

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 877**

51 Int. Cl.:

G01N 33/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2012 E 12183540 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2568281**

54 Título: **Sensor desechable para la detección electroquímica de la hemoglobina**

30 Prioridad:

12.09.2011 US 201113230423

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

05.04.2019

73 Titular/es:

**NOVA BIOMEDICAL CORPORATION (100.0%)
200 Prospect Street
Waltham, MA 02454, US**

72 Inventor/es:

**CAI, XIAOHUA;
YOUNG, CHUNG CHANG y
MOFIENSKI, JESSICA JOY**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 707 877 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

Sensor desechable para la detección electroquímica de la hemoglobina

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a sensores electroquímicos que se pueden usar para la cuantificación de un componente o analito específico en una muestra líquida. En particular, la presente invención se refiere a un sensor electroquímico desechable para medir la concentración de hemoglobina en sangre. Más particularmente, la presente invención se refiere a un sistema para medir simultáneamente la hemoglobina y el hematocrito en una muestra de sangre. Aún más particularmente, la presente invención se refiere a un dispositivo que puede emplearse para realizar ensayos de hemoglobina y hematocrito en una muestra de pequeño volumen (de aproximadamente 1,6 µl) con alta precisión.

15 **Descripción de la técnica anterior**

La hemoglobina es una proteína del interior de los glóbulos rojos que transporta el oxígeno por todo el organismo. Un análisis de hemoglobina revela cuánta hemoglobina hay en la sangre de una persona, que se puede usar para diagnosticar y controlar la anemia (un nivel bajo de hemoglobina) y la policitemia vera (un nivel alto de hemoglobina). En general, una medición de hemoglobina baja significa que la persona tiene anemia. Una hemoglobina elevada puede deberse a la deshidratación (disminución de agua), hipoxia (disminución de oxígeno) o policitemia vera.

La medición de la hemoglobina en la sangre venosa o capilar es uno de los análisis clínicos realizados con mayor frecuencia. En casos de traumatismo, quirófanos y unidades de cuidados intensivos, es esencial conocer de inmediato el valor de la hemoglobina del paciente. La hemoglobina se usa para monitorizar y controlar la anemia en los pacientes en diálisis. También es un parámetro ampliamente usado para evaluar a los donantes de sangre con el fin de detectar la anemia en los bancos de sangre. Por lo tanto, la medición precisa de la hemoglobina es altamente deseable.

Los métodos colorimétricos son los métodos más populares para la medición de la hemoglobina. Estos métodos se basan en la propiedad de reducción del hierro ferroso de la hemoglobina, HbFe (II) (Ashwood, R. Edward y Burtis, A. Carl. *Textbook of Clinical Chemistry*. 1996; W. C. Stadie, *J. Biol. Chem.*, 1920, 41, 237). Concretamente, el hierro ferroso de la hemoglobina se oxida mediante un oxidante, por ejemplo, ferricianuro, para producir HbFe (III), un monómero de metahemoglobina, que luego se convierte en una cianomethemoglobina estable mediante la adición de cianuro de potasio. La absorbancia de la cianomethemoglobina resultante, medida fotométricamente, está relacionada con la concentración de hemoglobina. Este método ha sido modificado mediante el uso de reactivo de Drabkin (Drabkin *et al. J. Biol. Chem.* 1932, 98, 719) que comprende una solución acuosa alcalina de ferricianuro de potasio y cianuro de potasio y, por lo tanto, permite la realización del ensayo usando un solo reactivo. Vanzetti en *J. Lab. Clin. Med.* 1966, 67, 116 ha propuesto usar azida de sodio en lugar de cianuro de potasio. La azida-metahemoglobina tiene un espectro de absorción similar al de la cianomethemoglobina. Debido a la toxicidad del cianuro de potasio, los métodos fueron mejorados posteriormente por varios grupos (S. Wong *et al.*, patente de EE.UU. n.º 5.958.781; Y. Li *et al.*, patente de EE.UU. n.º 5.882.934; W. Ziegler, patente de EE.UU. n.º 5.773.301) para lograr reactivos exentos de cianuro. Se han desarrollado y comercializado algunos productos basándose en las mejoras.

El medidor de la anemia BIOSAFE (de Biosafe Co., Pittsburg, PA) se considera el primer análisis de sangre instantáneo para la detección de la anemia. El método se basa en el movimiento de la sangre (se necesitan unas cuantas gotas de sangre) y en el desarrollo del color (15-25 min) en el dispositivo, y el resultado se lee a simple vista desde la escala.

El sistema de análisis de la MHgb STAT-Site® (Stanbio Laboratory Co., Boerne, TX) consiste en un medidor de la reflectancia y una tarjeta de análisis de la hemoglobina que mide la hemoglobina en una sola gota de sangre. La reacción se basa en el método de la azida-methemoglobina y usa muestras de sangre del dedo o de sangre completa venosa (se necesitan aproximadamente 10 µl de sangre).

El sistema HemoCue (HemoCue Inc., Cypress, CA) se usa ampliamente en la actualidad para medir la hemoglobina en sangre completa. Se toman aproximadamente 10 µl de sangre para llenar la cubeta capilar que contiene un reactivo que consiste en desoxicolato de sodio, nitrito de sodio y reactivo de nitrito de azida de sodio, que lisa la sangre y convierte la hemoglobina en hemiglobinazida. A continuación, se mide la absorbancia mediante espectrometría (S. S. Morris, *et al., Am. J. Clin. Nutr.*, 1999, 69(6), 1243). Debido a los problemas asociados con los sistemas de medición espectrométrica, como los rellenos de las cubetas y la turbidez de fondo y otros problemas (por ejemplo, trampa de burbujas), se informaron resultados de dispersión amplia (H. Gehring *et al., Acta Anaes. Scand.*, 2002, 46, 980). A. M. Conway *et al.* advirtieron que se ha de suspender la medición de la hemoglobina en gotas individuales de sangre de punción en la piel con el sistema HemoCue. (*J. Clin. Pathol.*, 1998, 51, 248).

65

El dispositivo iSTAT-1 POCT (Modelo iSTAT-1 con cartuchos EC6+, I-STAT Corp., Princeton, NJ) usa un método basado en la conductividad para medir el hematocrito en sangre. La conductividad medida es inversamente proporcional a la concentración de hematocrito en las muestras de sangre. La concentración de hemoglobina en sangre se calcula a través de una ecuación experimental. Es evidente que la conductividad puede verse fuertemente influenciada por la concentración de proteínas plasmáticas, y la concentración de electrolitos y otros factores. Los resultados serían muy dudosos considerando la concentración variable de las proteínas plasmáticas y la concentración de electrolitos (por ejemplo, cloruro de sodio) en las muestras de sangre. Por lo tanto, se recomienda que los análisis del hematocrito y de la hemoglobina en pacientes con sospecha de hipoproteinemia o hemodilución sustancial se analicen con un método no basado en la conductividad (Sidney M. Hopfer *et al.*, *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 2004, 34, 75.)

Las técnicas electroquímicas han recibido mucha atención en los últimos años debido a ventajas tales como la rapidez, la alta sensibilidad, la instrumentación barata y el funcionamiento sencillo. J. Green, *et al.* desvelaron un ensayo electroquímico para la hemoglobina en la patente de EE.UU. n.º 4.876.205. El método se basa en el uso de una tira seca cargada con una mezcla que comprende un tensioactivo (para lisar los glóbulos rojos y liberar la hemoglobina), ferricianuro de potasio (para oxidar el HbFe (II) de la hemoglobina). Tras 30-60 s de incubación en 20 µl de muestra de sangre, se registran las oscilaciones momentáneas de corriente-tiempo (amperometría) con un potencial aplicado de 0,45 V o 0,50 V frente al electrodo de referencia de Ag/AgCl y las corrientes, medidas tras 30 s, se relacionan con la concentración de hemoglobina en las muestras de sangre.

Basándose en el principio de reacción del ferricianuro de potasio-HbFe (II) anterior, A. Hodges, *et al.*, desvelaron una celda electroquímica desechable en la patente de EE. UU. n.º 6.632.349 y la solicitud de patente de EE. UU. n.º 20030201177 para la detección de la concentración de hemoglobina. La celda electroquímica desechable se construyó con una cámara de detección, un primer electrodo y un segundo electrodo (electrodo de referencia), en la que el segundo electrodo se monta en sentido opuesto (cara a cara) con una distancia inferior a 500 micrómetros desde el primer electrodo. La celda de detección funciona como un sensor amperométrico.

El documento US 20030082076 se refiere a un sensor de hemoglobina y de hematocrito desechable que detecta la tira de electrodos. La concentración de hemoglobina y de hematocrito en una muestra líquida se puede determinar mediante el análisis electroquímico de la muestra líquida y la baja tensión de operación.

En 2006, Yiang *et al.* desvelaron un biosensor desechable para la determinación de la hemoglobina en sangre completa, cuya tecnología de detección se basa en la tecnología de detección amperométrica (véase "Nano/micro Engineered and molecular systems" 2006, 1ª conferencia internacional de IEEE, IEEE, PI, 1 de enero de 2006, páginas 204-206, XP031063830, ISB 978-1-4244-0139-0).

Recientemente, una solicitud de patente de EE.UU. n.º 20070062822 desveló un sensor electroquímico para la medición del hematocrito. El método desvelado proporciona un sistema de electrodos que tiene un electrodo de trabajo y un contraelectrodo, proporcionándose una sustancia redox en el contraelectrodo, pero no en el electrodo de trabajo. Se aplica un alto voltaje (igual o mayor que un voltaje que causa la electrólisis del agua) a través del sistema de electrodos. De acuerdo con los datos desvelados en la patente, la concentración de hematocrito también es inversamente proporcional a la señal de corriente resultante.

Más recientemente, una solicitud de patente de EE.UU. n.º 20090104641 desveló un método electroquímico y una tira de análisis para la detección de la hemoglobina en una muestra. El método se basa en la detección de la corriente eléctrica producida mediante la reacción de la hemoglobina y un mediador de electrones (tetratiafulvaleno o dimetilferroceno modificado con ciclodextrina) en una muestra en una condición potencioestática. Sin embargo, la concentración de hemoglobina es inversamente proporcional a la señal de la corriente, es decir, una concentración de hemoglobina o un hematocrito inferiores dan una respuesta de corriente superior, o viceversa.

Es muy deseable medir la hemoglobina y el hematocrito con precisión. Un resultado del análisis de la hemoglobina falsamente alto o bajo dará lugar a tratamientos incorrectos para los pacientes, conduciendo incluso a complicaciones potencialmente mortales. Por lo tanto, es deseable tener un sistema de medición de la hemoglobina que pueda proporcionar una lectura de la hemoglobina más precisa.

Además, es deseable tener un sistema de medición de la hemoglobina que pueda proporcionar una lectura más exacta de la hemoglobina mediante la superación de las deficiencias de los métodos de la técnica anterior causadas por factores variables.

Por otra parte, es deseable tener un sensor electroquímico que requiera un volumen de muestra inferior al requerido por la técnica anterior.

También es deseable tener un sensor de hemoglobina desechable, fácil de usar capaz de proporcionar lecturas de la hemoglobina más precisas.

Sumario de la invención

- 5 Es un objetivo de la presente invención proporcionar un sensor de hemoglobina desechable capaz de medir la concentración de hemoglobina en un pequeño volumen de fluido corporal.
- Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un sensor de hemoglobina desechable que sea capaz de medir la concentración de hemoglobina en un pequeño volumen de fluido corporal tal como de sangre obtenida mediante la punción en la piel del usuario.
- 10 Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar un sensor de hemoglobina desechable que tenga un tiempo de respuesta rápido
- Es otro objetivo más de la presente invención proporcionar un sensor desechable para su uso en la determinación de la hemoglobina y el hemotocrito simultáneamente en una muestra de sangre con un solo dispositivo desechable.
- 15 Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar métodos para la medición fiable del contenido de hemoglobina de una muestra de sangre usando una tira sensora.
- La presente invención proporciona estos y otros objetivos en las siguientes realizaciones descritas.
- 20 De acuerdo con una realización de la presente invención, se configura una tira sensora para realizar mediciones de hemoglobina en una muestra de sangre completa como se define en la reivindicación 1.
- De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el mediador rédox oxida el hierro (II) de la hemoglobina, y en una realización, puede ser ferricianuro de potasio que comprende del 0,1 % al 20 % (p/p) de la composición de reactivo.
- 25 La composición de reactivo comprende una cantidad eficaz de un aglutinante polimérico, una cantidad eficaz de tensioactivo y al menos un tampón. El aglutinante polimérico puede estar en el intervalo del 0,04 % al 2 % (p/p) de la composición, el tensioactivo puede estar en el intervalo del 0,01 % al 5 % (p/p) de la composición y el tampón puede tener un pH superior 7. El aglutinante polimérico puede comprender óxido de polietileno, el tensioactivo puede comprender un éter de polioxitileno y el tampón puede comprender una composición alcalina.
- 30 En una realización preferida, la tira sensora puede incluir una primera capa intermedia sobre la capa base, una segunda capa intermedia sobre la primera capa intermedia y una capa superior, incluyendo la primera capa intermedia una primera abertura que coincide con la primera capa conductora en la que se recibe la composición de reactivo y una segunda abertura que coincide con la segunda capa conductora en la que se recibe la composición de reactivo, incluyendo la segunda capa intermedia un corte que reside sobre la primera y la segunda abertura para definir el canal, e incluyendo la capa superior una abertura de ventilación en comunicación con el canal, en la que el canal está dimensionado para recibir no más de 2 microlitros de sangre completa de acuerdo con otro aspecto de la presente invención.
- 35 De acuerdo con otra realización de la presente invención, la tira sensora incluye además una tercera capa conductora de la electricidad sobre la capa base y una segunda composición de reactivo en contacto con la tercera capa conductora para definir un electrodo en blanco, incluyendo la tercera composición de reactivo un mediador rédox insensible a la hemoglobina. En esta realización, la primera capa intermedia incluye una primera abertura pasante que coincide con la primera capa conductora en la que se recibe la composición de reactivo, una segunda abertura pasante que coincide con la segunda capa conductora en la que se recibe la composición de reactivo y una tercera abertura que coincide con la tercera capa conductora en la que se recibe la segunda composición de reactivo, incluyendo la segunda capa intermedia un corte que reside sobre la primera, la segunda y la tercera abertura para definir el canal, e incluyendo la capa superior una abertura de ventilación en comunicación con el canal, en la que el canal está dimensionado para recibir no más de 2 microlitros de sangre completa de acuerdo con un aspecto de la presente invención.
- 40 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la muestra de sangre puede tener un volumen en el intervalo de 1,6 microlitros a 10 microlitros.
- 45 En otra realización, la primera cantidad de la primera composición de reactivo y la segunda cantidad de la segunda composición de reactivo son composiciones idénticas.
- 50 De acuerdo con otro ejemplo, se configura una tira sensora para mediciones de la hemoglobina en una muestra de sangre completa, e incluye una capa base que tiene al menos una primera capa conductora de la electricidad y una segunda capa conductora de la electricidad dispuestas sobre una superficie de la misma; incluyendo una primera
- 55
- 60
- 65

cantidad de una composición de reactivo al menos una cantidad eficaz de un mediador rédox sensible a la hemoglobina en contacto con la primera capa conductora de la electricidad para definir un electrodo de trabajo, y una segunda cantidad de una composición de reactivo en contacto con la segunda capa conductora de la electricidad para definir un electrodo de referencia; y un canal que proporciona comunicación entre la primera cantidad y la segunda cantidad de composición de reactivo; en la que la tira sensora devuelve una señal eléctrica medible indicativa del contenido de hemoglobina de una muestra de sangre que tiene un volumen en el intervalo de 1,6 microlitros a 10 microlitros en respuesta a una aplicación de tensión a través del electrodo de trabajo y el electrodo de referencia cuando la muestra de sangre está en contacto con la primera y la segunda cantidad de composición de reactivo dentro del canal.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se pueden emplear diversos métodos para determinar de manera fiable el contenido de hemoglobina en una pequeña muestra de sangre (inferior a 2 microlitros) usando una tira sensora de acuerdo con la presente invención. Los métodos pueden incluir voltametría de barrido lineal, amperometría, la combinación de amperometría y mediciones de impedancia como se detalla a continuación.

