

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 784**

51 Int. Cl.:

A61B 5/00 (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: **30.03.2007 E 10180741 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2263522**

54 Título: **Métodos para analizar una muestra en presencia de interferentes**

30 Prioridad:

31.03.2006 US 278341

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

17.04.2018

73 Titular/es:

**LIFESCAN, INC. (100.0%)
965 Chesterbrook Boulevard
Wayne, PA 19087, US**

72 Inventor/es:

**CHATELIER, RONALD C.;
HODGES, ALASTAIR MCINDOE y
VERITY, BRUCE**

74 Agente/Representante:

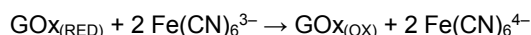
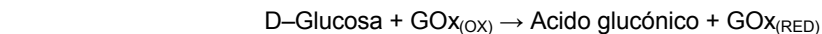
IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 663 784 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).

Métodos para analizar una muestra en presencia de interferentes**DESCRIPCIÓN****5 Antecedentes de la invención**

Las tiras de ensayo de glucosa electroquímicas, tales como las usadas en el kit de análisis de sangre entera OneTouch® Ultra®, que está disponible en LifeScan, Inc., están diseñadas para medir la concentración de glucosa en una muestra de sangre de pacientes con diabetes. La medición de la glucosa se basa en la oxidación específica de la glucosa por la flavoenzima glucosa oxidasa ($\text{GOX}_{(\text{ox})}$). Durante esta reacción, la enzima se reduce, indicado como ($\text{GOX}_{(\text{red})}$). La enzima se vuelve a oxidar mediante la reacción con el mediador oxidado ferricianuro ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$), que se reduce durante el curso de la reacción. Estas reacciones se resumen a continuación.



20 Cuando la reacción expuesta anteriormente se realiza con un potencial de ensayo aplicado entre dos electrodos, se puede crear una corriente de eléctrica por la reoxidación electroquímica del mediador reducido (ferrocianuro o $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$) en la superficie del electrodo. De esta manera, como en un entorno ideal, la cantidad de ferricianuro creada durante la reacción química descrita anteriormente es directamente proporcional a la cantidad de glucosa en la muestra situada entre los electrodos, la corriente generada sería proporcional al contenido de glucosa de la muestra. Un mediador, tal como el ferricianuro, es un compuesto que intercambia electrones entre una enzima redox, tal como glucosa oxidasa, y un electrodo. En un tipo diferente de tira de ensayo de glucosa, se puede usar la enzima glucosa deshidrogenasa usando un cofactor de pirroloquinolina quinona (PQQ) en lugar de glucosa oxidasa. A medida que se incrementa la concentración de glucosa, la cantidad de mediador reducido que se forma también se incrementa, por tanto, hay una relación directa entre la corriente de glucosa y la corriente resultante de la reoxidación del mediador reducido. En particular, la transferencia de electrones a través de la interfase eléctrica da lugar a un flujo de corriente (2 moles de electrones por cada mol de glucosa que se oxida). La corriente resultante de la introducción de glucosa puede, por lo tanto, denominarse corriente de analito o, más particularmente, corriente de glucosa.

35 Debido a que el control de los niveles de glucosa en la sangre es una herramienta importante en el tratamiento de enfermedades como la diabetes, los medidores de ensayo que usan los principios expuestos anteriormente se han hecho muy populares. La corriente de glucosa generada durante una prueba es registrada por el medidor de ensayo y se convierte en una lectura de la concentración de glucosa usando un algoritmo predeterminado que relaciona la corriente con una concentración de glucosa por medio de una fórmula matemática sencilla. En general, los medidores de ensayo funcionan junto con una tira de ensayo desechable que incluye una cámara de recepción de la muestra y al menos electrodos y un reactivo. Durante el uso, el usuario deposita una pequeña muestra de sangre en la cámara de reacción de la muestra, que analiza el medidor de ensayo para proporcionar al usuario un nivel de azúcar en sangre.

45 En términos electroquímicos, la función del medidor de ensayo es doble. Primero, proporciona un potencial polarizante de ensayo (por ejemplo, 0,4 V) que polariza la interfase eléctrica y permite el flujo de una corriente celular entre dos la superficies de del electrodo de trabajo. En segundo lugar, el medidor de ensayo puede medir la corriente celular. Por lo tanto, puede considerarse que el medidor de ensayo es un sistema electroquímico simple que funciona en modo de dos electrodos aunque, en la práctica, puede usarse un tercero o incluso un cuarto electrodo para facilitar la medición de la glucosa y/o llevar a cabo otras funciones del medidor del ensayo.

50 En la mayoría de las situaciones, se considera que las ecuaciones expuestas anteriormente son una aproximación suficiente de la reacción química que tiene lugar en la tira de ensayo, de modo que se obtiene una representación razonablemente exacta de la concentración de glucosa. Sin embargo, en ciertas circunstancias y para ciertos fines, puede ser ventajoso mejorar la precisión de la medición, por ejemplo, cuando una parte de la corriente medida en el electrodo es el resultado de la presencia de otros productos químicos o compuestos en la muestra. Cuando tales compuestos o compuestos químicos adicionales están presentes, pueden denominarse interferentes y la corriente adicional resultante puede denominarse corriente interferente.

60 Ejemplos de potenciales interferentes (es decir, compuestos que se encuentran en fluidos fisiológicos, como la sangre, pueden generar una corriente de interferencia en presencia de un potencial ensayo) incluyen ascorbato, urato y acetaminofén (Tylenol™ o Paracetamol). Un primer mecanismo para generar una corriente de interferencia en un medidor de ensayo implica la oxidación de uno o más compuestos interferentes mediante la reducción del mediador (por ejemplo, ferricianuro). A su vez, el mediador reducido resultante puede oxidarse después en el electrodo de trabajo. Este primer mecanismo también puede denominarse corriente interferente indirecta. Un segundo mecanismo para generar una corriente interferente en un medidor de ensayo implica la oxidación de uno o más interferentes en el electrodo de trabajo. El segundo mecanismo puede denominarse corriente interferente

directa. Por lo tanto, la corriente celular medida incluye contribuciones no deseadas de los interferentes.

Una estrategia que puede usarse para disminuir el efecto interferente es usar un segundo electrodo de trabajo junto con un primer electrodo de trabajo y un electrodo de referencia. Si el segundo electrodo de trabajo está desnudo, el segundo electrodo de trabajo puede medir una corriente interferente directa. El primer electrodo de trabajo debe tener una enzima y un mediador para medir una corriente que incluye la suma de una corriente de glucosa, una corriente interferente directa y una corriente interferente indirecta. La corriente interferente directa medida en el segundo electrodo de trabajo puede restarse de la corriente en el primer electrodo de trabajo para reducir el efecto de los interferentes.

Como alternativa, o adicionalmente, el segundo (o tercero) electrodo de trabajo puede recubrirse con un mediador (pero no una enzima) para permitir que el segundo electrodo de trabajo mida una corriente que incluya una suma de la corriente interferente directa e indirecta (pero no glucosa). En este caso, la corriente interferente directa e indirecta medida en el segundo electrodo de trabajo puede restarse de la corriente en el primer electrodo de trabajo para reducir el efecto de los interferentes.

Una desventaja del uso de un segundo (o tercero) electrodo de trabajo para compensar los efectos de los interferentes es que el segundo electrodo de trabajo aumenta de forma incremental el volumen de la cámara de reacción de la muestra y es preferente que la cámara de reacción de la muestra sea pequeña para que los usuarios no tengan que proporcionar una muestra de sangre grande. Una desventaja adicional del uso de un segundo electrodo de trabajo es que aumenta el coste de fabricación y la complejidad. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos para medir la glucosa independientemente de los interferentes usando solamente dos electrodos.

Sumario

De acuerdo con la presente invención se proporciona un método como se define en la reivindicación 1.

En una realización, se divulga un método para determinar una concentración de hemoglobina en una muestra fisiológica que contiene tanto un analito como un interferente. El método incluye el paso de introducir una muestra fisiológica en una célula electroquímica, y aplicar un primer potencial de prueba que tienen una primera polaridad a la célula. Se mide el valor de corriente de la célula como una función del tiempo para obtener un primer transitorio de corriente. Se descubre luego un segundo transitorio de corriente aplicando un segundo potencial de prueba que tiene una segunda polaridad y midiendo dicho valor de corriente de la célula como una función del tiempo.

En base al primer transitorio de corriente se determina un primer estado estacionario y en base al segundo transitorio de corriente se determina un segundo estado estacionario. Restar el primer valor de corriente de estado estacionario del segundo valor de corriente de estado estacionario proporciona una corriente que es proporcional a la concentración de hemoglobina.

En un aspecto, la concentración de hemoglobina se calcula en base a una ecuación

$$[H] = \text{intersección} + \text{pendiente} \times L \left\{ \frac{i_{ssb} - i_{ssa}}{2FAD} \right\}$$

donde $[H]$ es una concentración de analito, i_{ssa} es la corriente de estado estacionario del primer transitorio de corriente, i_{ssb} es la corriente de estado estacionario del segundo transitorio de corriente, la pendiente y la intersección son factores de calibración, F es la constante de Faraday, A es el área del primer electrodo, D es el coeficiente de difusión de la molécula redox activa, y L es la separación de los electrodos.

Breve descripción de los dibujos

Las nuevas características de la invención se exponen, en particular, en las reivindicaciones adjuntas. Puede obtenerse una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención por referencia a la siguiente descripción detallada que expone formas de realización ilustrativas, en las que se usan los principios de la invención y sus figuras adjuntas.

La figura 1A ilustra una vista en perspectiva de una tira de ensayo montada adecuada para su uso en los métodos divulgados en el presente documento;

La figura 1B ilustra una vista en perspectiva en despiece ordenado de una tira de ensayo no montada adecuada para su uso en los métodos divulgados en el presente documento;

La figura 1C ilustra una vista en perspectiva ampliada de una parte proximal de la tira de ensayo adecuada para su uso en los métodos divulgados en el presente documento;

La figura 2 es una vista en planta desde abajo de una realización de una tira de ensayo divulgada en el presente

documento;

La figura 3 es una vista en planta lateral de la tira de ensayo de la figura 2;

la figura 4A es una vista en planta desde arriba de la tira de prueba de la Figura 3;

la figura 4B es una vista lateral parcial de una parte proximal de la tira de ensayo de la figura 4A:

5 La figura 5 es un esquema simplificado que muestra un medidor de ensayo que se conecta eléctricamente con partes de una tira de ensayo divulgada en el presente documento;

la figura 6 muestra un ejemplo de una forma de onda de potencial en la que un medidor de ensayo aplica un potencial de circuito abierto y una pluralidad de potenciales de ensayo para intervalos de tiempo prescritos;

10 la figura 7 muestra una primera y un segundo transitorio de corriente generado analizando una muestra fisiológica que contiene 62 mg / dl de concentración de glucosa sin interferentes añadidos (línea continua) y con una concentración de ascorbato de 20 mg / dl (línea discontinua);

la figura 8 es una vista ampliada de la figura 7 que muestra un primer transitorio de corriente;

la figura 9 es una representación gráfica de un gradiente de concentración de mediador reducido dentro de una cámara de reacción de la muestra;

15 la figura 10 es un gráfico que muestra el % de perturbación del gradiente de mediador reducido en el primer electrodo como una función del segundo intervalo de tiempo de circuito abierto;

la figura 11 es un gráfico que muestra la polarización absoluta de los resultados de glucosa para un primer algoritmo de glucosa y un segundo algoritmo de glucosa;

20 la figura 12 es un gráfico que muestra el sesgo absoluto de los resultados de glucosa para un primer algoritmo de glucosa y un tercer algoritmo de glucosa; y

la figura 13 muestra un sesgo absoluto para la concentración de hemoglobina en presencia de un interferente particular usando un primer algoritmo de hemoglobina y un segundo algoritmo de hemoglobina.

Descripción detallada de realizaciones ilustrativas de la invención

25 Los métodos y dispositivos objeto son adecuados para usar en la determinación de una amplia variedad de muestras y son particularmente adecuados para usar en la determinación de analitos en sangre entera, plasma, suero, líquido intersticial o derivados de los mismos, cuando un analito de interés concreto es la glucosa. La presente invención proporciona métodos para determinar un valor de concentración de analito en una muestra fisiológica de una manera rápida y con resultados precisos. En el presente documento se describen estructuras de ejemplos de ejemplos de tiras ensayo que pueden usarse para medir un valor de concentración del analito. Adicionalmente, en el presente documento se describen métodos de uso de la tira de ensayo en la que se mide un transitorio de corriente y se recoge mediante un medidor conectado eléctricamente a la tira de ensayo. En el presente documento se describen todavía adicionalmente algoritmos que se usan para procesar el transitorio de corriente de una manera rápida y que proporciona valores precisos de la concentración del analito. En un aspecto adicional, en el presente documento se describen métodos para determinar la concentración del analito de una manera que reduce la influencia de los interferentes.

