

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 978**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/32 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 33/98 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2015 PCT/FI2015/050158**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15136154**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2015 E 15718247 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 3117006**

54 Título: **Tira reactiva y aparato para medir el contenido de alcohol en sangre, y un método para medir el contenido de alcohol en sangre**

30 Prioridad:

13.03.2014 FI 20145230

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

15.10.2018

73 Titular/es:

**PAL FINLAND OY (100.0%)
Kirkkokatu 33 B 21
70100 Kuopio, FI**

72 Inventor/es:

**KOLEHMAINEN, KARI;
VARTIANEN ILKKA y
PYHÄLUOTO, RIKKA**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 685 978 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

Tira reactiva y aparato para medir el contenido de alcohol en sangre, y un método para medir el contenido de alcohol en sangre

5

Un objeto de la invención es una tira reactiva para medir el contenido de alcohol en sangre.

Otro objeto de la invención es un aparato para medir el contenido de alcohol en sangre, comprendiendo el aparato la tira reactiva mencionada anteriormente y un dispositivo de medición.

Aún objeto de la invención es un método para medir el contenido de alcohol en sangre.

10

El aparato de acuerdo con la invención y la tira reactiva aplicable a éste son cualquier aparato y tira reactiva que funcionen según el principio amperométrico. Dichas pruebas son, por ejemplo, etanol (alcohol etílico), metanol (alcohol metílico), etilenglicol, y sus reactivos adecuados para la medición según el principio amperométrico.

15 **Técnica anterior**

Un dispositivo ampliamente utilizado y conocido para determinar el contenido de alcohol en sangre (contenido de etanol) de una persona es un alcoholímetro, por medio del cual el contenido de alcohol en sangre se determina a partir del aire exhalado por la persona. Por lo tanto, los alcoholímetros no miden directamente el contenido de

20

alcohol en la sangre, lo que requiere un análisis de sangre. El funcionamiento de los alcoholímetros portátiles ("alcoholímetro de campo") utilizados por las autoridades finlandesas se basa en la oxidación electroquímica del alcohol contenido en la respiración. En la celda de material de trabajo que actúa como un sensor, el alcohol, es decir, el etanol, se descompone para formar ácido acético y un exceso de electrones sobre la superficie superior de la celda. La escasez de electrones que se forma en la superficie inferior de la celda forma una corriente eléctrica entre las superficies. La tensión se mide con electrodos de platino y se puede leer como una lectura por mil que indica el contenido de etanol en la sangre.

25

Los alcoholímetros usados actualmente son en principio funcionales, pero éstos y su uso tienen algunas desventajas que se describen a continuación.

30

En su trabajo de campo, los paramédicos y la policía se encuentran con personas cuyo contenido de alcohol en la sangre debe medirse, pero que se niegan a soplar en un alcoholímetro o no pueden hacerlo debido a su condición.

35

Cuando los paramédicos reciben una llamada del centro de emergencia, se van/llegan al lugar donde está el paciente. Si hay razones para creer que el paciente está bajo la influencia del alcohol, se realiza una prueba de aliento con un alcoholímetro, y el resultado obtenido determinará el tratamiento que debe iniciarse. El problema es que la prueba de aliento no revela la cantidad de alcohol en la sangre. Si el paciente no puede (está inconsciente) o no está dispuesto a soplar, solo se puede iniciar el tratamiento primario. El paciente debe ser transportado a una unidad de primeros auxilios para realizar un análisis de sangre con el fin de determinar la cuestión.

40

Las debilidades del modelo de operaciones actual de los paramédicos son, por lo tanto:

- un retraso en comenzar el tratamiento
- costes adicionales (conducción adicional, procedimientos adicionales en la unidad de primeros auxilios).

