

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 806**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/72** (2006.01)

**G01N 27/327** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2014** E 17191150 (6)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** EP 3276355

54 Título: **Calibración normalizada de determinaciones de la concentración de analito**

30 Prioridad:

**14.03.2013 US 201361782520 P**

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

**18.03.2021**

73 Titular/es:

**ASCENSIA DIABETES CARE HOLDINGS AG  
(100.0%)  
Peter Merian-Strasse 90  
4052 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**WU, HUAN-PING**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 812 806 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

Calibración normalizada de determinaciones de la concentración de analito

## REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. N° 61/782.520 titulada "Calibration of Analyte Concentration Determinations" presentada el 14 de marzo de 2013, que se incorpora como referencia en su totalidad.

## ANTECEDENTES

10 Los sistemas de biosensor proporcionan un análisis de una muestra de líquido biológico, tal como sangre, suero, plasma, orina, saliva, líquido intersticial o intracelular. Normalmente, los sistemas incluyen un dispositivo de medición que analiza una muestra que reside en un sensor de prueba. La muestra está normalmente en forma líquida y además de ser un líquido biológico, puede ser el derivado de un líquido biológico, tal como un extracto, una dilución, un filtrado o un precipitado reconstituido. El análisis realizado por el sistema de biosensor determina la presencia y/o la concentración de uno o más analitos, tales como alcohol, glucosa, ácido úrico, lactato, colesterol, bilirrubina, ácidos grasos libres, triglicéridos, proteínas, cetonas, fenilalanina o enzimas, en el líquido biológico. Por ejemplo, una persona con diabetes puede usar un sistema de biosensor para determinar el nivel de A1c o de glucosa en sangre para ajustes para la dieta y/o medicación.

15 En muestras de sangre que incluyen hemoglobina (Hb), se puede determinar la presencia y/o la concentración de hemoglobina total (THb) y hemoglobina glicada (HbA1c). HbA1c (%-A1c) es una reflexión del estado de control de glucosa en pacientes diabéticos, que proporciona percepción sobre el control de glucosa promedio durante los tres meses que precede a la prueba. Para individuos diabéticos, una medición precisa de %-A1c ayuda a determinar cómo de bien está controlando el paciente los niveles de glucosa en sangre con la dieta y/o medicación durante un plazo más largo que el proporcionado por una medida instantánea del nivel de glucosa en sangre. Ya que una medición instantánea de glucosa en sangre no indica control de glucosa en sangre excepto cuando se hace la medición.

20 Los sistemas de biosensor se pueden diseñar para analizar uno o más analitos y pueden usar diferentes volúmenes de líquidos biológicos. Algunos sistemas pueden analizar una única gota de sangre, tal como desde 0,25-15 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de volumen. Los sistemas de biosensor se pueden implementar usando dispositivos de medición de mesa, portátiles y similares. Los dispositivos de medición portátiles pueden ser de mano y permiten la identificación y/o cuantificación de uno o más analitos en una muestra. Los ejemplos de sistemas de medición portátiles incluyen los medidores Contour® de Bayer HealthCare en Tarrytown, Nueva York, mientras que ejemplos de sistemas de medición de mesa incluyen la Electrochemical Workstation disponible de CH Instruments en Austin, Texas.

25 Los sistemas de biosensor pueden usar métodos ópticos y/o electroquímicos para analizar el líquido biológico. En algunos sistemas ópticos, la concentración de analito se determina midiendo la luz que ha interactuado con o que ha sido absorbida por una especie identificable por la luz, tal como el analito o una reacción o producto formado a partir de un indicador químico que reacciona con el analito. En otros sistemas ópticos, un indicador químico fluoresce o emite luz en respuesta al analito cuando se ilumina por un haz de excitación. La luz se puede convertir en una señal de salida eléctrica, tal como corriente o potencial, que se puede procesar similarmente a la señal de salida de un sistema electroquímico. En cualquier sistema óptico, el sistema mide y correlaciona la luz con la concentración de analito de la muestra.