Un método de acuerdo con la presente invención para medir el contenido de hemoglobina de una muestra de sangre completa se define en la reivindicación 13.

El potencial inicial en una realización preferida puede ser de -0,5 voltios, el potencial final puede ser de 0,3 voltios, y cada etapa diferenciada puede ser de 0,1 voltios por segundo.

De acuerdo con la presente invención, se mide la impedancia de la muestra de sangre, y se usan conjuntamente los valores de corriente y los valores de impedancia para obtenerse el contenido de hemoglobina de la muestra de sangre. Usando los valores de impedancia y los valores de corriente, se puede medir el contenido de hemoglobina en un intervalo lineal extendido. El intervalo lineal extendido puede ser de al menos 0 g/dl a 23 g/dl de hemoglobina.

Ventajosamente, el volumen de la muestra de sangre puede ser tan bajo como 1,6 µl. Sin embargo, un sensor de acuerdo con la presente invención puede funcionar con precisión para muestras de sangre de hasta 10 µl.

También se devela un método para medir el contenido de hematocrito de una muestra de sangre completa que incluye medir el contenido de hemoglobina de la muestra de sangre completa usando una tira sensora que incluye una capa base que tiene al menos una primera capa conductora de la electricidad y una segunda capa conductora de la electricidad dispuestas sobre una superficie de la misma; incluyendo una primera cantidad de una composición de reactivo al menos una cantidad eficaz de un mediador rédox sensible a la hemoglobina en contacto con la primera capa conductora de la electricidad para definir un electrodo de trabajo y una segunda cantidad de una composición de reactivo en contacto con la segunda capa conductora de la electricidad para definir un electrodo de referencia; y un canal que proporciona comunicación entre la primera cantidad y la segunda cantidad de composición de reactivo; en la que la tira sensora devuelve una señal eléctrica medible indicativa del contenido de hemoglobina de una muestra de sangre en respuesta a una aplicación independiente de una tensión variable y una tensión constante a través del electrodo de trabajo y el electrodo de referencia cuando la muestra de sangre está en contacto con la primera y la segunda cantidad de composición de reactivo dentro del canal; determinar el contenido de hematocrito basado en el contenido de hemoglobina medido usando una relación lineal de forma:

$$\text{Hct} = a\text{Hb} + b$$

en la que Hct representa el contenido de hematocrito, Hb es el contenido de hemoglobina, y a y b son constantes.

En un ejemplo, la relación lineal se puede determinar midiendo el contenido de hematocrito de la sangre completa usando otro método; y correlacionando los resultados de la primera etapa de medición con la segunda etapa de medición, obteniéndose la relación lineal indicativa del contenido de hematocrito en la sangre completa.

De acuerdo con otro aspecto, se configura una tira sensora para mediciones de hemoglobina en una muestra de sangre completa, e incluye una capa base; al menos una primera capa conductora de la electricidad, una segunda capa conductora de la electricidad y una tercera capa conductora de la electricidad sobre la capa base; una primera cantidad de una primera composición de reactivo que incluye al menos una cantidad eficaz de un mediador rédox sensible a la hemoglobina en contacto con la primera capa conductora de la electricidad para definir un electrodo de trabajo, y una segunda cantidad de una segunda composición de reactivo en contacto con la segunda capa conductora de la electricidad para definir un electrodo de referencia; una tercera composición de reactivo en contacto con la tercera capa conductora para definir un electrodo en blanco, incluyendo la tercera composición de reactivo un mediador rédox no sensible a la hemoglobina; y un canal que proporciona comunicación entre la primera cantidad y la segunda cantidad de la composición de reactivo; en la que la tira sensora devuelve una señal eléctrica medible indicativa del contenido de hemoglobina de una muestra de sangre en respuesta a la aplicación de una tensión a través del electrodo de trabajo y del electrodo de referencia cuando la muestra de sangre está en contacto con la primera y la segunda cantidad de composición de reactivo dentro del canal, en la que la señal eléctrica medible no se ve influenciada por la presencia de una cantidad inferior a la cantidad máxima de una especie oxidable interferente, pudiéndose determinar la cantidad máxima empíricamente mediante la adición, a una muestra

de sangre completa, de diferentes cantidades de la especie oxidable interferente, midiéndose la corriente del electrodo en blanco y del electrodo de trabajo tras la aplicación de una tensión para cada cantidad de especie oxidable añadida, determinándose una señal de corriente corregida tras cada medición de la corriente del electrodo en blanco y del electrodo de trabajo basándose en una relación que tenga la forma:

$$I = I_2 - kI_1$$

en la que I es la señal corregida proporcional al contenido de hemoglobina de la muestra, I₁ es el valor de la corriente en el electrodo en blanco, I₂ es la corriente en el electrodo de trabajo y k es una constante; y comparar cada señal corregida determinada con un valor de referencia respectivo para determinar si la especie oxidable interferente añadida ha influido en la señal eléctrica medible.

La presente solicitud desvela además un método de medición de la hemoglobina en una muestra de sangre completa, usando una tira sensora que incluye una capa base; al menos una primera capa conductora de la electricidad, una segunda capa conductora de la electricidad y una tercera capa conductora de la electricidad en la capa base; una primera cantidad de una composición de reactivo que incluye al menos una cantidad eficaz de un mediador rédox sensible a la hemoglobina en contacto con la primera capa conductora de la electricidad para definir un electrodo de trabajo y una segunda cantidad de una segunda composición de reactivo en contacto con la segunda capa conductora de la electricidad para definir un electrodo de referencia; una tercera composición de reactivo en contacto con la tercera capa conductora para definir un electrodo en blanco, incluyendo la tercera composición de reactivo un mediador rédox no sensible a la hemoglobina; y un canal que proporciona comunicación entre la primera cantidad y la segunda cantidad de la composición de reactivo; en el que la tira del detección devuelve una señal eléctrica medible indicativa del contenido de hemoglobina de una muestra de sangre en respuesta a la aplicación de una tensión en el electrodo de trabajo y al electrodo de referencia cuando la muestra de sangre está en contacto con la primera y segunda cantidad de composición de reactivo dentro del canal, incluyendo el método aplicar una primera tensión a través del electrodo en blanco y del electrodo de referencia durante un primer período de tiempo; aplicar una segunda tensión a través del electrodo de trabajo y el electrodo de referencia durante un segundo período de tiempo; y, tras un retardo de circuito abierto durante un tercer período de tiempo, aplicar voltametría de barrido lineal a través de los electrodos de trabajo y de referencia en incrementos de tensión desde un valor de tensión inicial hasta un valor de tensión final a una velocidad predeterminada para determinar los valores de corriente eléctrica en los incrementos de tensión; y determinar el contenido de hemoglobina a partir del valor de la corriente máximo obtenido de la aplicación de la voltametría de barrido lineal.

En un ejemplo, la primera tensión puede ser de 0,7 voltios, el primer período de tiempo puede ser de cinco segundos, la segunda tensión puede ser de 1,0 voltios, el segundo período de tiempo puede ser de 10 segundos, el tercer período de tiempo puede ser 17 segundos de circuito abierto seguido de un barrido de potencial lineal, el valor de tensión inicial puede ser de -0,5 voltios, el valor de tensión final puede ser de 0,3 voltios y la velocidad predeterminada puede ser de 0,1 V/s

La presente solicitud también desvela un método de medición de la hemoglobina en una muestra de sangre completa, usando una tira sensora que incluye una capa base; al menos una primera capa conductora de la electricidad, una segunda capa conductora de la electricidad y una tercera capa conductora de la electricidad en la capa base; una primera cantidad de una composición de reactivo que incluye al menos una cantidad eficaz de un mediador rédox sensible a la hemoglobina en contacto con la primera capa conductora de la electricidad para definir un electrodo de trabajo y una segunda cantidad de una segunda composición de reactivo en contacto con la segunda capa conductora de la electricidad para definir un electrodo de referencia; una tercera composición de reactivo en contacto con la tercera capa conductora para definir un electrodo en blanco, incluyendo la tercera composición de reactivo un mediador rédox no sensible a la hemoglobina; y un canal que proporciona comunicación entre la primera cantidad y la segunda cantidad de la composición de reactivo; en el que la tira del detección devuelve una señal eléctrica medible indicativa del contenido de hemoglobina de una muestra de sangre en respuesta a la aplicación de una tensión a través del electrodo de trabajo y del electrodo de referencia cuando la muestra de sangre está en contacto con la primera y segunda cantidad de composición de reactivo dentro del canal, incluyendo el método aplicar una primera tensión a través del electrodo en blanco y del electrodo de referencia durante un primer período de tiempo; aplicar una segunda tensión a través del electrodo de trabajo y del electrodo de referencia durante un segundo período de tiempo; y, tras un retardo de circuito abierto durante un tercer período de tiempo, aplicar una tensión constante mientras se mide el aumento en la corriente durante el tiempo entre los electrodos de trabajo y en blanco para determinar el contenido de hemoglobina.

En un ejemplo, la primera tensión puede ser de 0,7 voltios, el primer período de tiempo puede ser de cinco segundos, la segunda tensión puede ser de 1,0 voltios, el segundo período de tiempo puede ser de 10 segundos, y el tercer período de tiempo puede ser 17 segundos mientras el circuito está abierto.

En la primera realización de la presente invención (Figuras 1 y 2), el sensor de la presente invención usa una construcción laminada de 4 capas, similar al sensor de glucosa, que se ha desvelado en las patentes de EE.UU. n.º 6.767.441; 6.287.451; 6.837.976, y las solicitudes de patente de EE.UU. n.º 20060278537; 20070131549.

Una configuración práctica de un sensor de acuerdo con la presente invención puede tener un cuerpo alargado, laminado, que tiene un canal de fluido de muestra conectado entre una abertura en un extremo del cuerpo laminado y un orificio de ventilación separado de la abertura. Dentro del canal de fluido se encuentran al menos un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia (o un contraelectrodo) en cualquier orden. El electrodo de trabajo y el electrodo de referencia están en contacto eléctrico con las respectivas trayectorias conductoras. Las trayectorias conductoras separadas terminan y están expuestas para crear una conexión eléctrica con un dispositivo de lectura opuesto al extremo del canal abierto del cuerpo laminado.

El cuerpo laminado puede tener una capa aislante base hecha de un material plástico, como policarbonato, acrílicos, poliésteres, siliconas, poliuretanos y similares. Se pueden delimitar al menos dos trayectorias conductoras en la capa aislante base. Las trayectorias conductoras pueden depositarse sobre la capa aislante mediante serigrafía, deposición por vapor o mediante cualquier método que proporcione una capa conductora que se adhiera a la capa aislante base. Las trayectorias conductoras se pueden disponer individualmente sobre la capa aislante, o una capa conductora se puede disponer sobre la capa aislante seguida del grabado/trazado del número requerido de trayectorias conductoras. El proceso de grabado se puede realizar mediante líneas de trazado mecánico y químico en la capa conductora, usando un láser para trazar la capa conductora en trayectorias conductoras separadas, o mediante cualquier otro método adecuado que cause una ruptura entre las trayectorias conductoras separadas requeridas por la presente invención. Los recubrimientos conductores o las capas conductoras que pueden usarse son recubrimientos de níquel, oro, óxido de estaño/oro, paladio, otros metales nobles o sus óxidos, o composiciones de películas de carbono. Los recubrimientos conductores preferidos son una película de oro o una composición de película de óxido de estaño/oro.

El cuerpo laminado puede tener una primera capa aislante intermedia, también denominada capa de retención de reactivo/de definición del área del electrodo, encima de la capa aislante base y las trayectorias conductoras. La primera capa intermedia, o capa de retención de reactivo, incluye al menos dos aberturas, una para recibir un electrodo de trabajo y la otra para recibir un electrodo de referencia. Cada abertura corresponde a y expone una pequeña porción de la superficie de un electrodo. Preferentemente, las dos aberturas de la capa intermedia tienen la misma forma y dimensiones, pero tienen formas y/o dimensiones diferentes sin desviarse del alcance de la presente invención. La colocación de todas las aberturas se realiza de modo que se ubicarán dentro del canal de fluido de muestra descrito anteriormente. La primera capa aislante intermedia también está hecha de un material dieléctrico aislante, preferentemente de plástico, y se puede fabricar troquelando el material mecánicamente, o con un láser, y luego sujetando el material a la capa base. Se puede usar un adhesivo, tal como un adhesivo sensible a la presión, para fijar la primera capa aislante intermedia a la capa base. La adhesión también se puede lograr mediante la unión ultrasónica de la primera capa intermedia a la capa base. La primera capa aislante intermedia también se puede fabricar mediante la serigrafía de un material aislante o uniendo un fotopolímero sobre la capa base.

El cuerpo laminado puede tener también una segunda capa aislante intermedia, denominada capa formadora del canal, encima de la primera capa intermedia. La segunda capa intermedia, o capa formadora del canal, también está hecha de un material aislante de plástico y crea el canal de fluido de muestra del cuerpo laminado. Contiene un recorte en forma de U en un extremo que cubre las aberturas en la primera capa intermedia con el extremo abierto correspondiente al extremo abierto del cuerpo laminado descrito anteriormente. Se puede usar una cinta adhesiva sensible a la presión con doble recubrimiento como la segunda capa intermedia.

El cuerpo laminado también puede tener una capa superior con una abertura de ventilación y, preferentemente, una muesca de entrada. Esta capa está hecha de un plástico tal como un policarbonato, un acrílico, un poliéster, una silicona, un poliuretano. La abertura de ventilación está ubicada de manera que al menos una parte de la abertura de ventilación cubre la parte inferior del recorte en forma de U de la segunda capa aislante intermedia. La ventilación permite que el aire de dentro del canal del fluido de muestra se escape cuando el fluido de muestra entra por el extremo de entrada de la muestra del cuerpo laminado. La muesca se encuentra en el extremo de entrada de la muestra. En general, el fluido de muestra llena el canal de fluido de muestra por la acción capilar. La extensión de la acción capilar depende de la naturaleza hidrófoba/hidrófila de las superficies en contacto con el fluido que experimenta la acción capilar. Las fuerzas capilares se potencian usando un material aislante hidrófilo para formar la capa superior, o recubriendo al menos una parte de un lado de un material aislante hidrófobo con una sustancia hidrófila en la zona de la capa superior de enfrente del canal de fluido de muestra entre el extremo de entrada de la muestra del cuerpo laminado y la abertura de ventilación de la capa superior. Debe entenderse que se puede recubrir un lado entero de la capa superior con la sustancia hidrófila y luego unirse a la segunda capa intermedia.