45

Sin embargo, la medición del contenido de alcohol debe realizarse rápidamente antes de iniciar el tratamiento adicional, porque el posible contenido de alcohol en la sangre del paciente es información crucial para planificar el tratamiento posterior. Si el contenido de alcohol en la sangre no se determina inmediatamente de forma correcta, esto puede provocar un retraso en el tratamiento, procedimientos incorrectos e incluso la pérdida de la vida de un

50

paciente. Una medición realizada a partir de la respiración no siempre proporciona una imagen suficientemente fiable del contenido de alcohol en la sangre. La policía, a su vez, usa los alcoholímetros como dispositivos de detección para controlar el uso de sustancias tóxicas en la carretera. Si el dispositivo de detección indica que hay motivos para creer que un conductor es culpable de conducir en estado de ebriedad, se lleva al conductor a la estación de policía para realizar pruebas adicionales con un alcoholímetro de precisión o a un centro de salud para un análisis de sangre. Si la prueba de aliento da una lectura cero a pesar de que el conductor puede ser identificado como un usuario bajo intoxicantes, el conductor es llevado a un examen médico. Dado que el contenido de etanol en la sangre no siempre se corresponde con el contenido de etanol en la respiración, las mediciones realizadas a partir de la respiración pueden ser engañosas debido a la disposición de la medición. Si, por otro lado, se trata de una persona con una respiración deficiente, no

55

se puede usar una prueba de aliento para la evaluación correcta de la condición de la persona, ni siquiera como punto de partida.

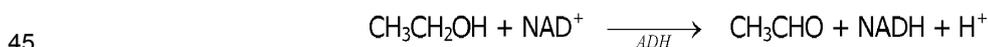
Las debilidades del modelo de operaciones actual de la policía son, por lo tanto:

- 5 - costes adicionales (conducción adicional, procedimientos adicionales en la unidad de primeros auxilios)
 - la confirmación se realiza con un alcoholímetro de precisión, que es costoso de usar (los alcoholímetros de precisión se calibran regularmente y el Finnish National Institute for Health and Welfare es responsable de su calidad).
- 10 Los vehículos de emergencia a menudo son los primeros en llegar a un paciente y su personal inicia el tratamiento correcto o deriva a la persona a la atención de la policía. Para poder tomar la decisión correcta, se requiere una imagen clara del contenido de etanol en la sangre.
 En lugar de, o además de, un alcoholímetro es, por lo tanto, requerido un método por medio del cual el contenido de alcohol en sangre se pueda medir de forma rápida y fiable en condiciones de campo.
- 15 El documento US 2010/077598 describe un sensor de etanol electroquímico que comprende como reactivo activo alcohol deshidrogenasa, cofactor de NAD y tampón.

Descripción de la invención

- 20 Existe, por lo tanto, demanda de un aparato por medio del cual el contenido de alcohol en sangre de una persona/paciente pueda medirse de manera fiable y precisa en condiciones de campo, independientemente de si la persona/paciente está consciente o inconsciente.
 Con el fin de eliminar los puntos débiles mencionados anteriormente y satisfacer la demanda anterior, la tira reactiva de acuerdo con la invención se caracteriza en la reivindicación 1. En una realización preferida de la tira reactiva de acuerdo con la invención, los electrodos son electrodos de grafito. Al área de reacción de la tira reactiva se le aplica sacarosa y albúmina de suero bovino (BSA) como sustancias auxiliares. En la realización preferida, los reactivos y las sustancias auxiliares se secan en la base, sobre los electrodos. Los reactivos y las sustancias auxiliares se protegen preferiblemente con una película protectora de aislamiento eléctrico (por ejemplo, una película de polietileno), ya que abertura de la muestra la penetra. La tira reactiva de acuerdo con la invención incluye preferiblemente un sensor de temperatura.
- 30 El aparato de acuerdo con la invención se caracteriza en la reivindicación 5. En una realización preferida del aparato de acuerdo con la invención, la potencia operativa del dispositivo de medición consiste en baterías ordinarias, tales como tres baterías AAA. El dispositivo de medición de acuerdo con la invención tiene preferiblemente una pantalla, por ejemplo, una pantalla LCD, que da el resultado de la medición como mg/l o por mil.