30 En los sistemas ópticos de absorción de luz, el indicador químico produce un producto de reacción que absorbe luz. Se puede usar un indicador químico tal como tetrazolio junto con una enzima tal como diaforasa. El tetrazolio forma normalmente formazano (un cromógeno) en respuesta a la reacción redox del analito. Un haz de entrada incidente de una fuente de luz se dirige hacia la muestra. La fuente de luz puede ser un láser, un diodo emisor de luz, o similares. El haz incidente puede tener una longitud de onda seleccionada para la absorción por el producto de reacción. Como el haz incidente pasa a través de la muestra, el producto de reacción absorbe una porción del haz incidente, atenuando o reduciendo así la intensidad del haz incidente. El haz incidente se puede reflejar de nuevo o transmitir a través de la muestra a un detector. El detector recoge y mide el haz incidente atenuado (señal de salida). La cantidad de luz atenuada por el producto de reacción es una indicación de la concentración de analito en la muestra.

35 En los sistemas ópticos generados por luz, el indicador químico fluoresce o emite luz en respuesta a la reacción redox del analito. Un detector recoge y mide la luz generada (señal de salida). La cantidad de luz producida por el indicador químico es una indicación de la concentración de analito en la muestra y se representa como una corriente o potencial del detector.

40 Un ejemplo de un sistema óptico que usa reflectancia es un sistema de %-A1c de flujo laminar que determina la concentración de hemoglobina A1c en sangre. Estos sistemas usan la química de inmunoensayo donde la sangre se introduce al sensor de prueba del sistema de biosensor donde reacciona con reactivos y entonces circula a lo largo de una membrana de reactivo. Cuando se pone en contacto con la sangre, se liberan las perlas de color recubiertas con el anticuerpo A1c y se mueven junto con la sangre a una zona de detección 1. Debido a la competición entre el A1c en la muestra de sangre y un péptido de A1c presente en la zona de detección 1 para las perlas de color, las

perlas de color no unidas al anticuerpo A1c se capturan en la zona 1 y así se detectan como la señal de A1c del cambio en la reflectancia. La hemoglobina total (THb) en la muestra de sangre también reacciona con otros reactivos de tratamiento de la sangre y se mueve aguas abajo dentro de la zona de detección 2, donde se mide a una longitud de onda diferente. Para determinar la concentración de A1c en la muestra de sangre, la señal de reflectancia es proporcional a la concentración de analito A1c (%-A1c), pero está afectada por el contenido de THb de la sangre. Para la medición de THb, sin embargo, la reflectancia en la zona 2 es inversamente proporcional a la THb (mg/mL) de la muestra de sangre, pero no se afecta apreciablemente por el contenido de A1c de la sangre.

En sistemas electroquímicos, la concentración de analito de la muestra se determina a partir de una señal eléctrica generada por una reacción de oxidación/reducción o redox del analito o una especie medible sensible a la concentración de analito cuando una señal de entrada se aplica a la muestra. La señal de entrada puede ser un potencial o corriente y puede ser constante, variable, o una combinación de los mismos, tal como cuando se aplica una señal de CA con un desplazamiento de la señal de CC. La señal de entrada se puede aplicar como un único pulso o en múltiples pulsos, secuencias o ciclos. Se puede añadir una enzima o especie similar a la muestra para potenciar la transferencia de electrones del analito durante la reacción redox. La enzima o especie similar puede reaccionar con un único analito, proporcionando así la especificidad a una porción de la señal de salida generada. Se puede usar un mediador redox como especie medible para mantener el estado de oxidación de la enzima y/o ayudar con la transferencia de electrones del analito a un electrodo. Así, durante la reacción redox, una enzima o especie similar puede transferir electrones entre el analito y el mediador redox, mientras que el mediador redox transfiere electrones entre sí mismo y un electrodo del sensor de prueba.

Los sistemas de biosensor electroquímico normalmente incluyen un dispositivo de medición que tiene contactos eléctricos que conectan con los conductores eléctricos del sensor de prueba. Los conductores se pueden fabricar de materiales conductores, tales como metales sólidos, pastas metálicas, carbono conductor, pastas de carbono conductor, polímeros conductores y similares. Los conductores eléctricos conectan con electrodos de trabajo y contraelectrodos, y pueden conectar con electrodos de referencia y/u otros electrodos que se extienden dentro de un depósito de muestra dependiendo del diseño del sensor de prueba. También se pueden extender uno o más conductores eléctricos dentro del depósito de muestra para proporcionar funcionalidad no proporcionada por los electrodos.

