interferente y un índice de reacción residual para una pluralidad de muestras de sangre (diamantes) y muestras de solución de control (cuadrados);

40 La FIG. 12 muestra un ejemplo de una realización de una onda potencial de prueba donde el medidor de prueba aplica una pluralidad de voltajes de prueba para intervalos prescritos de tiempo;

La FIG. 13 muestra una corriente de prueba transitoria generada con la onda de voltaje de prueba de la FIG. 12;

45 La FIG. 14 es una gráfica que muestra la relación entre un índice de interferente y un índice de reacción residual que usa un algoritmo alternativo probado en un amplio rango de temperaturas, niveles de hematocrito y concentraciones de glucosa; y

50 La FIG. 15 es una gráfica que muestra una relación entre un índice de interferente y un índice de reacción residual que usa el algoritmo alternativo probado solamente a temperatura ambiente.

Descripción detallada

55 Ciertas realizaciones ejemplares ahora se describirán para proporcionar una comprensión general de los principios de la estructura, función, fabricación y uso de los sistemas y métodos aquí desvelados. Uno o más ejemplos de estas realizaciones se ilustran en los dibujos acompañantes. Aquellos expertos en la técnica entenderán que los sistemas y métodos específicamente aquí descritos e ilustrados en los dibujos acompañantes son realizaciones ejemplares no limitativas y que el alcance de la presente divulgación está definido solamente por las reivindicaciones. Las características ilustradas o descritas en relación con una realización ejemplar pueden combinarse con las características de otras realizaciones. Tales modificaciones y variaciones pretenden incluirse dentro del alcance de la presente divulgación.

65 Los sistemas y métodos desvelados actualmente son adecuados para su uso en la determinación de una amplia variedad de analitos en una amplia variedad de muestras, y son particularmente adecuados para la su uso en la determinación de analitos en sangre total o derivados de la misma, donde un analito de particular interés es glucosa. En un aspecto, la presente divulgación proporciona varias realizaciones de un método para determinar si

una muestra aplicada a una tira de ensayo es una muestra acuosa que no es sangre (por ejemplo, una solución de control) o una muestra de sangre. Al menos se usan dos características para distinguir entre una muestra de sangre y una muestra que no es sangre. Esta descripción se centrará en la distinción entre muestras de sangre y soluciones de control. Sin embargo, como se muestra en el Ejemplo 2 más abajo, los sistemas y métodos aquí proporcionados son igualmente aplicables para distinguir muestras de sangre de cualquiera de una variedad de muestras que no son sangre (por ejemplo, bebidas que incluyen bebidas isotónicas como Gatorade®).

El método que aquí se proporciona puede usarse, en principio, con cualquier tipo de célula electroquímica que tenga un primer y un segundo electrodo separados y una capa de reactivo. Por ejemplo, una célula electroquímica puede tener la forma de una tira de ensayo. En un aspecto, la tira de ensayo incluye dos electrodos opuestos separados por una capa separadora fina, donde estos componentes definen una cámara de reacción de muestra o zona donde está situada una capa de reactivo. Un experto en la técnica apreciará que otros tipos de tiras de ensayo, incluyendo por ejemplo, tiras de ensayo con electrodos co-planares podrían usarse con los métodos aquí descritos.

Las FIGS. 1A-4B muestran varias vistas de una tira de ensayo ejemplar 62 adecuada para su uso con los métodos aquí descritos. Como se muestra, la tira de ensayo 62 puede incluir un cuerpo alargado que se extiende desde un extremo proximal 80 a un extremo distal 82, y que tiene bordes laterales 56, 58. La parte proximal del cuerpo 59 puede incluir una cámara de reacción de muestra 61 que tiene múltiples electrodos 164, 166 y un reactivo 72, mientras que la parte distal del cuerpo de tira de ensayo 59 puede incluir características configuradas para comunicarse eléctricamente con un medidor de prueba. En uso, el fluido fisiológico o una solución de control pueden entregarse a la cámara de reacción de muestra 61 para análisis electroquímico.

En la realización ilustrativa, la tira de ensayo 62 puede incluir una primera capa de electrodo 66 y una segunda capa de electrodo 64, con una capa separadora 60 colocada entre ellas. La primera capa de electrodo 66 puede proporcionar un primer electrodo 166 y una primera vía de conexión 76 para conectar eléctricamente el primer electrodo 166 con un primer contacto eléctrico 67. Similarmente, la segunda capa de electrodo 64 puede proporcionar un segundo electrodo 164 y una segunda vía de conexión 78 para conectar eléctricamente el segundo electrodo 164 con un segundo contacto eléctrico 63.

En una realización, la cámara de reacción de la muestra 61 está definida por el primer electrodo 166, el segundo electrodo 164 y un separador 60 como se muestra en las FIGS. 1A-4B. Específicamente, el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164 definen, respectivamente, la parte inferior y superior de la cámara de reacción de la muestra 61. Un área recortada 68 del separador 60 puede definir las paredes laterales de la cámara de reacción de la muestra 61. En un aspecto, la cámara de reacción de la muestra 61 puede además incluir un número de puertos 70 que proporcionan un entrada de muestra y/o un conducto.

La cámara de reacción de la muestra 61 puede tener un volumen pequeño. Por ejemplo, el volumen puede oscilar entre aproximadamente 0,1 microlitros y aproximadamente 5 microlitros, preferentemente entre aproximadamente 0,2 microlitros y aproximadamente 3 microlitros, y más preferentemente entre aproximadamente 0,3 microlitros y aproximadamente 1 microlitro. Como aquellos expertos en la técnica apreciarán, la cámara de reacción de la muestra 61 puede tener otros volúmenes diferentes. Para proporcionar el volumen de muestra pequeña, el recorte 68 puede tener un área que oscila entre aproximadamente 0,01 cm² y aproximadamente 0,2 cm², preferentemente entre aproximadamente 0,02 cm² y aproximadamente 0,15 cm², y más preferentemente entre aproximadamente 0,03 cm² y aproximadamente 0,08 cm². Similarmente, aquellos expertos en la técnica apreciarán que el volumen del recorte 68 puede tener otras áreas diferentes. Además, el primer y segundo electrodo 166, 164 pueden estar separados en el rango de aproximadamente 1 micrón a aproximadamente 500 micrones, preferentemente entre aproximadamente 10 micrones y aproximadamente 400 micrones, y más preferentemente entre aproximadamente 40 micrones y aproximadamente 200 micrones. En otras realizaciones, tal rango puede variar entre otros valores diferentes. El espacio cercano de los electrodos puede también permitir que ocurra un ciclo redox, donde el mediador oxidado generado en el primer electrodo 166 puede difundirse al segundo electrodo 164 para reducirse, y posteriormente se vuelve a difundir al primer electrodo 166 para oxidarse de nuevo.

En el extremo distal del cuerpo de la tira de ensayo 59, un primer contacto eléctrico 67 puede usarse para establecer una conexión eléctrica con un medidor de prueba. El medidor de prueba puede acceder a un segundo contacto eléctrico 63 a través de una muesca en forma de U 65 como se ilustra en la FIG. 2. Un experto en la técnica apreciará que la tira de ensayo 62 puede incluir una variedad de contactos eléctricos alternativos configurados para conectarse eléctricamente con un medidor de prueba. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.379.513 desvela medios de conexión con célula electroquímica.

En una realización, la primera capa de electrodo 66 y/o la segunda capa de electrodo 64 pueden ser un material conductor formado a partir de materiales como oro, paladio, carbono, plata, platino, óxido de estaño, iridio, indio y combinaciones de los mismos (por ejemplo, óxido de estaño dopado con indio). Además, los electrodos pueden formarse disponiendo un material conductor en una lámina aislante (no mostrada) mediante varios procesos como, por ejemplo, pulverización catódica, chapeado no electrolítico o un proceso de serigrafía. En una realización ejemplar, la segunda capa de electrodo 64 puede ser un electrodo con pulverización de oro y la primera capa de

electrodo 66 puede ser un electrodo con pulverización de paladio. Los materiales adecuados que pueden emplearse como la capa separadora 60 incluyen varios materiales aislantes, como, por ejemplo, plásticos (por ejemplo, PET, PETG, poliimida, policarbonato, poliestireno), silicona, cerámica, vidrio, adhesivos y combinaciones de los mismos.

Una capa de reactivo 72 puede estar dispuesta dentro de la cámara de reacción de la muestra usando un proceso tal como revestimiento de ranura, dispensación desde el extremo de un tubo, inyección de tinta y serigrafía. Tales procesos se describen, por ejemplo, en los siguientes números de patentes de Estados Unidos 6.749.887; 6.869.411; 6.830.995 y 6.830.934. En una realización, la capa de reactivo 72 puede incluir al menos un mediador y una enzima, y puede estar depositada en el primer electrodo 166. Varios mediadores y/o enzimas están dentro del alcance de la presente divulgación. Por ejemplo, mediadores adecuados incluyen ferricianuro, ferroceno, derivados de ferroceno, complejos de osmio bipyridilo y derivados de quinona. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen oxidasa de glucosa, deshidrogenasas de glucosa (GDH) basada en co-factor de pirroloquinolina quinona (PQQ), GDH basada en co-factor de nicotinamida adenina dinucleótido, y GDH basada en FAD [E.C.1.1.99.10]. Una formulación de reactivo ejemplar que sería adecuada para hacer la capa de reactivo 72, se describe en la solicitud de Estados Unidos pendiente N° 10/242.951, titulada "Método para fabricar un dispositivo médico con base de biosensor esterilizado y calibrado", publicada como solicitud de patente de Estados Unidos publicada N° 2004/0120848.

Bien el primer electrodo 166 o el segundo electrodo 164 pueden funcionar como electrodo de trabajo que oxida o reduce una cantidad limitada de mediador dependiendo de la polaridad del potencial de prueba aplicado del medidor de prueba. Por ejemplo, si la especie que limita la corriente es un mediador reducido, puede oxidarse en el primer electrodo 166 siempre y cuando se aplique un potencial suficientemente positivo con respecto al segundo electrodo 164. En tal situación, el primer electrodo 166 realiza la función del electrodo de trabajo y el segundo electrodo 166 realiza la función de electrodo contador/referencia. Debería señalarse que a menos que se establezca lo contrario para la tira de ensayo 62, todos los potenciales aplicados por el medidor de prueba 100 se establecerán de aquí en adelante con respecto al segundo electrodo 164.

Similarmente, si se aplica un potencial suficientemente negativo con respecto al segundo electrodo 164, entonces el mediador reducido puede oxidarse en el segundo electrodo 164. En tal situación, el segundo electrodo 164 puede realizar la función del electrodo de trabajo y el primer electrodo 166 puede realizar la función del electrodo contador/referencia.

Una primera etapa en una realización del método actualmente desvelado puede incluir la introducción de una cantidad de la muestra de fluido de interés en la tira de ensayo 62, que incluye el primer electrodo 166, el segundo electrodo 164 y una capa de reactivo 72. La muestra de fluido puede ser sangre total o un derivado o fracción de la misma, o una solución de control. La muestra de fluido, por ejemplo, puede administrarse una dosis en la cámara de reacción de la muestra 61 por medio del puerto 70. En un aspecto, el puerto 70 y/o la cámara de reacción de la muestra 61 pueden configurarse para que la acción capilar provoque que la muestra de fluido llene la cámara de reacción de la muestra 61.

La FIG. 5 proporciona un esquema simplificado de un medidor de prueba 100 que se conecta con un primer contacto eléctrico 67 y un segundo contacto eléctrico 63, que están en comunicación eléctrica con el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164, respectivamente, de la tira de ensayo 62. El medidor de prueba 100 puede estar configurado para conectarse eléctricamente con el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164 por medio de un primer contacto eléctrico 67 y un segundo contacto eléctrico 63, respectivamente (como se muestra en las FIGS. 2 y 5). Como aquellos expertos en la técnica apreciarán, pueden usarse una variedad de medidores de prueba con el método aquí descrito. Sin embargo, en una realización, el medidor de prueba incluye al menos un procesador configurado para realizar cálculos capaces de discriminar entre sangre y muestra de control, así como configurado para clasificación de datos y/o almacenamiento.

Como se ilustra en la FIG. 5, un contacto eléctrico 67 puede incluir dos dientes 67a, 67b. En una realización ejemplar, el medidor de prueba 100 conecta por separado con los dientes 67a, 67b, de tal manera que cuando el medidor de prueba 100 conecta con una tira de ensayo 62 se completa un circuito. El medidor de prueba 100 puede medir la resistencia o continuidad eléctrica entre los dientes 67a, 67b para determinar si la tira de ensayo 62 está eléctricamente conectada con el medidor de prueba 100. Un experto en la técnica apreciará que el medidor de prueba 100 puede usar una variedad de sensores y circuitos para determinar cuándo la tira de ensayo 62 está adecuadamente colocada con respecto al medidor de prueba 100.