40 Los métodos objeto se pueden usar, en principio, con cualquier tipo de célula electroquímica que tenga un primero y un segundo electrodos separados. Para ilustrar la invención, en el presente documento se describe una realización particular que utiliza electrodos opuestos. Sin embargo, debe entenderse que la invención es igualmente aplicable a células con electrodos en otras configuraciones, por ejemplo, también pueden usarse células con electrodos en el mismo plano. La única limitación de la configuración que se tiene que aplicar es que los electrodos deben estar colocados de tal manera que la medición de la corriente interferente esté sustancialmente libre de contribuciones de especies electroactivas formadas por la reacción del analito (por ejemplo, glucosa). Esto se logra normalmente separando los electrodos por una distancia suficiente de manera que las especies electroactivas formadas por reacción del analito no tengan tiempo suficiente para alcanzar el electrodo donde se está midiendo la corriente interferente antes o durante la medición de la corriente interferente.

50 A continuación se describen e ilustran en las figuras 1A a 4B varios ejemplos de uno de tales dispositivos en forma de una tira de ensayo 62 que incluye un cuerpo alargado 59 que se extiende a lo largo de un eje longitudinal L desde un extremo proximal 80 hasta un extremo distal 82 y que tiene bordes laterales 56, 58. El cuerpo 59 puede incluir una cámara de reacción 61 de la muestra proximal que contiene los electrodos 164, 166 y un reactivo 72. El cuerpo de la tira de ensayo 59 puede incluir además contactos eléctricos posicionados distalmente 63, 67 para comunicarse eléctricamente con un medidor de ensayo (no ilustrado).

60 En un aspecto, la tira de ensayo 62 está formada por múltiples capas que incluyen una primera capa conductora de electricidad 66, un separador 60, una segunda capa conductora de electricidad 64. La primera capa conductora de electricidad 66 y / o la segunda capa conductora de electricidad 64 pueden estar formadas por diversos materiales conductores que están, en un ejemplo, colocados sobre una lámina aislante (no mostrada). La capa separadora 60 puede estar formada por diversos materiales eléctricamente aislantes y puede incluir, o estar formada por, un adhesivo. Un experto en la técnica apreciará que aunque se ilustra una tira de ensayo de tres capas, se podrían usar capas adicionales conductoras de la electricidad o aislantes para formar el cuerpo de la tira de ensayo 59.

65

Como se ilustra en las Figuras 1A a 1C, la cámara de reacción de muestra proximal 61 puede estar definida por la primera capa conductora de electricidad 66, la segunda capa conductora eléctricamente 64 y la capa separadora 60. Como se describe con más detalle a continuación, la cámara de reacción 61 puede incluir también un reactivo 72 y el primero y segundo electrodos 166, 164. Por ejemplo, un área recortada 68 en el espaciador 60 puede exponer una parte de la segunda capa conductora de electricidad 64 y la primera capa conductora de electricidad 66, y por lo tanto, define el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164, respectivamente. El reactivo 72 puede estar en forma de una capa colocada sobre el primer electrodo 166.

En un ejemplo, la cámara de reacción 61 está adaptada para analizar muestras de pequeño volumen. Por ejemplo, la cámara de reacción de la muestra 61 puede tener un volumen que varía de aproximadamente 0,1 microlitros a aproximadamente 5 microlitros, preferentemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 3 microlitros y, más preferentemente, de aproximadamente 0,3 microlitros a aproximadamente 1 microlitro. Para acomodar un volumen de muestra pequeño, los electrodos están preferentemente muy separados. Por ejemplo, cuando el separador 60 define la distancia entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164, la altura del separador 60 puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 500 micrómetros, preferentemente entre aproximadamente 10 micrómetros y aproximadamente 400 micrómetros, y más preferentemente entre aproximadamente 40 micrómetros y aproximadamente 200 micrómetros.

Para ayudar aún más con la reducción del volumen de la cámara de reacción 61, se puede ajustar la dimensión longitudinal y / o lateral de la zona de recorte 68 y / o del cuerpo 59. Por ejemplo, el cuerpo de la tira de ensayo 59 puede incluir partes recortadas 51, 52 de manera que la anchura lateral de la cámara de reacción 61 sea menor que la anchura total (anchura más ancha) del cuerpo de la tira de ensayo 59. Las partes recortadas 51 también pueden facilitar el suministro de una muestra a la cámara de reacción 61. Por ejemplo, la porción recortada 51, 52 puede tener una forma correspondiente a una parte de un dedo de un usuario. Cuando un usuario exprime una gota de sangre con un punzón digital, las partes cortadas 51, 52 pueden ayudar al usuario a alinear una muestra colocada sobre el dedo con un puerto receptor de la muestra (por ejemplo, aberturas 70) en el borde lateral 56, 58 del cuerpo 59. Un experto en la técnica apreciará que mientras se ilustran dos porciones recortadas, el cuerpo de la tira de ensayo 59 podría incluir solamente una sola porción recortada o ninguna porción recortada.

Como se ha indicado anteriormente, la parte proximal del cuerpo de la tira de ensayo 59 puede incluir al menos un puerto de liberación de la muestra de una muestra a la cámara de reacción 61. Por ejemplo, el área recortada 68 puede extenderse transversalmente a los bordes laterales 56, 58 del cuerpo de la tira de ensayo 59 para proporcionar dos aberturas 70 para la liberación del fluido fisiológico a la cámara de reacción de la muestra 61. Cuando hay dos aberturas 70 presentes, una puede actuar como un puerto de recepción de la muestra para suministrar una muestra de fluido mientras que la otra puede actuar como ventilación. Un experto en la técnica apreciará que la muestra puede suministrarse a la cámara de reacción de la muestra 61 usando estructuras alternativas que incluyen puertos de recepción de muestras y / o ventilaciones situados en diferentes posiciones en el cuerpo de la tira de ensayo 59, tales como, por ejemplo, puertos de recepción de la muestra y/o ventilaciones posicionados en las capas primera y / o segunda conductoras de la electricidad 66, 64.

En un ejemplo, la tira de ensayo 62 está adaptada para extraer la muestra a la cámara de reacción 61 por acción capilar. Por ejemplo, las dimensiones y las características de la superficie de la cámara de reacción 61 y las aberturas 70 pueden adaptarse para producir una fuerza capilar cuando una muestra líquida (por ejemplo, sangre entera) se pone en contacto con una de las aberturas 70. Un experto en la técnica apreciará que la cámara de reacción 61 puede incluir estructuras adicionales para ayudar / crear fuerzas capilares, tales como, por ejemplo, perlas, una membrana porosa y / u otras cargas.

Como se ha mencionado anteriormente, puede disponerse un reactivo, tal como el reactivo 72, dentro de la cámara de reacción 61. La composición del reactivo 72 puede variar dependiendo del analito deseado y de la forma esperada de la muestra. En un aspecto, el reactivo 72 incluye al menos un mediador y una enzima y se deposita sobre el primer electrodo 166. Entre los ejemplos de mediadores adecuados se incluyen ferricianuro, ferroceno, derivados de ferroceno, complejos de osmio bipyridilo y derivados de quinona. Entre los ejemplos de enzimas adecuadas se incluyen glucosa oxidasa, glucosa deshidrogenasa (GDH) a base de cofactor de pirroloquinolina quinona (PQQ), y GDH basada en el cofactor del dinucleótido nicotinamida adenina. Una formulación de reactivo de ejemplo, que sería adecuada para fabricar la capa de reactivo 72, se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos pendiente de tramitación N.º 10 / 242.951, titulada Método de fabricación de un dispositivo médico basado en biosensor esterilizado y calibrado, publicada como la solicitud de patente publicada de Estados Unidos n.º 2004/0120848.

Distal a la cámara de muestra proximal 61, el cuerpo 59 puede incluir pistas de conexión que conectan eléctricamente los electrodos primero y segundo 166, 164 con contactos eléctricos distales 63, 67. En un aspecto, la primera capa conductora de electricidad 66 incluye una primera pista de conexión 76 que conecta eléctricamente el primer electrodo 166 con un primer contacto eléctrico 67. De manera similar, la segunda capa conductora de la electricidad 64 puede incluir una segunda pista de conexión 78 que conecta el segundo electrodo 164 con un segundo contacto eléctrico 63 (figura 2).

Las capas conductoras de la electricidad primera y segunda también pueden definir un primer y un segundo contactos eléctricos 67, 63 que facilitan el contacto eléctrico de la tira de ensayo 62 con un medidor de ensayo. En un ejemplo, una parte de la primera capa conductora de la electricidad 66 se extiende distalmente desde el extremo distal de la capa separadora 60 y la segunda capa conductora de la electricidad 64 para definir el primer contacto eléctrico 67. El segundo contacto eléctrico puede definirse mediante una muesca 65 en forma de U en la primera capa conductora de la electricidad 66 que expone una porción de la segunda capa conductora de la electricidad 64. Un experto en la técnica apreciará que la tira de ensayo 62 puede incluir diversas configuraciones alternativas de contacto eléctrico para conectarse eléctricamente a un medidor de ensayo. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.379.513 divulga estructuras de conexión de células electroquímicas.

La figura 5 proporciona un esquema simplificado que muestra un medidor de ensayo 100 que se interconecta con el primer contacto eléctrico 67 y el 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 ensayo 100 está adaptado para conectarse eléctricamente al primer electrodo 166 y al segundo electrodo 164, a través del primer contacto eléctrico 67 y el segundo contacto eléctrico 63, respectivamente (como se muestra en las figuras 2 y 5). En un aspecto, el medidor de ensayo 100 contacta con el segundo contacto eléctrico 63 a través de la muesca en forma de U 65.

Como se ilustra en la figura 5, el contacto eléctrico 67 puede incluir dos puntas denotadas como 67a y 67b. En un ejemplo ejemplar, el medidor de ensayo 100 se conecta por separado a las puntas 67a y 67b, de tal manera que cuando el medidor de ensayo 100 interacciona con la tira de ensayo 62, se completa un circuito. El medidor de ensayo 100 puede medir la resistencia o continuidad eléctrica entre las puntas 67a y 67b para determinar si la tira de ensayo 62 está conectada eléctricamente al medidor de ensayo 100. Un experto en la técnica apreciará que el medidor de ensayo 100 puede usar diversos sensores y/o circuitos alternativos para determinar cuando la tira de ensayo 62 está posicionada apropiadamente con respecto al medidor de ensayo 100.

El medidor de ensayo 100 también se puede adaptar para detectar la presencia de fluido dentro de la cámara de reacción 61. Por ejemplo, una vez que el medidor de ensayo 100 reconoce que la tira 62 se ha insertado, el medidor de ensayo 100 puede aplicar una corriente constante (por ejemplo, una corriente de 1 microamperio) entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164. Debido a que la cámara de reacción 61 está inicialmente seca, el medidor de ensayo 100 puede aplicar un voltaje máximo en un intento de conseguir el flujo de corriente deseado. Sin embargo, una vez que un usuario dosifica una muestra fisiológica sobre la entrada 70, esta cámara de reacción de muestra 61 se llena. Cuando la muestra fisiológica atraviesa el espacio entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164, el medidor de ensayo 100 medirá una disminución en el voltaje medido (por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 6.193, 873) que está por debajo de un umbral predeterminado.

En algunos casos, reconocer que el fluido fisiológico se aplicó no indica necesariamente que la cámara de reacción de la muestra 61 está completamente llena, sino que solo puede confirmar la presencia de algún fluido fisiológico en la cámara de reacción de la muestra 61. Una vez que el medidor de ensayo 100 determina que se ha aplicado fluido fisiológico a la tira de ensayo 62, puede dejarse que transcurra un tiempo corto, pero finito, de modo que el fluido fisiológico llene completamente la cámara de reacción de la muestra 61.

Una vez que se ha dosificado una muestra fisiológica sobre la tira de ensayo 62, el medidor de ensayo 100 puede realizar una prueba de glucosa aplicando un potencial de circuito abierto y una pluralidad de potenciales de ensayo durante los periodos de tiempo prescritos. Por ejemplo, se puede realizar una prueba de glucosa a lo largo de un intervalo de tiempo de ensayo de glucosa T_G que puede incluir secuencialmente un intervalo de tiempo de circuito abierto T_{oc} , un primer intervalo de tiempo de potencial T_1 , y un segundo intervalo de tiempo de potencial de ensayo T_2 . La figura 6 proporciona una representación gráfica de una prueba de ejemplo que tiene tres intervalos de tiempo.