En muchos sistemas de biosensores, el sensor de prueba se puede adaptar para su uso fuera de, dentro de, o parcialmente dentro de un organismo vivo. Cuando se usa fuera de un organismo vivo, una muestra del líquido biológico se puede introducir en un depósito de muestra en el sensor de prueba. El sensor de prueba se puede disponer en el dispositivo de medición antes, después o durante la introducción de la muestra para análisis. Cuando está dentro o parcialmente dentro de un organismo vivo, el sensor de prueba puede estar continuamente sumergido en la muestra o la muestra puede ser intermitentemente introducida en el sensor de prueba. El sensor de prueba puede incluir un depósito que aísla parcialmente un volumen de la muestra o puede estar abierto a la muestra. Cuando está abierto, el sensor de prueba puede adoptar la forma de una fibra u otra estructura puesta en contacto con el líquido biológico. Similarmente, la muestra puede circular continuamente a través del sensor de prueba, tal como para monitorización continua, o ser interrumpida, tal como para monitorización intermitente, para análisis.

El dispositivo de medición de un sistema de biosensor electroquímico aplica una señal de entrada a través de los contactos eléctricos a los conductores eléctricos del sensor de prueba. Los conductores eléctricos transportan la señal de entrada a través de los electrodos en la muestra presente en el depósito de muestra. La reacción redox del analito genera una señal de salida eléctrica en respuesta a la señal de entrada. La señal de salida eléctrica del sensor de prueba puede ser una corriente (como se genera por amperometría o voltametría), un potencial (como se genera por potenciometría/galvanometría), o una carga acumulada (como se genera por culombimetría). El dispositivo de medición puede tener la capacidad de procesamiento para medir y correlacionar la señal de salida con la presencia y/o la concentración de uno o más analitos en la muestra.

En la culombimetría, se aplica un potencial a la muestra para oxidar o reducir exhaustivamente el analito. Un sistema de biosensor que usa culombimetría se describe en la patente de EE. UU. Nº 6.120.676. En la amperometría, se aplica una señal eléctrica de potencial constante (tensión) a los conductores eléctricos del sensor de prueba mientras que la señal de salida medida es una corriente. Los sistemas de biosensor que usan amperometría se describen en las patentes de EE. UU. Nº 5.620.579; 5.653.863; 6.153.069; y 6.413.411. En la voltametría, se aplica una señal eléctrica de potencial variable a una muestra de líquido biológico, mientras que la salida medida es corriente. En la amperometría controlada y la voltametría controlada, se usan entradas pulsadas como se describe en los documentos de patente WO 2007/013915 y WO 2007/040913, respectivamente.

Las señales de salida primarias son sensibles a la concentración de analito de la muestra y se obtienen de una señal de entrada analítica. Las señales de salida que son sustancialmente independientes de las señales sensibles a la concentración de analito de la muestra incluyen señales sensibles a la temperatura y señales sustancialmente sensibles a interferentes, tales como el contenido de hematocrito o acetaminofeno de una muestra de sangre cuando el analito es, por ejemplo, glucosa. Las señales de salida sustancialmente no sensibles a la concentración de analito se pueden denominar señales de salida secundarias, ya que no son señales de salida primarias sensibles a la alteración de la luz por el analito o indicador sensible al analito, la reacción redox electroquímica del analito, o la reacción redox electroquímica del mediador redox sensible al analito. Las señales de salida secundarias son sensibles

a las características físicas o medioambientales de la muestra biológica. Las señales de salida secundarias pueden surgir de la muestra o de otras fuentes, tales como un termopar que proporciona una estimación de una característica medioambiental de la muestra. Así, las señales de salida secundarias se pueden determinar a partir de la señal de entrada analítica o de otra señal de entrada.

- 5 Cuando surgen de la muestra, las señales de salida secundarias se pueden determinar a partir de los electrodos usados para determinar la concentración de analito de la muestra, o de electrodos adicionales. Los electrodos adicionales pueden incluir la misma composición de reactivo que los electrodos usados para determinar la concentración de analito de la muestra, una composición diferente de reactivo, o sin composición de reactivo. Por ejemplo, se puede usar una composición de reactivo que reacciona con un interferente o se puede usar un electrodo que carece de composición de reactivo para estudiar una o más características físicas de la muestra, tales como el hematocrito de sangre completa.