En una realización, el medidor de prueba 100 puede aplicar un potencial de prueba y/o corriente entre el primer contacto eléctrico 67 y el segundo contacto eléctrico 63. Una vez que el medidor de prueba 100 reconoce que la tira 62 se ha insertado, el medidor de prueba 100 se enciende e inicia un modo de detección de fluido. En una realización, el modo de detección de fluido provoca que el medidor de prueba 100 aplique una corriente constante de 1 microamperio entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164. Debido a que la tira de ensayo 62 está inicialmente seca, el medidor de prueba 100 mide un voltaje máximo, que está limitado por el hardware en el medidor de prueba 100. Sin embargo, una vez que un usuario dosifica una muestra de fluido en la entrada 70, esto provoca que la cámara de reacción de la muestra 61 se llene. Cuando la muestra de fluido salva la distancia entre el

primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164, el medidor de prueba 100 medirá un descenso en el voltaje medido (por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos N° 6.193.873, que está por debajo de un umbral predeterminado provocando que el medidor 100 inicie automáticamente la prueba de glucosa.

Debería señalarse que el voltaje medido puede descender por debajo de un umbral pre-determinado cuando solamente una fracción de la cámara de reacción de la muestra 61 se ha llenado. Un método para reconocer automáticamente que se ha aplicado el fluido no indica necesariamente que la cámara de reacción de la muestra 61 se ha llenado por completo, sino que solamente puede confirmar la presencia de algo de cantidad de fluido en la cámara de reacción de la muestra 61. Una vez que el medidor de prueba 100 determina que se ha aplicado fluido a la tira de ensayo 62, puede ser necesaria una pequeña cantidad de tiempo, aunque no cero, para permitir que el fluido llene por completo la cámara de reacción de la muestra 61.

En un ejemplo, una vez que el medidor de prueba 100 ha determinado que se ha introducido un fluido (por ejemplo, administrar una dosis) en la tira de ensayo 62, un medidor de prueba 100 puede realizar una prueba de glucosa aplicando una pluralidad de potenciales de circuito abierto y una pluralidad de potenciales de prueba a la tira de ensayo 62 para intervalos prescritos como se muestra en la FIG. 6. Un intervalo de tiempo para glucosa T_G representa una cantidad de tiempo para realizar la prueba de glucosa (pero no necesariamente todos los cálculos asociados con la prueba de glucosa) donde el intervalo de tiempo de prueba de glucosa T_G puede incluir un primer intervalo de tiempo de circuito abierto T_{CA1} , un primer intervalo de tiempo potencial de prueba T_1 , un segundo intervalo de tiempo de circuito abierto T_{CA2} , un segundo intervalo de tiempo potencial de prueba T_2 y un tercer intervalo de tiempo potencial de prueba. El intervalo de tiempo de prueba de glucosa T_G puede oscilar, por ejemplo, entre aproximadamente 1 segundo y aproximadamente 5 segundos. Mientras los dos intervalos de tiempo de circuito abierto y los tres intervalos de tiempo potencial se describen, un experto en la técnica apreciará que el intervalo de tiempo de prueba de glucosa puede incluir diferentes números de circuito abierto e intervalos de tiempo potencial de prueba. Por ejemplo, el intervalo de tiempo de prueba de glucosa podría incluir un único intervalo de tiempo de circuito abierto y dos intervalos de tiempo potencial de prueba.

Una vez que se ha iniciado el ensayo de glucosa, el medidor de prueba 100 se cambia a un primer circuito abierto durante un primer intervalo de tiempo potencial de circuito abierto T_{CA1} , que en el ejemplo ilustrado es aproximadamente 0,2 segundos. En otro ejemplo, el primer intervalo de tiempo potencial de circuito abierto T_{CA1} puede estar en el rango entre aproximadamente 0,05 segundos y aproximadamente 2 segundos y preferentemente entre aproximadamente 0,1 segundos y aproximadamente 0,1 segundos, y más preferentemente entre aproximadamente 0,15 segundos y aproximadamente 0,6 segundos.

Una de las razones para implementar el primer circuito abierto es permitir tiempo suficiente para que la cámara de reacción de la muestra 61 se llene o se llene parcialmente con la muestra. Típicamente, a temperatura ambiente (esto es, 22°C), la cámara de reacción de la muestra 61 tarda desde aproximadamente 0,1 segundos a aproximadamente 0,5 segundos en llenarse por completo con sangre. Sin embargo, a temperatura ambiente, la cámara de reacción de la muestra 61 tarda aproximadamente 0,2 segundos o menos en llenarse por completo con solución de control, donde la solución de control se formula para que tenga una viscosidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 centipoise.

Mientras las soluciones de control están compuestas por componentes conocidos y son generalmente uniformes, las muestras de sangre pueden variar en su estructura y/o composición. Por ejemplo, las muestras de sangre con hematocrito alto son más viscosas que las muestras de sangre con bajo hematocrito, por lo que las muestras de sangre con hematocrito más alto requieren tiempo adicional para llenarse en comparación con muestras de sangre con hematocrito más bajo. Así, dependiendo de una variedad de factores, el tiempo de llenado de la muestra de sangre puede variar.

Después de aplicar el primer potencial de circuito abierto, el medidor de prueba 100 aplica un primer potencial de prueba E_1 entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164 (por ejemplo, -0,3 Voltios en la FIG. 6), durante un primer intervalo de tiempo potencial de prueba T_1 (por ejemplo, 0,15 segundos en la FIG. 6). El medidor de prueba 100 mide la primera corriente transitoria resultante, que puede referirse como $i_a(t)$ como se muestra en la FIG. 7. Una corriente transitoria representa una pluralidad de valores de corriente medidos por un medidor de prueba durante un intervalo de tiempo potencial de prueba particular. En un ejemplo, el primer intervalo de tiempo potencial de prueba T_1 puede oscilar entre aproximadamente 0,05 segundos y aproximadamente 1,0 segundos y preferentemente entre aproximadamente 0,1 segundos y aproximadamente 0,5 segundos, y más preferentemente entre aproximadamente 0,1 segundos y aproximadamente 0,2 segundos. En otros ejemplos, el primer intervalo de tiempo potencial de prueba T_1 puede incluir cualquiera otro rango deseado de tiempo.

Como se analiza más abajo, una parte o toda la primera corriente transitoria puede usarse en los métodos aquí descritos para determinar si una solución de control o una muestra de sangre se aplicaron a la primera tira de ensayo 62. La magnitud de la primera corriente transitoria se efectúa por la presencia de sustancias fácilmente oxidables en la muestra. La sangre normalmente contiene compuestos endógenos y exógenos que se oxidan fácilmente en el segundo electrodo 164. En cambio, la solución de control puede formularse de tal manera que no contenga compuestos oxidables. Sin embargo, la composición de la muestra de sangre puede variar y la magnitud

de la primera corriente transitoria para muestras de sangre de alta viscosidad será típicamente más pequeña que la muestras con menor viscosidad (en algunos casos incluso menor que las muestras de solución de control) porque la cámara de reacción de la muestra 61 puede no llenarse por completo después de aproximadamente 0,2 segundos. Un llenado incompleto puede provocar que el área efectiva del primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164 disminuyan lo que a su vez puede provocar que la primera corriente transitoria disminuya. Así, la presencia de sustancias oxidables en una muestra, por sí mismas, no es siempre un factor discriminatorio suficiente debido a las variaciones en las muestras de sangre.

Después de que el medidor de prueba 100 deja de aplicar el primer potencial de prueba E_1 , puede configurarse para cambiarse a un segundo circuito abierto durante un segundo intervalo de tiempo de circuito abierto T_{CA2} , que en el ejemplo de la FIG. 6 es aproximadamente 0,65 segundos. En otro ejemplo, un segundo intervalo de tiempo de circuito abierto T_{CA2} puede estar en el rango entre aproximadamente 0,1 segundos y aproximadamente 2,0 segundos y preferentemente entre aproximadamente 0,3 segundos y aproximadamente 1,5 segundos, y más preferentemente entre aproximadamente 0,5 segundos y aproximadamente 1,0 segundos. En otros ejemplos, el segundo intervalo de tiempo de circuito abierto T_{CA2} puede tener cualquier otro intervalo de tiempo deseado.

Una de las razones para implementar el segundo circuito abierto es proporcionar suficiente tiempo para que la cámara de reacción de la muestra 61 se llene por completo, para permitir que la capa de reactivo 72 se disuelva y permitir que un mediador reducido y un mediador oxidado se vuelvan a equilibrar en el respectivo primer electrodo 166 y segundo electrodo 164 de la perturbación causada por el primer potencial de prueba E_1 . Aunque la cámara de reacción de la muestra 61 típicamente se llena rápido, el segundo intervalo de tiempo de circuito abierto T_{CA2} puede ser suficientemente largo como para representar condiciones que provoquen que los tiempo de llenado aumenten como la temperatura ambiente baja (por ejemplo, aproximadamente 5°C) y niveles altos de hematocrito (por ejemplo, >60% hematocrito).

Durante el primer potencial de prueba E_1 , un mediador reducido puede disminuir en el segundo electrodo 164 y puede generarse en el primer electrodo 166 para formar un gradiente de concentración. El segundo potencial de circuito abierto proporciona tiempo para el perfil de concentración reducida de mediador para que se acerque al estado inmediatamente antes de que aplique el primer potencial de prueba E_1 . Como se describirá más abajo, un segundo potencial de circuito abierto suficientemente largo es útil porque permite que la concentración de glucosa se calcule en presencia de interferentes.

Un potencial alternativo de prueba ejemplar E_1' puede aplicarse entre los electrodos durante una duración entre cuando el medidor puede detectar que la tira de ensayo se está llenado con la muestra y antes de que se aplique el segundo potencial de prueba E_2 . En un aspecto, el potencial de prueba E_1' es pequeño. Por ejemplo, el potencial puede estar entre aproximadamente -1 y aproximadamente -100 mV, preferentemente entre -5 mV y aproximadamente -50 mV y más preferentemente entre aproximadamente -10 mV y aproximadamente -30 mV. El potencial más pequeño perturba el gradiente de concentración de mediador reducido a un menor grado en comparación con la aplicación de una mayor diferencia potencial, pero sigue siendo suficiente para obtener una medida de las sustancias oxidables en la muestra. El potencial de prueba E_1' puede aplicarse durante una porción de tiempo entre la detección del llenado y cuando el segundo potencial de prueba E_2 se aplica o puede aplicarse durante todo este periodo de tiempo. Si el potencial de prueba E_1' se va a usar para una porción del tiempo entonces podría aplicarse un circuito abierto para el resto del tiempo. La combinación de cualquier número de circuito abierto y aplicaciones de potencial de pequeño voltaje, su orden y tiempos aplicados no es crítica en este ejemplo, puede aplicarse siempre y cuando el periodo total durante el que el potencial pequeño E_1' se aplica sea suficiente para obtener una medición de corriente indicativa de la presencia y/o cantidad de sustancias oxidables presentes en la muestra. En un ejemplo preferente, el potencial pequeño E_1' se aplica durante sustancialmente todo el periodo entre cuando se detecta el llenado y cuando se aplica el segundo potencial de prueba E_2 .

Una vez que el segundo intervalo de tiempo de circuito abierto T_{CA2} o un tiempo equivalente en el ejemplo de potencial pequeño E_1' ha pasado, el medidor de prueba 100 puede aplicar un segundo potencial E_2 entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164 durante un segundo intervalo de tiempo potencial de prueba T_2 . Durante el segundo intervalo de tiempo potencial de prueba T_2 , el medidor de prueba 100 puede medir una segunda corriente transitoria $i_b(t)$. Después de que el segundo intervalo de tiempo potencial T_2 haya pasado, el medidor de prueba 100 puede aplicar un tercer potencial de prueba E_3 entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164 durante un tercer intervalo de tiempo potencial de prueba T_3 , que puede ser referido como $i_c(t)$. El segundo intervalo de tiempo potencial de prueba T_2 y el tercer intervalo potencial de prueba T_3 pueden individualmente oscilar entre aproximadamente 0,1 segundos y aproximadamente 4 segundos. Para el ejemplo mostrado en la FIG. 6, el segundo intervalo de tiempo potencial de prueba T_2 fue aproximadamente 3 segundos y el tercer intervalo de tiempo potencial de prueba T_3 fue aproximadamente 1 segundo. Como se ha mencionado anteriormente, un periodo de tiempo potencial de circuito abierto puede dejarse pasar entre el segundo potencial de prueba E_2 y el tercer potencial de prueba E_3 . Alternativamente, el tercer potencial de prueba E_3 puede aplicarse después de la aplicación del segundo potencial de prueba E_2 . Hay que señalar que una parte de la primera, segunda y tercer corriente transitoria puede referirse generalmente como una corriente de célula o un valor de corriente.

En un ejemplo, el primer potencial de prueba E_1 y el segundo potencial de prueba E_2 tienen una primera polaridad, y el tercer potencial de prueba E_3 tiene una segunda polaridad, que es opuesta a la primera polaridad. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que la polaridad del primer, segundo y tercer potencial puede elegirse dependiendo de la manera en que la concentración de analito se determina y/o dependiendo de la manera en la que las muestras de prueba y las soluciones de control se distinguen.