En el siguiente ejemplo de la presente invención, se describirá una serie de intervalos de tiempo que representan colectivamente un intervalo de tiempo del ensayo de glucosa T_G de 5 segundos. Sin embargo, debe apreciarse que el intervalo de tiempo de la glucosa puede variar, incluyendo, por ejemplo, intervalos de tiempo de más o menos de 5 segundos. En un aspecto, los intervalos de tiempo de ensayo de glucosa T_G pueden variar desde aproximadamente 1 segundo a 10 segundos, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 2 a 8 segundos, y, más preferentemente, en el intervalo de aproximadamente 3 a 6 segundos. Una prueba de glucosa puede estar con un intervalo de tiempo de circuito abierto T_{oc} para permitir que la cámara de reacción de muestra 61 se llene. El intervalo de tiempo de circuito abierto T_{oc} puede variar dependiendo de la naturaleza de la muestra (por ejemplo, viscosidad, composición, etc.), las dimensiones y características físicas de la cámara de reacción de la muestra y / o variaciones en el método de llenado (por ejemplo, la fuerza de la acción capilar). Por ejemplo, cuando la temperatura ambiente es fría (por ejemplo, aproximadamente 5 °C) y / o cuando una muestra de sangre puede ser viscosa debido a un alto hematocrito (por ejemplo, > 60 % de hematocrito) podría requerirse un tiempo extra de circuito abierto. En un ejemplo de la presente invención, el intervalo de tiempo de circuito abierto T_{oc} puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 segundos a aproximadamente 2 segundos y preferentemente entre

aproximadamente 0,3 segundos a aproximadamente 1,5 segundos, y más preferentemente entre aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1 segundo.

Una vez transcurrido el intervalo de tiempo de circuito abierto T_{oc} , el medidor de ensayo 100 puede aplicar un primer potencial de ensayo T_1 entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164 para un primer intervalo de tiempo de potencial de ensayo T_1 . Después de que haya transcurrido el primer intervalo de tiempo de potencial de ensayo T_1 el medidor de ensayo 100 puede aplicar un segundo potencial de ensayo E_2 entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164 para un segundo intervalo de tiempo de potencial de prueba T_2 . Durante T_1 y T_2 , el medidor de ensayo 100 puede medir la corriente de la célula como una función del tiempo, denominada en el presente documento transitorio de corriente en el tiempo o un transitorio de corriente y denominado $i_a(t)$ durante el primer intervalo de tiempo de potencial de ensayo T_1 y $i_b(t)$ durante el segundo intervalo de tiempo de potencial de ensayo T_2 .

En un ejemplo, el primer potencial de ensayo E_1 tiene una primera polaridad y el segundo potencial de ensayo E_2 tiene una segunda polaridad y la primera polaridad es opuesta a la segunda polaridad. Además, el primer potencial de ensayo E_1 puede ser suficientemente negativo en magnitud con respecto al segundo electrodo 164, de tal manera que el segundo electrodo 164 funcione como un electrodo de trabajo en el que se mide una corriente de oxidación limitante. Por lo tanto, las especies oxidables se agotan localmente en la superficie del electrodo de trabajo de tal manera que la corriente de oxidación medida es proporcional al flujo de especies oxidables que se difunde desde la solución en masa hacia la superficie del electrodo de trabajo. El término "solución en masa" se refiere a una porción de la solución lo suficientemente alejada del electrodo de trabajo donde la especie oxidable no estaba situada dentro de la zona de agotamiento. De forma similar, el segundo potencial de ensayo E_2 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 en el que se mide una corriente de oxidación limitante. En un ejemplo, el primer potencial de ensayo E_1 y el segundo potencial de ensayo E_2 pueden oscilar desde aproximadamente -0,6 voltios hasta aproximadamente +0,6 voltios. Cuando el primer potencial de ensayo E_1 es negativo, el reactivo 72 puede estar dispuesto sobre el primer electrodo 166.

La figura 6 ilustra un ejemplo de intervalo de tiempo de ensayo de glucosa T_G con el primer potencial de ensayo E_1 de -0,3 voltios y el segundo potencial de ensayo E_2 puede ser de +0,3 voltios. El primer intervalo de tiempo de potencial de ensayo T_1 fue de 3 segundos y el segundo intervalo de tiempo de potencial de ensayo T_2 fue de 1 segundo. El segundo potencial de ensayo E_2 se aplica inmediatamente después de la aplicación del primer potencial de ensayo E_1 .

La figura 7 muestra una primera y una segunda corrientes transitorias generadas en base al intervalo de tiempo del ensayo de glucosa T_G de la figura 6 para una muestra fisiológica que contiene 62 mg / dl de concentración de glucosa sin interferentes añadidos (línea continua) y con una concentración de ascorbato de 20 mg / dl (línea discontinua). La figura 8 muestra una vista ampliada de un primer transitorio de corriente en la figura 7.

Suponiendo que una tira de ensayo tiene una disposición opuesta o en oposición como se muestra en las Figuras 1A a 4B, se puede calcular una concentración de glucosa usando un primer algoritmo de glucosa como se muestra en la Ecuación (Ec.). 1.

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

En la ecuación 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 derivadas empíricamente. Una derivación de la Ec. 1 se puede encontrar en una solicitud de patente de Estados Unidos pendiente de tramitación n.º 11 / 240.797 que se presentó el 30 de septiembre de 2005 y titulada "Método y aparato para análisis electroquímico rápido" y la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2007/074977.

El primer valor de corriente i_1 y el segundo valor de corriente i_2 se pueden calcular a partir de el segundo transitorio de corriente y el tercer valor de corriente i_3 se calcula a partir de el primer transitorio de corriente. Un experto en la técnica apreciará que los nombres "primero", "segundo" y "tercero" se eligen por conveniencia y no reflejan necesariamente el orden en el que se calculan los valores de la corriente. Todos los valores de la corriente (por ejemplo, i_1 , i_2 e i_3) indicados en la Ec. 1 y en las ecuaciones posteriores puede utilizar el valor absoluto de la corriente.

El primer valor de corriente i_1 y el segundo valor de corriente i_2 pueden ser, en un aspecto, una integral de los valores de la corriente en un intervalo de tiempo de el segundo transitorio de corriente, una suma de los valores de la corriente en un intervalo de tiempo de el segundo transitorio de corriente o un promedio o único valor de la corriente de el segundo transitorio de corriente multiplicado por un intervalo de tiempo de el segundo transitorio de corriente. De forma similar, el tercer valor de corriente i_3 puede ser, en un aspecto, una integral de los valores de la

corriente en un intervalo de tiempo de el primer transitorio de corriente, una suma de los valores de la corriente en un intervalo de tiempo de el primer transitorio de corriente o un promedio o único valor de la corriente de el primer transitorio de corriente multiplicado por un intervalo de tiempo de el primer transitorio de corriente. Para la suma de los valores de la corriente, un intervalo de la medición consecutiva de la corriente se puede sumar a partir de solo dos valores de la corriente o a todos los valores de la corriente.

En otro ejemplo, el primer valor de corriente i_1 , el segundo valor de corriente i_2 , y el tercer valor de corriente i_3 se pueden sustituir por un valor coulombico. En lugar de medir una corriente, se puede medir la carga pasada. La carga total pasada proporciona la misma información que la integración de un transitorio de corriente. Por ejemplo, la carga pasada se puede medir a lo largo de un intervalo de tiempo predeterminado y utilizarse para el primer, segundo y / o tercer valor de corriente.

En un ejemplo de un método divulgado en el presente documento, la cinética de la reacción de glucosa se contabiliza usando valores de la corriente (por ejemplo, i_1 , i_2 , y/o i_3). El resultado es menos dependiente de la concentración del hematocrito y la temperatura y se puede lograr una exactitud y una precisión mejoradas en la determinación de la concentración de glucosa.

En un aspecto, la capa de reactivo 72 está dispuesta en el primer electrodo 166 y, por lo tanto, permanece generalmente próxima al primer electrodo 166 después de su disolución con la muestra fisiológica. Esto da como resultado, al menos inicialmente, que una proporción mayoritaria del mediador reducido esté próxima al primer electrodo 166. Después de que transcurra un cierto periodo de tiempo, el mediador reducido, generado en la capa de reactivo 72 por la reacción de la glucosa, difundirá pasivamente lejos del primer electrodo 166. Durante este proceso, la magnitud de la concentración del mediador entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164 forma un gradiente en el que la concentración del mediador reducido es mayor en el primer electrodo 166 y menor en el segundo electrodo 164. Una mayor concentración de mediador reducido en el primer electrodo 166 hará que la magnitud del gradiente se vuelva más pronunciada. La magnitud de el primer transitorio de corriente es proporcional a la magnitud de este gradiente. Por lo tanto, la cantidad de mediador reducido generada por la capa de reactivo 72 impulsa la difusión del mediador reducido al segundo electrodo 164. La velocidad de cambio de la corriente medida en los electrodos es, por tanto, indicativa de la velocidad de cambio de la concentración del mediador reducido en la capa de reactivo 72 y también de la cinética de la reacción de glucosa (es decir, la velocidad de reacción de la glucosa que genera mediador reducido).

La cinética de la reacción de glucosa depende de varios factores que incluyen la separación del electrodo (en relación con la distancia máxima que la glucosa tiene que difundir para llegar a la capa de reactivo 72), la viscosidad de la muestra fisiológica, la concentración de hematocrito y la temperatura.

Se puede producir un aumento de la viscosidad en la muestra fisiológica con incrementos del hematocrito, las proteínas, el contenido de lípidos o combinaciones de los mismos. Hematocrito se refiere a la proporción de glóbulos rojos en una muestra de sangre. Típicamente, una mayor proporción de glóbulos rojos hace que la sangre sea más viscosa y da como resultado una mayor proporción de la glucosa total dentro de los glóbulos rojos. Para que la glucosa dentro de los glóbulos rojos reaccione con la capa de reactivo 72, la glucosa debe transportarse a través de la membrana de los glóbulos rojos. En ciertas condiciones, este transporte puede ser relativamente lento para limitar la cinética de la reacción de glucosa. Por lo tanto, un hematocrito más alto ralentiza la cinética de la reacción de glucosa. La viscosidad generalmente ralentiza el proceso de difusión general dentro de la cámara de reacción de la muestra 61. Una temperatura más alta generalmente aumenta la velocidad de reacción de la glucosa con la capa de reactivo 72 dentro de la cámara de reacción de la muestra 61 a medida que acelera los procesos de transporte implicados.

Los valores de corriente (i_1 , i_2 y/o i_3), y, particularmente, una relación de valores de la corriente, pueden usarse para corregir las variaciones en la cinética de reacción de la glucosa. Por ejemplo, la magnitud de el segundo transitorio de corriente será generalmente mayor que la magnitud absoluta del transitorio de corriente. Por lo tanto, la relación i_2 / i_3 será generalmente mayor que la unidad, mientras que la reacción de glucosa está en curso dentro de la cámara de reacción de muestra 61 y se convertirá en unidad cuando la reacción de glucosa esté completa. La desviación de la relación i_2 / i_3 de la unidad será, por lo tanto, un factor que indica el grado de terminación de la reacción. Valores relativamente altos de i_2 / i_3 indicarán que la reacción de glucosa está lejos de haber finalizado, mientras que los valores de i_2 / i_3 cercanos a la unidad indicarán que la reacción de glucosa está casi completa. Por lo tanto, la relación i_2 / i_3 proporciona generalmente información sobre el progreso de la reacción de glucosa y puede usarse para eliminar el efecto del hematocrito, la viscosidad y la temperatura en la medición de la concentración de glucosa.

Para refinar aún más los cálculos, pueden usarse uno o más factores de calibración. Por ejemplo, como se muestra en la Ec. 1, la relación i_2 / i_3 se ajusta a la p exponencial en la que p es un factor de calibración que puede usarse para un lote particular de tira de ensayo. El uso del exponente p se encontró a través de medios empíricos para mejorar la precisión y permitir tiempos de ensayo rápidos. En un ejemplo de la invención, p puede oscilar de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 4, y, preferentemente, de entre aproximadamente 0,1 y

aproximadamente 1.

Como se muestra en la Ec. 1, se puede utilizar un factor de calibración a para tener en cuenta posibles variaciones en el área de recorte 68 y la altura del separador 60. Las variaciones en el área de recorte 68 pueden causar un cambio proporcional en la magnitud de la corriente medida. En ciertas circunstancias, los procesos de fabricación pueden hacer que el área del electrodo varíe de un lote de tiras de ensayo a otro lote de tiras de ensayo. De forma similar, la altura del separador 60 también puede variar entre lotes. Las variaciones en la altura del separador 60 tienen un impacto proporcional sobre la corriente de ensayo. Por ejemplo, un aumento de la altura del separador 60 conduce a una disminución de la corriente de ensayo. El cálculo de un factor de calibración a para cada lote de tiras de ensayo ayuda a compensar las variaciones en el área del electrodo y la altura del separador 60. El término a puede calcularse durante el proceso de calibración de un lote de tiras de ensayo.

En un ejemplo, como se muestra en la Ec. 1, se utiliza un factor de calibración Z para tener en cuenta las variaciones en el fondo. Una presencia de una especie oxidable dentro de la capa de reactivo 72 antes de añadir fluido fisiológico a la tira de ensayo 62 puede contribuir a una señal de fondo. Por ejemplo, si la capa de reactivo 72 debía contener una pequeña cantidad de ferrocianuro (por ejemplo, mediador reducido) antes de añadir fluido fisiológico a la tira de ensayo, se produciría un incremento en la corriente de ensayo medida que no se atribuiría a la concentración de glucosa. Debido a que esto provocaría un sesgo constante en la corriente de ensayo medida global para un lote particular de tiras de ensayo, este sesgo puede corregirse para el uso del factor de calibración Z . Similar a los términos p y a , Z también se puede calcular durante el proceso de calibración.