Una abertura puede contener material de electrodo para el electrodo de trabajo (W) cargado con productos químicos sensibles a la hemoglobina y otros ingredientes, y una abertura para el electrodo de referencia (R). La disposición posicional del electrodo de trabajo y del electrodo de referencia en el canal es irrelevante para obtener resultados útiles del sensor electroquímico. Las posibles disposiciones de los electrodos dentro del canal del fluido de muestra pueden ser W-R o R-W, con la disposición mencionada como la disposición de los electrodos que aparecería desde el extremo de entrada de la muestra del cuerpo laminado hasta la abertura de ventilación. El electrodo de trabajo y el electrodo de referencia están en contacto eléctrico con trayectorias conductoras separadas, respectivamente. Las trayectorias conductoras separadas terminan y están expuestas para crear una conexión eléctrica con un dispositivo de lectura en el extremo opuesto al extremo de entrada de la muestra del cuerpo laminado.

- El electrodo de trabajo puede cargarse con una mezcla de al menos un compuesto capaz de reaccionar con hierro ferroso de hemoglobina y, opcionalmente, con uno o más de un tensioactivo, un aglutinante polimérico y un tampón. Preferentemente, el compuesto es un oxidante, más preferentemente, es un mediador rédox, cuya forma reducida es electroquímicamente activa y detectable. El mediador rédox se puede seleccionar de, pero sin limitación, diversos complejos metálicos y compuestos rédox orgánicos. Son ejemplos de mediadores rédox aceptables el ferricianuro de potasio, ferroceno y sus derivados, complejos organometálicos de cobalto, osmio, rodio, iridio y rutenio, promazina, tetratifulvaleno, azul de metilo, 1,4-benzoquinona, 1,4-bis(*N,N*-dimetilamino)benzeno, 4,4'-dihidrobifenilo. El mediador preferido en la presente invención es el ferricianuro de potasio. El electrodo de referencia puede cargarse con la misma mezcla que el electrodo de trabajo. Preferentemente, la abertura del electrodo de referencia está cargada con una forma oxidada de mediador rédox, tal como ferricianuro de potasio, junto con otros ingredientes. La abertura del electrodo de referencia también podría cargarse con una capa de Ag/AgCl (por ejemplo, aplicando tinta de Ag/AgCl o con una capa de pulverización catódica de plata o una capa de Ag/AgCl) u otros materiales de electrodos de referencia.
- 15 Cuando se aplica una muestra líquida al sensor, la muestra llena todo el canal y cubre tanto el electrodo de trabajo como el electrodo de referencia (o contraelectrodo). Las técnicas electroquímicas, que incluyen, pero sin limitación, la voltamperometría cíclica, la voltametría lineal, la potenciometría de corriente constante, la amperometría de potencial constante, la voltametría de corriente alterna, la coulometría y la potenciometría, se usan para detectar las señales eléctricas generadas por el electrodo de trabajo. En la presente invención, se prefiere la voltametría de barrido lineal. Preferentemente, el barrido del potencial comienza a partir de un potencial relativamente negativo y termina en un potencial relativamente positivo. El potencial de inicio preferido es -1,0 V (en comparación con el electrodo de referencia, si no se indica lo contrario). Más preferentemente, el potencial de inicio es de -0,5 V. El potencial final preferido es de 1,2 V. Más preferentemente, el potencial final es de 0,3 V. La velocidad de barrido (el incremento de potencial por segundo) puede ser de 1 mV/s a 10 V/s. Preferentemente, la velocidad de barrido es de 10 mV/s a 500 mV/s; más preferentemente, es de 50 mV/s a 200 mV/s; aún más preferentemente, es de aproximadamente 100 mV/s. Por lo tanto, se requieren 8 s para finalizar el barrido de potencial desde el potencial de inicio de -0,5 V hasta el potencial final de 0,3 V. Se mide la señal de corriente a 0,2 V, que es proporcional a la concentración de hemoglobina de la muestra. La corriente se debe a la electrooxidación del ferrocianuro (forma reducida de ferricianuro) generada a partir de la reacción entre el ferricianuro y hierro ferroso de hemoglobina.
- 20 Se puede aplicar un potencial de tratamiento previo junto con un retardo de circuito abierto antes del barrido de potencial. El potencial de tratamiento previo se usa para oxidar el ferrocianuro resultante de la matriz química, por tanto, para reducir la corriente de fondo. El potencial de tratamiento previo preferido es de 0,2 V a 1,2 V, más preferentemente; es de 0,5 V a 1,0 V; aún más preferentemente, es de aproximadamente 1,0 V. El tiempo preferido para el tratamiento previo es de 1 s a 120 s, más preferentemente, es de 5 s a 30 s; aún más preferentemente, es de aproximadamente 10 s. El retardo de circuito abierto permite la reacción entre el ferricianuro y el hierro ferroso de la hemoglobina. El tiempo preferido para el retardo es de 1 s a 180 s, más preferentemente, de 10 s a 60 s; aún más preferentemente, es de aproximadamente 17 s.
- 30 La impedancia entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia se puede medir al principio, a la mitad o al final de la aplicación del potencial de tratamiento previo. Es bien sabido que la impedancia está relacionada con el hematocrito o la hemoglobina de una muestra de sangre, es decir, a mayor concentración de hemoglobina, mayor impedancia o viceversa. Como se demuestra a continuación, un sensor de acuerdo con la presente invención permite una medición exacta de la impedancia entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia. La impedancia se puede usar para corregir la medición de la corriente a fin de medir el contenido de hemoglobina con mayor precisión.
- 35 A continuación, se desvela una configuración práctica de una segunda realización de la presente invención que incluye una estructura y un procedimiento de ensayo similares a los de la primera realización, pero que tiene un electrodo de trabajo (W2), un electrodo de referencia (R) y un electrodo en blanco (W1). El electrodo de trabajo y el electrodo en blanco pueden compartir el mismo electrodo de referencia cuando se aplica el potencial. Un diseño de acuerdo con la presente invención también permite la carga de diferentes mezclas de reactivos y la aplicación de diferentes técnicas electroquímicas en los electrodos de trabajo y en blanco, según se desee. El electrodo de trabajo se carga con un material sensible a la hemoglobina (por ejemplo, ferricianuro de potasio) y otros ingredientes; el electrodo en blanco se carga con un reactivo optimizado para responder a los interferentes oxidables. Se pueden usar varias técnicas electroquímicas, que incluyen, pero sin limitación, voltamperometría cíclica, voltametría de barrido lineal, potenciometría de corriente constante, amperometría de potencial constante, voltametría de corriente alterna, coulometría y potenciometría para detectar los interferentes oxidables en el electrodo en blanco. El electrodo en "blanco" funciona, por tanto, como un electrodo indicador de la interferencia. Dicho sistema de tres electrodos no solo posee la característica de la primera realización, sino también la capacidad de eliminar la interferencia de cualquier especie oxidable que coexista con la hemoglobina en muestras de sangre, tal como ácido ascórbico, paracetamol, ácido úrico, etc., restando las señales de fondo obtenidas en el electrodo en blanco (W1) de las señales de corriente obtenidas en el electrodo de trabajo (W2).
- 60 El electrodo de trabajo (W2) se carga con un material sensible a la hemoglobina (por ejemplo, ferricianuro potásico) y otros ingredientes, mientras que el electrodo en blanco (W1) se carga con una química similar a la del electrodo de
- 65

trabajo, pero sin la adición de un material sensible a la hemoglobina, de modo que el electrodo en "blanco" pueda funcionar como un electrodo indicativo de las interferencias. Se aplican un potencial y un tiempo apropiados, y una composición química adecuada al electrodo en blanco para que se pueda medir con precisión la concentración total de la especie oxidable. El potencial preferido es lo suficientemente alto como para oxidar los interferentes oxidables, tal como ácido ascórbico, paracetamol, ácido úrico, etc., pero sin oxidar los materiales del electrodo o los electrolitos. El potencial aplicado puede ser de aproximadamente 0,2 V a aproximadamente 1,2 V, más preferentemente de aproximadamente 0,4 V a aproximadamente 1,0 V, aún más preferentemente de aproximadamente 0,7 V. El tiempo preferido para la aplicación del potencial es de aproximadamente 1 s a aproximadamente 30 s, más preferentemente, de aproximadamente 2 s a aproximadamente 10 s, aún más preferentemente de aproximadamente 5 s. Cabe mencionar que la señal de corriente representa la concentración total de las especies oxidables en la muestra y, por lo tanto, el electrodo en blanco funciona como un sensor indicativo de interferencias. Al investigar el efecto de la concentración de la especie oxidable en la señal de corriente en el electrodo de trabajo (W2), se puede obtener una señal de corriente precisa, proporcional a la concentración de hemoglobina. Debe señalarse que dicha corrección puede que no sea simplemente una resta o una adición entre las señales de corriente en W1 y W2, porque: 1) se pueden aplicar diferentes técnicas electroquímicas a W1 (por ejemplo, amperometría) y a W2 (por ejemplo, barrido de potencial lineal); 2) los puntos de tiempo para medir las señales de corriente en W1 y W2 pueden ser diferentes; 3) los productos químicos cargados en W1 y W2 pueden ser diferentes.

El electrodo de trabajo se carga con un material sensible a la hemoglobina (por ejemplo, ferricianuro potásico) y otros ingredientes, mientras que el electrodo en blanco se carga con al menos un compuesto capaz de reaccionar con las especies oxidables en la muestra, de manera que el electrodo en "blanco" también puede funcionar como un electrodo indicativo de interferencias. El diseño único de la presente invención permite cargar diferentes composiciones de reactivo en los electrodos de trabajo y en blanco, según se desee. La composición de reactivo cargada en el electrodo en blanco se puede optimizar para medir las especies oxidables distintas del hierro ferroso de la hemoglobina. Los compuestos pueden seleccionarse de, pero sin limitación, diversos complejos metálicos y compuestos rédox orgánicos. Son ejemplos de mediadores rédox aceptables el ferricianuro de potasio, ferroceno y sus derivados, complejos organometálicos de cobalto, osmio, rodio, iridio y rutenio, promazina, tetratifulvaleno, azul de metilo, 1,4-benzoquinona, 1,4-bis(*N,N*-dimetilamino)benzeno, 4,4'-dihidrobifenilo. El mediador preferido en la presente invención es el ferricianuro de potasio. El pH preferido es de aproximadamente 7. La técnica electroquímica preferida usada para el electrodo en blanco es la amperometría. Se aplican un potencial y un tiempo adecuados al electrodo en blanco para poderse medir la concentración total de especies oxidables amperométricamente. El potencial preferido puede ser de aproximadamente 0,2 V a aproximadamente 1,2 V, más preferentemente de aproximadamente 0,3 V a aproximadamente 0,7 V, aún más preferentemente de aproximadamente 0,4 V. El tiempo preferido para la aplicación del potencial es de aproximadamente 1 s a aproximadamente 30 s, más preferentemente, de 2 s a 10 s, aún más preferentemente de aproximadamente 5 s. Dicho sistema de tres electrodos no solo posee la característica de la primera realización, sino también la capacidad de eliminar la interferencia de cualquier especie oxidable en la muestra al corregir las señales de corriente en el electrodo de trabajo.

El funcionamiento del electrodo en blanco puede llevarse a cabo antes o después del funcionamiento del electrodo de trabajo, o al mismo tiempo que el electrodo de trabajo. Un diseño de acuerdo con la presente invención también permite la aplicación de diferentes técnicas de detección electroquímica en el electrodo en blanco sin interferir con el funcionamiento en el electrodo de trabajo.

La impedancia entre el electrodo de trabajo (o en blanco) y el electrodo de referencia se puede medir al principio, a la mitad o al final de la aplicación del potencial anterior. Un diseño de acuerdo con la presente invención permite la medición precisa de la impedancia entre el electrodo en blanco (W1) y el electrodo de referencia (R), así como entre el electrodo de trabajo (W2) y el electrodo de referencia (R). Los valores de impedancia resultantes se pueden usar para corregir la medición de corriente, obteniéndose una medición de hemoglobina más precisa.

Se pueden delimitar al menos tres trayectorias conductoras sobre la capa base aislante. La primera capa intermedia, o capa de retención de reactivo, contiene al menos tres aberturas para un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un electrodo en blanco.

Una abertura contiene material de electrodo para el electrodo de trabajo (W2) cargado con un mediador rédox y otros ingredientes; uno para el electrodo en blanco (W1) y otro para el electrodo de referencia (R). La disposición posicional del electrodo de trabajo, del electrodo de referencia y del electrodo en blanco en el canal es irrelevante para la obtención de resultados útiles del sensor electroquímico. Se encontró que la posición preferida era W1-R-W2; es decir, al entrar el fluido de muestra por el extremo abierto de entrada del cuerpo laminado, el fluido cubriría primero W1, luego R y luego W2.

El electrodo de trabajo y el electrodo en blanco pueden tener electrodos de referencia separados (R1 y R2), uno para el electrodo de trabajo y el otro para el electrodo en blanco, respectivamente. La disposición posicional de los electrodos de trabajo y de los electrodos de referencia en el canal es irrelevante para obtener resultados útiles del sensor electroquímico. Existen numerosas combinaciones para la disposición posicional. Por ejemplo, una posible disposición es W1-R1-W2-R2; es decir, a medida que el fluido de muestra entra por el extremo abierto de entrada

del cuerpo laminado, el fluido cubrirá primero W1, luego R1, luego W2 y luego R2.

Un sensor de acuerdo con la presente invención puede idearse sin la primera capa intermedia; es decir, las otras tres capas son las mismas que en la primera realización. Los detalles de dicho diseño de 3 capas se han desvelado en la patente de EE.UU. n.º 6.258.229; 6.942.770. El recorte del canal en forma de U se encuentra en el extremo del sensor (extremo de entrada de la muestra). La longitud, el espesor y el ancho del recorte del canal en forma de U definen el tamaño o el volumen del canal capilar. La longitud y el ancho del recorte del canal en forma de U, junto con la capa base conductora, definen las áreas de los electrodos de trabajo y de referencia.

El electrodo de trabajo (W) se carga con al menos un compuesto sensible a la hemoglobina, y con uno o más de un aglutinante polimérico, opcionalmente uno o más de un tensioactivo y uno o más de un tampón. El electrodo de referencia (R) puede recubrirse con la misma mezcla de reactivos que el electrodo de trabajo. En lugar de la mezcla de reactivos, el electrodo de referencia también podría cubrirse con un material de referencia, usado habitualmente en el campo, tal como Ag/AgCl. Esto se puede lograr mediante la aplicación de tinta de Ag/AgCl o con una capa de pulverización catódica de plata o una capa de Ag/AgCl.

Un sensor de acuerdo con la presente invención puede tener dos canales (Canal 1 y Canal 2) en la misma tira, dispuestos uno al lado del otro o de espaldas. Al menos un canal sirve como sensor de la hemoglobina que tiene una estructura similar a las mencionadas en las realizaciones anteriores; al menos un canal sirve como el otro sensor, por ejemplo, un sensor indicativo de interferencias. Los extremos de entrada de la muestra, o las entradas de muestreo de los dos canales, están cerca uno del otro; o los dos canales simplemente comparten la misma entrada de muestreo. En cualquier caso, los dos canales pueden usar la misma gota de muestra de sangre. Se puede encontrar un ejemplo de una construcción de dos canales en la patente de EE.UU. n.º 7.955.484.