El primer potencial de prueba E_1 y el segundo potencial de prueba E_2 pueden ser suficientemente negativos en magnitud con respecto al segundo electrodo 164 de tal manera que el segundo electrodo 164 funcione como un electrodo de trabajo donde una corriente de oxidación limitativa se mide. En cambio, el tercer potencial de prueba E_3 puede ser suficientemente positivo en magnitud con respecto al segundo electrodo 164 de tal manera que el primer electrodo 166 funcione como un electrodo de trabajo donde una corriente de oxidación limitativa se mide. Una oxidación limitativa ocurre cuando todas las especies oxidables han disminuido localmente en la superficie del electrodo de trabajo de tal manera que la corriente de oxidación medida sea proporcional al flujo de especies oxidables que se dispersan desde la masa de la solución hacia la superficie del electrodo de trabajo. El término masa de solución se refiere a una parte de la solución suficientemente alejada del electrodo de trabajo donde la especie oxidable no se localizó dentro de la zona de disminución. El primer potencial de prueba E_1 , el segundo potencial de prueba E_2 y el tercer potencial de prueba E_3 pueden oscilar entre aproximadamente -0,6 Voltios y aproximadamente +0,6 Voltios (con respecto al segundo electrodo 164) cuando se usa un electrodo de trabajo con pulverización catódica de oro o paladio y un mediador de ferricianuro.

La FIG. 7 muestra una primera, segunda y tercera corriente transitoria generadas por un medidor de prueba 100 y una tira de ensayo 62 usando una muestra de solución de control (línea de puntos) o una muestra de sangre (línea continua). La muestra de solución de control contenía una concentración de glucosa de 530 mg/dL con aproximadamente 25% hematocrito. La FIG. 8 muestra una vista ampliada de la primera y segunda corriente transitoria en la FIG. 7. Las FIGS. 7 y 8 muestran las corrientes transitorias resultantes cuando se aplica la onda potencial mostrada en la FIG. 6. La descripción más abajo detalla cómo las corrientes transitorias pueden convertirse en una medida de glucosa precisa para la solución de prueba o la solución de control.

Como se ilustra en la FIG. 12, el medidor de prueba 100 puede realizar una prueba de glucosa aplicando una pluralidad de potenciales de prueba para los intervalos prescritos. La pluralidad de potenciales de prueba pueden incluir un primer potencial de prueba E_1' para el primer intervalo de tiempo potencial de prueba T_1 , un segundo potencial de prueba E_2 para un segundo intervalo de tiempo potencial de prueba T_2 , y un tercer potencial de prueba E_3 para un tercer intervalo de tiempo potencial de prueba T_3 . La pluralidad de valores de corriente de prueba medidos durante el primer, segundo y tercer intervalo de tiempo potencial de prueba puede realizarse en una frecuencia que oscila entre aproximadamente 1 medición por nanosegundo y aproximadamente una medición por 100 milisegundos. Un experto en la técnica apreciará que los nombres "primero", "segundo" y "tercero" se eligen por conveniencia y no necesariamente reflejan el orden en el que los potenciales de prueba se aplican.

Una vez que el ensayo de glucosa se ha iniciado usando la onda potencial de prueba de la FIG. 12, el medidor de prueba 100 aplica un primer potencial de prueba E_1' (por ejemplo, -20 mV) para un primer intervalo de tiempo potencial de prueba T_1 (por ejemplo, entre aproximadamente 0 y aproximadamente 1 segundo). En ciertos ejemplos, el primer intervalo de tiempo potencial de prueba T_1 puede oscilar entre aproximadamente 0,1 segundos y aproximadamente 3 segundos y preferentemente oscila entre aproximadamente 0,2 segundos y aproximadamente 2 segundos, y más preferentemente oscila entre aproximadamente 0,3 segundos y aproximadamente 1 segundo. De acuerdo con la presente invención, el primer tiempo potencial de prueba T_1 puede ser suficientemente largo como para que la cámara de reacción de la muestra 61 pueda llenarse por completo con la muestra y también para que la capa de reactivo 72 pueda al menos disolverse o someterse a solvatación parcialmente. En un aspecto, el primer potencial de prueba E_1' puede ser un valor relativamente cercano al potencial redox del mediador para que una cantidad relativamente pequeña de una corriente de reducción u oxidación se mida. La FIG. 3 muestra que una cantidad relativamente pequeña de corriente puede observarse durante el primer intervalo de tiempo potencial de prueba en comparación con durante el segundo o tercer intervalo de tiempo potencial de prueba. Por ejemplo, cuando se usa ferricianuro y/o ferrocianuro como mediador, el primer potencial de prueba E_1' puede oscilar entre aproximadamente -100 mV y aproximadamente -1 mV, preferentemente entre aproximadamente -50 mV y aproximadamente -5 mV, y más preferentemente entre aproximadamente -30 mV y aproximadamente -10 mV.

Después de aplicar el primer potencial E_1' , el medidor de prueba aplica un segundo potencial de prueba E_2 entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164 (por ejemplo, aproximadamente -0,3 Voltios como se ilustra en la FIG. 12), durante un segundo intervalo de tiempo potencial T_2 (por ejemplo, aproximadamente 3 segundos como se ilustra en la FIG. 12). El segundo potencial de prueba E_2 puede ser un valor suficientemente negativo del potencial redox del mediador como para que una corriente de oxidación limitativa ocurra en el segundo electrodo 164. Por ejemplo, cuando se usa ferricianuro y/o ferrocianuro como mediador, el segundo potencial de prueba E_2 puede oscilar entre aproximadamente -600 mV y aproximadamente cero mV, preferentemente entre aproximadamente -600 mV y aproximadamente -100 mV, y más preferentemente puede ser aproximadamente -300 mV.

El segundo intervalo de tiempo potencial de prueba T_2 puede ser suficientemente largo como para controlar la velocidad de generación de mediador reducido (por ejemplo, ferrocianuro) en la cámara de reacción de

la muestra 61 en base a la magnitud de la corriente de oxidación limitativa. El mediador reducido puede generarse por una serie de reacciones química en la capa de reactivo 72. Durante el segundo intervalo de tiempo potencial de prueba T_2 , una cantidad limitativa de mediador reducido se oxida en el segundo electrodo 164 y una cantidad no limitativa de mediador oxidado se reduce en el primer electrodo 166 para formar un gradiente de concentración entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164. Como se describirá, el segundo intervalo de tiempo potencial de prueba T_2 debería ser suficientemente largo como para que una cantidad suficiente de ferricianuro pueda generarse en el segundo electrodo 164. Una cantidad suficiente de ferricianuro puede ser necesaria en el segundo electrodo 164 para que una corriente limitativa pueda medirse para oxidar ferrocianuro en el primer electrodo 166 durante el tercer potencial de prueba E_3 . En ciertos ejemplo, el segundo intervalo de tiempo potencial de prueba T_2 puede oscilar entre aproximadamente 0 segundos y aproximadamente 60 segundos y preferentemente oscila entre aproximadamente 1 segundo y aproximadamente 10 segundos, y más preferentemente oscila entre aproximadamente 2 segundos y aproximadamente 5 segundos. De acuerdo con la realización de la presente invención mostrada en la Figura 12, el segundo tiempo potencial de prueba T_2 es 3 segundos.

La FIG. 13 muestra un pico relativamente pequeño al comienzo del segundo intervalo de tiempo potencial de prueba T_2 seguido de un incremento gradual de un valor absoluto de una corriente de oxidación durante el segundo intervalo de tiempo potencial de prueba (por ejemplo, entre aproximadamente 1 segundo y aproximadamente 4 segundos). El pico pequeño ocurre debido a una inicial disminución de mediador reducido en aproximadamente 1 segundo. El incremento gradual en la corriente de oxidación se atribuye a la generación de ferrocianuro por la capa de reactivo 72 seguido de su difusión al segundo electrodo 164.

Después de aplicar el segundo potencial E_2 , el medidor de prueba 100 aplica un tercer potencial E_3 entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164 (por ejemplo, +0,3 Voltios en la FIG. 12), durante un tercer intervalo de tiempo potencial T_3 (por ejemplo, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5 segundos como se ilustra en la FIG. 12). El tercer potencial de prueba E_3 puede ser un valor suficientemente positivo del potencial redox del mediador como para que una corriente de oxidación limitativa ocurra en el primer electrodo 166. Por ejemplo, cuando se usa ferricianuro y/o ferrocianuro como mediador, el tercer potencial de prueba E_3 puede oscilar entre aproximadamente cero mV y aproximadamente 600 mV, preferentemente entre aproximadamente 100 mV y aproximadamente 600 mV, y más preferentemente puede ser aproximadamente 300 mV.

El tercer intervalo de tiempo potencial de prueba T_3 puede ser suficientemente largo como para controlar la difusión de un mediador reducido (por ejemplo, ferrocianuro) cerca del primer electrodo 166 en base a la magnitud de la corriente de oxidación. Durante el tercer intervalo de tiempo potencial de prueba T_3 , una cantidad limitativa de mediador reducido se oxida en el primer electrodo 166 y una cantidad no limitativa de mediador oxidado se reduce en el segundo electrodo 164. En ciertos ejemplo, el tercer intervalo de tiempo potencial de prueba T_3 puede oscilar entre aproximadamente 0,1 segundos y aproximadamente 5 segundos y preferentemente oscila entre aproximadamente 0,3 segundos y aproximadamente 3 segundos, y más preferentemente oscila entre aproximadamente 0,5 segundos y aproximadamente 2 segundos. De acuerdo con la realización de la presente invención, el tercer tiempo potencial de prueba T_3 es 1 segundo.

La FIG. 13 muestra un pico relativamente grande al comienzo del tercer intervalo de tiempo potencial de prueba T_3 seguido de un descenso a una corriente en estado estacionario. El segundo potencial de prueba E_2 tiene una primera polaridad y el tercer potencial de prueba E_3 tiene una segunda polaridad que es opuesta a la primera polaridad. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que la polaridad del segundo y tercer potencial pueden elegirse dependiendo de la manera en la que se determine la concentración de analito.

Asumiendo que una tira de ensayo tiene una cara opuesta o una disposición opuesta como se muestra en las FIGS. 1A-1B, y que la onda potencial se aplica a la tira de ensayo como se muestra en la FIG. 6, puede calcularse una concentración de glucosa usando un algoritmo de glucosa como se muestra en la Ecuación 1 (Ec.) 1:

$$\text{Ec. 1} \quad [G] = \left(\frac{i_2}{i_3} \right)^p \times (a \times i_1 - Z)$$

En la Ec. 1 $[G]$ es la concentración de glucosa, i_1 es un primer valor de corriente, i_2 es un segundo valor de corriente e i_3 es un tercer valor de corriente, y los términos p , Z y a son constantes de calibración empíricamente derivadas. Una derivación de Ec. 1 puede encontrarse en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada N° 2007/0074977 (Solicitud de Estados Unidos N° de Serie 11/240.797), presentada el 30 de septiembre, 2005, titulada "Método y aparato para análisis electroquímico rápido". El primer valor de corriente i_1 y el segundo valor de corriente i_2 se calculan a partir de la tercera corriente transitoria y el tercer valor de corriente i_3 se calcula a partir de la segunda corriente transitoria. Un experto en la técnica apreciará que los nombres "primer", "segundo" y "tercer" se eligen por conveniencia y no reflejan necesariamente el orden en el que se calculan los valores de corriente. Además, todos los valores de corriente (por ejemplo, i_1 , i_2 3 i_3) establecidos en Ec. 1 usan el valor absoluto de la corriente.

En otra realización, el término i_1 puede definirse para incluir valores de corriente pico de la segunda y tercer corriente transitoria para permitir concentraciones de glucosa más precisas en presencia de interferentes como se muestra en la Ec. 2:

$$\text{Ec. 2} \quad i_1 = i_2 \left\{ \frac{i_{pc} - 2i_{pb} + i_{ss}}{i_{pc} + i_{ss}} \right\}$$

El término i_{pb} representa un valor de corriente pico para el segundo intervalo de tiempo potencial de prueba T_2 y el término i_{pc} representa un valor de corriente pico para el tercer intervalo de tiempo potencial de prueba T_3 . El término i_{ss} es una estimación de la corriente en estado estacionario, que es la corriente que se predice que ocurra en tiempos largos después de la aplicación del tercer potencial de prueba E_3 en ausencia de reacciones químicas en curso. Donde se usa Ec. 2, el segundo intervalo de tiempo potencial de circuito abierto T_{CA2} es preferentemente suficientemente largo para permitir que Ec. 2 compense la presencia de interferentes. Cuando el segundo intervalo de tiempo potencial de circuito abierto T_{CA2} es demasiado corto, el segundo valor de corriente pico i_{pb} puede distorsionarse y puede reducir la eficacia de los cálculos de corrección interferentes. El uso de valores de corriente pico para representar interferentes en una muestra fisiológica se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada N° 2007/0227912 (Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 11/278.341), presentada el 31 de marzo, 2006 y titulada "Métodos y aparato para analizar una muestra en presencia de interferentes".

En una realización, Ec. 1 y Ec. 2 pueden usarse juntas para calcular una concentración de glucosa para sangre o una solución de control. En otra realización, el algoritmo de Ec. 1 y Ec. 2 pueden usarse para sangre con un primer conjunto de factores de calibración (esto es, a , p y Z) y un segundo conjunto de factores de calibración puede usarse para la solución de control. Cuando se usan dos conjunto diferentes de factores de calibración, los métodos aquí descritos para discriminar entre un fluido de prueba y una solución de control pueden mejorar la eficacia de los cálculos de concentración de analito.

Además, si el medidor de prueba determina que la muestra es solución de control (en oposición a sangre), el medidor de prueba puede almacenar la concentración de glucosa resultante de la muestra de control de tal manera que el usuario pueda revisar los datos de concentración de muestra por separado de los datos de la solución de control. Por ejemplo, las concentraciones de glucosa para soluciones de control pueden almacenarse en bases de datos separadas, pueden marcarse y/o descartarse (esto es, no almacenarse o almacenarse durante un periodo corto de tiempo).