Aunque el método divulgado en el presente documento se describe con el uso de factores de calibración, p , a y Z , un experto en la técnica apreciará que no se requiere su uso. Por ejemplo, en un ejemplo, la concentración de glucosa podría calcularse sin p , a , y / o Z (en la Ec. 1 p y/o a podrían fijarse en igual a uno y Z podría fijarse en igual a cero).

La selección de los intervalos de tiempo en los que se calculan i_1 , i_2 e i_3 se puede determinar con un algoritmo de preparación para un tipo concreto de tira de ensayo (es decir, determinado empíricamente). Durante el algoritmo de preparación se probarían varias tiras de ensayo sobre una serie de condiciones que un usuario puede encontrar durante el ensayo. Tales condiciones pueden incluir un intervalo de concentración de glucosa de 20 mg / dl a 600 mg / dl, un intervalo de del hematocrito de 0 % a 70 %, un intervalo de temperatura de 5 °C a 45 °C, un intervalo de humedad de 5 % de humedad relativa (HR de 5 %) a 95 % de HR e interferentes endógenos y exógenos. Ejemplos de interferentes endógenos y exógenos y sus intervalos de concentración fisiológica pueden encontrarse en una publicación titulada "Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico: Análisis de Interferentes en Química Clínica; directriz propuesta EP7-P". Wayne, PA.: NCCLS, 1986. Usando técnicas estándar de minimización de error, se definió una selección optimizada de intervalos de tiempo o i_1 , i_2 e i_3 de tal manera que la concentración de glucosa calculada usando la Ec. era exacta (por ejemplo, dentro de +/- 10 % de una medida de referencia) y precisa (por ejemplo, variación de tira a tira de aproximadamente 2 % o menos a 1 σ). Un experto en la técnica apreciará que el intervalo de tiempo elegido para el primer valor de corriente, el segundo valor de corriente y el tercer valor de corriente pueden ser, de este modo, iguales o diferentes, y en un ejemplo, solo se calculan dos valores de corriente. Por ejemplo, se puede definir que el segundo valor de corriente i_2 sea el mismo que el primer valor de corriente i_1 .

Después de seleccionar el intervalo de tiempo de i_1 , i_2 e i_3 se puede calibrar el lote de tiras. Los métodos de ejemplo para calibrar lotes de tiras se describen en la Patente de Estados Unidos N.º 6.780.645. Más particularmente, los factores de calibración a , p , y / o Z se pueden calcular para un lote particular de tiras de ensayo. Típicamente, se evalúa un intervalo de concentraciones de glucosa en sangre de donantes múltiples usando las tiras de ensayo de glucosa y , también, en un instrumento de referencia conocido como exacto y preciso. El error entre los resultados de las tiras de ensayo de la presente invención y el método de referencia se minimiza encontrando la combinación óptima de a , p y / o Z . En un ejemplo, la información de calibración puede transmitirse y / o almacenarse en un medidor de ensayo 100 antes de usar una tira de ensayo del lote de tira de ensayo.

Se describen otros métodos de cálculo de la concentración del analito que pueden explicar la presencia de interferentes en una muestra. Por ejemplo, ciertas enfermedades, tales como la gota, harán que la concentración de urato de una persona se eleve, lo que puede afectar la precisión de una medición de glucosa. El urato es un interferente potencial para muchas mediciones electroquímicas porque puede ser fácilmente oxidado en una superficie de electrodo de trabajo y / o por un mediador oxidado. En una realización de la presente invención, la Ec. 1 se modificó para aumentar la precisión de la medición de glucosa en presencia de interferentes tales como urato. Con el fin de desarrollar un algoritmo modificado, se encontró una relación matemática basada en la oxidación de los interferentes durante el primer transitorio de corriente y el segundo transitorio de corriente.

Si se supone que la concentración global del mediador reducido no cambia dentro de la cámara de reacción de la muestra 61 durante el intervalo de tiempo del ensayo de glucosa T_a , se puede describir una magnitud de la corriente para el primer transitorio de corriente como una función del tiempo por la Ec. 2.

$$Ec. 2 \quad i_a(t) = i_{ss} \left\{ 1 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} \exp\left(\frac{-4\pi^2 n^2 Dt}{L^2}\right) \right\}$$

5 El término i_{ss} es la corriente en equilibrio tras la aplicación del primer potencial de ensayo E_1 , D es el coeficiente de difusión del mediador, L es el espesor del separador. Cabe destacar que en la Ec. 2, t hace referencia al tiempo transcurrido después de aplicar el primer potencial de ensayo E_1 . Por ejemplo, para ser consistente con la figura 7, el valor t usado en la Ec. 2 debe tener 1 segundo restado del tiempo real. Una magnitud de la corriente para el segundo transitorio de corriente se puede describir como una función del tiempo mediante la Ec. 3.

10

$$\text{Ec. 3} \quad i_b(t) = i_{ss} \left\{ 1 + 4 \sum_{n=1}^{\infty} \exp\left(\frac{-4\pi^2 n^2 Dt}{L^2}\right) \right\}$$

15 Existe un factor de dos diferencias para el término exponencial en la Ec. 3 en comparación con el término exponencial en la Ec. 2 debido a que el segundo transitorio de corriente se genera a partir del segundo potencial de ensayo E_2 , que era de polaridad opuesta al primer potencial de ensayo E_1 , y se aplicó inmediatamente después del primer potencial de ensayo E_1 . Cabe señalar que en la Ec. 3, t hace referencia al tiempo transcurrido después de aplicar el segundo potencial de ensayo E_2 . Por ejemplo, para ser consistente con la figura 7, el valor t usado en la Ec. 3 debe tener 4 segundos restados del tiempo real. Durante un primer potencial de ensayo E_1 de -0,3 V, el interferente se oxida en el segundo electrodo 164 y, a su vez, genera mediador reducido en el primer electrodo 166. Es esta acumulación de mediador reducido en el primer electrodo 166 lo que hace que la corriente inicial en el segundo potencial de ensayo E_2 sea dos veces más grande para el término exponencial.

25 La Figura 9 muestra una representación gráfica de un gradiente de concentración dentro de la cámara de reacción de muestra 61 que puede usarse para explicar el factor de dos diferencias para el término exponencial en la Ec. 3 en comparación con el término exponencial en la Ec. 2. Si se supone que una concentración de mediador reducido dentro de la cámara de reacción de la muestra 61 no cambia durante el intervalo de tiempo de ensayo de glucosa T_c , la concentración de especies oxidables debe ser uniforme a lo largo de la cámara de reacción de muestra 61 antes de aplicar el primer potencial de ensayo E_1 a la tira de ensayo 62. Los círculos de la Figura 9 indican que la concentración normalizada de las especies oxidables era uniforme mostrando la concentración como unidad. Esta concentración inicial también puede denominarse concentración en masa. Una vez aplicado el primer potencial de ensayo E_1 , la concentración normalizada de especies oxidables en el segundo electrodo 164 se agota inmediatamente, haciendo que la concentración sea cero. Obsérvese que la superficie del segundo electrodo 164 se representa como cero en el eje X y que la distancia normalizada desde el segundo electrodo 164 al primer electrodo 166 se representa como una en el eje X, según la figura 9.

40 Después de aplicar el primer potencial de ensayo E_1 , la concentración normalizada de especies oxidables se hace dos veces mayor que la concentración en masa en el primer electrodo 166, que en este caso es dos. Además, se forma un gradiente de concentración lineal dentro de la cámara de reacción de muestra 61 como se indica mediante los cuadrados, según la Figura 9, donde la concentración normalizada de especies oxidables es más alta en el primer electrodo 166 y más baja en el segundo electrodo 164. Debido a que existe una conservación de la carga dentro de la cámara de reacción de la muestra 61, cada especie oxidable consumida en el segundo electrodo 164 debe dar lugar a una especie oxidable generada en el primer electrodo 166. Por lo tanto, la concentración normalizada de especies oxidables en el primer electrodo 166 es dos después de la aplicación del primer potencial de ensayo E_1 .

50 Al aplicar el segundo potencial de ensayo E_2 , la corriente un corto tiempo después será el doble de la corriente al mismo tiempo después de la aplicación de E_1 menos la corriente en estado estacionario. La razón para el factor de dos es porque la concentración inicial de especies oxidables en el primer electrodo 166 será el doble de la concentración en masa. Por el contrario, la concentración inicial normalizada de especies oxidadas en el segundo electrodo 164 antes de aplicar el primer potencial de ensayo E_1 era sólo la mitad, que en este caso era la concentración en masa. La razón de la resta de la corriente en estado estacionario es que existe un gradiente de especies oxidables entre los dos electrodos que hace que el flujo de electrones se aleje del primer electrodo 166.

60 La figura 7 muestra que hay un pico de corriente para el primer intervalo de tiempo del potencial de ensayo T_1 que se indica como i_{pa} , y un pico de corriente para el segundo intervalo de tiempo del potencial de ensayo T_2 , que se indica como i_{pb} . Si tanto en el primer pico de corriente i_{pa} como en el segundo pico de corriente i_{pb} se midieran en el mismo tiempo corto después de la aplicación del primer potencial de ensayo E_1 y el segundo potencial de ensayo E_2 respectivamente, por ejemplo 0,1 segundos, la Ec. 2 puede restarse de la Ec. 3 para dar la Ec. 4.

65

$$\text{Ec. 4} \quad i_{pb} - 2i_{pa} = -i_{ss}$$

Cabe señalar que la Ec. 2 se multiplicó por dos para permitir cancelar los términos de la suma. La Ec. 4 describe una relación entre el primer transitorio de corriente y un segundo transitorio de corriente cuando la tira de ensayo 62 se analiza con una muestra que contiene un interferente y no glucosa. Dado que no hay glucosa en la muestra, la capa de reactivo 72 no genera mediador reducido durante el intervalo de tiempo de ensayo de glucosa T_G . Por lo tanto, los transitorios de corriente primero y segundo reflejarían solo la oxidación de los interferentes. De la discusión anterior se desprende que la relación entre los picos de corriente primero y segundo y la corriente en estado estacionario pueden derivarse recurriendo a las ecuaciones electroquímicas fundamentales o mediante argumentos heurísticos verbales / gráficos. Ambos enfoques pueden conducir a la Ec. 4.

El intervalo de tiempo de circuito abierto T_{oc} puede utilizarse para mejorar la nitidez del primer valor del pico de corriente i_{pa} en el que el pico se forma inmediatamente después de la aplicación del primer potencial de ensayo E_1 . Un intervalo nominal de tiempo de circuito abierto T_{oc} permite que la cámara de reacción de la muestra se llene completamente. Además, un intervalo nominal de tiempo de circuito abierto T_{oc} también permite que la capa de reactivo 72 se disuelva, lo que permite que el mediador oxidado sea reducido por el primer electrodo 166 de manera que se pueda medir una corriente de oxidación limitante en el segundo electrodo 164.

La magnitud de los transitorios de corriente primero y segundo tiene una relación más complicada si la capa de reactivo 72 genera mediador reducido durante el intervalo de tiempo de ensayo de glucosa T_G . A un régimen de escala de tiempo temprano de aproximadamente 1,1 segundos, se supone que la capa de reactivo 72 no genera una cantidad significativa de mediador reducido debido a la reacción de glucosa. Además, se supone que el mediador reducido que se genera permanecerá en su mayor parte cerca del primer electrodo 166, donde la capa de reactivo 72 se depositó inicialmente y no se difundió significativamente al segundo electrodo 164. Por lo tanto, la magnitud del i_{pa} se atribuye predominantemente a la oxidación del interferente en el segundo electrodo 164 que es una corriente interferente directa.

A un régimen de escala de tiempo posterior de aproximadamente 4,1 segundos, la capa de reactivo 72 genera una cantidad significativa de mediador reducido en el primer electrodo 166 en presencia de glucosa debido a la reacción de glucosa. También se puede generar una cantidad significativa de mediador reducido debido a una posible oxidación de un interferente con el mediador oxidado. Como se mencionó anteriormente, el interferente que reduce el mediador oxidado contribuye a una corriente que se puede denominar corriente indirecta. Además, los interferentes también se pueden oxidar directamente en el primer electrodo 164, que puede denominarse corriente directa. Para la situación en la que el mediador puede oxidarse en el electrodo de trabajo, se puede suponer que la suma de la oxidación directa y la oxidación indirecta es aproximadamente igual a una corriente de oxidación directa que habría sido medida si no hubiera mediador oxidado dispuesto sobre el electrodo de trabajo. En resumen, la magnitud del i_{pb} se atribuye a oxidación del interferente tanto directa como indirecta y a la reacción de glucosa en el segundo electrodo 164. Debido a que se ha determinado que i_{pa} está controlado principalmente por interferentes, i_{pb} se puede usar con i_{pa} para determinar un factor de corrección. Por ejemplo, como se muestra a continuación i_{pb} se puede utilizar con i_{pa} en una función matemática para determinar una corriente corregida que es proporcional a la glucosa y menos sensible a los interferentes.