El número de trayectorias conductoras de base sobre la capa base aislante debe coincidir con el número total de los electrodos del Canal 1 y del Canal 2. Hay dos filas de aberturas en la segunda capa intermedia, una usada para el Canal 1 y la otra usada para el Canal 2. Por consiguiente, la segunda capa intermedia tiene dos cortes en forma de U, uno usado para el Canal 1 y el otro usado para el Canal 2. El cuerpo laminado también tiene una capa superior con una abertura de ventilación para cada canal. Los dos canales también pueden compartir una abertura de ventilación mayor. Preferentemente, cada uno tiene una muesca de entrada en el extremo de entrada de muestras. Lo más preferentemente, los dos canales comparten la misma muesca de entrada, de modo que los dos canales pueden usar la misma gota de muestra de sangre.

El Canal 1 puede tener al menos un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia. Al menos uno de los electrodos de trabajo está cargado con un material sensible a la hemoglobina y otros ingredientes. El Canal 1 puede funcionar independientemente como un sensor de hemoglobina.

El Canal 2 puede tener al menos un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia. Al menos uno de los electrodos de trabajo es sensible a las especies oxidables que coexisten con la hemoglobina en las muestras de sangre. El Canal 2 puede funcionar independientemente como un sensor para las especies oxidables (interferencias).

Todas las ventajas de la presente invención se harán más evidentes tras la revisión de la descripción detallada, de los dibujos y de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una vista en perspectiva de una tira reactiva de acuerdo con la primera realización (configuración de dos electrodos) de la presente invención.

La FIG. 2 es una vista en despiece de la primera realización (configuración de dos electrodos) que muestra las cuatro capas componentes de la tira reactiva.

La FIG. 3 es una vista en perspectiva de una tira reactiva de acuerdo con la segunda realización (configuración de tres electrodos) de la presente invención.

La FIG. 4 es una vista en despiece de la segunda realización (configuración de tres electrodos) que muestra las cuatro capas componentes de la tira reactiva.

La FIG. 5 muestra voltamogramas de barrido lineal de muestras de sangre usando las tiras de acuerdo con la presente invención.

La FIG. 6 muestra las curvas amperométricas $i-t$ de las muestras de sangre usando las tiras de acuerdo con la presente invención.

La FIG. 7 muestra la dependencia de la señal de corriente obtenida con la voltimetría de barrido lineal en la concentración de hemoglobina.

La FIG. 8 muestra la dependencia de la impedancia en la concentración de hemoglobina.

La FIG. 9 muestra los resultados combinados de Hb (aHb (i) + bHb (Imp)) frente al valor de referencia (HemoCue), que indica el intervalo lineal extendido de las tiras de acuerdo con la presente invención.

La FIG. 10 ilustra la capacidad de las tiras de acuerdo con la presente invención para proporcionar mediciones fiables del contenido de hemoglobina en una pequeña muestra de sangre completa (de menos de 2 microlitros).

La FIG. 11 muestra la determinación de la hemoglobina usando los sensores de hemoglobina de acuerdo con la presente invención para variar la hemoglobina en las muestras de sangre.

La FIG. 12 muestra la medición del hematocrito usando las tiras de acuerdo con la presente invención.

Descripción detallada de las realizaciones de la invención

Las realizaciones de la presente invención mencionadas anteriormente se ilustran en las FIG. 1-12.

Las FIG. 1 y 2 muestran una tira de acuerdo con la primera realización de la presente invención (configuración de dos electrodos). Las FIG. 3 y 4 muestran una tira de acuerdo con la segunda realización de la presente invención (configuración de tres electrodos). Como se entenderá a partir de la siguiente divulgación, una tira de acuerdo con la primera realización de la presente invención incluye un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia, mientras que la segunda realización incluye un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un electrodo en blanco. Aunque se puede crear un sensor de hemoglobina basado en la configuración de dos electrodos (primera realización) de acuerdo con los principios desvelados en el presente documento, a continuación, se describirá en detalle la configuración de tres electrodos (segunda realización), que posee más características. Las características de la segunda realización, que emplea el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, pueden aplicarse igualmente para crear una tira de acuerdo con la primera realización de la presente invención.

A menos que se indique lo contrario, en las figuras, todos los números similares identifican características similares. Además, "aproximadamente" o "alrededor de", como se usan en el presente documento, pretenden significar dentro de un grado de error científicamente aceptable.

Con referencia a la FIG. 3, el sensor 10 tiene un cuerpo laminado 12, un extremo 14 de muestreo de fluido, un extremo 16 de contacto eléctrico y una abertura de ventilación 52. El sensor 10 también puede incluir una muesca de entrada opcional 54. El extremo 14 de muestreo de fluido incluye una cámara 17 de muestras entre una la entrada 18 del extremo de muestreo y la abertura de ventilación 52. El extremo 16 del contacto eléctrico tiene tres contactos conductores diferenciados 16a, 16b y 16c.

Haciendo ahora referencia a la FIG. 4, el cuerpo laminado 12 se compone de una capa base 20, una capa de retención de reactivo, una capa formadora de canal y una cubierta. Todas las capas del cuerpo laminado 12 son de un material dieléctrico, preferentemente de plástico. Los ejemplos de un material dieléctrico preferido son cloruro de polivinilo, policarbonato, polisulfona, nailon, poliuretano, nitrato de celulosa, propionato de celulosa, acetato de celulosa, acetato butirato de celulosa, poliéster, poliimida, polipropileno, polietileno y poliestireno.

La capa base 20 tiene una capa conductora 21 sobre la que se definen tres trayectorias conductoras espaciadas. Las trayectorias conductoras pueden formarse trazando o marcando la capa conductora 21, o serigrafando las trayectorias conductoras en la capa base 20. El trazado o marcado de la capa conductora 21 se puede realizar trazando mecánicamente la capa conductora 21 lo suficiente para crear al menos tres trayectorias conductoras aisladas galvánicamente y separadas. El método preferido de trazado o marcado de la presente invención es el uso de un láser de dióxido de carbono, un láser YAG o un láser de excímero. La capa conductora 21 puede ser de cualquier material eléctricamente conductor tal como, por ejemplo, de oro, paladio, otros metales nobles o sus óxidos, o composiciones de película de carbono. El material eléctricamente conductor preferido es el oro u otros metales nobles. Un material que se puede usar para la capa inferior 20 es una película de poliéster dorada (n.º de cat. FM-2) comercializada por Courtaulds Performance Films, Canoga Park, California. La película de poliéster dorada se usó en la construcción de tiras que se probaron como se describe detalladamente a continuación.

La capa de retención de reactivo tiene una primera abertura 32 de electrodo que expone una parte de la primera trayectoria conductora, una segunda abertura 34 de electrodo que expone una parte de la segunda trayectoria conductora y una tercera abertura 36 de electrodo que expone una parte de la tercera trayectoria conductora. La capa de retención de reactivo es de un material de plástico, preferentemente una cinta adhesiva de una sola cara de calidad médica disponible en Adhesive Research, Inc., de Glen Rock, Pa. Los espesores aceptables de la cinta para su uso en la presente invención están en el intervalo de aproximadamente 0,025 mm (0,001 in) a aproximadamente 0,25 mm (0,01 in). Se prefiere una cinta de este tipo, ARcareÖ 7815 (aproximadamente 0,075 mm (0,003 in)),

debido a su facilidad de manejo y a su capacidad para potenciar la acción capilar a través de la cámara de muestras del sensor. Se ha de entender que no se requiere el uso de una cinta. La capa de retención de reactivo puede ser de una lámina de plástico y puede estar recubierta con un adhesivo sensible a la presión, un fotopolímero, unido por ultrasonidos a la capa base 20 o serigrafado sobre la capa base 20 para lograr los mismos resultados que usando la cinta de poliéster mencionada.

Las aberturas 32, 34 y 36 de los electrodos definen los pocillos de los electrodos W1, R y W2, respectivamente, y retienen los reactivos químicos que forman un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un electrodo en blanco. En general, el pocillo del electrodo W2 se carga con una matriz de reactivo sensible a la hemoglobina que contiene al menos un mediador rédox, un aglutinante polimérico, un tampón y, opcionalmente, un tensioactivo. El pocillo del electrodo W1 se carga con un compuesto químico similar al de W2, sin añadir el material sensible a la hemoglobina. Se carga una matriz de referencia en el pocillo del electrodo R, que puede ser igual a la matriz para W1 o W2.

Por lo general, la matriz de referencia contiene al menos un reactivo/una pareja rédox o un mediador rédox, tal como una forma reducida de un mediador rédox, una forma oxidada de un mediador rédox o una mezcla de una forma reducida y oxidada de un mediador rédox. Si R no se carga con un reactivo/pareja o mediador rédox, los electrodos de trabajo W2 y el electrodo en blanco W1 no funcionarán correctamente. Como alternativa, el electrodo de referencia (pocillo del electrodo R) se puede cargar con una capa de Ag/AgCl (por ejemplo, aplicando tinta de Ag/AgCl o mediante recubrimiento por pulverización catódica de (a) una capa de Ag seguida de la cloración de la Ag; o (b) una capa de Ag/AgCl) u otros materiales de electrodos de referencia que no requieren un mediador rédox adicional para funcionar correctamente. Ag/AgCl es un tipo de pareja rédox, pero no es hidrosoluble. Por lo tanto, si un electrodo de referencia contiene Ag/AgCl, puede que no sea necesario un mediador rédox adicional.

La forma preferida de las aberturas 32, 34, 36 de retención de reactivo es redonda y tiene un diámetro de aproximadamente 0,51 a 1,02 cm (0,02 a 0,04 in). Las tres aberturas 32, 34 y 36 de retención de reactivo/electrodo son adyacentes entre sí y están espaciadas preferentemente de aproximadamente 0,13 mm a 2,54 mm (0,005 in a 0,1 in), preferentemente, aproximadamente 1,14 mm (0,045 in) entre sí. Las aberturas circulares de retención de reactivo son solo para fines ilustrativos. Se ha de entender que la forma y el tamaño de las aberturas de retención de reactivo, así como la distancia entre las aberturas de retención de reactivo, son irrelevantes, siempre que el tamaño de las aberturas sea lo suficientemente grande para facilitar la dispensación de reactivos químicos, pero lo suficientemente pequeño para permitir una canal de muestra razonablemente pequeño.

La disposición posicional del electrodo de trabajo, electrodo en blanco y electrodo de referencia en la cámara de muestra es irrelevante para la obtención de resultados útiles del sensor de la hemoglobina. Las posibles disposiciones de los electrodos dentro de la cámara de muestra pueden ser W1-B-W2, W1-R-W2, R-W1-W2, R-W2-W1, W2-R-W1 o W2-W1-R, apareciendo la disposición mencionada como la disposición de los electrodos desde la entrada 18 de la muestra del cuerpo laminado 12 hasta la abertura de ventilación 52. En la realización preferida, se encontró que la posición relativa era W1-R-W2. Es decir, cuando la muestra de fluido entra en el extremo de muestreo 14 del cuerpo laminado 12, la muestra de fluido cubrirá primero W1, luego R y luego W2.

El electrodo de trabajo, el electrodo en blanco y el electrodo de referencia están en contacto galvánico directo con las trayectorias conductoras separadas. Las trayectorias conductoras separadas terminan y se exponen para crear una conexión eléctrica con un dispositivo de lectura en el extremo opuesto a la entrada 18 de muestra del cuerpo laminado 12.

La capa de formación de canales tiene un recorte 42 en forma de U situado en el extremo 14 de muestreo de fluido. La longitud del corte 42 es tal que cuando la capa de formación de canales se lamina en la capa de soporte de reactivo, las áreas de los electrodos W1, R y W2 están dentro del espacio definido por el recorte 42. La longitud, la anchura y el espesor del recorte 42 en forma de U definen el volumen de la cámara capilar. El espesor de la capa de formación de canales puede afectar a la velocidad del flujo del fluido de muestra hacia la cámara de muestra, que se llena por la acción capilar del fluido de muestra. En la realización preferida, la capa de formación de canales puede ser de un material de plástico, una cinta adhesiva sensible a la presión de doble cara de calidad médica disponible en Adhesive Research, Inc., de Glen Rock, Pa. Los espesores aceptables de la cinta para su uso en la presente invención están en el intervalo de aproximadamente 0,025 mm (0,001 in) a aproximadamente 0,25 mm (0,010 in). Una de dichas cintas es ARcare[®] 7840 (aproximadamente 0,089 mm (0,0035 in)). El recorte 42 en forma de U se puede realizar con un láser o mediante troquelado. El método preferido es troquelar el corte. El tamaño preferido del recorte en forma de U es de aproximadamente 5,46 mm (0,215 in) de longitud, aproximadamente 1,27 mm (0,050 in) de anchura y aproximadamente 0,216 mm (0,0085 in) de espesor. Por lo tanto, el volumen del canal en la realización preferida es de aproximadamente 1,6 µl.

La cubierta, que se lamina en la capa formadora de canales, incluye una abertura de ventilación 52 espaciada del extremo 14 de muestreo de fluido del sensor 10 de hemoglobina para asegurar que la muestra de la cámara 17 de muestras cubra completamente las áreas del electrodo W1, R y W2. La abertura de ventilación 52 está colocada en la cubierta de modo que está algo alineada con el recorte 42 en forma de U. Preferentemente, la abertura de ventilación 52 expondrá una parte de y se superpondrá parcialmente en la parte inferior del recorte 42 en forma de

U. La forma preferida de la abertura de ventilación 52 es un rectángulo con dimensiones de aproximadamente 2 mm (0,08 in) por aproximadamente 0,9 mm (0,035 in). El material para la cubierta puede ser una película de poliéster. Para facilitar la acción capilar, es deseable que la película de poliéster tenga una superficie altamente hidrófila que mire hacia la cámara capilar. Las películas de transparencia (n.º de cat. PP2200 o PP2500) de 3M son el material usado como cubierta en la presente invención. La cubierta puede incluir opcionalmente una muesca de entrada 54.

Se ha de entender que las trayectorias de los conductos de cualquiera de las realizaciones desveladas en el presente documento podrían realizarse con cualquier metal no corrosivo. También se pueden usar depósitos de carbono tales como pasta de carbono o tinta de carbono, como trayectorias de los conductos, todos bien conocidos por los expertos en la materia.

Mediadores rédox

Aunque una gran cantidad de oxidantes puede oxidar el hierro ferroso de la hemoglobina, se prefiere una forma oxidada del mediador rédox, pues la forma reducida resultante del mediador rédox se puede medir electroquímicamente. Los mediadores rédox pueden incluirse en el electrodo de trabajo W2 y, si se incluyen, se prefiere una forma oxidada de los mediadores rédox, tal como el ferricianuro de potasio. Es deseable que el mediador sea estable en la matriz. Todavía es deseable que el mediador pueda mantener un potencial deseado para el electrodo de trabajo de hemoglobina. El mediador puede seleccionarse de, pero sin limitación, diversos complejos metálicos y compuestos rédox orgánicos, tales como ferricianuro de potasio, ferroceno y sus derivados, complejos organometálicos de cobalto, osmio, rodio, iridio y rutenio, promazina, tetratrafalvaleno, azul de metilo, 1,4-benzoquinona, 1,4-bis(*N,N*-dimetilamino)benzeno y 4,4'-dihidrobifenilo. El mediador preferido es un mediador rédox oxidado, por ejemplo, ferricianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$).