Otra ventaja de ser capaces de reconocer una solución de control es que un medidor de prueba puede programarse para comparar automáticamente los resultados (por ejemplo, concentración de glucosa) de la prueba de la solución de control con la concentración de glucosa esperada de la solución de control. Por ejemplo, el medidor de prueba puede pre-programarse con el nivel esperado de glucosa para la solución (o soluciones) de control. Alternativamente, un usuario podría introducir la concentración esperada de glucosa para la solución de control. Cuando el medidor de prueba reconoce una solución de control, el medidor de prueba puede comparar la concentración medida de glucosa de la solución de control con la concentración esperada de glucosa para determinar si el medidor de prueba está funcionando adecuadamente. Si la concentración medida de glucosa está fuera del rango esperado, el medidor de prueba puede generar un mensaje de alerta para el usuario.

En un ejemplo, el método aquí descrito usa la presencia de especies redox para distinguir una solución de control de una muestra de sangre. El método puede incluir la etapa de aplicar un primer potencia de prueba E_1' y usar uno o más valores de corriente medidos durante el potencial de prueba como un discriminador. En un ejemplo, dos valores de corriente del primer potencial de prueba E_1' se suman y usan como el discriminador. La FIG. 8 muestra datos para una solución de control, plasma, una muestra de sangre con 48% hematocrito, y una muestra de sangre con 77% hematocrito. Se aplicó un potencial de aproximadamente 20 mV durante el primer 1 segundo y se sumaron los valores de corriente en aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5 segundos. Como se muestra en la FIG. 8, los valores de corriente sumados fueron suficientes para distinguir entre una solución de control (que estaba sustancialmente libre de interferentes) y muestras de sangre.

En una realización de la presente invención, se usan dos características de solución de control para distinguir soluciones de control de sangre: la presencia y/o concentración de especies redox en la muestra y cinética de reacción. El método aquí desvelado incluye la etapa de calcular un primer valor de referencia que es representativo de la concentración redox en la muestra y un segundo valor de referencia que es representativo de la velocidad de reacción de la muestra con el reactivo. El primer valor de referencia es un corriente de oxidación de interferente y el segundo valor de referencia es un porcentaje de terminación de reacción.

Con respecto a especies redox en la muestra, la sangre normalmente contiene varias especies redox endógenas o "interferentes" como ácido ascórbico y ácido úrico, así como interferentes derivados exógenamente como ácido genticónico (ácido genticónico es un metabolito de aspirina). Los interferentes endógenos son especies químicas que pueden oxidarse fácilmente en un electrodo y están normalmente presentes en sangre dentro de un

rango fisiológico para individuos sanos. Los interferentes derivados exógenamente son también especies químicas que pueden oxidarse fácilmente en un electrodo, pero no están normalmente presentes en sangre a menos que se introduzcan en el cuerpo por medio de consumo, inyección, absorción y similares.

Una solución de control puede formularse para que esté esencialmente libre de antioxidantes o para que tenga una concentración de interferentes relativamente alta en comparación con la concentración de interferentes en una muestra de sangre. Para el caso en el que la solución de control está esencialmente libre de antioxidantes, la magnitud de la primera corriente transitoria debería ser más pequeña para la solución de control que para la muestra de sangre como se muestra en la FIG. 9. Para el caso en el que la solución de control tiene una concentración de interferentes relativamente alta, la magnitud de la primera corriente transitoria debería ser más grande para la solución de control que para la muestra de sangre (datos no mostrados).

Se calcula un primer valor de referencia en base a los valores de corriente en la primera corriente transitoria. En un ejemplo, el primer valor de referencia puede incluir una suma de valores de corriente en dos puntos en el tiempo durante la primera corriente transitoria. En un ejemplo, los valores de corriente en aproximadamente 0,3 y aproximadamente 0,35 segundos pueden usarse cuando se emplea la onda potencial de prueba de la FIG. 6. En otro ejemplo, cuando el potencial de prueba E_1' se aplica a todo el periodo entre cuando se detecta el llenado y el segundo potencial de prueba E_2 , el primer valor de referencia se obtiene preferentemente sumando dos valores durante un periodo más largo, por ejemplo de aproximadamente 0,2 segundos a aproximadamente 0,5 segundos. En una realización de la presente invención, el primer valor de referencia se obtiene sumando los valores de corriente obtenidos durante la primera corriente transitoria usando la onda potencial de prueba de la FIG. 12. Como un ejemplo, la suma puede representarse por la Ec. 3:

$$\text{Ec. 3} \quad i_{\text{sum}} = \sum_{t=0.05}^1 i(t)$$

Los términos i_{sum} es la suma de los valores de corriente y t es un tiempo.

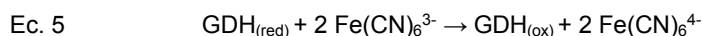
El primer valor de referencia puede ser referido como un índice de interferente porque es proporcional a la concentración de interferente y no debería depender sustancialmente de la concentración de glucosa. Por lo tanto, en teoría, el medidor de prueba debería ser capaz de distinguir si la muestra es sangre o solución de control en base al índice de interferente. Sin embargo, en la práctica, usando solamente el índice de interferente no siempre discriminó de manera suficiente entre sangre y la solución de control. Aunque la sangre típicamente tiene una concentración de interferente mucho más alta, hay ciertas condiciones en las que la primera corriente transitoria para sangre puede atenuarse de tal manera que sea comparable con la solución de control. Estas condiciones incluyen alta concentración de glucosa, alto hematocrito, baja temperatura y llenado incompleto de la cámara de reacción de la muestra 61. Así, en realizaciones de la presente invención, se implementó un valor adicional para permitir que el medidor de prueba discrimine de manera suficiente entre sangre y solución de control.

El factor adicional usado para ayudar a discriminar entre sangre y solución de control puede ser un segundo valor de referencia. El segundo valor de referencia es referido como un índice de reacción residual, que puede ser un valor que es una función del porcentaje de sustrato remanente que reaccionaría si se diera suficiente tiempo. El índice de reacción residual se relaciona con la velocidad de reacción porque una velocidad alta de reacción puede provocar que el sustrato disminuya por la reacción. Sin embargo, el índice de reacción residual también dependerá de la magnitud inicial de la concentración de sustrato.

La capa de reactivo 72 puede incluir glucosa deshidrogenasa (GDH) en base al co-factor PQQ y ferricianuro. En otro ejemplo, la enzima GDH en base al co-factor PQQ puede sustituirse por enzima GDH en base a co-factor FAD. Cuando la sangre y la solución de control se administran en dosis en una cámara de reacción de muestra 61, la glucosa se oxida por $\text{GDH}_{(\text{ox})}$ y en el proceso $\text{GDH}_{(\text{ox})}$ se convierte en $\text{GDH}_{(\text{red})}$, como se muestra en la Ec. 4 más abajo. Hay que señalar que $\text{GDH}_{(\text{ox})}$ se refiere al estado oxidado de GDH y $\text{GDH}_{(\text{red})}$ se refiere al estado reducido de GDH:



Después, $\text{GDH}_{(\text{red})}$ se regenera de vuelta a su estado activo oxidado mediante ferricianuro (esto es, mediador oxidado de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) como se muestra en la Ec. 5 más abajo. En el proceso de regeneración de $\text{GDH}_{(\text{ox})}$, ferrocianuro (esto es, mediador reducido de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$) se genera a partir de la reacción como se muestra en la Ec. 5:



En general, la velocidad de consumo de glucosa en base a la Ec. 4 y Ec. 5 es más rápido para la solución de control que para la sangre. Típicamente, la solución de control es menos viscosa que la sangre lo que provoca

que la velocidad de reacción de la Ec. 4 y Ec. 5 sea más rápida para la solución de control. Además, la velocidad de reacción es más rápida para la solución de control porque una parte de la glucosa presente en la muestra de sangre debe dispersarse fuera de los glóbulos rojos para participar en la Ec. 4. Esta etapa extra de dispersión de glucosa fuera de los glóbulos rojos ralentiza la velocidad de reacción hasta algún grado medible. La FIG. 9 muestra que la velocidad de reacción para sangre es más lenta que para la solución de control como lo evidencia el hecho de que el valor de curva absoluta general (por ejemplo, entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 4 segundos) para la segunda corriente transitoria es menos que para la muestra de sangre. Debido a las velocidades de reacción más rápidas en la solución de control en comparación con la sangre, el índice de reacción residual para la solución de control será generalmente más bajo que para sangre.

El índice de reacción residual es un número que se relaciona con el porcentaje de glucosa que no se ha consumido. Un índice de reacción residual relativamente bajo puede indicar que las reacciones de Ec. 4 y Ec. 5 están cercanas a la finalización. Sin embargo, un índice de reacción residual relativamente alto indicará que la reacción no está cercana a la finalización. Por ejemplo, el índice de reacción residual puede ser una proporción absoluta de un valor de corriente de una tercera corriente transitoria por un valor de corriente de la segunda corriente transitoria, como se muestra en la Ec. 6:

$$\text{Ec. 6} \quad \text{abs} \left(\frac{i(4.15)}{i(3.8)} \right)$$

Para el denominador de la Ec. 6, se usó el valor de corriente en 3,8 segundos para la segunda corriente transitoria. El tiempo de 3,8 segundos se eligió empíricamente, aunque un experto en la técnica apreciará que pueden usarse otros valores de corriente. En un ejemplo, se elige un valor de corriente en aproximadamente el final de la segunda corriente transitoria. Durante el segundo intervalo de tiempo potencial de prueba T_2 , el mediador reducido se oxida en el segundo electrodo 164. La magnitud de los valores de corriente medidos durante el segundo intervalo de tiempo potencial de prueba T_2 pueden atribuirse a la cantidad de ferrocianuro generado por la capa de reactivo 72 en el primer electrodo 166 y que después se dispersa al segundo electrodo 164. Se asume que la capa de reactivo 72 permanece cercana al primer electrodo 166 después de que se disuelva en sangre. Como resultado, la mayor parte del ferrocianuro que se oxida por el segundo electrodo 164 tuvo que dispersarse necesariamente desde el primer electrodo 166.

Para el numerador de Ec. 6, se usó el valor de corriente en aproximadamente 4,15 segundos. Pueden elegirse otros valores de corriente de la tercera corriente transitoria, aunque el valor de corriente al aproximadamente al comienzo de la tercera corriente transitoria es preferente. Durante el tercer intervalo de tiempo potencial de prueba T_3 , el mediador reducido se oxida en el primer electrodo 166. La magnitud de los valores de corriente medidos durante el segundo intervalo de tiempo potencial de prueba T_2 pueden atribuirse a la cantidad de ferrocianuro generado por la capa de reactivo 72 en el primer electrodo 166 y no se dispersó lo suficientemente lejos del primer electrodo 166. Como resultado de la capa de reactivo 72 que permanece cercana al primer electrodo 166, la magnitud de los valores de corriente para la tercera corriente transitoria será generalmente más grande que la segunda corriente transitoria. Además, la tercera corriente transitoria será también más grande en magnitud que la segunda corriente transitoria porque la capa de reactivo 72 habrá tenido más tiempo para generar ferrocianuro. Así, la proporción absoluta como se muestra en la Ec. 6 será más grande si la reacción de glucosa está aún lejos de finalizar en el momento de la medición.

En una realización de la presente invención, puede usarse un índice de reacción residual, como se muestra en la Ec. 7 más abajo. El índice de reacción residual puede aumentar para indicar que las reacciones de la Ec. 4 y Ec. 5 están más cercanas a la finalización y disminuyen para indicar que las reacciones están alejadas de la finalización. Debería señalarse que la Ec. 6 tiene un índice de reacción residual que oscila entre aproximadamente 1 y el infinito y la Ec. 7 tiene un índice de reacción residual que oscila entre aproximadamente cero y aproximadamente 1. Bajo ciertas circunstancias, la Ec. 7 puede ser un mejor discriminador para solución de control que Ec. 6. Por ejemplo, el índice de reacción residual puede ser una proporción absoluta de un valor de corriente de la segunda corriente transitoria dividida por un valor de corriente de la tercera corriente transitoria, como se muestra en la Ec. 7:

$$\text{Ec. 7} \quad \text{abs} \left(\frac{i(3.8)}{i(4.15)} \right)$$

La FIG. 10 es una gráfica que muestra una relación no-lineal entre el porcentaje estimado (%) de sustrato consumido y el índice de reacción residual de Ec. 6 para muestra de sangre que tienen varios niveles de hematocrito y para solución de control (diamantes = sangre 25% hematocrito, cuadrados = 42% sangre, triángulos = sangre 60% hematocrito, x = solución de control). La Fig. 10 ilustra que el índice de reacción residual es relativamente alto cuando el % de sustrato consumido es bajo y que el índice de reacción residual es relativamente bajo cuando el % de sustrato consumido es alto para una valor dado de tipo de muestra/valor de hematocrito. El % de sustrato consumido

se estima a partir de una proporción $\frac{C_o}{Y_{SI}}$, donde C_o es una concentración de sustrato estimado en la superficie de electrodo y Y_{SI} es la concentración de sustrato usando una técnica de referencia estándar. El término C_o se deriva usando la siguiente Ec. 8:

Ec. 8

$$C_o = \frac{i_{ss} L}{2FAD}$$

En esta ecuación, L es la distancia entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164, F es la constante de Faraday, A es el área del primer electrodo y D es el coeficiente de difusión. Más detalles en relación con la Ec. 8 se encuentran en la patente de Estados Unidos N° 6.284.125.