La Ec. 5 se derivó empíricamente para calcular una corriente i_4 que es proporcional a la glucosa y tiene una fracción relativa de la corriente eliminada que se atribuye a los interferentes.

$$Ec. 5 \quad i_4 = i_2 \left\{ \frac{i_{pb} - 2i_{pa} + i_{ss}}{i_{pb} + i_{ss}} \right\}$$

El término i_{ss} se añadió tanto al numerador como al denominador para permitir que el numerador se acerque a cero cuando no hay glucosa presente. Se puede estimar i_{ss} usando la ecuación 5B, para corrientes a veces mayores que un tiempo mínimo, donde un tiempo mínimo adecuado se puede estimar a partir de la ecuación 5C.

$$Ec. 5B \quad i(t) = i_{ss} \left\{ 1 + 4 \exp \left(\frac{-4\pi^2 Dt}{L^2} \right) \right\}$$

$$Ec. 5C \quad t_{min} = \frac{-L^2 \ln 0,01}{12\pi^2 D}$$

en la que, i_{ss} es la corriente en estado estacionario después de la aplicación del segundo potencial eléctrico; i es la corriente medida que es una función del tiempo; D es el coeficiente de difusión de la molécula redox activa, donde este coeficiente puede determinarse a partir de la primera ley de Fick, es decir, $J(x,t) = -D \frac{dC(x,t)}{dx}$; L es el espesor

separador; y t es el tiempo para la aplicación del segundo potencial eléctrico donde $t = 0$ para el comienzo del segundo intervalo de tiempo.

La Ec. 1 puede ser modificado reemplazando el término i_1 para el término i_4 para dar un segundo algoritmo de glucosa que se muestra en la Ec. 6.

$$\text{Ec. 6} \quad [G] = \left(\frac{i_2}{i_3} \right)^p \times (a \times i_4 - Z)$$

Por tanto, la Ec. 6 permitirá mediciones precisas de la glucosa en presencia de interferentes utilizando solo dos electrodos

En otro ejemplo, un algoritmo de glucosa como se muestra en la Ec. 7 puede usarse para medir glucosa en presencia de interferentes. En la ecuación 7 la concentración inicial C_o se multiplica por un factor de corrección. El producto es proporcional a la concentración de glucosa reaccionada más mediador reducido de fondo. Como tal, el término Z se resta y el resultado se multiplica por $(i_{ss}/i_{pp})^p$ para llegar a la medida de la glucosa total en la muestra.

$$\text{Ec. 7} \quad [G] = \left(\frac{i_{ss}}{i_{pp}} \right)^p \times \left(C_o \left\{ \frac{i_{pb} - 2i_{pa} + i_{ss}}{i_{pb} + i_{ss}} \right\} - Z \right)$$

El término i_{pp} es un valor de la corriente derivado del primer transitorio de corriente. En un aspecto, i_{pp} es una corriente promedio durante un periodo de tiempo corto cerca del fin del primer transitorio de corriente. Por ejemplo, la corriente promedio se puede encontrar entre 3,8 y 4,0 segundos. C_o es una concentración estimada de la glucosa que se define mediante la Ec. 8,

$$\text{Ec. 8} \quad C_o = \frac{i_{ss}L}{2FAD}$$

en la que F es una constante de Faraday, es decir 96.485 Culombios/mol, y A es el área del primer electrodo.

Ciertos agentes interferentes no se oxidan fácilmente directamente en la superficie de un electrodo. Por ejemplo, el acetaminofén puede no oxidarse fácilmente en el segundo electrodo 164 donde está hecho de oro pulverizado y el primer electrodo se mantiene a -0,3 V. Si no es posible medir una corriente interferente directa en el segundo electrodo 164, la relación de i_{pa} e i_{pb} debido a los interferentes ya no seguirá la Ec. 4 en ausencia de glucosa. A su vez, la Ec. 6 y la Ec. 7 no proporcionará una medida tan precisa de glucosa en presencia de interferentes. Para remediar el problema de no medir una corriente interferente en el segundo electrodo 164, se puede disponer una segunda capa de reactivo, que incluye un mediador oxidado y está sustancialmente exenta de enzima, en el segundo electrodo 164. Un mediador oxidado tal como, por ejemplo, ferricianuro puede a continuación oxidar fácilmente el acetaminofén, permitiendo que se mida una corriente interferente indirecta en el segundo electrodo 164. Permitiendo la medición de la oxidación de los interferentes en el segundo electrodo 164, ello permite que las Ec. 6 y 7 calculen concentraciones precisas de glucosa en presencia de interferentes.

En otro ejemplo, para remediar este problema, el mediador oxidado secado sobre el primer electrodo puede estar en cantidad suficiente y / o secarse de tal manera que una porción del mediador oxidado se mezcla en el volumen de la muestra mientras llena la celda, al tiempo que no permite que una cantidad significativa de enzima se mezcle en la mayor parte de la muestra. puede conseguirse, por ejemplo, teniendo suficiente mediador oxidado en la formulación y secándolo lo suficientemente lentamente para que al menos una porción del mediador oxidado cristaliza sustancialmente libre de enzima. Los cristales pueden disolverse y mezclarse en la muestra en una mayor extensión que la enzima, ayudado asegurando que el mediador tenga un tamaño sustancialmente menor en comparación con la enzima. De esta manera, los potenciales interferentes pueden ser oxidados por el mediador oxidado para formar un mediador reducido que puede medirse como parte de la corriente interferente, obviando una segunda capa de reactivo.

En otro ejemplo, se introduce un potencial de circuito abierto entre el primer potencial de ensayo E_1 y el segundo potencial de ensayo E_2 . Aunque este potencial de circuito abierto se denomina en el presente documento "segundo" circuito abierto, el uso del término "segundo" se utiliza por conveniencia y no requiere un "primer" potencial de circuito abierto. El segundo potencial de circuito abierto permite que el gradiente electroquímico vuelva al estado no perturbado (es decir, el mediador oxidado que se acumuló en el primer electrodo 166 debido a la aplicación del

primer potencial E_1 puede difundir de nuevo en la solución a granel). Bajo estas condiciones, el efecto interferente puede eliminarse restando el primer transitorio de corriente directamente del segundo transitorio de corriente. Como se ha mencionado anteriormente, la corriente inicial, que resulta cuando se aplica un segundo potencial de ensayo E_2 inmediatamente después del primer potencial de ensayo E_1 , es mayor, lo que está avalado por los términos en la Ec. 3. Sin embargo, si se introduce un segundo potencial de circuito abierto suficientemente largo permitiendo que el mediador reducido acumulado en el primer electrodo 166 se disipe nuevamente dentro de la solución a granel, la corriente inicial para el segundo potencial de ensayo E_2 será la misma que la corriente inicial para el primer potencial de ensayo E_1 . Por lo tanto, si no se genera mediador reducido durante el intervalo de tiempo de ensayo y hay un segundo potencial de circuito abierto suficientemente largo, el transitorio de corriente para los potenciales de ensayo primero y segundo será el mismo.

El tiempo requerido para permitir que el mediador reducido se disipe del primer electrodo 166 puede predecirse usando ecuaciones de difusión estándar. En general, la fracción de mediador reducido que se disipará en la superficie del primer electrodo 166 es proporcional a

$$\exp\left(\frac{-4\pi^2 Dt}{L^2}\right)$$

como una función del tiempo. Como ejemplo, se puede suponer que L es 95 micrómetros y D es $4,5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. La figura 10 muestra un gráfico que indica el % de perturbación del gradiente del mediador reducido como una función del segundo intervalo de tiempo de circuito abierto. En este caso, la perturbación se refiere a la cantidad de mediador reducido que todavía tiene que disiparse antes de que la concentración del mediador reducido se aproxime a la concentración en masa. Utilizando los parámetros asumidos de L y D , se requerirán aproximadamente 2,5 segundos (es decir, $5 \times L^2/(4\pi^2 D)$) para que el potencial de circuito abierto sea lo suficientemente largo. En un ejemplo, el segundo intervalo de tiempo de potencial de circuito abierto puede estar comprendido entre aproximadamente 1 segundo y aproximadamente 5 segundos, y preferentemente está comprendido entre aproximadamente 2 segundos y aproximadamente 4 segundos. Dependiendo de los parámetros de una tira de ensayo dada, un experto en la técnica puede determinar fácilmente cuál sería un intervalo de tiempo de potencial de circuito abierto suficientemente largo de modo que el transitorio de corriente para el primer y el segundo potencial de ensayo sea el mismo en ausencia de una reacción de glucosa.

Se puede usar un algoritmo simplificado para calcular una concentración de glucosa en presencia de interferentes, cuando se utiliza un intervalo de tiempo de potencial de circuito abierto suficientemente largo como se muestra en la Ec. 9.

$$\text{Ec. 9} \quad [G] = \text{intersección} + \text{pendiente} \times (i_{pb} - i_{pa})$$

En la ecuación 9 la intersección y la pendiente son factores de calibración. En este caso, i_{pb} será proporcional a la concentración de glucosa y la concentración interferente e i_{pa} será proporcional a la concentración interferente solamente. La diferencia entre i_{pb} e i_{pa} será una corriente que es proporcional a la glucosa con una corrección para los interferentes. La Ec. 9 puede usarse cuando la celda electroquímica utilizada para realizar un ensayo tiene electrodos coplanares.

Otra realización del algoritmo simplificado para calcular una concentración de glucosa en presencia de interferentes con un intervalo de tiempo de potencial de circuito abierto suficientemente largo se muestra en la Ec. 10.

$$\text{Ec. 10} \quad [G] = \left(\frac{i_2}{i_3}\right)^p \times \{ \text{intersección} + \text{pendiente} \times (i_{pb} - i_{pa}) \}$$

La Ec. 10 es similar a la Ec. 9 excepto que tiene un factor de corrección (es decir, $\left(\frac{i_2}{i_3}\right)^p$) para tener en cuenta la cinética de la reacción de glucosa.

En una realización divulgada en el presente documento, se pueden preparar tiras de ensayo para medir la hemoglobina en la sangre. En este ejemplo, la capa de reactivo 72 de una tira de ensayo 62 se sustituye por una nueva capa de reactivo que contiene ferricianuro y un agente de lisis tal como desoxicolato de sodio. Cuando la sangre se dosifica sobre la nueva capa de reactivo, los glóbulos rojos se lisan, permitiendo que el ferricianuro oxide la hemoglobina. Se puede encontrar una descripción de un sensor de hemoglobina en la patente de Estados Unidos N.º 6.632.349. El ferrocianuro generado posteriormente puede medirse a continuación como una corriente de

hemoglobina. Similar a la glucosa, se supone que el ferrocianuro no alcanza el segundo electrodo 164 durante la etapa inicial del ensayo. Una vez que se detecta sangre en una tira de ensayo mediante un medidor de ensayo, el medidor de ensayo puede aplicar en serie un potencial de circuito abierto de un segundo, un primer potencial de ensayo de 3 segundos de -0,3 V y un potencial de ensayo de 5 segundos de +0,3 V.

5 La concentración de hemoglobina H puede medirse usando un primer algoritmo de hemoglobina como se muestra en la siguiente Ec. 11.

$$10 \quad \text{Ec. 11} \quad H = \text{intersección} + \text{pendiente} \times C_o$$

En este caso, C_o es proporcional a la concentración de hemoglobina y puede calibrarse a una técnica de referencia utilizando el análisis de regresión estándar (pendiente e intersección). Sin embargo, se puede realizar una modificación de la Ec. 11 de manera que el ensayo de hemoglobina se pueda realizar con precisión en presencia de interferentes. La ec. 12 muestra un segundo algoritmo de hemoglobina para mejorar la precisión de un sensor de hemoglobina.

$$20 \quad \text{Ec. 12} \quad H = \text{intersección} + \text{pendiente} \times L \left\{ \frac{i_{ssb} - i_{ssa}}{2FAD} \right\}$$

25 donde i_{ssa} e i_{ssb} son las corrientes en estado estacionario desde el transitorio de la primera corriente y los segundos transitorios de corriente, respectivamente.

Ejemplo 1

30 Se preparó un tampón que contenía citraconato 67 mM a pH 6,8, 0,1 % de antiespumante (2 partes de Pluronic P103 y 1 parte de Pluronic F87), sacarosa 60 mM y CaCl_2 7 mM. A continuación, se añadió GDH que usó un cofactor PQQ, al tampón, de manera que fue de 15 mg / ml. A continuación se añadió PQQ al tampón para que pudiera activar el GDH. Después de la adición de PQQ, la formulación se dejó incubar aproximadamente a la hora. A continuación, se añadió ferricianuro de potasio a la mezcla tal que era 600 mM. La formulación se repartió sobre la primera capa conductora de electricidad 66 como se muestra en la Figura 1 por medio de un proceso de recubrimiento de ranura que se describe en la patente de Estados Unidos N.º 6.749.887; 6.689.411; y 6.676.995. Tras recubrir la formulación y secarla de tal manera que forma la capa de reactivo 72, el separador 60 y el segundo electrodo 164 se ensamblan sobre el mismo para formar la tira de ensayo 62.