En la realización preferida, la concentración de ferricianuro potásico en la mezcla de reactivos es preferentemente del 0,1 % (p/p) a 20 %. Más preferentemente, la concentración de ferricianuro de potasio es del aproximadamente 10 %. Si la concentración es inferior al 0,1 %, el sensor de la presente invención puede no dar una señal detectable ni reproducible. Si la concentración es superior al 20 %, el sensor de la presente invención puede no dar resultados reproducibles. Cabe señalar que se puede aplicar una capa de plata o de Ag/AgCl u otros materiales de electrodo de referencia a la abertura del electrodo de referencia, que no requieran el uso de un medio rédox adicional tal como los enumerados anteriormente.

Aglutinantes poliméricos

Se usan polímeros como aglutinantes para unir los ingredientes en las superficies de los electrodos. También sirven como blindajes para proteger los compuestos activos (por ejemplo, el mediador rédox) de la humedad. Los polímeros deben ser suficientemente hidrosolubles, y también deben ser capaces de estabilizar y unir todos los demás productos químicos en los reactivos en las áreas de los electrodos a la capa superficial conductora. Preferentemente, se pueden añadir al menos dos polímeros a la mezcla de reactivos usada en una tira de acuerdo con la presente invención. Uno de los polímeros preferidos es el óxido de polietileno (PEO). Su peso molecular varía de miles a millones. Preferentemente, el peso molecular es superior a 1 millón. Más preferentemente, el peso molecular es de aproximadamente 4 millones. Dicho producto está disponible en Scientific Polymer Products, NY, EE. UU. (PM: 4.000.000, n.º de cat. 344). La concentración de PEO en la mezcla de reactivos es preferentemente del 0,04 % (p/p) al 2 %. Más preferentemente, la concentración de PEO es del aproximadamente 0,6 %. Si la concentración es inferior al 0,04 %, el efecto de unión puede no ser lo suficientemente fuerte como para unir el reactivo a la superficie del electrodo. Como resultado de ello, el sensor de la presente invención puede no dar resultados precisos ni reproducibles. Si la concentración es superior al 2 %, la mezcla de reactivos sería demasiado viscosa para dispensarse con precisión. Como resultado de ello, el sensor de la presente invención puede no dar resultados reproducibles. El otro polímero que se puede usar en la realización preferida es la metilcelulosa, que está disponible con el nombre comercial Methocel 60 HG (n.º de cat. 64655, Fluka Chemicals, Milwaukee, WI, EE. UU.). La concentración de Methocel 60 HG en la mezcla de reactivos es preferentemente del 0,02 % (p/p) al 5 %. Más preferentemente, la concentración de Methocel 60 HG es del aproximadamente 0,5 %. La razón de este intervalo es similar al de PEO.

Tensioactivos

Los tensioactivos se usan para facilitar la dispensación de la mezcla de reactivos en las aberturas para los electrodos de trabajo y de referencia, así como para disolver rápidamente los reactivos químicos secos cuando se aplica una muestra al canal. Los tensioactivos, cuando se seleccionan correctamente, pueden facilitar la liberación de hemoglobina de una muestra de sangre al lisar la muestra de sangre. La cantidad y el tipo de tensioactivos se seleccionan para garantizar las funciones mencionadas anteriormente. Los tensioactivos pueden seleccionarse, pero sin limitación, de diversos detergentes aniónicos, catiónicos, no iónicos y zwitteriónicos, tales como polioxietiléneter, Tween 20, hidrato de colato de sodio, ácido cólico, monohidrato de coluro de hexadecilpiridinio y CHAP. El tensioactivo preferido es un polioxietiléneter. Más preferentemente, es *t*-octilfenoxipolietoxietanol y está disponible con la marca Triton X-100. La concentración de Triton X-100 en la mezcla de reactivos es preferentemente del 0,01 % (p/p) al 5 %. Más preferentemente, la concentración de Triton X-100 es de aproximadamente 1 %. Si la

concentración de tensioactivo está por debajo o por encima del intervalo, el sensor de la presente invención puede no dar resultados precisos y exactos. Opcionalmente, se puede añadir un tensioactivo adicional, tal como ácido cólico, a la formulación para garantizar las funciones mencionadas anteriormente.

5 El tampón

Puede haber un tampón presente junto con un mediador rédox en forma seca en una tira sensora de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos de tampones adecuados incluyen ácido cítrico, fosfatos, carbonatos, Tris y similares. Preferentemente, el pH de la solución tampón es superior a 7, más preferentemente, es de 9 a 13, aún más preferentemente, es de aproximadamente 12,5. Si el pH es inferior a 7, la interacción entre el hierro ferroso de la hemoglobina y el mediador rédox (ferricianuro de potasio) puede no producirse rápidamente (en un minuto). Aunque a un pH superior a 13, la interacción todavía se produce, pero el sensor resultante puede no dar resultados precisos. Los ejemplos de tampones adecuados para este pH incluyen, pero sin limitación, sales de fosfatos, carbonato, citrato y acetato de sodio o potasio. Preferentemente, se usa una combinación de al menos dos sales de sodio, como el fosfato de sodio y el carbonato de sodio, que forman una solución tampón alcalina, para lograr las funciones mencionadas anteriormente. Más preferentemente, fosfato trisódico y carbonato sódico. Las concentraciones de las sales de sodio en la mezcla de reactivos son del 0,5 % al 10 % (p/p), preferentemente, del aproximadamente 1 al 3 % (p/p). Más preferentemente, la concentración de fosfato trisódico es del 1,5 % (p/p) y la concentración de carbonato de sodio es del 3 % (p/p).

En la realización preferida, la mezcla de reactivos (denominada a continuación "mezcla de reactivos 1") que se usa para el electrodo en blanco (W1) contiene Methocel 60 HG al 0,5 % (p/p), óxido de polietileno al 0,6 % (p/p), Triton X-100 al 1 % (p/p).

En la realización preferida, la mezcla de reactivos (denominada a continuación "mezcla de reactivos 2") usada para el electrodo de trabajo (W2) contiene Methocel 60 HG al 0,5 % (p/p), óxido de polietileno al 0,6 % (p/p), Triton X-100 al 1 % (p/p), dodecahidrato de fosfato trisódico al 1,5 %, carbonato de sodio al 3 % y ferricianuro de potasio al 10 %. En la realización preferida, la mezcla de reactivos 2 también se usa para el electrodo de referencia (R).

30 Preparación de las mezclas de reactivos

La mezcla de reactivos 1 se puede preparar como se indica a continuación: en 100 ml de agua destilada, se añaden 0,5 g de Methocel 60 HG, 0,6 g de óxido de polietileno y 1,0 g de Triton X-100. Se agita la solución hasta que se disuelve. La solución resultante está lista para dispensarse.

La mezcla de reactivos 2 se puede preparar como se expone a continuación: en 100 ml de agua destilada, se añaden 0,5 g de Methocel 60 HG, 0,6 g de óxido de polietileno, 10,0 g de ferricianuro de potasio y 1,0 g de Triton X-100, 1,5 g de dodecahidrato de trifosfato sódico, 3,0 g de carbonato de sodio. Se agita la solución hasta que se disuelve. La solución resultante está lista para dispensarse.

40 Construcción del sensor/de la tira

El montaje de las diversas realizaciones de la presente invención es relativamente sencillo. En general, para la configuración de 4 capas (ilustrada en las Fig. 1-4), la capa base y la capa de retención de reactivo se laminan entre sí, y luego se dispensan las mezclas de reactivos en sus respectivos pocillos de electrodo. Tras secar las mezclas de reactivos, se lamina la capa de formación de canales sobre la capa de retención de reactivo y luego se lamina la cubierta sobre la capa de formación de canales. Para otras construcciones de sensores como las configuraciones de lado a lado o de espalda con espalda, la capa base y la capa de retención de reactivo se laminan entre sí, y luego se dispensan las mezclas de reactivos dentro de sus respectivos pocillos de electrodo (o dentro de cada uno de los pocillos de electrodo en las patas de la realización de lado a lado). Tras secar la mezcla de reactivos, se lamina la capa de formación de canales sobre la capa de retención de reactivo y luego se lamina la cubierta sobre la capa de formación de canales.

Más particularmente, se corta un fragmento de una película de poliéster de oro para realizar la conformación como se ilustra en la FIG. 4, formando la capa base 20 del sensor 10. Se puede usar un láser o similar (mencionado anteriormente) para marcar la película de poliéster de oro. Como también se ilustra en la FIG. 4, la película se puede marcar con el láser de manera que se definan tres electrodos en el extremo 14 del fluido de muestra y tres puntos de contacto en el extremo 16 de contacto eléctrico. La línea de marcaje puede ser muy fina, pero suficiente para crear tres trayectorias eléctricas aisladas galvánicamente, espaciadas, separadas. Opcionalmente, pero no necesariamente, se puede crear una línea de marcaje 28 a lo largo del borde exterior de la capa base 20 para evitar posibles problemas estáticos de potencial, que podrían causar una señal ruidosa del sensor 10 acabado.

A continuación, se corta un fragmento de una cinta adhesiva de una sola cara hasta un tamaño y con una forma que se forme la capa de soporte de reactivo que cubra una parte importante de la capa conductora 21 de la capa base 20, a excepción de la exposición de una pequeña zona de contacto eléctrico como se ilustra en FIG. 4.

Antes de unir la capa de retención de reactivo a la capa base 20, se perforan tres aberturas circulares 32, 34 y 36 de tamaño esencialmente igual con láser o por medios mecánicos tales como un conjunto punzón y troquel, creando las aberturas 32, 34 y 36 de electrodo en la capa de retención de reactivo. El tamaño del orificio preferido para las aberturas 32, 34 y 36 tiene un diámetro típico de aproximadamente 0,70 mm (0,0276 in). Como se ilustra en la FIG. 4, las aberturas 32, 34 y 36 de electrodo están alineadas entre sí y tienen una separación de aproximadamente 1,14 mm (0,045 in) entre sí. Las aberturas circulares son solo para fines ilustrativos. Se ha de entender que la forma y el tamaño de las aberturas y la distancia entre las aberturas son irrelevantes, siempre que el tamaño de las aberturas sea lo suficientemente grande como para contener suficientes reactivos químicos para que los electrodos funcionen correctamente, pero lo suficientemente pequeño para permitir una cámara de muestras razonablemente pequeña. Como se ha indicado anteriormente, la disposición preferida de los electrodos formados en las aberturas 32, 34 y 36 es W1 (electrodo en blanco), R (electrodo de referencia) y W2 (electrodo de trabajo). La capa de retención de reactivo se une luego a la capa base 20 de manera que se definan los pocillos de los electrodos W1, R y W2.

La mezcla de reactivos 1 se dispensa en el área del electrodo W1. Como se ha descrito anteriormente, la mezcla de reactivos 1 es preferentemente una mezcla de al menos un polímero y un tensioactivo. De manera similar, la mezcla de reactivos 2 se dispersa en el área del electrodo R y W2. La mezcla de reactivos 2 es preferentemente una mezcla de un mediador redox (preferentemente, ferricianuro de potasio), al menos un tensioactivo, un tampón y un aglutinante polimérico. Preferentemente, los reactivos 1 y 2 se dispensan en W1, R y W2 al mismo tiempo y, por lo tanto, se secan simultáneamente en las mismas condiciones de secado. El volumen dispensado en W1, W2 y R es de 40 a 110 nl para las dimensiones del sensor de la presente invención. Más preferentemente, es de 50 a 90 nl, aún más preferentemente, es de aproximadamente 70 nl. Si el volumen es inferior a 40 nl, es posible que la mezcla de reactivos no cubra completamente la superficie del electrodo; si el volumen es superior a 110 nl, la mezcla de reactivo puede desbordarse. En cualquier caso, el sensor resultante puede no dar resultados exactos y precisos.

Tras la adición de las mezclas de reactivos, las mezclas de reactivos se secan. El secado de los reactivos puede producirse dentro de un intervalo de temperaturas de aproximadamente la temperatura ambiente a aproximadamente 50 °C. El tiempo requerido para secar los reactivos depende de la temperatura a la que se realiza el proceso de secado.

Tras el secado, se forma un fragmento de cinta de doble cara disponible en Adhesive Research la capa de formación de la cámara que contiene canal 42 en forma de U. La capa de formación de la cámara se estratifica entonces sobre la capa de retención de reactivos. Como se ha mencionado anteriormente, esta capa de formación de la cámara sirve como espaciador y define el tamaño de la cámara 17 de muestras. Su anchura y longitud están optimizadas para proporcionar una muestra de fluido en movimiento relativamente rápido.

Se forma un fragmento de una película de transparencia (n.º de cat. PP2200 o PP2500 disponible en 3M) en la capa superior. Se realiza una abertura de ventilación 52 rectangular usando el láser mencionado anteriormente o por medio de un troquel y un punzón. La abertura de ventilación 52 está ubicada aproximadamente a 5,38 mm (0,212 in) de la entrada del fluido 54. La capa superior se alinea y se estratifica sobre la capa que forma la cámara para completar el ensamblaje del sensor 10, como se ilustra en la FIG. 4.

Aunque la descripción de la construcción de electrodos anterior describe la construcción de un solo sensor, el diseño y los materiales usados son ideales para fabricar múltiples sensores a partir de una pieza del material de cada capa. Esto se lograría comenzando con un fragmento relativamente grande de capa base que tuviera una capa conductora encima. Se crea una pluralidad de líneas marcadas en la capa conductora de manera que se crea un patrón repetitivo usando el método de trazado preferido descrito anteriormente, por lo que cada patrón definirá finalmente las trayectorias conductoras para cada sensor. De manera similar, se dimensiona un fragmento grande del material de la capa de retención de reactivo que también tiene una pluralidad de aberturas en un patrón repetitivo para ajustarse sobre la capa base de manera que se haya fabricado una pluralidad de sensores una vez completado. El tamaño de cada abertura y el material de los electrodos dispuesto en la pluralidad de áreas de los electrodos W1, R y W2 son similares a los desvelados anteriormente. Tras disponer la mezcla de reactivo en sus respectivas aberturas de retención de reactivo y secar, se estratifica una gran parte del material de la capa de formación de canales, que tiene una pluralidad de aberturas alargadas, sobre el material de la capa de retención de reactivo de manera que cada abertura alargada del material de la capa formadora de canales contenga aberturas del material de la capa de retención del reactivo. Se estratifica un material de capa de cubierta de tamaño similar, que tiene una pluralidad de aberturas de ventilación y aberturas que forman muescas en un patrón repetitivo, sobre el material de la capa que forma la cámara. La lámina laminada se corta luego en ubicaciones apropiadas para formar tiras de sensores individuales.

Aplicación del sensor/de la tira

Una tira de hemoglobina de acuerdo con la segunda realización de la presente invención se puede usar junto con un medidor portátil para determinar el contenido de hemoglobina de una muestra pequeña (inferior a 2 microlitros) de sangre completa. La tira se puede insertar en el conector de la tira, activándose así el medidor. Se aplican aproximadamente 1,6 µl de sangre a la tira de hemoglobina. Una vez que una muestra de sangre entra en el canal

capilar de la tira de hemoglobina de la presente invención, se aplica un potencial de aproximadamente 0,7 voltios a través del electrodo vacío (W1) y del electrodo de referencia (R), y se registran las señales de corriente resultantes frente al tiempo (amperometría). La corriente a los 5 segundos es proporcional a las especies oxidables (interferentes) que coexisten con la hemoglobina en la muestra, por lo que se usa para corregir la señal de corriente obtenida en el electrodo de trabajo (W2).