- El método de acuerdo con la invención se caracteriza en la reivindicación 8. Durante mucho tiempo ha existido la necesidad en el campo del aparato de acuerdo con la invención. Por medio de la invención, ahora se puede cumplir esta necesidad. La invención se basa en la observación inesperada de la reacción de oxidación del alcohol catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) conocida como tal, en la que el etanol reacciona con el dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD⁺), que actúa como una coenzima para formar acetaldehído, una forma reducida de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH) y protones (H⁺), y se puede implementar en el campo con una tira reactiva. La ecuación de reacción de esta reacción de oxidación es:



Descripción detallada de la invención

- 50 A continuación se divulga con mayor detalle un ejemplo de una realización preferida de la tira, el aparato y el método de acuerdo con la invención, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que

- La Figura 1 muestra una vista desde arriba de una realización preferida de la tira reactiva de acuerdo con la invención,
 la Figura 2 muestra una vista lateral en sección transversal de la tira reactiva mostrada en la Figura 1,
 55 la Figura 3 muestra gráficamente la determinación del contenido de alcohol en sangre a partir de una muestra de sangre que no según la invención.

Por lo tanto, la invención se refiere a una medición del contenido de alcohol en sangre sencilla y rápida basada en un biosensor. En esta realización preferida, el aparato está compuesto por una tira de biosensor y un dispositivo de

medición, cuyo funcionamiento se basa en medir la diferencia de potencial entre los electrodos de grafito en el biosensor, es decir, la tira reactiva, de los cuales uno es un electrodo de trabajo 1 y el otro un electrodo de referencia 2. La diferencia de potencial se forma cuando el etanol contenido en la muestra se convierte en acetaldehído y un protón (hidrógeno, H⁺) en una reacción catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). El aparato contiene
5 todo lo necesario para hacer la medición. La medición dura aproximadamente 3 minutos y puede realizarse sin una preparación especial. La muestra consiste en sangre de la yema del dedo, su volumen es de aproximadamente 10 µl.

Como un dispositivo de medición basado en la diferencia de potencial se puede utilizar un medidor de azúcar en sangre que aplica el método de reactivo de glucosa oxidasa y opera en el principio amperométrico, a cuyo medidor
10 se conecta un sensor de temperatura automático, desde el cual el dispositivo de medición recibe la lectura correctiva que utiliza para calcular el resultado. Solo se necesita hacer mediciones experimentales a diferentes temperaturas e incluir un algoritmo en el programa para corregir el resultado para que se corresponda con la temperatura ambiente. Como ejemplo de un medidor de azúcar en la sangre que, cuando se modifica como se especifica anteriormente, se puede usar para implementar el dispositivo de medición de acuerdo con la invención, se puede mencionar un
15 medidor de azúcar en la sangre con el nombre de Mendor Discreet, que es un medidor de azúcar en sangre todo en uno fabricado y vendido por la empresa finlandesa Mendor Oy.

La tira reactiva mostrada en la Figura 1 comprende el material de base 5 y dos electrodos de grafito 1, 2 unidos a éste y un área de reacción 3 conectada a ambos electrodos. Al área de reacción 3 se le aplica dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD⁺) y la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), y como sustancias auxiliares sacarosa y
20 albúmina sérica bovina (BSA). El área de reacción 3 con sus reactivos y sustancias auxiliares está protegida hacia el exterior con una película protectora electroaislante 7 (por ejemplo, polietileno). El área de reacción está conectada a una abertura de muestra 6, desde la cual la muestra de sangre a medir puede transferirse al área de reacción para disolver los reactivos y las sustancias auxiliares. Al mismo tiempo, la muestra de sangre entra en contacto con ambos electrodos 1, 2, entre los cuales puede formarse, por medio de un dispositivo de medición que funciona
25 según el principio amperométrico, una diferencia de potencial, que permite que los protones (H⁺) formados en la reacción se muevan hacia el electrodo de trabajo cargado negativamente 1, por lo que se forma un cambio medible en la corriente.

Los reactivos y las sustancias auxiliares en la tira reactiva se han añadido y secado sobre los electrodos 1, 2. La
30 adición de reactivos y sustancias auxiliares a la base 5, sobre los electrodos, tiene lugar por medio de dosificación de líquido industrial, después de que los reactivos y las sustancias auxiliares se secan, y finalmente se protegen con una película protectora aislante 7, tal como una película de polietileno.

Como se puede ver en la Figura 2, la tira reactiva está compuesta en general por electrodos de grafito 1, 2
35 colocados sobre un material sólido, entre los cuales se forma un área de reacción 3 a la que los reactivos y sustancias auxiliares se han aplicado en forma líquida y luego se han secado. Además de estos, la tira reactiva también comprende un sensor de temperatura 4, que se coloca debajo del área de reacción 3, separado por un aislante 6. Por lo tanto, el sensor de temperatura 4 se fija directamente a la base 5, en cuya parte superior está montado el aislante 6 para aislar el sensor del área de reacción.