La FIG. 11 es una gráfica que muestra la relación entre el índice de interferente y un índice de reacción residual para una pluralidad de muestra de sangre y muestras de solución de control. Al trazar el índice de interferente en el eje X y el índice de reacción residual en el eje Y, puede observarse una segregación entre la sangre y la solución de control. Puede dibujarse una línea de discriminación para determinar si la muestra es una solución de control o sangre. En esta realización, el índice de interferente es $i(0,3) + i(0,35)$ y el índice de reacción residual es

$$abs\left(\frac{i(4.15)}{i(3.8)}\right).$$

Debería señalarse que los tiempos (por ejemplo, 4,15, 3,8) en los que se seleccionaron los valores de corriente para el índice de reacción residual se encontraron empíricamente. Se evaluó un gran número de proporciones de corriente para su habilidad para discriminar entre muestras de sangre y de solución de control. La proporción mostrada en la Ec. 6 o Ec. 7 se seleccionó porque resultó producir una separación significativa entre muestras de sangre y de solución de control.

Se derivó una línea de discriminación para permitiré que el medidor de prueba determine si la muestra fue una solución de control o sangre. Para todas las muestras de solución de control probadas, se trazó el índice de interferente contra el índice de reacción residual. Después, se calculó una línea usando la regresión lineal para muestras de solución de control. Después de calcular una ecuación para la línea, se calculó la inclinación perpendicular entre cada punto de datos y la línea. La inclinación perpendicular representa la distancia más corta entre el punto de datos y la línea en oposición a una inclinación vertical que se calcula comúnmente. Se determinó una desviación estándar para todas las inclinaciones perpendiculares (SD_{perp}). Por último, la línea se cambió $3 \cdot SD_{perp}$ unidades hacia los puntos de datos para el grupo de sangre. La razón para esta técnica es que los datos para el grupo de solución de control muestran muy poca dispersión y por lo tanto el "99% de límite de seguridad" del grupo de solución de control está bien definido.

En el método aquí descrito, la información obtenida de este análisis estadístico del índice de reacción residual y el índice de interferente pueden usarse por el medidor de prueba para distinguir una solución de control de muestras de sangre. El medidor de prueba puede calcular el índice de interferente y el índice de reacción residual y usar estos valores en asociación con la línea de discriminación derivada (o una ecuación que represente la línea de discriminación) para distinguir las soluciones de control de las muestras de sangre.

Para la situación en la que se emplea la onda potencial de prueba de la FIG. 12, se usa un algoritmo alternativo para discriminar entre solución de control y sangre. El algoritmo alternativo incluye el uso del índice de interferente de la Ec. 3 y el índice de reacción residual de la Ec. 7. La FIG. 14 ilustra una gráfica que muestra la relación entre el índice de interferente y el índice de reacción residual para una pluralidad de muestras de sangre y muestras de solución de control usando el algoritmo alternativo. En la FIG. 14, las muestras de sangre y las muestras de solución de control se probaron sobre un rango de temperatura de aproximadamente 5 grados Celsius a aproximadamente 45 grados Celsius. Además, las muestras de de sangre tenían un rango de concentración de glucosa de aproximadamente 100 mg/dL a aproximadamente 560 mg/dL y un rango de nivel de hematocrito de 0% a aproximadamente 60%. La FIG. 15 ilustra otra gráfica donde se probaron más tiras de ensayo (aproximadamente 27.400) usando el algoritmo alternativo solamente a temperatura ambiente. Al trazar el índice de interferente en el eje X y el índice de reacción residual en el eje Y, puede observarse una segregación entre la sangre y la muestra de control en las FIGS. 14 y 15.

Puede usarse un criterio de discriminación para determinar si la muestra es solución de control o sangre en base al índice de interferente de la Ec. 3 y el índice de reacción residual de la Ec. 7. En la presente invención, el índice de interferente de la Ec. 3 se compara con un umbral predeterminado y el índice de reacción residual de la Ec. 3 se compara con una ecuación de umbral predeterminado. El umbral predeterminado es aproximadamente 10

microamperios. La ecuación de umbral predeterminado se basa en la función usando el índice de interferente. Más específicamente, la ecuación de umbral predeterminado es Ec. 9.

5 Ec. 9

$$\text{abs}\left(\frac{i(3.8)}{i(4.15)}\right) < \frac{K * \left(\sum_{t=0.05}^1 i(t)\right) - 10}{\sum_{t=0.05}^1 i(t)}$$

10 El término K es aproximadamente 0,2. Así, el algoritmo alternativo puede identificar una muestra como

sangre si $\sum_{t=0.05}^1 i(t) > 10$ y si

$$\text{abs}\left(\frac{i(3.8)}{i(4.15)}\right) < \frac{K * \left(\sum_{t=0.05}^1 i(t)\right) - 10}{\sum_{t=0.05}^1 i(t)}$$

15 Si no, la muestra es solución de control.

EJEMPLOS

20 Ejemplo 1

Lo siguiente proporciona la preparación de la solución de control que se utilizó para generar los datos de las FIGS. 7 y 11. Esta preparación es no limitativa ya que pueden utilizarse varias otras preparaciones y/o soluciones de control con el sistema y método actualmente desvelado.

25 Componente tampón de ácido citracónico 0,0833 g
 Componente tampón de citraconato de dipotasio 1,931 g
 Conservante de metilparabeno 0,050 g
 Conservante Germal II 0,400 g
 30 Modificador de viscosidad Dextrano T-500 3,000 g
 Agente de absorción Pluronic 25R2 0,050 g
 Tinte (FD&C Azul N° 1) de 1-[(6-metoxi-4-sulfo-m-tolil)azo]-2-naftol-6-ácido sulfónico sal disodio 0,100 g
 Analito D-Glucosa 50, 120 o 525 mg
 Disolvente de agua desionizada 100 g
 35 Disolvente de agua desionizada 100 g

Primero se preparó el tampón citracónico pH 6,5±0,1 disolviendo las cantidades requeridas de ácido citracónico y citraconato de dipotasio en agua desionizada. Después, se añadió metilparabeno y la solución se agitó hasta que el conservante se disolvió por completo. Posteriormente, se añadieron Dextrano T-500, Germal II, Pluronic 25R2 y 1-[(6-metoxi-4-sulfo-m-tolil)azo]-2-naftol-6-ácido sulfónico sal disodio secuencialmente, seguido de la completa disolución del químico anteriormente añadido. En este punto, el pH del fluido de control se verificó, seguido de la adición de la cantidad necesaria de glucosa para obtener un nivel bajo, normal o alto de glucosa del fluido de control. Después de disolver la glucosa por completo, el fluido de control se dejó a temperatura ambiente durante la noche. Finalmente, la concentración de glucosa se verificó usando un analizador de Bioquímica Select Modelo 2700 fabricado por Yellow Springs Instrument Co., Inc. El tinte usado en esta solución de control tiene un color azul, lo que reduce la posibilidad de que el usuario confunda la solución de control con sangre.

Ejemplo 2

50 Algunas personas (por ejemplo, gente joven intentando engañar a padres o médicos) cargará un sensor con Gatorade® en oposición a sangre para dar la impresión de que su glucosa está bajo control. El siguiente experimento se realizó para determinar si el método y sensor actualmente desvelados podrían utilizarse para distinguir Gatorade® de sangre.

55 Se probaron cinco (5) sabores diferentes de Gatorade®. El sensor clasificó los 5 sabores como una solución de control (glucosa media = 264 mg/dL; CV = 6,7%). Así, el sensor puede usarse para distinguir entre Gatorade® y sangre.

60 Un experto en la técnica apreciará que más características y ventajas del sistema y métodos desvelado en el presente en base a las realizaciones anteriormente descritas. Por consiguiente, el sistema y método desvelados en el presente no están limitados por lo que se ha mostrado y descrito particularmente, excepto como se indica en la reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para distinguir entre una muestra de sangre y una muestra acuosa que no es sangre, comprendiendo el método:

- (a) aplicar un primer potencial de prueba, E_1 , entre un primer electrodo y un segundo electrodo durante un primer intervalo de tiempo, T_1 , donde $E_1 = -20\text{mV}$ y T_1 es entre $t=0\text{s}$ y $t=1\text{s}$, cuando una muestra se introduce en una célula electroquímica y medir una primera corriente transitoria;
- (b) aplicar un segundo potencial de prueba, E_2 , entre dicho primer electrodo y dicho segundo electrodo durante un segundo intervalo de tiempo, T_2 , donde $E_2 = -0,3\text{mV}$ y T_2 es entre $t=1\text{s}$ y $t=4\text{s}$, siendo el segundo potencial suficiente para oxidar un mediador reducido en el segundo electrodo y medir una segunda corriente transitoria;
- (c) aplicar un tercer potencial de prueba, E_3 , entre dicho primer electrodo y dicho segundo electrodo durante un tercer intervalo de tiempo, T_3 , donde $E_3 = +0,3\text{mV}$ y T_3 es entre $t=4\text{s}$ y $t=5\text{s}$, siendo el tercer potencial suficiente para oxidar un mediador reducido en el primer electrodo y medir una tercera corriente transitoria;
- (d) calcular, en base a la primera corriente transitoria, un primer valor de referencia;
- (e) calcular, en base a la segunda y tercera corriente transitoria, un segundo valor de referencia; y
- (f) determinar, en base al primer y segundo valor de referencia, si la muestra es una muestra de sangre o una muestra acuosa que no es sangre,

donde el primer valor de referencia es un índice de interferente, y el segundo valor de referencia es un índice de reacción residual;

donde el índice de interferente es:

$$i_{sum} = \sum_{t=0.05}^1 i(t) \quad \text{donde } i_{sum} \text{ es una suma de valores de corriente medidos durante la}$$

primera corriente transitoria,

donde i es la corriente y t es un tiempo medido en segundos (s),

donde el índice de reacción residual es:

$$\text{abs}\left(\frac{i(3.8)}{i(4.15)}\right),$$

donde $i(3,8)$ es el valor de corriente medido en el tiempo $t=3,8\text{s}$,

donde $i(4,15)$ es el valor de corriente medido en el tiempo $t=4,15\text{s}$, y

donde la etapa (f) comprende además:

comparar el primer valor de referencia con un valor umbral predeterminado, donde el valor de umbral predeterminado es $10\mu\text{A}$;

determinar si el segundo valor de referencia satisface una ecuación de umbral predeterminado, donde la ecuación de umbral predeterminado es:

$$\text{abs}\left(\frac{i(3.8)}{i(4.15)}\right) < \frac{K * (\sum_{t=0.05}^1 i(t)) - 10}{\sum_{t=0.05}^1 i(t)},$$

e identificar la muestra como sangre si:

$$i_{sum} = \sum_{t=0.05}^1 i(t) > 10\mu\text{A}$$

y si:

$$\text{abs}\left(\frac{i(3.8)}{i(4.15)}\right) < \frac{K * (\sum_{t=0.05}^1 i(t)) - 10}{\sum_{t=0.05}^1 i(t)}$$

donde K es una constante y $K = 0,2$,

si no identificar la muestra como una muestra acuosa que no es sangre.

2. El método de la reivindicación 1, donde el primer valor de referencia es proporcional a una concentración de un interferente en la muestra.

3. El método de cualquier reivindicación precedente, donde el segundo valor de referencia se basa en una finalización porcentual de una reacción química.

4. El método de cualquier reivindicación precedente, que además comprende la etapa de medir una concentración de un analito.

5 5. El método de la reivindicación 4, donde, si se encuentra que la primera muestra es una muestra acuosa que no es sangre, se marca la concentración de analito asociada con la muestra acuosa que no es sangre.

10 6. El método de cualquier reivindicación precedente, donde la etapa (f) comprende además usar clasificación estadística para determinar si la muestra es una muestra acuosa que no es sangre o una muestra de sangre.

7. El método de la reivindicación 1, que además comprende:

(a) introducir la muestra en la célula electroquímica, comprendiendo la célula electroquímica:

(i) el primer y segundo electrodo en una relación de separación; y

(ii) un reactivo;

15 donde el primer potencial de prueba tiene una primera polaridad.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la muestra acuosa que no es sangre es una solución de control.