Tras la medición amperométrica en el electrodo en blanco (W1), se aplica un potencial de 1,0 voltios al electrodo de trabajo (W2) durante aproximadamente 10 s con el fin de convertir (oxidar) la forma reducida del mediador (Fe (II)) a su forma oxidada (Fe (III)), reduciendo así al mínimo el ruido de fondo y mejorando el rendimiento del sensor. Tras un retardo de circuito abierto (por ejemplo, de aproximadamente 17 segundos) para permitir que el Fe (III) reaccione con el hierro de la hemoglobina (HbFe (II)), se lleva a cabo un barrido de potencial lineal. En la realización preferida, el potencial de barrido inicial es de aproximadamente -0.5 voltios y el potencial final es de aproximadamente 0,3 voltios. La velocidad de barrido es de aproximadamente 0,1 V/s. La duración del barrido es de aproximadamente 8 s. La respuesta de la corriente a un potencial fijo (por ejemplo, 0,2 voltios) o la corriente máxima (aproximadamente 0,2 V) es proporcional a la concentración de hemoglobina. El tiempo total del ensayo es de aproximadamente 40 s (5 + 10 + 17 + 8 s). La tira de hemoglobina de la presente invención está diseñada para un solo uso, lo que significa que no se podrá reutilizar tras una aplicación y que se desechará después de su uso.

Los siguientes métodos ilustran la eficacia de una tira sensora de acuerdo con la presente invención. Todos los sensores de la presente invención se ensayaron en un medidor de hemoglobina manual fabricado por Nova Biomedical Corporation de Wal-tham, Massachusetts. Para obtenerse los valores de referencia, también podrían analizarse las mismas muestras con un analizador de referencia, como el sistema HemoCue. (HemoCue Inc., Cypress, CA), Sistema de Hematología Sysmex (Kobe, Japón). Los sensores usados en los métodos desvelados a continuación se diseñaron de acuerdo con las composiciones de reactivo preferidas y los materiales preferidos desvelados anteriormente.

Métodos de barrido de tensión (tensión variable) y amperometría (tensión constante)

Para la obtención de técnicas de detección electroquímicas óptimas, se siguieron varias técnicas electroquímicas incluyendo voltametría cíclica, voltametría de barrido lineal, amperometría, coulometría, potenciometría, cronopotenciometría, etcétera. Se determinó que los métodos preferidos eran la voltametría de barrido lineal y la amperometría.

El procedimiento para la voltametría de barrido lineal se llevó a cabo de la siguiente manera: en primer lugar, se aplicó un potencial de aproximadamente 0,7 voltios al electrodo en blanco (W1) durante 5 s; en segundo lugar, se aplicó un potencial de 1,0 voltios en el electrodo de trabajo (W2) durante 10 s; en tercer lugar, tras un retardo de circuito abierto (17 s), se realizó una voltamperometría de barrido lineal con un potencial inicial de -0,5 voltios y un potencial final de 0,3 voltios y una velocidad de barrido de 0,1 V/s.

La FIG. 5 muestra los voltamogramas de barrido lineal para las muestras de sangre de diferentes niveles de hemoglobina usando las tiras de hemoglobina de la presente invención. El máximo de electrooxidación de aproximadamente 0,1 a 0,2 voltios (A a G) se atribuye a la reoxidación del ferrocianuro generado a partir de la electrorreducción y a la interacción entre el ferricianuro y el hierro ferroso de la hemoglobina de las muestras de sangre (véase la siguiente Tabla 1). La Fig. 5 muestra que las corrientes máximas o los valores de corriente a un potencial fijo (por ejemplo, de 0,2 voltios) aumentan linealmente al aumentar la concentración de hemoglobina (A a G). Los valores de hemoglobina se obtuvieron con el sistema HemoCue (HemoCue Inc., Cypress, CA).

Tabla 1

Muestra	Concentración de hemoglobina (g/dl)
A	0
B	5,1
C	7,0
D	9,6
E	13,5
F	17,0
G	19,5

La amperometría se llevó a cabo usando el siguiente procedimiento: en primer lugar, se aplicó un potencial de aproximadamente 0,7 voltios al electrodo en blanco durante 5 s; en segundo lugar, se aplicó un potencial de 1,0 voltios al electrodo de trabajo durante 10 s; en tercer lugar, tras un retardo de circuito abierto (17 s), se aplicó el potencial constante de 0,2 voltios y se registraron las curvas de corrientes en función del tiempo. La FIG. 6 muestra las curvas i-t de la amperometría para las mismas muestras de sangre A-G que en la FIG. 5 (véase la Tabla 1). La Fig. 6 muestra que las corrientes en un punto de tiempo determinado aumentan al aumentar la concentración de hemoglobina (A a G), pero la linealidad no es tan buena como la que se obtiene en la voltimetría de barrido lineal.

Mediciones de voltimetría e impedancia combinadas

5 Se recogió una muestra de sangre venosa en un tubo superior verde heparinizado y se centrifugó para separar el plasma y los glóbulos rojos. Se combinaron los glóbulos rojos y el plasma para preparar muestras de sangre con diferentes niveles de hemoglobina. Cada muestra se midió con el sistema HemoCue y luego con los sensores de la presente invención junto con el medidor de hemoglobina manual. Se aplican aproximadamente 1,6 µl de sangre a la tira de hemoglobina, el resultado del análisis se muestra en aproximadamente 40 s en el medidor.

10 La FIG. 7 muestra la dependencia de las señales de corriente obtenidas con la voltimetría de barrido lineal en la concentración de hemoglobina obtenida usando el analizador de referencia (medidor HemoCue). Cabe señalar que la respuesta de la corriente es lineal, de 0 a aproximadamente 20 g/dl de hemoglobina, y luego comienza a nivelarse por encima de ese intervalo.

15 La FIG. 8 muestra la dependencia de la impedancia en la concentración de hemoglobina obtenida usando el analizador de referencia (medidor HemoCue). La impedancia aumenta ligeramente al aumentar la concentración de hemoglobina por debajo de aproximadamente 7,8 g/dl, mientras que muestra una excelente sensibilidad por encima de ese valor. Por lo tanto, una combinación del uso de los valores de señal de corriente y los valores de impedancia podría hacer que la medición de hemoglobina fuera más precisa y el intervalo lineal más amplio.

20 La concentración de hemoglobina (Hb) se puede calcular a partir de las siguientes ecuaciones:

$$Hb = aHb(i) + bHb(Imp) \quad (1)$$

$$a + b = 1 \quad (2)$$

25 en la que Hb es hemoglobina (g/dl); Hb (i) es el valor de hemoglobina basado en la señal de corriente; Hb (Imp) es el valor de la hemoglobina basado en la impedancia; a y b son coeficientes iguales a 0 a 1.

30 Para demostrar la ventaja del uso de los valores tanto de las señales de corriente como de la impedancia, se representaron las lecturas de las concentraciones de hemoglobina combinadas (Hb), que combinan Hb (i) y Hb (Imp) usando las ecuaciones (1) y (2) frente a los valores de concentración obtenidos usando el analizador de referencia (medidor HemoCue) y se ilustran en la FIG. 9. Es evidente que los resultados combinados son superiores a Hb (i) o Hb (Imp) solas. Como resultado de ello, los sensores de la presente invención muestran un intervalo lineal extendido de hasta 23 g/dl.

35 La precisión de los sensores de la presente invención se investigó ensayando la misma muestra varias veces. Con este fin, se usaron tres lotes diferentes de sensores de la presente invención y se analizaron tres niveles de hemoglobina de las muestras de sangre. Por lo general, el coeficiente de variación (% de CV) fue del aproximadamente 4,0; 3,6 y 3,8 % para muestras que contenían niveles de 7,5; 14,0 y 20,0 g/dl de hemoglobina (n = 40), respectivamente.

Eliminación de la influencia de los interferentes

45 El diseño único del sistema de tres electrodos de la segunda realización de la presente invención hace que sea posible eliminar la interferencia de las especies coexistentes que son oxidables en el electrodo. Esto se logra midiendo la concentración total de las especies oxidables en el electrodo en blanco (W1) y corrigiendo las señales de corriente en el electrodo de trabajo (W2). La corrección está representada por la siguiente ecuación:

$$I = I_2 - kI_1 \quad (3)$$

50 en la que I₂ es la corriente en W2 (electrodo de trabajo); I₁ es la corriente en W1 (electrodo en blanco); k es una constante relacionada con las áreas de electrodo, la estructura del canal capilar y otros factores; I es la señal de corriente corregida que es proporcional a la concentración de hemoglobina en la muestra.

55 Para evaluar el efecto de las interferencias, se añadieron a las muestras de sangre diferentes concentraciones de interferentes. Las muestras se analizaron luego con las tiras de hemoglobina de acuerdo con la segunda realización de la presente invención. Las muestras de sangre también se analizaron con el sistema HemoCue (HemoCue Inc., Cypress, CA) para los valores de referencia. Los resultados del análisis mostraron que hasta 10 mg/dl de acetaminofeno, ácido ascórbico, hidroxurea, 15 mg/dl de bilirrubina, 8 mg/dl de tolazamida, 30 mg/dl de ácido salicílico, 20 mg/dl de ácido úrico no tienen influencia sobre la determinación de la concentración de hemoglobina usando las tiras de hemoglobina de acuerdo con la segunda realización de la presente invención. El valor máximo para cada interferencia citada anteriormente representa la concentración máxima del interferente que puede coexistir en la muestra de sangre. Cada valor máximo está significativamente por encima de un límite superior que sería de importancia clínica. Por lo tanto, el análisis indica que el rendimiento de un sensor de acuerdo con la presente invención no sufre debido a la presencia de los interferentes mencionados anteriormente, incluso en cantidades significativas.

Otra interferencia común procede de electrolitos tales como el cloruro de sodio, que varía de una muestra a otra y podría ser un problema importante para otro tipo de sensores de hemoglobina (por ejemplo, sensores basados en la impedancia o en la conductividad). Para evaluar el efecto de las concentraciones variables de los electrolitos en la medición de la hemoglobina usando los sensores de la presente invención, se añadieron a una muestra de sangre diferentes niveles de cloruro de sodio. Los resultados del análisis mostraron que hasta 30 mM de NaCl añadido las muestras de sangre no tiene un efecto sustancial en la medición de la hemoglobina. El valor máximo de NaCl mencionado anteriormente es la concentración máxima y tolerable de NaCl que puede existir en una muestra de sangre. Este valor máximo está significativamente por encima de un límite superior de importancia clínica. Por lo tanto, el ensayo indica que el rendimiento de un sensor de acuerdo con la presente invención no sufre debido a la presencia de NaCl incluso en cantidades significativas.

Exactitud de los resultados para muestras que tienen un volumen en el intervalo de 1,6-10 microlitros

Ventajosamente, un método de acuerdo con la presente invención que emplea una tira de acuerdo con la segunda realización de la presente invención requiere muy poca sangre para producir resultados precisos. El volumen de sangre requerido para la medición de la hemoglobina está determinado por el volumen del canal capilar. El volumen calculado para el canal capilar de la presente invención es de aproximadamente 1,6 µl. Para ensayar el efecto del volumen en la respuesta del sensor, se aplicaron diferentes volúmenes de muestra de sangre (de 1,6 a 10,0 µl) a los sensores. Cabe señalarse que un exceso de sangre (> 1,6 µl) no entraría en el canal capilar, ya que el canal solo puede contener hasta 1,6 µl. Los datos del ensayo se muestran en la FIG. 10. Como es evidente, los sensores de la presente invención no muestran ninguna dependencia de la respuesta en el volumen de muestra de 1,6 a 10 µl. Por lo tanto, el volumen mínimo requerido para obtenerse resultados precisos es de 1,6 µl. La Fig. 10 ilustra que se pueden usar tan solo 1,6 µl de sangre para producir resultados precisos al emplear los conceptos de la invención descritos en el presente documento.

Demostración de la precisión de las mediciones de hemoglobina usando los sensores de acuerdo con la presente invención

Las tiras de sensor de acuerdo con la presente invención se pueden usar junto con un medidor de hemoglobina manual. Se analizaron muestras de sangre heparinizada (parte superior verde) con diferentes concentraciones de hemoglobina (no sintética) con los sensores de hemoglobina de la presente invención. Las mismas muestras también se analizaron con un método de referencia (Sistema de hematología Sysmex, Kobe, Japón). Se aplican aproximadamente 2 µl de sangre a la tira de hemoglobina. El resultado del análisis se obtuvo en aproximadamente 39 s con el medidor. La FIG. 11 resume los resultados de los análisis para un total de 184 muestras y 368 puntos de datos (cada muestra tiene un resultado por duplicado). Como se ve observa el gráfico, los sensores de la presente invención responden a la concentración de hemoglobina en las muestras de sangre en un intervalo analizado de aproximadamente 6,6 g/dl a aproximadamente 22,0 g/dl. Se obtuvieron una ecuación de regresión de $y = 0,9678x + 0,4074$, R al cuadrado de 0,9377 y número total de 368.

Determinación del hematocrito usando tiras de sensor de acuerdo con la presente invención

El hematocrito es una medida del volumen fraccional de los glóbulos rojos. Para medir el hematocrito usando las tiras de sensor de hemoglobina de acuerdo con la presente invención, se estableció una correlación entre el hematocrito y la hemoglobina midiendo el contenido de hemoglobina de las muestras de sangre con las tiras de hemoglobina de la presente invención y con una microcentrifugadora (el método de referencia recomendado por la NCCLS para la determinación del hematocrito o volumen celular empaquetado (PCV) es la centrifugación). Se encontró que la correlación entre el hematocrito y la hemoglobina era:

$$\text{Hct} = a\text{Hb} + b \quad (4)$$

donde Hct representa el hematocrito (%); Hb representa la hemoglobina (g/dl); a y b son constantes empíricas, que equivalen a 2,805 y 2,205 respectivamente, en las presentes condiciones, respectivamente.

Por lo tanto, una vez que se mide la concentración de hemoglobina, el Hct se puede calcular fácilmente usando la ecuación anterior (4). La FIG. 12 muestra los resultados del análisis del hematocrito usando las tiras de hemoglobina de la presente invención.