40 El contenido de alcohol en sangre se mide de la siguiente manera:

- a. se toma una muestra de sangre, por ejemplo, de la punta del dedo de una persona
- b. la muestra de sangre se lleva a través de la abertura de muestra de la tira reactiva (poniendo la gota de
45 sangre en contacto con la abertura de la muestra, se absorbe en la tira) al área de reacción de la tira reactiva, en contacto con los reactivos, la coenzima NADH y enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), después de lo cual el alcohol (etanol) posiblemente contenido en la muestra de sangre y la coenzima NADH reaccionan en una reacción catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa (NAD⁺) de tal forma que el alcohol (etanol) se convierte en el correspondiente aldehído (acetaldehído) y un protón de acuerdo con la
50 siguiente ecuación de reacción:



- c. la tira reactiva está conectada a un dispositivo que funciona según el principio amperométrico, que
55 mantiene constante el potencial entre los dos electrodos (1, 2) y la intensidad instantánea de la corriente se mide en función de los protones producidos en la reacción.
- d. la magnitud del cambio en la corriente causado por los protones producidos en la reacción y que se obtiene a partir de los resultados de la medición de la intensidad actual se convierte, por medio de un programa de cálculo, en un valor que indica el contenido de alcohol.

El dispositivo de medición que funciona de acuerdo con el principio amperométrico es un dispositivo médico IVD de clase I y está destinado a uso profesional. La potencia operativa consiste en tres pilas AAA. El dispositivo de medición y el aparato en su conjunto no presentan un riesgo inmediato para el usuario o paciente debido a la 5 conducción de potencia, ni a un riesgo biológico. El aparato incluye software para controlar el uso y la supervisión del aparato. Los accesorios incluyen un calibrador, control y lancetas necesarios para tomar la muestra. Tomar la muestra requiere un conocimiento especial, que debe incluirse en los requisitos del usuario del dispositivo. El correcto funcionamiento del dispositivo requiere una temperatura de 10-30 °C y una humedad relativa del 10-80%. Para periodos de almacenamiento más largos, el paquete del dispositivo debe mantenerse a temperatura ambiente 10 (10-25 °C). La vida útil de las tiras es de al menos seis meses a la temperatura adecuada. La medición se realiza directamente desde la muestra de sangre del dedo; no se recomienda transportar la muestra a otra parte. La precisión de medición dentro del intervalo del 0,5-6,0 ‰ es menor de ±20 % de CV.

Las propiedades del dispositivo de medición

- 15
 - tamaño 100 x 50 x 30 mm
 - peso 100-200 g
 - paquete del producto
- 20
 - dispositivo, tiras, instrucciones de uso
 - implementos requeridos para el muestreo
 - bolsa transportada en el cinturón
 - pantalla LCD
 - resultado en mg/l y por mil
 - fecha
- 25
 - indicador de tira
 - interfaz de usuario
 - 2 botones
 - menú y funciones de reconocimiento
 - potencia operativa 3 baterías AAA
- 30
 - puerta del sensor
 - identificación del sensor
 - el desarrollo del dispositivo de medición no requiere conocimientos especiales
 - una gran cantidad de fabricantes disponibles
 - los costes de fabricación en la producción a gran escala van de aproximadamente 20 a 30 €
- 35
 - el dispositivo comprende calibración interna; la calibración externa se realiza con material estándar
 - se pueden hacer varias versiones del dispositivo, por ejemplo, equipado con transferencia de datos