Ejemplo 2

40 Se analizaron varias tiras de ensayo 62 con sangre que contenía una concentración de glucosa que oscilaba entre aproximadamente 83 a 88 mg / dl y se introdujeron interferentes en la muestra de sangre. Las tiras de ensayo 62 se analizaron en el medidor de ensayo 100 usando un intervalo de tiempo de ensayo de glucosa T_G de 5 segundos. El medidor de prueba 100 aplicó una forma de onda potencial como se muestra en la Figura 6. Se recogió una corriente de ensayo para cada tira de ensayo y se convirtió a una concentración de glucosa utilizando un primer algoritmo de glucosa, como se muestra en la Ec. 1, y un segundo algoritmo de glucosa, como se muestra en la Ec. 6. Se calculó un sesgo promedio para cada tira de ensayo con respecto al método de referencia en unidades de mg / dl. La Figura 11 muestra que el sesgo global se redujo en presencia de interferentes, tales como ascorbato y urato, cuando se usa el segundo algoritmo de glucosa en oposición al uso del primer algoritmo de glucosa.

Ejemplo 3

55 El experimento del Ejemplo 3 se repitió de manera similar con un conjunto diferente de tiras de ensayo 62. Para este experimento, se recogió la corriente de ensayo para cada tira de ensayo y se convirtió a una concentración de glucosa utilizando un primer algoritmo de glucosa, como se muestra en la Ec. 1, y un tercer algoritmo de glucosa, como se muestra en la Ec. 7. La Figura 12 muestra que el sesgo global se redujo en presencia de interferentes cuando se usa el tercer algoritmo de glucosa en oposición al uso del primer algoritmo de glucosa. El uso del término C_o en lugar de la simple suma de corriente puede permitir una medición más precisa en presencia de interferentes.

Ejemplo 4

60 Se prepararon varias tiras de ensayo 62 para la medición de la hemoglobina. Se analizaron varias tiras de ensayo 62 con sangre que contenía una concentración de hemoglobina de 16.3 g/dl y se introdujeron interferentes en la muestra de sangre. Se recogió una corriente de ensayo para cada tira de ensayo y se convirtió a una concentración de hemoglobina utilizando una primera ecuación de hemoglobina, como se muestra en la Ec. 11, y

una segunda ecuación de hemoglobina, como se muestra en la Ec. 12. Se calculó un sesgo promedio para cada tira de ensayo con respecto al método de referencia en unidades de g / dl. La figura 13 muestra que el sesgo global se redujo en presencia de interferentes. tales como ascorbato (AA = 10 mg / dl), urato (UA = 10 mg / dl) y acetaminofén (Acet = 20 mg / dl) cuando se usa la segunda ecuación de hemoglobina en lugar de usar la primera ecuación de hemoglobina.

Un experto en la materia apreciará otras características y ventajas de la invención en base a las realizaciones descritas anteriormente. De acuerdo con esto, la invención no debe limitarse a lo que se ha mostrado y descrito particularmente, a excepción de lo indicado en las reivindicaciones adjuntas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un método para determinar una concentración de analito en una muestra fisiológica que contienen tanto un analito como un interferente, el método comprendiendo,

- 5
- (a) introducir una muestra fisiológica en una célula electroquímica para iniciar una reacción con un reactivo en la célula, la célula electroquímica comprendiendo el primer y segundo electrodos en una relación separada, y una primera capa de reactivo, la primera capa de reactivo comprendiendo un enzima y un mediador;
- 10
- (b) aplicar a la célula un primer potencial de prueba que tiene una primera polaridad y medir la corriente de la células;
- (c) aplicar un segundo potencial de prueba que tiene una segunda polaridad, en donde la primera polaridad es opuesta a la segunda polaridad y medir la corriente de la células;
- (d) determinar una primera corriente de estado estacionario a partir de la medición de corriente del paso (b);
- 15
- (e) determinar una segunda corriente de estado estacionario a partir de la medición de corriente del paso (c); y
- (f) determinar un valor que es proporcional a la concentración de analito, y que está menos influenciada por el interferente, sustrayendo el primer valor de corriente del estado estacionario del segundo valor de corriente del estado estacionario, en donde el analito es hemoglobina.

20 2. El método de la reivindicación 1, en donde la concentración de analito se calcula en base a una ecuación

$$[H] = \textit{intersección} + \textit{pendiente} \times L \left\{ \frac{i_{ssb} - i_{ssa}}{2FAD} \right\},$$

25

donde [H] comprende una concentración de analito, i_{ssa} comprende la corriente de estado estacionario del primer transitorio de corriente, i_{ssb} comprende la corriente de estado estacionario del segundo transitorio de corriente, la *pendiente* y la *intersección* son factores de calibración, F es la constante de Faraday, A comprende el área del primer electrodo, D comprende el coeficiente de difusión de la molécula redox activa, y L comprende la separación de los electrodos.

30

35

40

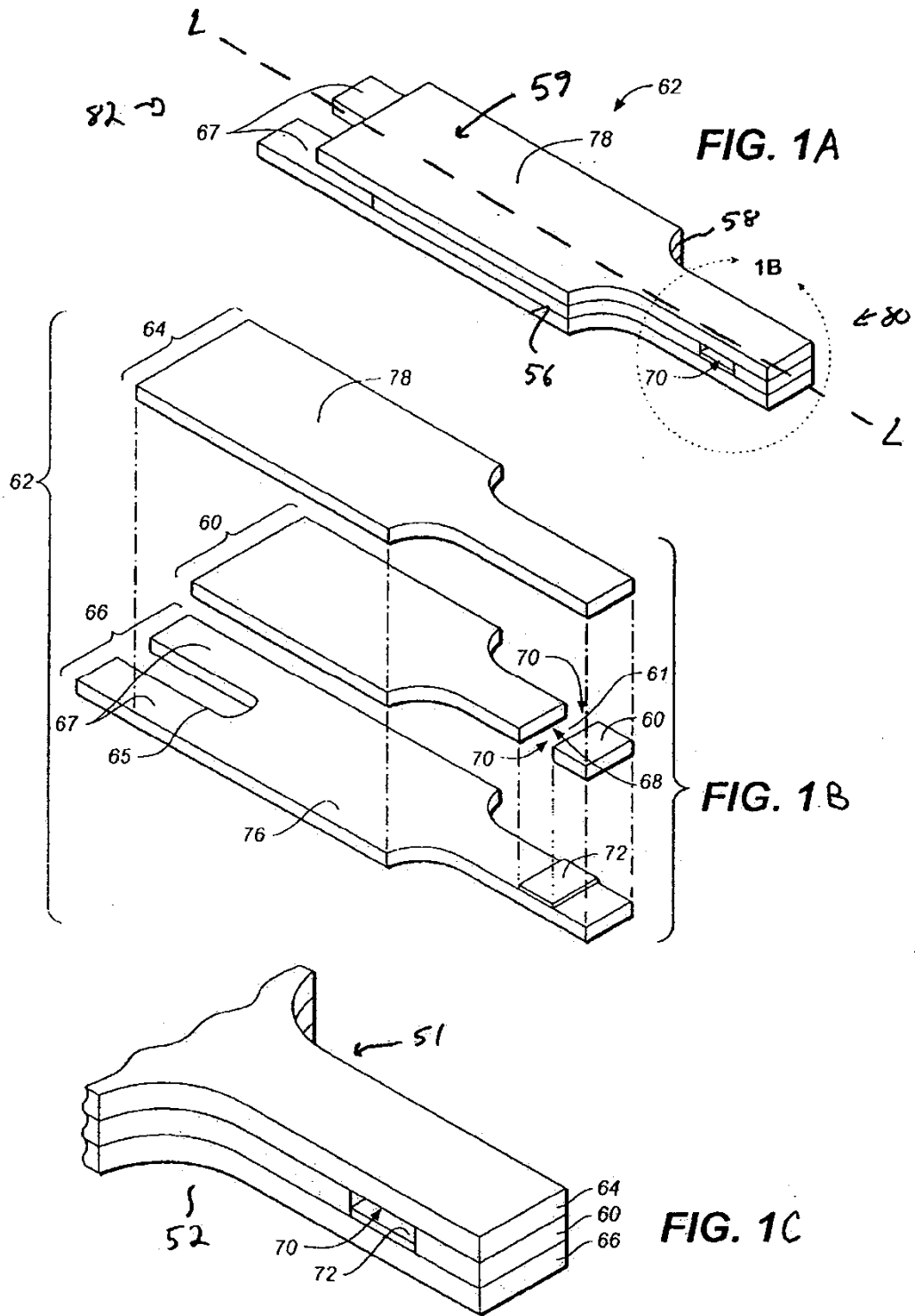
45

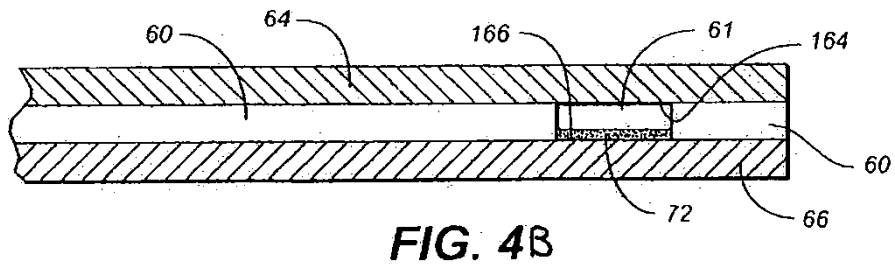
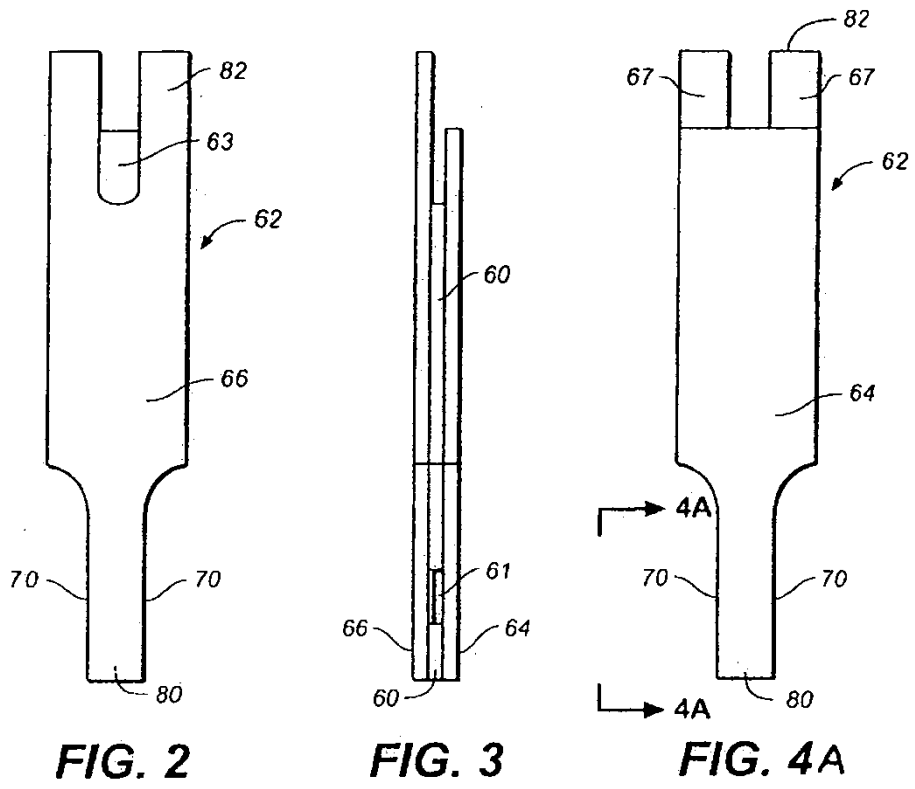
50