Cabe señalar que, aunque, en el presente documento, se han descrito las realizaciones preferidas de la presente invención, la descripción anterior es meramente ilustrativa. A los expertos en las respectivas materias se les ocurrirán modificaciones adicionales de la invención desvelada en el presente documento, y se considera que todas estas modificaciones están dentro del alcance de la invención según lo definido en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una tira sensora (10) configurada para realizar mediciones de hemoglobina en una muestra de sangre completa, que comprende:
- 5 una capa base (20) que tiene al menos una primera capa conductora de la electricidad (21) y una segunda capa conductora de la electricidad dispuesta sobre una superficie de la misma, caracterizada por que la tira sensora comprende además una primera cantidad de una composición de reactivo que incluye al menos una cantidad eficaz de un mediador rédox sensible a la hemoglobina y una cantidad eficaz de un aglutinante polimérico, preferentemente óxido de polietileno, una cantidad eficaz de tensioactivo y al menos un tampón en contacto con dicha primera capa conductora de la electricidad para definir un electrodo de trabajo (W) y una segunda cantidad de una composición de reactivo que incluye una cantidad eficaz de un aglutinante polimérico, preferentemente óxido de polietileno, una cantidad eficaz de tensioactivo y al menos un tampón en contacto con dicha segunda capa conductora de la electricidad para definir un electrodo de referencia (R); y
- 10 un canal que proporciona comunicación entre dicha primera cantidad y dicha segunda cantidad de la composición de reactivo; estando dicha tira sensora (10) configurada para devolver una señal eléctrica medible indicativa del contenido de hemoglobina de una muestra de sangre en respuesta a una aplicación independiente de una tensión variable y una tensión constante a través de dicho electrodo de trabajo (W) y de dicho electrodo de referencia (R) cuando dicha muestra de sangre está en contacto con dichas primera y segunda cantidades de composición de reactivo dentro de dicho canal.
2. La tira sensora (10) de la reivindicación 1, en la que dicho mediador rédox oxida el hierro (II) de la hemoglobina.
- 25 3. La tira sensora (10) de la reivindicación 1, en la que dicho mediador rédox comprende ferricianuro de potasio.
4. La tira sensora (10) de la reivindicación 3, en la que dicho mediador rédox está en el intervalo del 0,1 % al 20 % (p/p) de dicha composición de reactivo.
- 30 5. La tira sensora (10) de la reivindicación 1, en la que dicho aglutinante polimérico está en el intervalo del 0,04 % al 2 % (p/p) de dicha composición, dicho tensioactivo está en el intervalo del 0,01 % al 5 % (p/p) de dicha composición y dicho tampón tiene un pH superior a 7.
6. La tira sensora (10) de la reivindicación 5, en la que dicho aglutinante polimérico comprende óxido de polietileno, dicho tensioactivo comprende un polioxietiléneter y dicho tampón comprende una composición alcalina.
- 35 7. La tira sensora (10) de la reivindicación 1, que comprende además una primera capa intermedia sobre dicha capa base (20), una segunda capa intermedia sobre dicha primera capa intermedia y una capa superior, incluyendo dicha primera capa intermedia una primera abertura (32) que coincide con dicha primera capa conductora en la que se recibe dicha composición de reactivo, y una segunda abertura (34) que coincide con dicha segunda capa conductora en la que se recibe dicha composición de reactivo, incluyendo dicha segunda capa intermedia un corte que se encuentra sobre dichas primera y segunda aberturas para definir dicho canal, e incluyendo dicha capa superior una abertura de ventilación (52) en comunicación con dicho canal, estando dicho canal dimensionado para recibir no más de 2 microlitros de sangre completa.
- 40 8. La tira sensora (10) de la reivindicación 1, que comprende además una tercera capa conductora de la electricidad sobre dicha capa base (20) y una segunda composición de reactivo en contacto con dicha tercera capa conductora para definir un electrodo en blanco (W3), incluyendo dicha tercera composición de reactivo un mediador rédox no sensible a la hemoglobina.
- 45 9. La tira sensora (12) de la reivindicación 8, que comprende además una primera capa intermedia sobre dicha capa base (20), una segunda capa intermedia sobre dicha primera capa intermedia y una capa superior, incluyendo dicha primera capa intermedia una primera abertura pasante (32) que coincide con dicha primera capa conductora en la que se recibe dicha composición de reactivo, una segunda abertura pasante (34) que coincide con dicha segunda capa conductora en la que se recibe dicha composición de reactivo y una tercera abertura (36) que coincide con dicha tercera capa conductora en la que se recibe dicha segunda composición de reactivo, incluyendo dicha segunda capa intermedia un corte que se encuentra sobre dicha primera, dicha segunda y dicha tercera aberturas para definir dicho canal, e incluyendo dicha capa superior una abertura de ventilación (53) en comunicación con dicho canal, estando dicho canal dimensionado para recibir no más de 2 microlitros de sangre completa.
- 50 10. La tira sensora (10) de la reivindicación 1, en la que dicha composición de reactivo en contacto con dicha segunda capa conductora de la electricidad comprende una pila de Ag/AgCl en lugar de dicho mediador rédox.
- 55 11. La tira sensora (10) de la reivindicación 1, tira sensora que está configurada para recibir una muestra de sangre de un volumen en el intervalo de 1,6 microlitros a 10 microlitros.
- 60 65

12. La tira sensora (10) de la reivindicación 1, en la que dicha primera cantidad de dicha primera composición de reactivo y dicha segunda cantidad de dicha segunda composición de reactivo son composiciones idénticas.

5 13. Un método para medir el contenido de hemoglobina de una muestra de sangre completa con una tira sensora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:

10 introducir un mediador rédox sensible a la hemoglobina en dicha muestra de sangre;
 aplicar un potencial eléctrico inicial a dicha muestra de sangre;
 aumentar dicho potencial eléctrico en etapas diferenciadas hasta alcanzar un potencial eléctrico final; y
 medir un parámetro eléctrico de dicha sangre completa tras la aplicación de cada potencial eléctrico;
 en donde dicho parámetro comprende un valor de corriente y además comprende medir la impedancia eléctrica
 de dicha sangre, en donde el contenido de hemoglobina de dicha muestra de sangre se calcula a partir de las
 siguientes ecuaciones:

15
$$Hb = aHb (i) + bHb (Imp)$$

y

20
$$a + b = 1;$$

donde Hb es hemoglobina (g/dl); Hb (i) es el valor de la hemoglobina basado en la señal de corriente; Hb (Imp) es el
 valor de la hemoglobina basado en la impedancia; a y b son coeficientes iguales a 0 a 1.

25 14. El método de la reivindicación 13, en el que el uso de los valores de corriente y los valores de impedancia
 proporciona la medición de los valores del contenido de hemoglobina en un intervalo lineal extendido.

15. El método de la reivindicación 14, en el que el intervalo lineal extendido es de al menos 0 g/dl a 23 g/dl de
 hemoglobina.

30 16. El método de la reivindicación 13, en el que dicho potencial inicial es de -0,5 voltios, dicho potencial final es de
 0,3 voltios y cada etapa diferenciada es de 0,1 voltios por segundo.

35 17. El método de la reivindicación 13, en el que el volumen de dicha muestra de sangre está en el intervalo de
 1,6 microlitros a 10 microlitros.