20

25

30

35

40

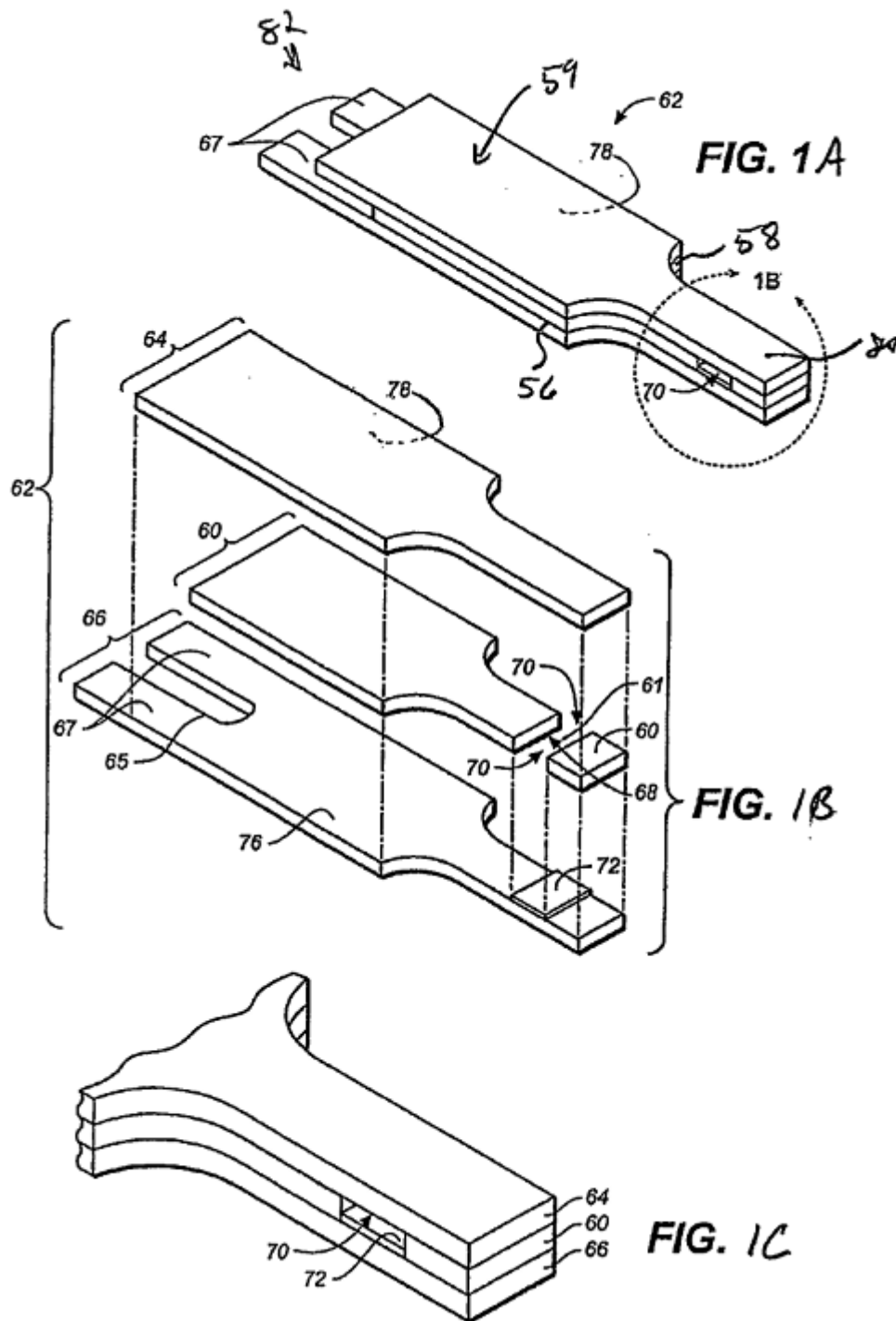
45

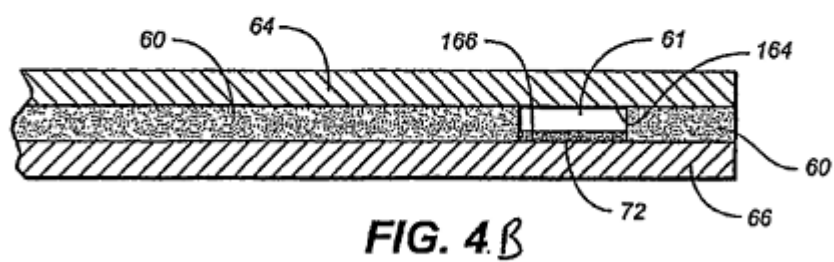
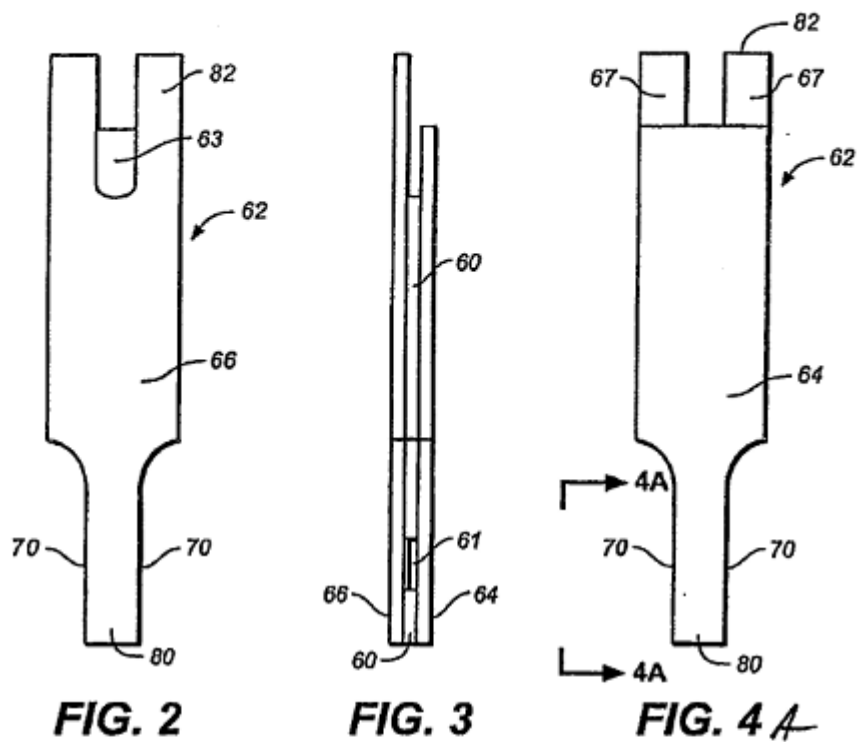
50