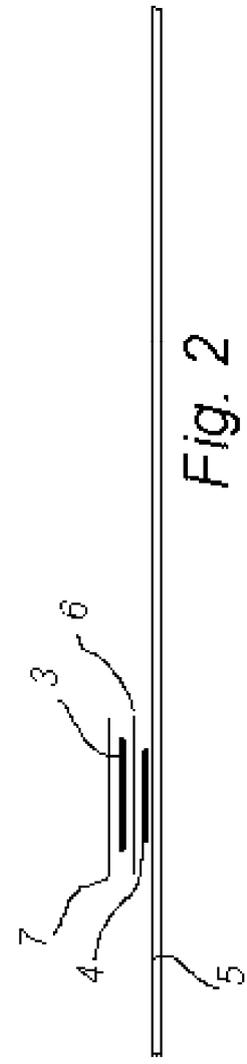
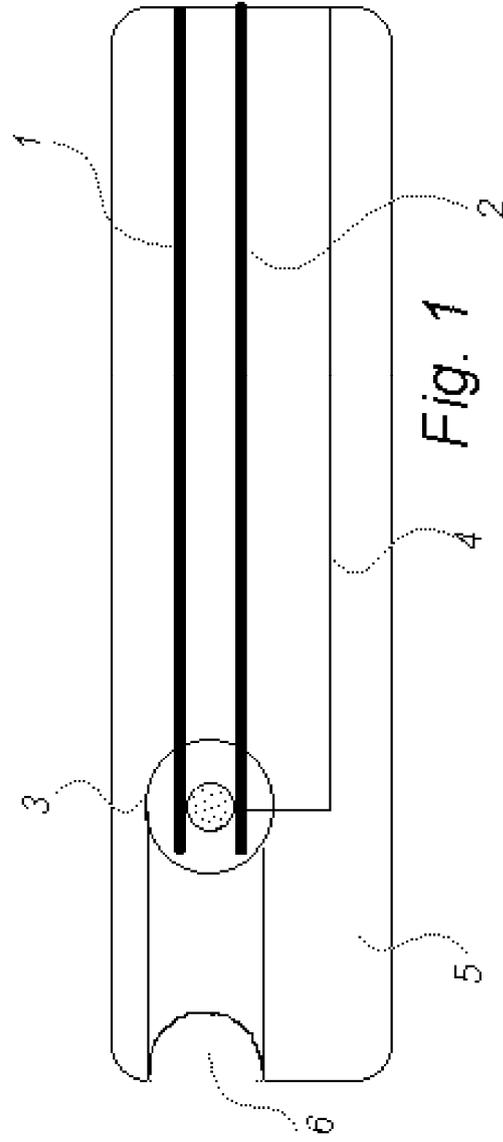
Sectores de usuario para el aparato:

- 40
 - Primeros auxilios/ambulancias
 - Policía de control de tráfico
 - Unidades de primeros auxilios de hospitales y centros de salud
 - Mercados de consumo
 - Otros usuarios aleatorios (por ejemplo, algunos empleadores, escuelas, el ejército, etc.)

45 La Figura 3 muestra gráficamente la determinación del contenido de alcohol en sangre a partir de una muestra (de sangre) no según la invención, utilizando un sensor de grafito transmitido por azul de Prusia de alcohol-oxidasa (AOX). La Figura muestra la relación lineal entre el contenido de alcohol (etanol, EtOH) y el cambio de corriente amperométrica por medio de la denominada ecuación de descriptor constante $y = -1,0577x - 1,4663$ (el cuadrado del coeficiente de la ecuación $R^2 = 0,9572$). Por medio de la ecuación en la memoria del dispositivo de medición se 50 puede calcular de forma fiable el contenido de etanol en la muestra de sangre de la persona/paciente que se está examinando.