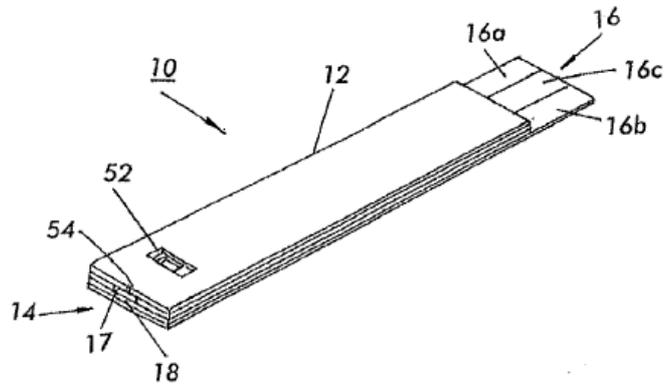


Fig. 1

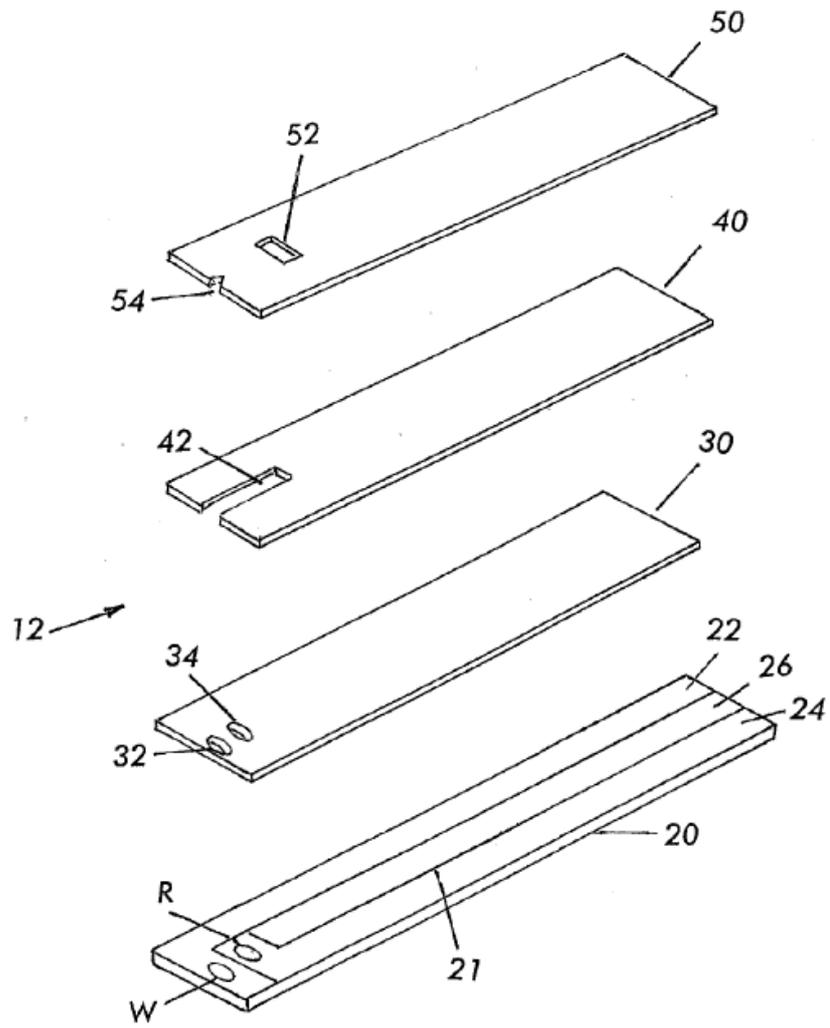


Fig. 2

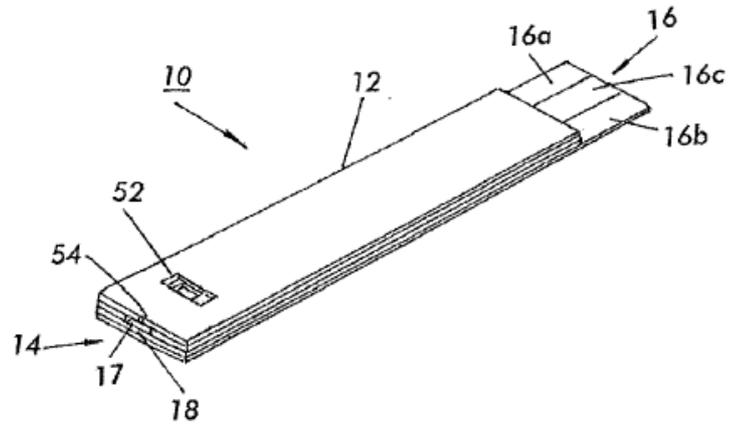


Fig. 3

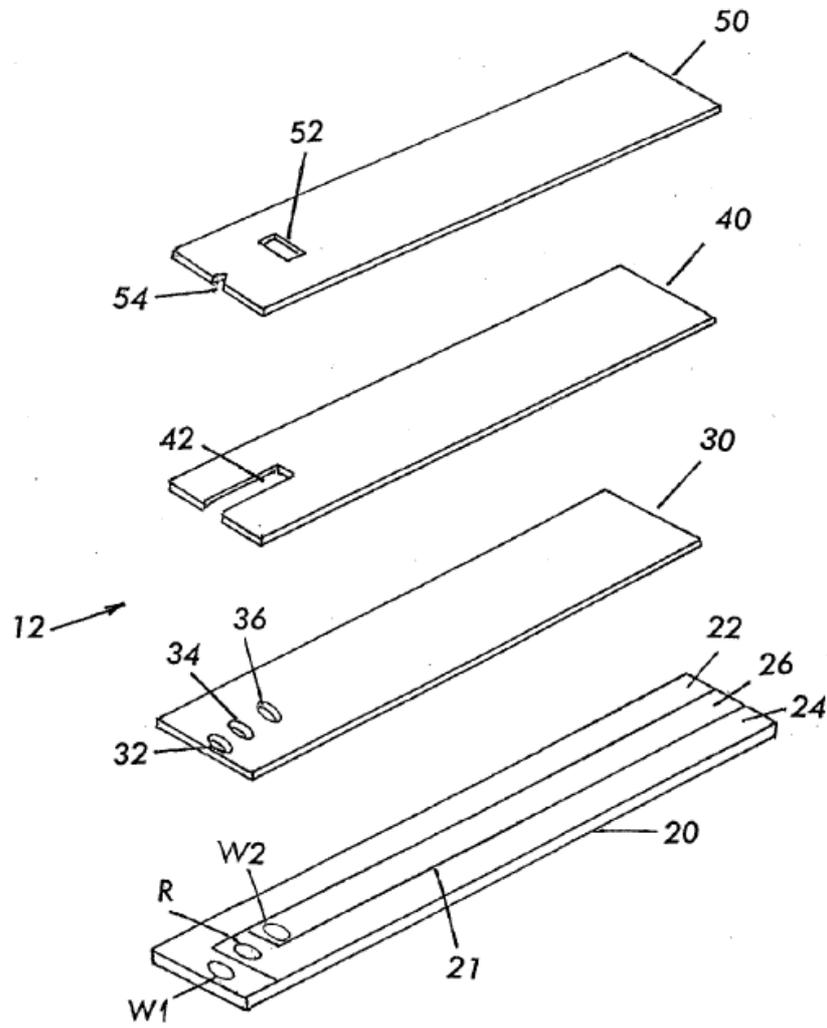


Fig. 4

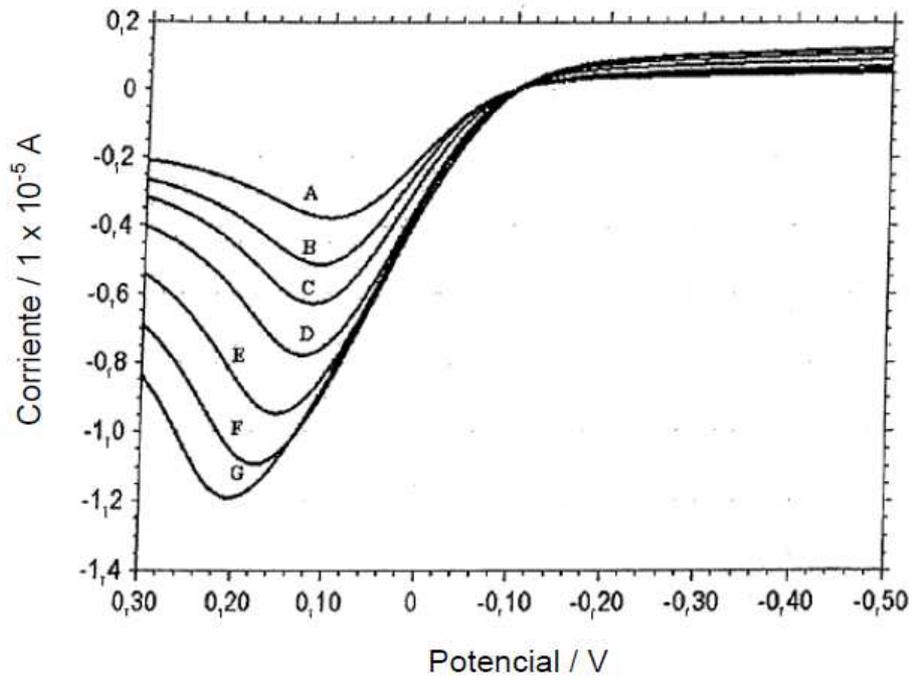


Fig. 5

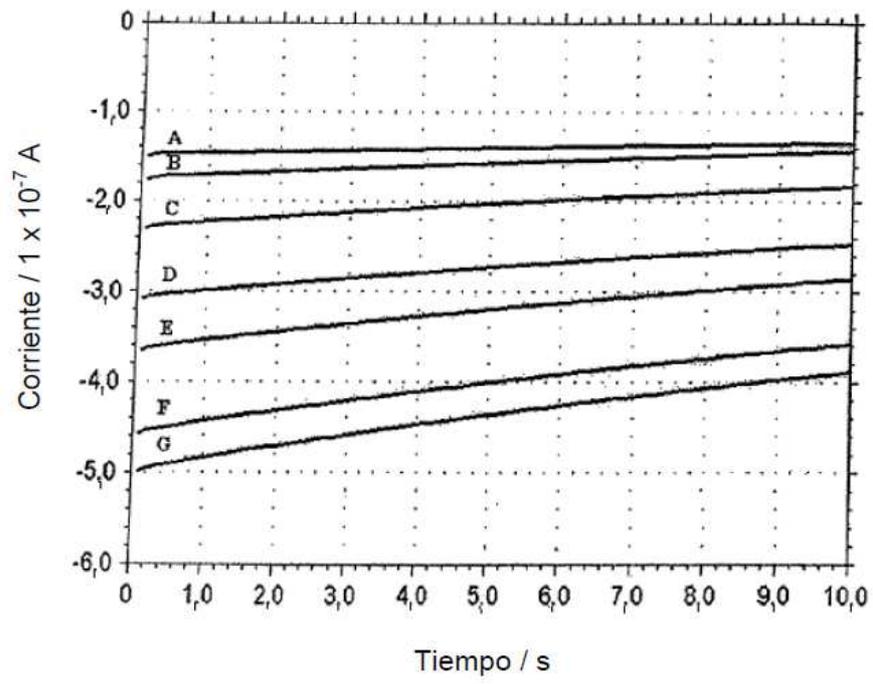


Fig. 6

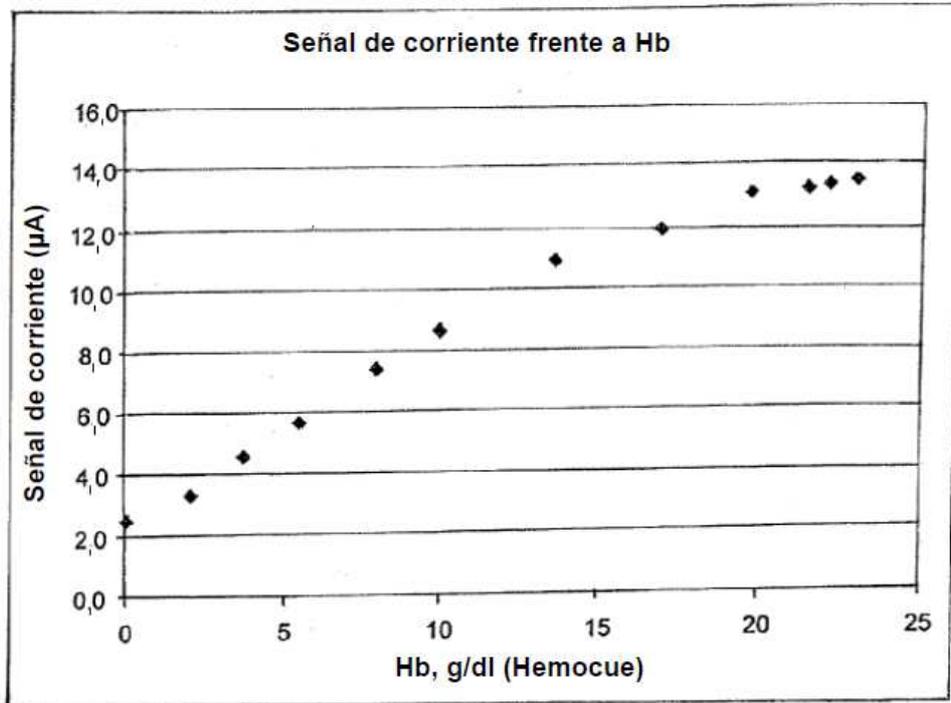


Fig. 7

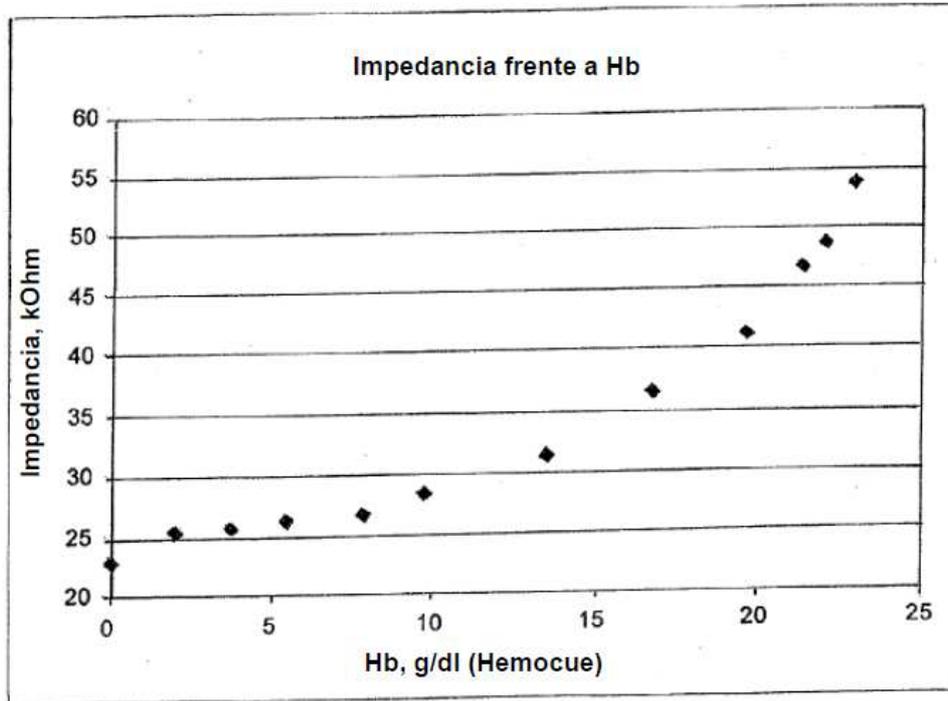


Fig. 8

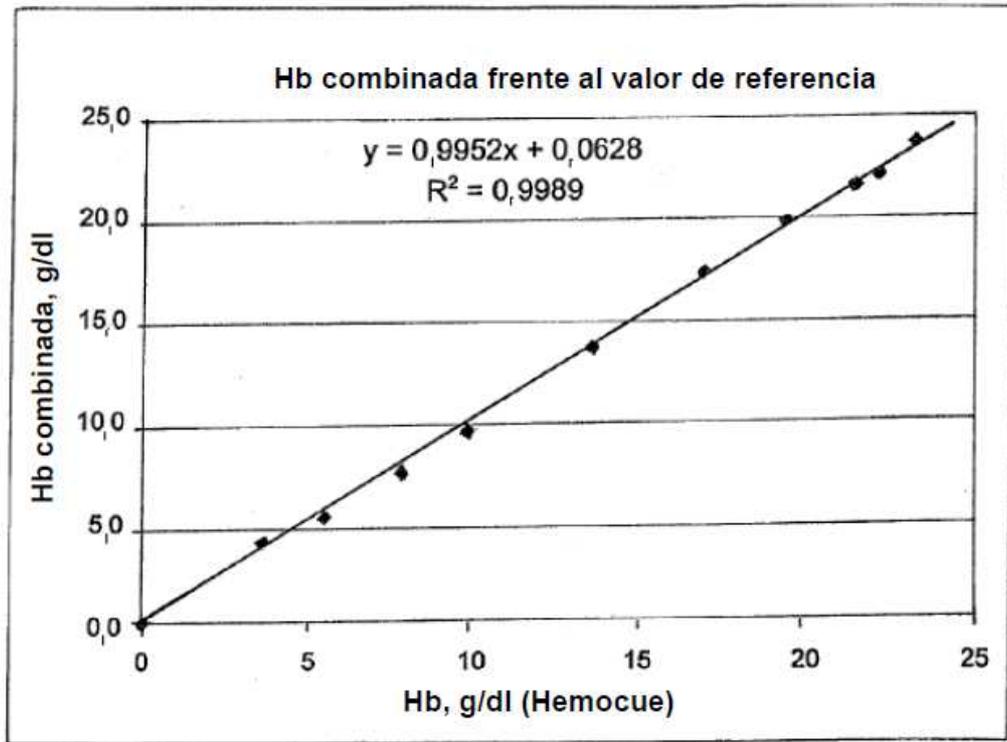


Fig. 9

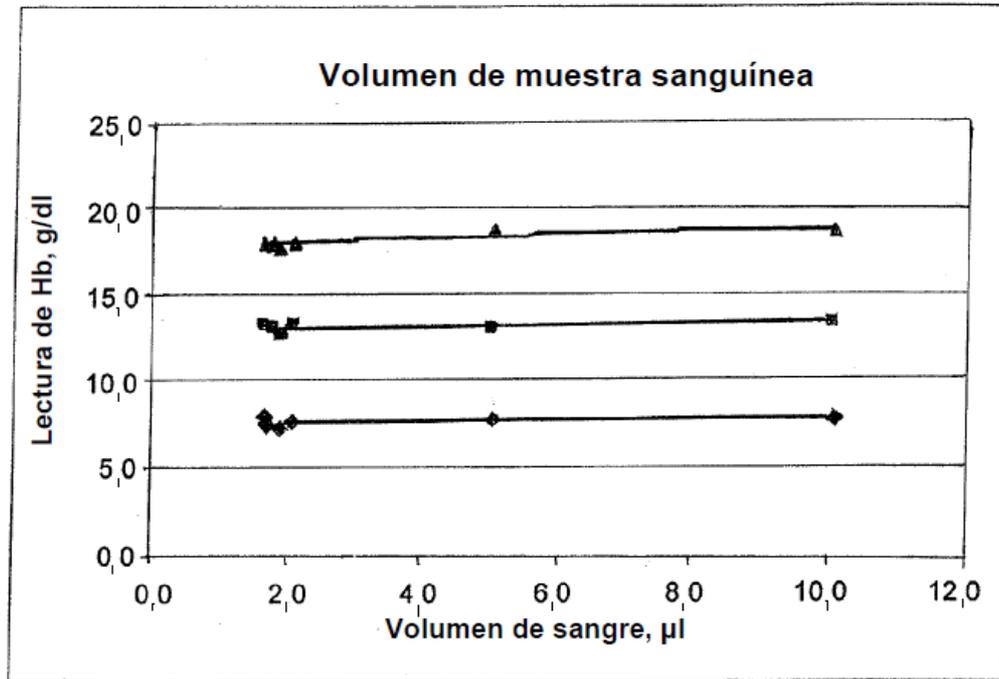


Fig. 10

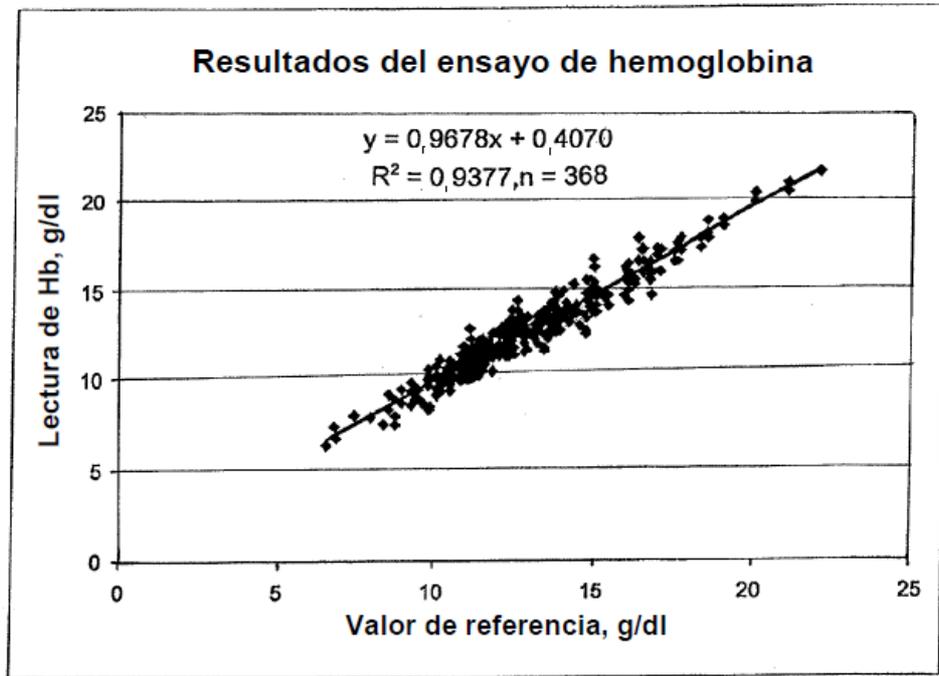


Fig. 11

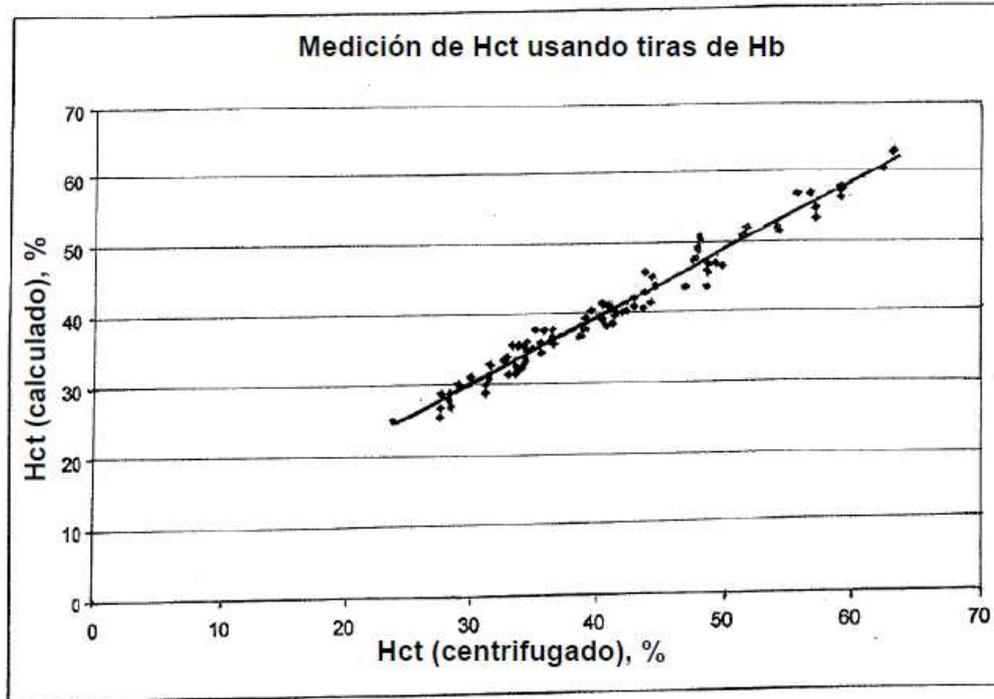


Fig. 12