55

60

65





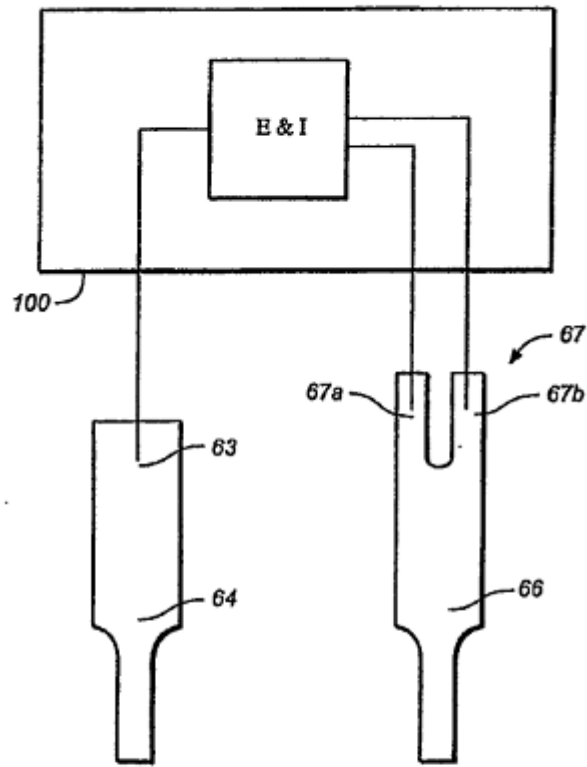


FIG. 5

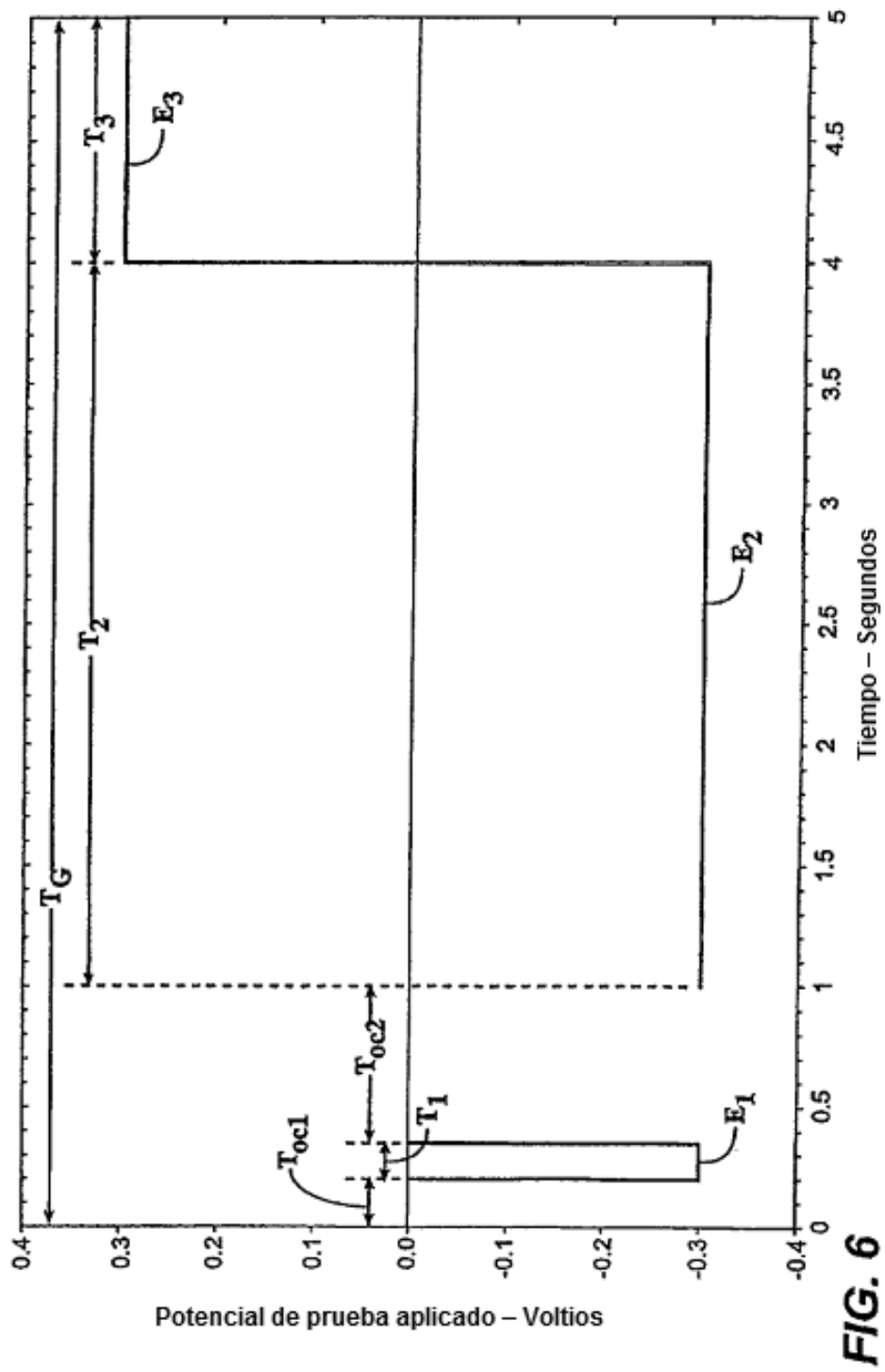


FIG. 6

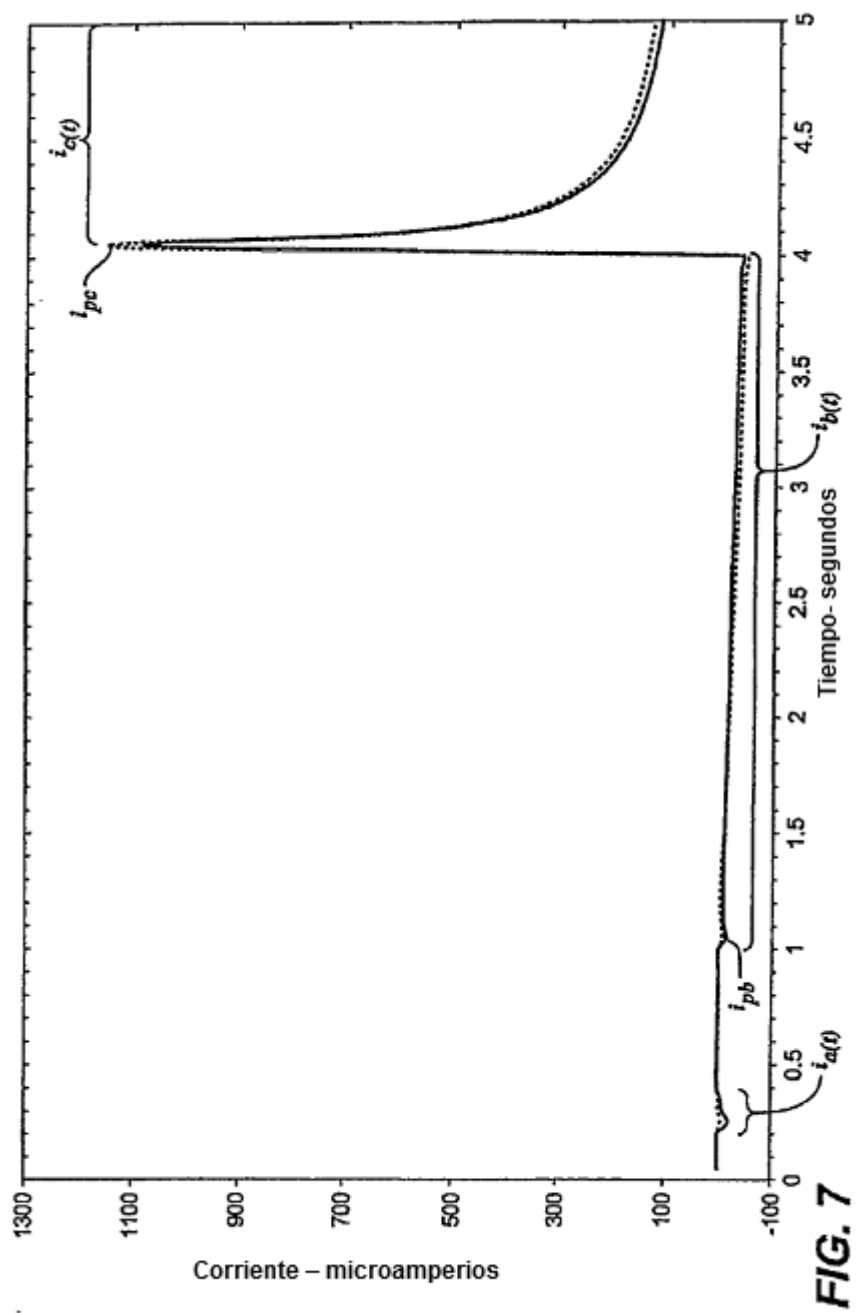


FIG. 7

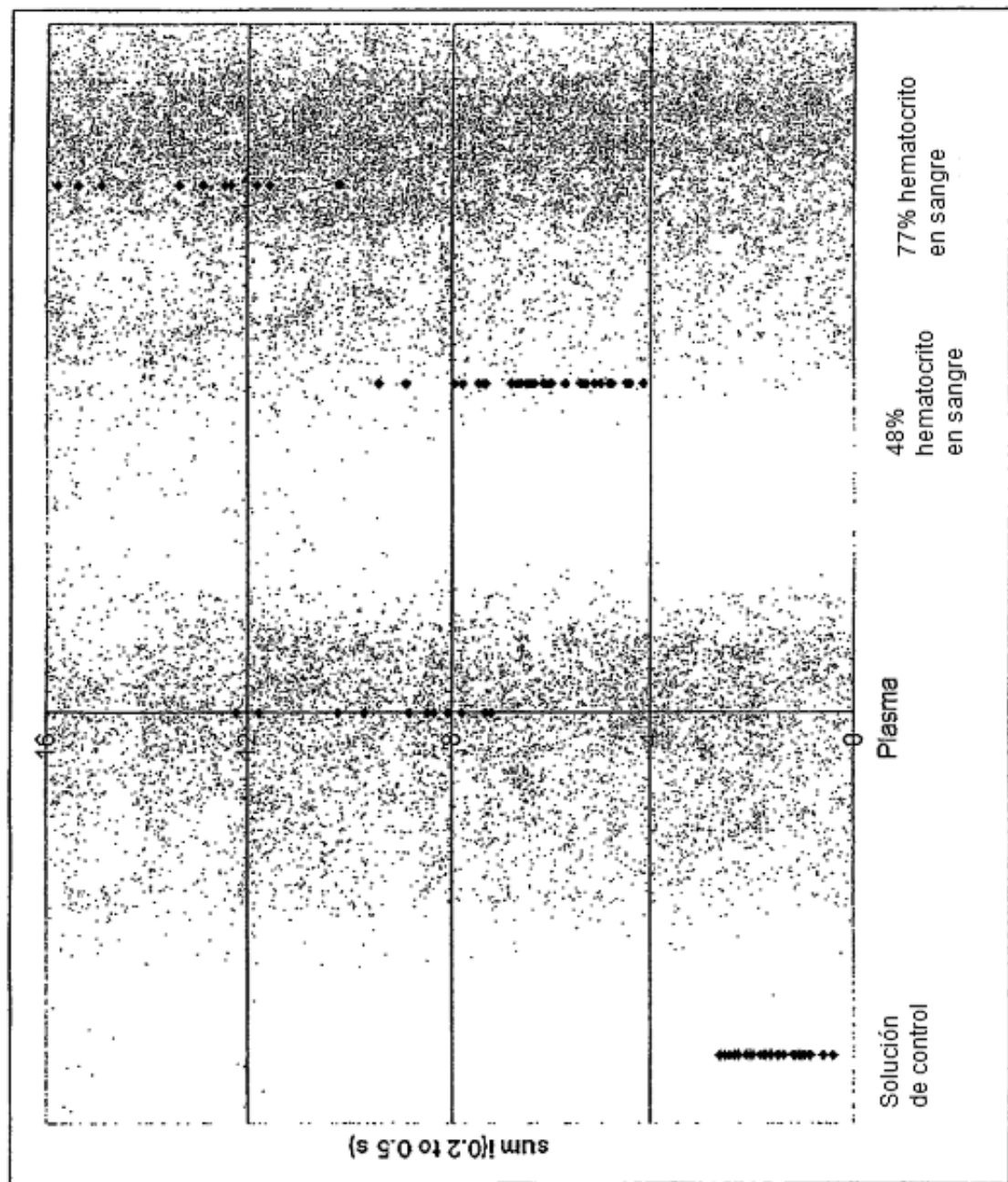


FIG. 8

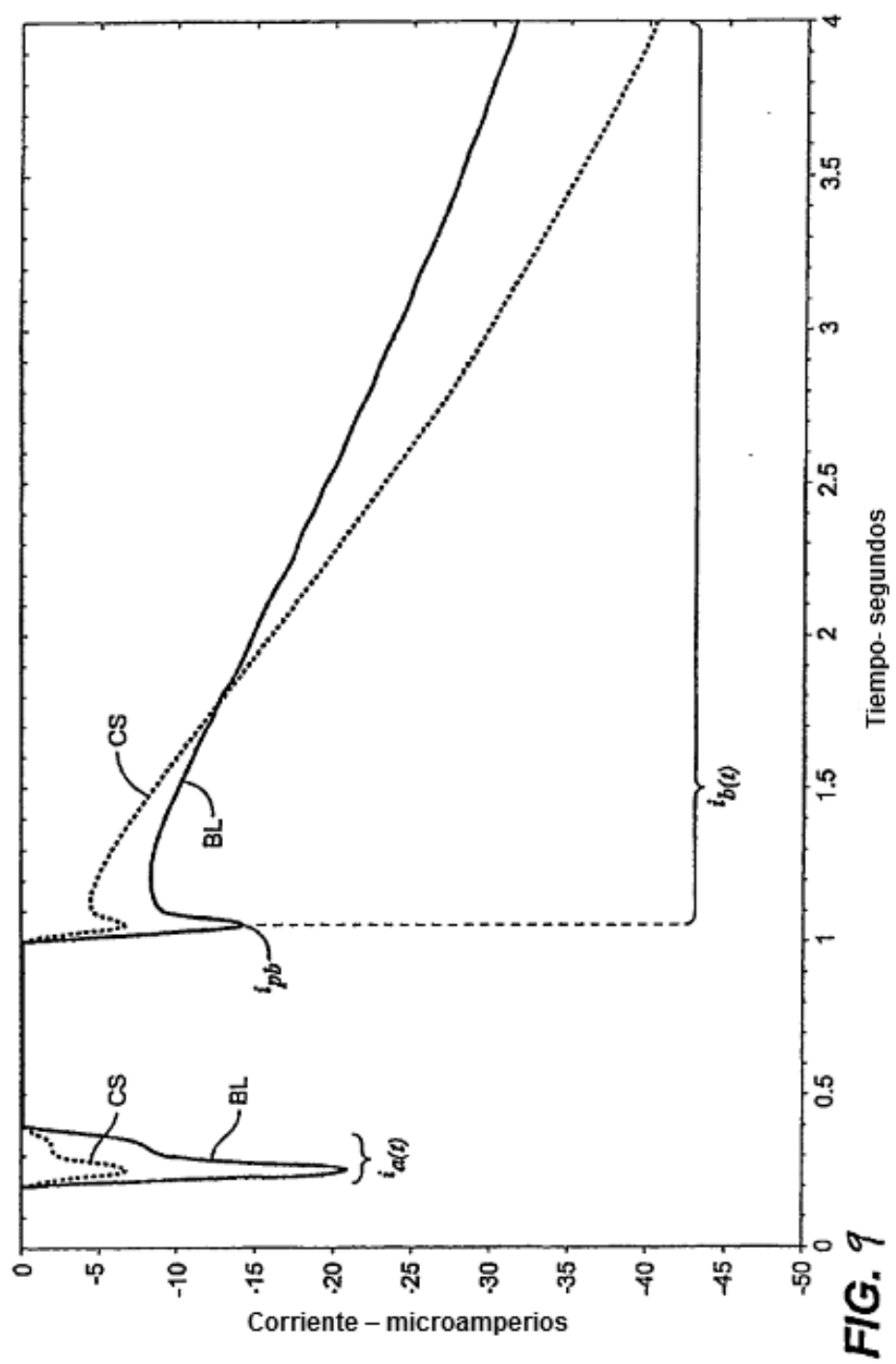


FIG. 9