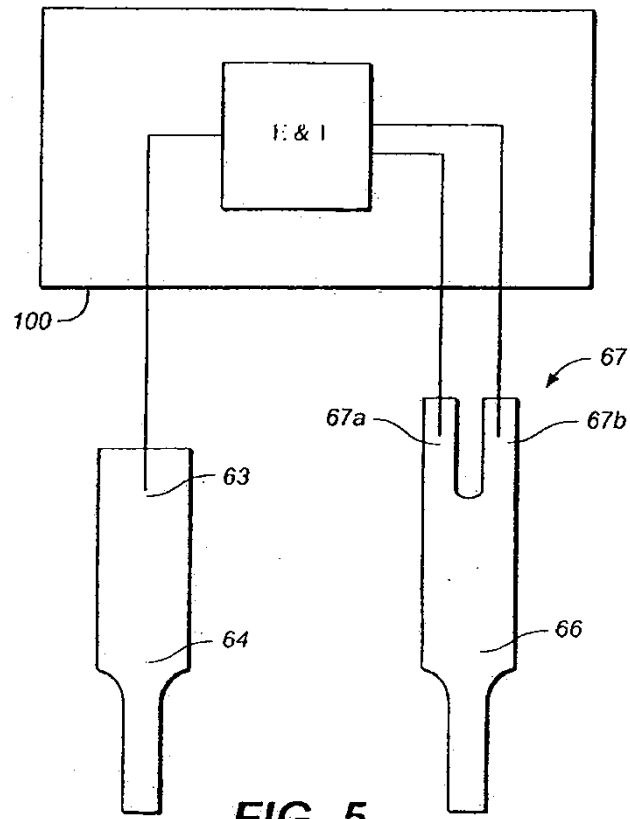
55

60

65







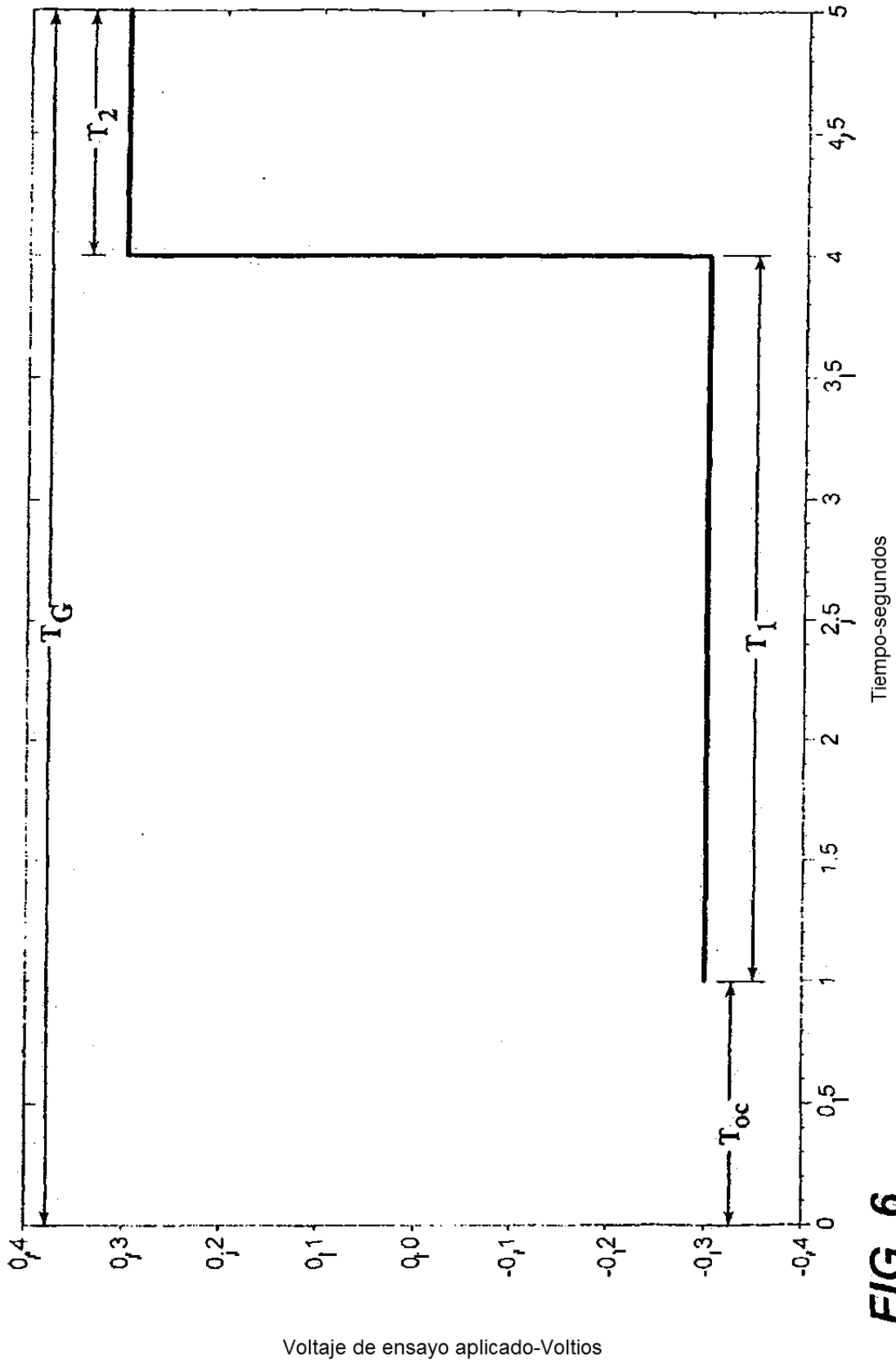


FIG. 6

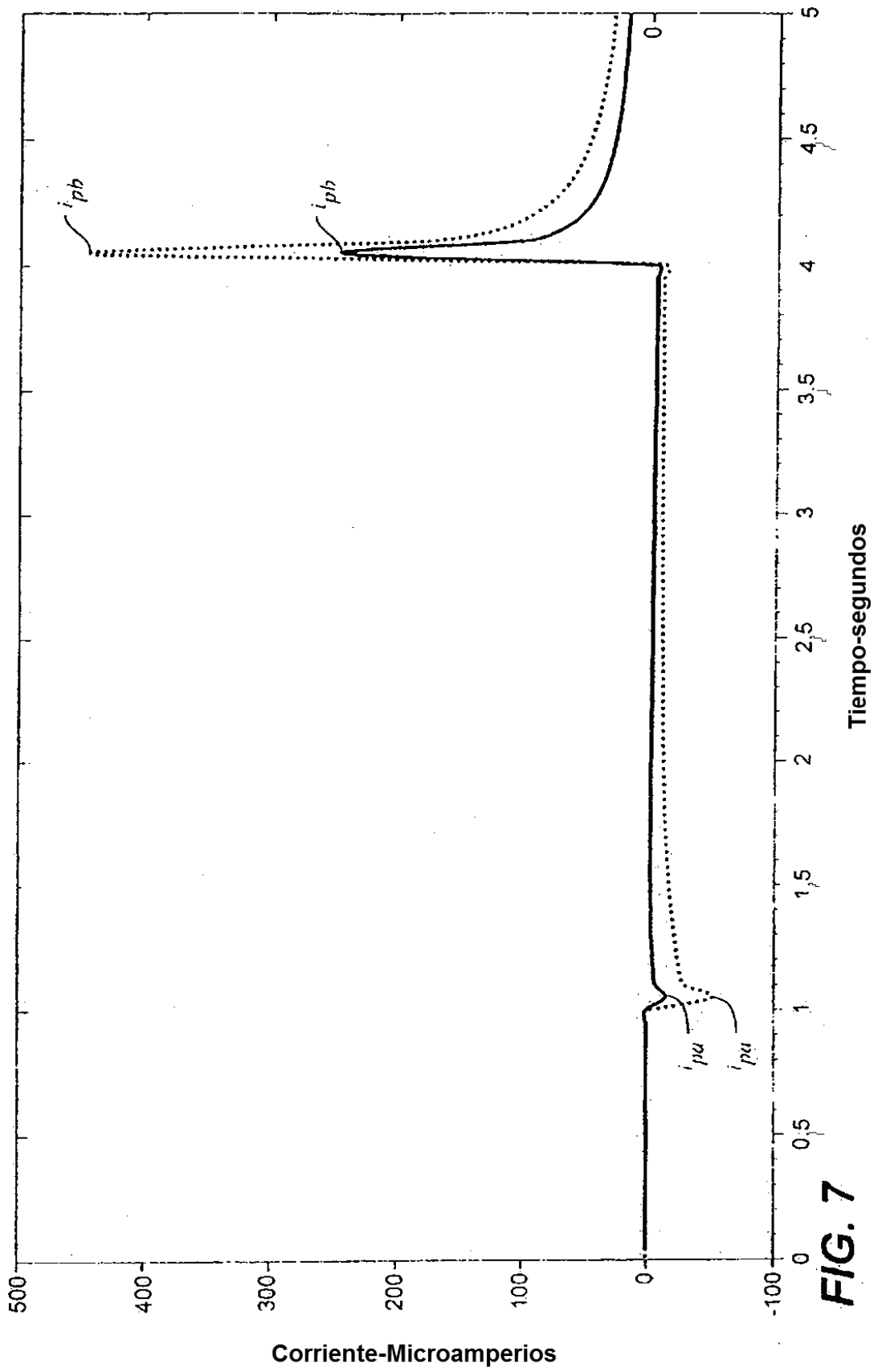


FIG. 7

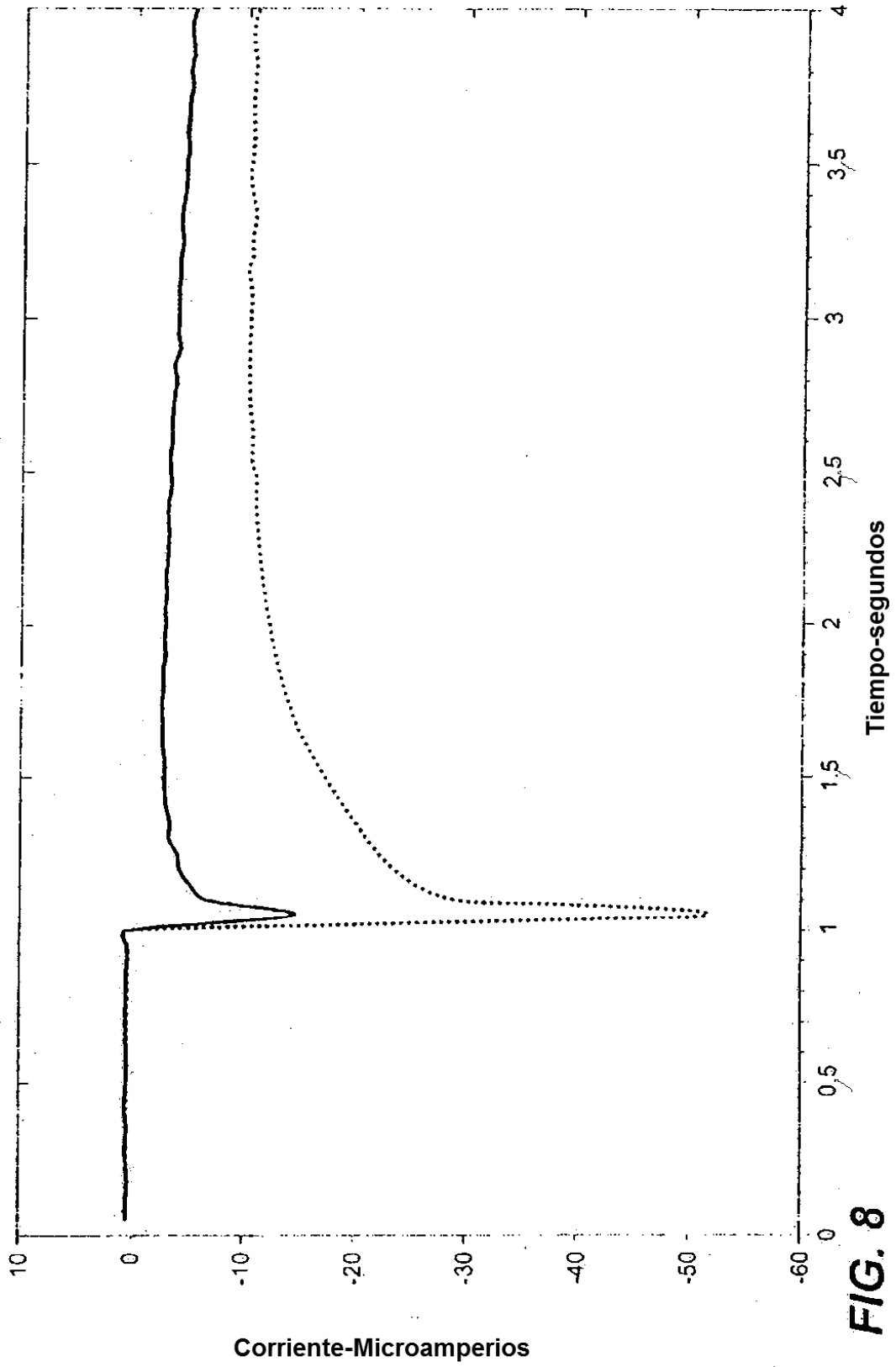


FIG. 8

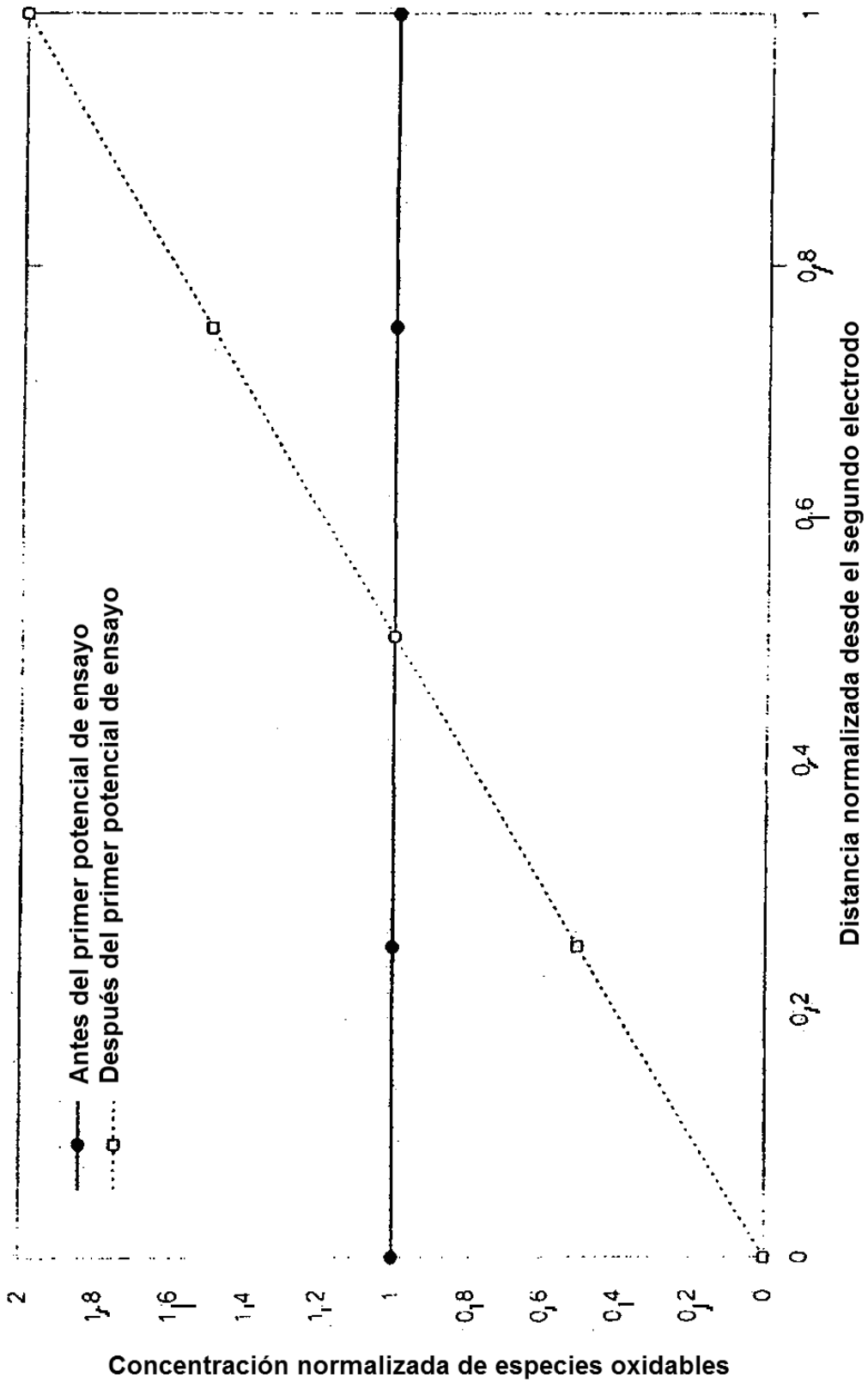