REIVINDICACIONES

1. Una tira reactiva para medir el contenido de alcohol en sangre, comprendiendo la tira reactiva un material de base (5) y dos electrodos (1, 2) unidos a ésta, y un área de reacción (3) conectada a ambos electrodos, en cuya área de reacción se aplican dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD⁺) y la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) como reactivos, y sacarosa y albúmina sérica bovina (BSA) como sustancias auxiliares, en la que los reactivos y las sustancias auxiliares se secan en la base (5), sobre los electrodos (1, 2), una abertura de muestra (6) en conexión con el área de reacción (3), a partir de cuya abertura de muestra se puede transferir la muestra de sangre que se va a medir al área de reacción (3) para disolver los reactivos y las sustancias auxiliares opcionales, y al mismo tiempo entrar en contacto con ambos electrodos (1, 2), entre los que se puede formar una diferencia de potencial que hace posible el movimiento de los protones (H⁺) formados en la reacción hacia un electrodo de trabajo con carga negativa (1), mediante lo cual se forma un cambio medible en la corriente.
2. Una tira reactiva según la reivindicación 1, en la que los electrodos (1, 2) son electrodos de grafito.
3. Una tira reactiva según la reivindicación 1 o 2, en la que los reactivos y las sustancias auxiliares están protegidos con una película protectora de electroaislante (7) (por ejemplo, una película de polietileno), y en la que penetra la abertura de muestra (6).
4. Una tira reactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende un sensor de temperatura (4).
5. Un aparato para medir el contenido de alcohol en sangre de sangre, comprendiendo el aparato una tira reactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un dispositivo de medición con una puerta para conectar la tira reactiva al dispositivo de medición, y configurado para medir el cambio en la corriente (diferencia de potencial) entre los electrodos (1, 2) en la tira reactiva cuando la tira reactiva está conectada a la puerta del dispositivo de medición.
6. Un aparato según la reivindicación 5, en el que la potencia operativa del dispositivo de medición consiste en baterías ordinarias, por ejemplo, tres baterías AAA.
7. Un aparato según la reivindicación 5 o 6, en el que el dispositivo de medición tiene una pantalla, por ejemplo, una pantalla LCD, que proporciona el resultado de la medición en mg/l o en por mil.
8. Un método para medir el contenido de alcohol en sangre, que incluye al menos las siguientes fases:
- se toma una muestra de sangre de una persona;
 - la muestra de sangre se lleva a través de la abertura de muestra de la tira reactiva de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 al área de reacción (3) de la misma, en contacto con los reactivos coenzima NADH y enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), después de lo cual el alcohol (etanol) posiblemente contenido en la muestra de sangre y la coenzima NADH reaccionan en una reacción catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa (NAD⁺) de tal manera que el alcohol (etanol) se convierte en el aldehído correspondiente (acetaldehído) y un protón de acuerdo con la siguiente ecuación de reacción:
- $$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{ADH}} \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH} + \text{H}^+$$
- la tira reactiva está conectada a un dispositivo que funciona según el principio amperométrico, que mantiene constante el potencial entre los dos electrodos (1, 2) y la intensidad instantánea de la corriente se mide en función de los protones producidos en la reacción;
 - la magnitud del cambio en la corriente causado por los protones producidos en la reacción y que se obtiene a partir de los resultados de la medición de la intensidad actual se convierte, por medio de un programa de cálculo, en un valor que indica el contenido de alcohol.



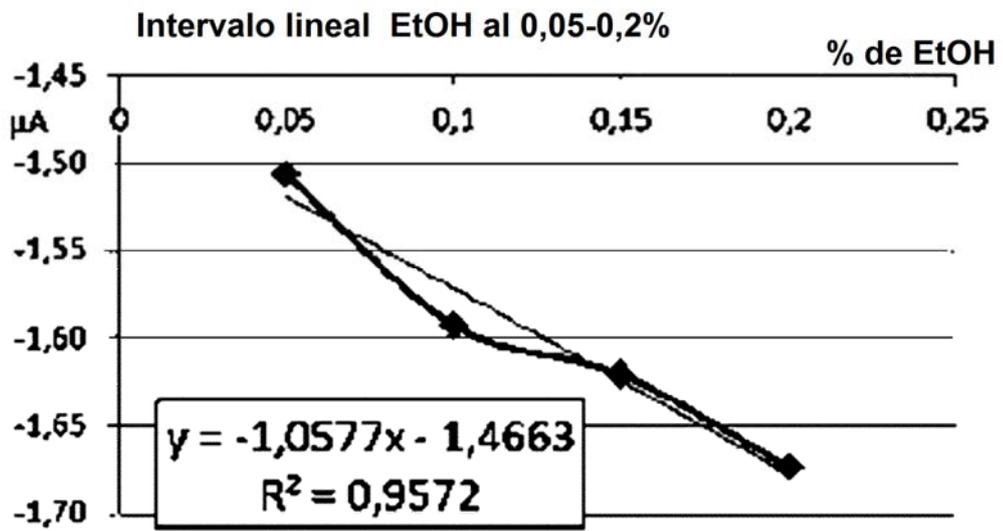


Fig. 3