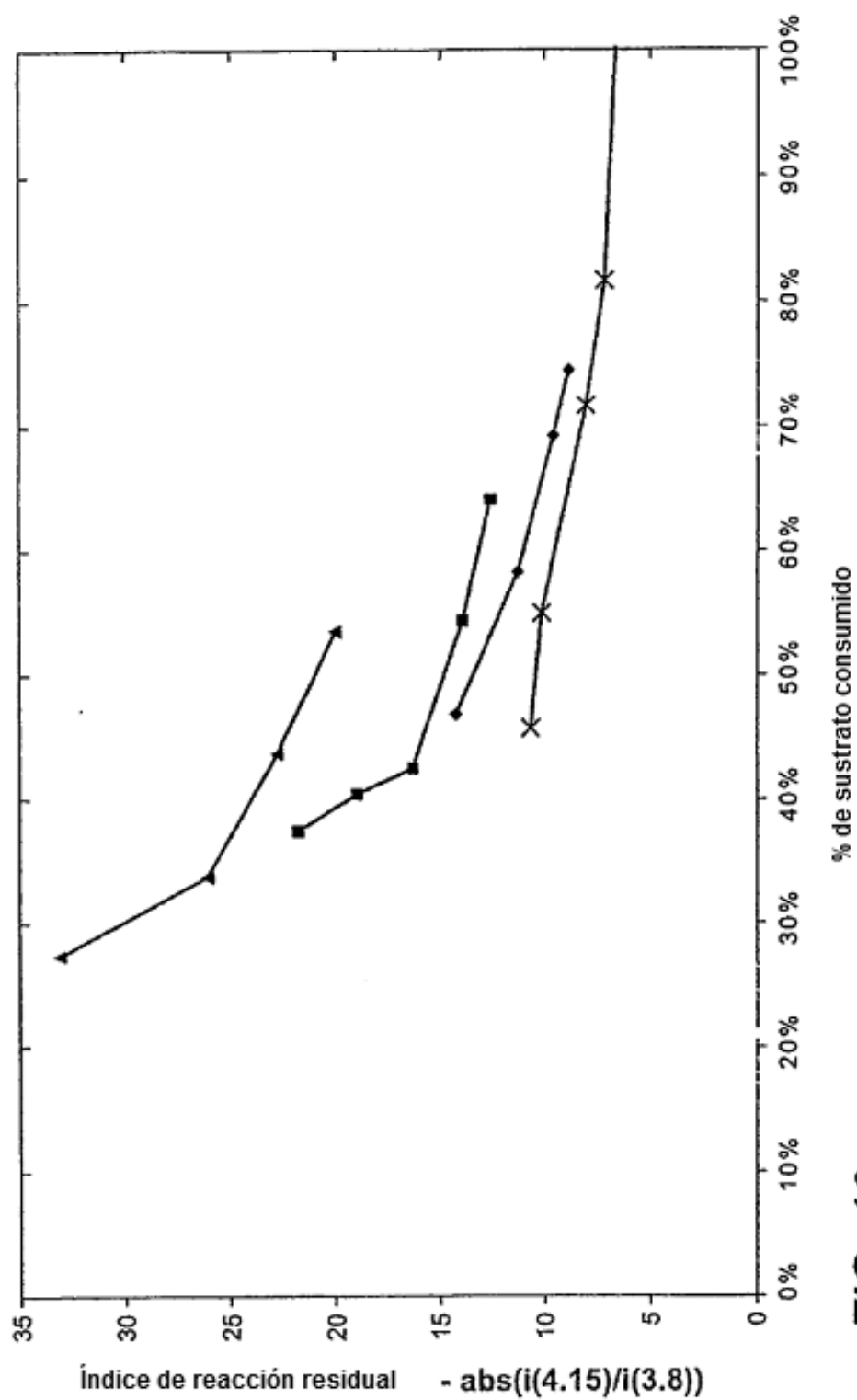


FIG. 10

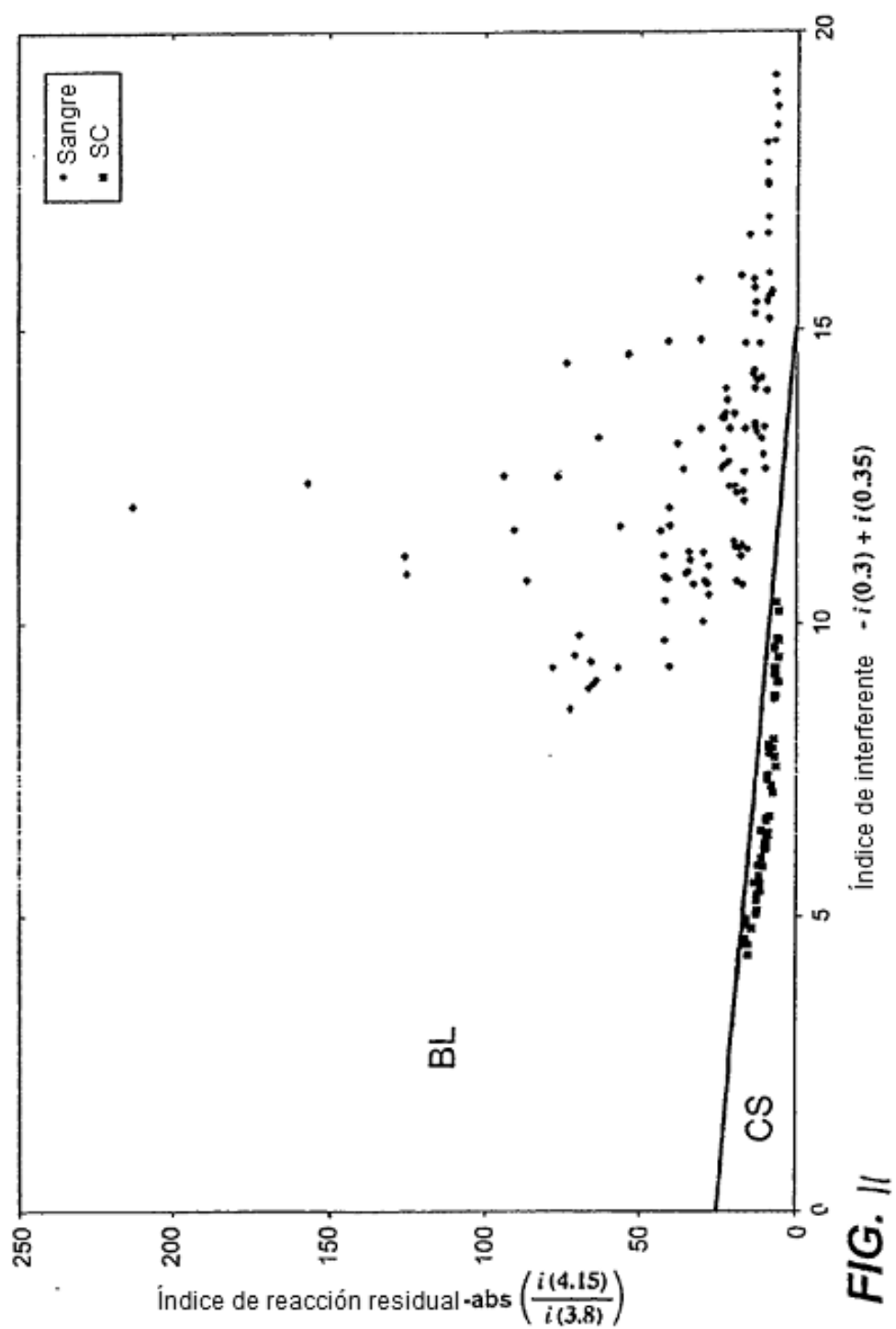


FIG. 11

Fig. 12

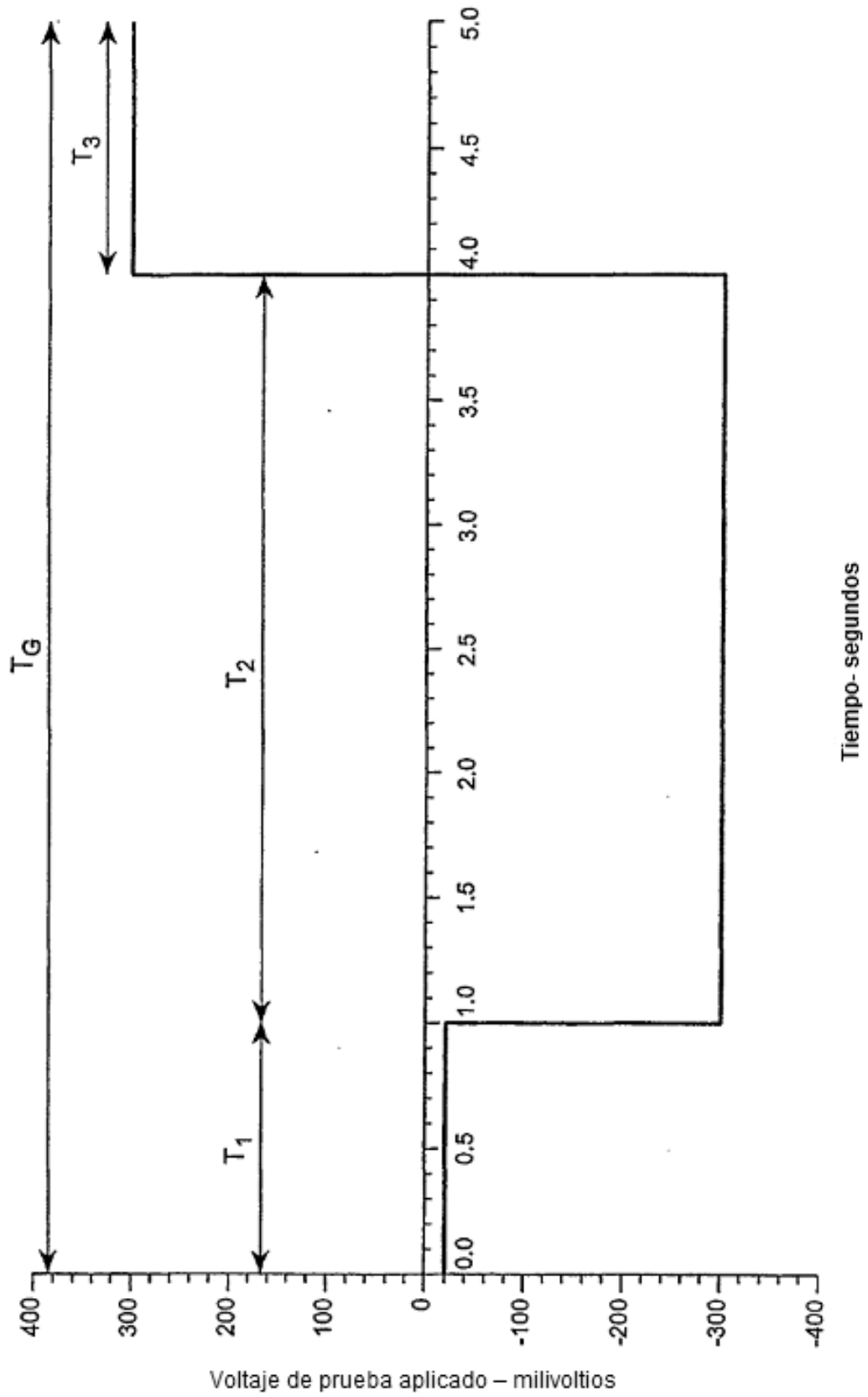


Fig. 13

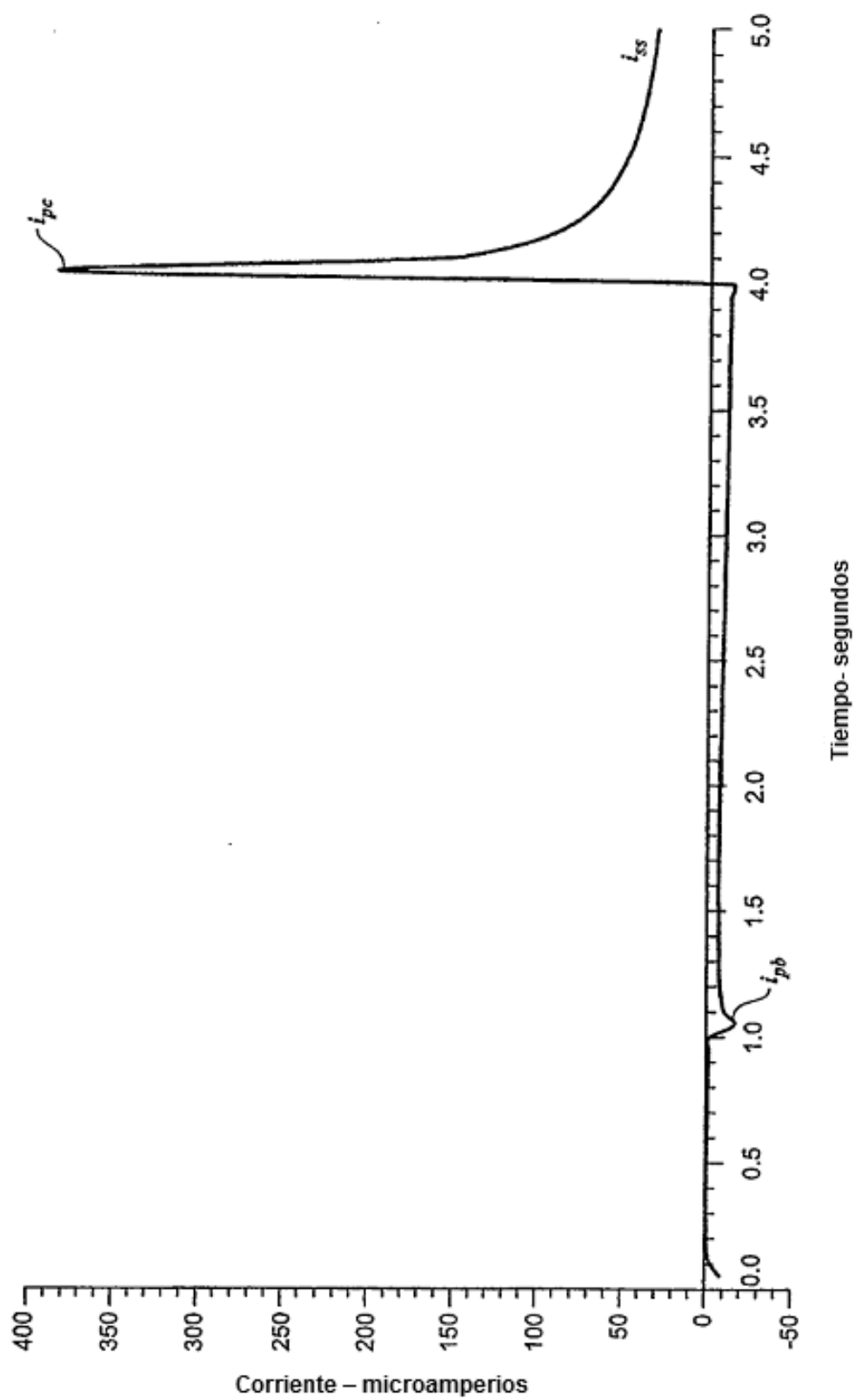


Figura 14

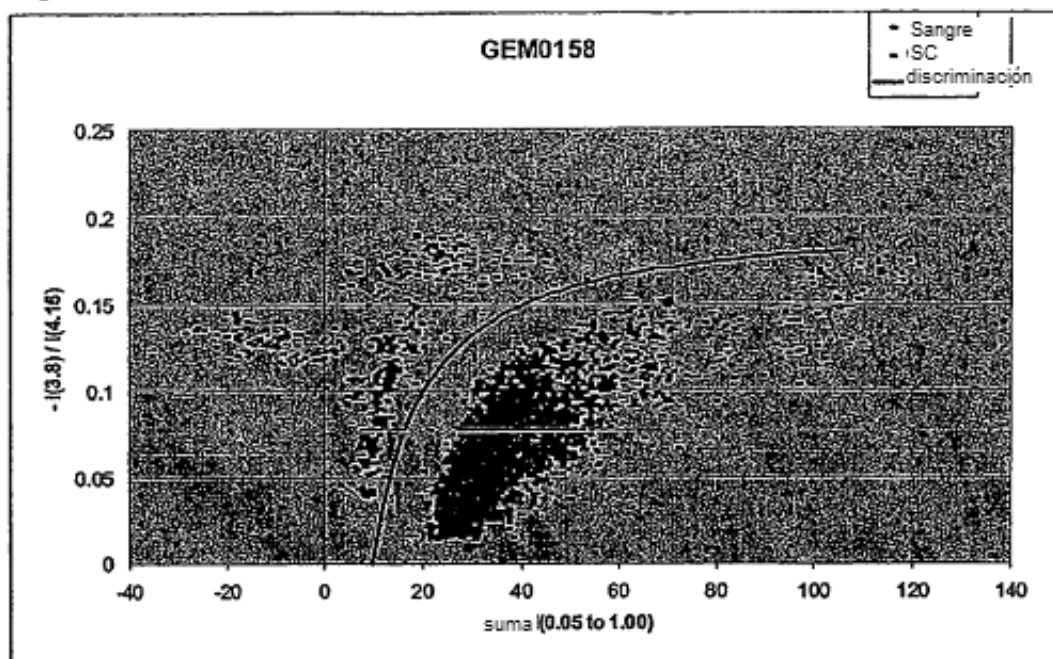


Figura 15