FIG. 9

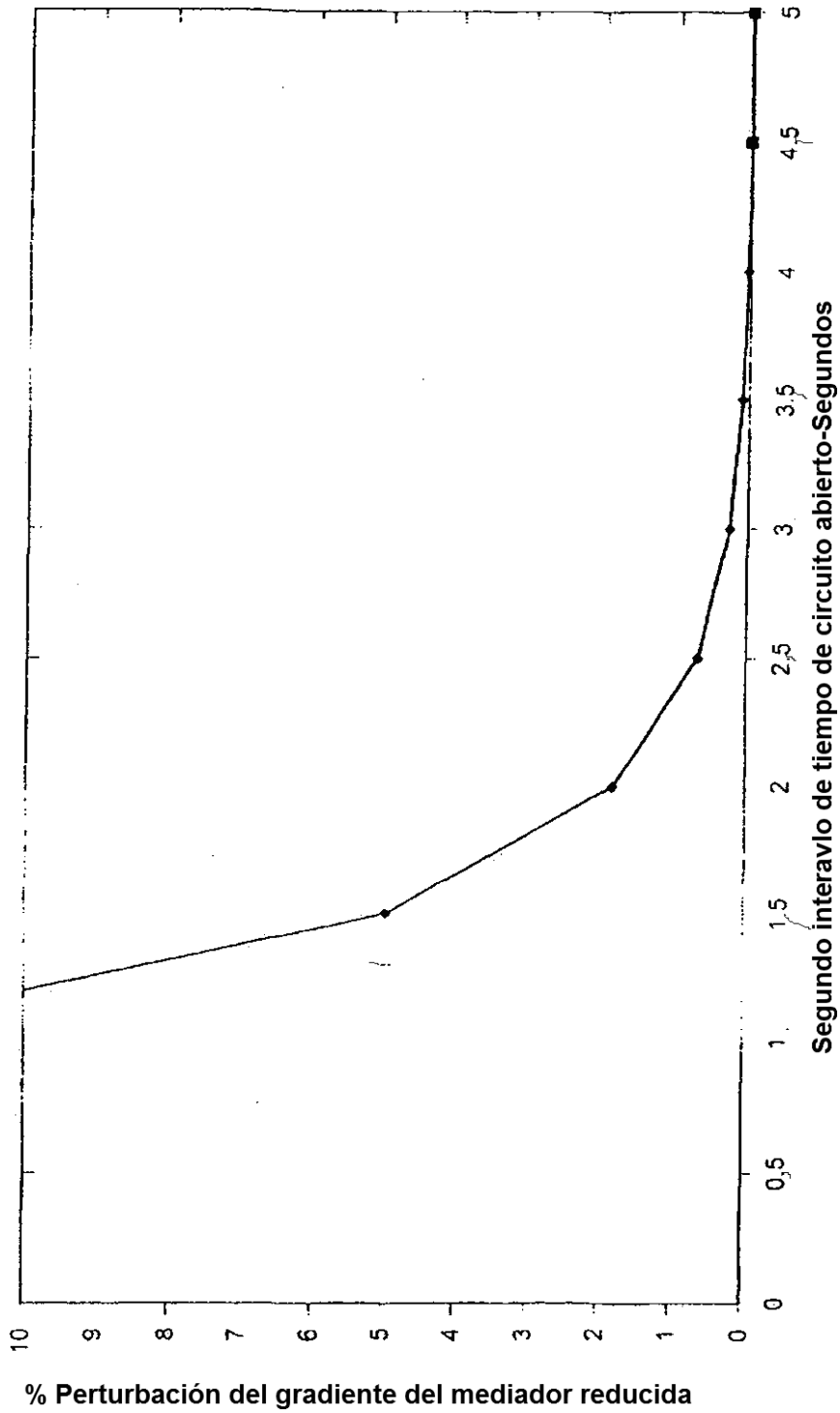


FIG. 10

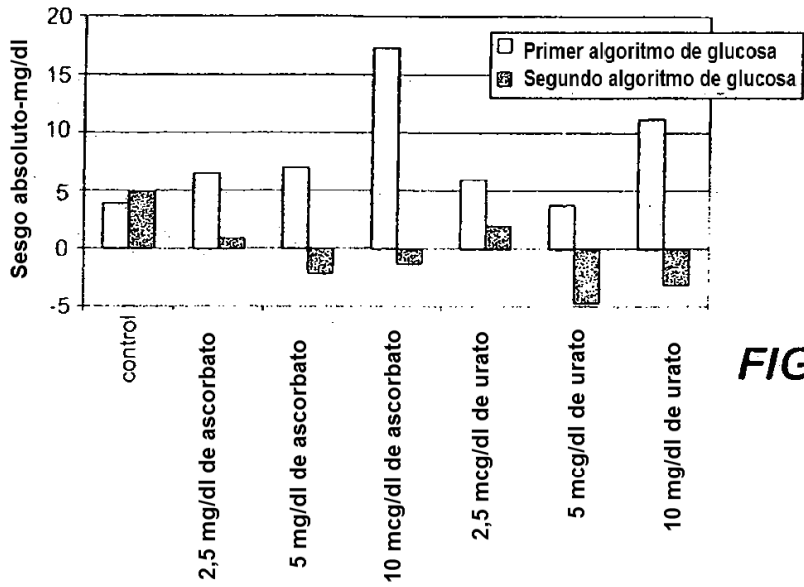


FIG. 11

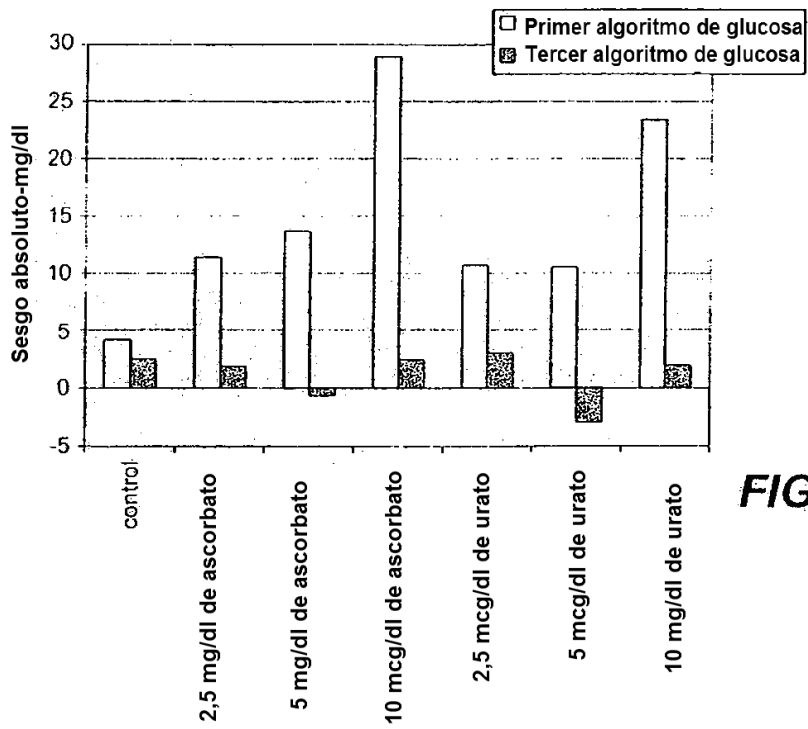


FIG. 12

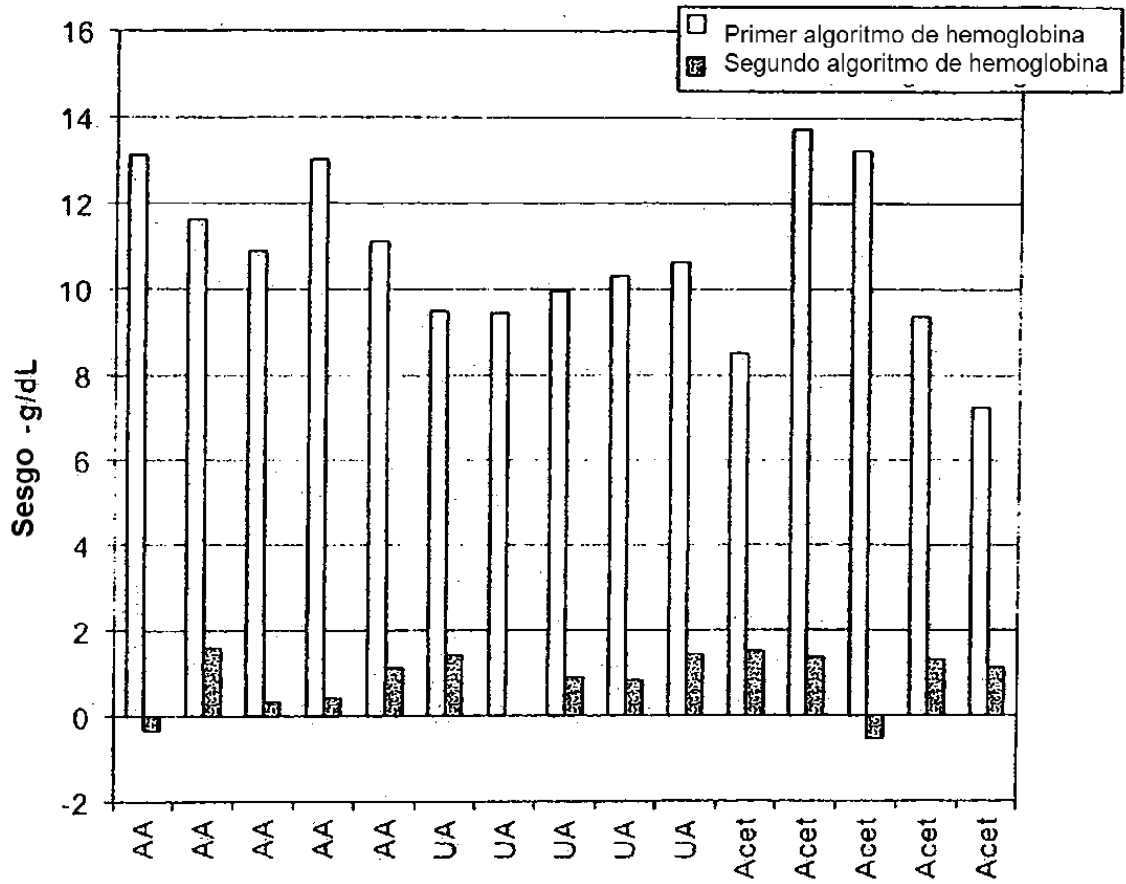


FIG. 13