10 Durante el análisis de muestras, puede haber más de un estímulo que afecta la señal de salida primaria analizada por el dispositivo de medición. Estos estímulos incluyen la concentración de analito de la muestra, las características físicas de la muestra, los aspectos medioambientales de la muestra, las variaciones de fabricación entre los lotes de sensores de prueba y similares. Puesto que el objetivo principal del análisis es determinar la presencia y/o la concentración del analito en la muestra, la concentración de analito de la muestra se denomina el estímulo principal. Todos los otros estímulos que afectan la señal de salida se denominan estímulos externos. Así, las señales de salida primarias incluyen un efecto principal del estímulo principal - la concentración de analito de la muestra - pero también incluyen cierto efecto de uno o más estímulos externos. A diferencia, las señales de salida secundarias incluyen un efecto principal de uno o más estímulos externos, y pueden o pueden no incluir un efecto principal del estímulo principal.

15 El rendimiento de medición de un sistema de biosensor se define en términos de exactitud y precisión. La exactitud refleja los efectos combinados de componentes de error sistemático y aleatorio. El error sistemático, o veracidad, es la diferencia entre el valor promedio determinado del sistema de biosensor y uno o más valores de referencia aceptados para la concentración de analito del líquido biológico. La veracidad se puede expresar en términos de sesgo medio, representando valores de sesgo medio más grandes menor veracidad y contribuyendo así a menos exactitud. La precisión es la proximidad de acuerdo entre las lecturas de múltiples análisis en relación con una media. Uno o más errores en el análisis contribuyen al sesgo y/o la imprecisión de la concentración de analito determinada por el sistema de biosensor. Una reducción en el error del análisis de un sistema de biosensor conduce, por tanto, a un aumento en la exactitud y/o precisión y así a una mejora en el rendimiento de la medición.

20 El sesgo se puede expresar en términos de "sesgo absoluto" o "porcentaje de sesgo". El sesgo absoluto es la diferencia entre la concentración determinada y la concentración de referencia, y se puede expresar en las unidades de la medición, tal como mg/dL, mientras que el porcentaje de sesgo se puede expresar como un porcentaje del valor de sesgo absoluto con respecto a la concentración de referencia, o expresar como un porcentaje del sesgo absoluto con respecto o al valor de concentración de corte o la concentración de referencia de la muestra. Por ejemplo, si el valor de concentración de corte es 100 mg/dL, entonces para concentraciones de glucosa inferiores a 100 mg/dL, el porcentaje de sesgo se define como (el sesgo absoluto con respecto a 100 mg/dL) \* 100; para concentraciones de glucosa de 100 mg/dL y más altas, el porcentaje de sesgo se define como el sesgo absoluto con respecto al valor de referencia aceptado de la concentración de analito \* 100.

25 Los valores de referencia aceptados para el analito glucosa en muestras de sangre se obtienen preferentemente con un instrumento de referencia, tal como el YSI 2300 STAT PLUS™ disponible de YSI Inc., Yellow Springs, Ohio. Se pueden usar otros instrumentos de referencia y formas de determinación del porcentaje de sesgo para otros análisis. Para las mediciones de %A1c, el error se puede expresar como el sesgo absoluto o el porcentaje de sesgo frente al valor de referencia de %A1c para el intervalo terapéutico de 4 – 12 %. Los valores de referencia aceptados para el %A1c en muestras de sangre se pueden obtener con un instrumento de referencia, tal como el instrumento Tosoh G7 disponible de Tosoh Corp, Japón.

30 El sesgo de hematocrito se refiere a la diferencia promedio (error sistemático) entre la concentración de referencia de glucosa obtenida con un instrumento de referencia y las lecturas experimentales de glucosa obtenidas del dispositivo de medición y el sensor de prueba de un sistema de biosensor para muestras que contienen niveles de hematocrito diferentes. La diferencia entre la referencia y los valores obtenidos del sistema de biosensor resulta del nivel de hematocrito variable entre muestras de sangre específicas y se puede expresar, en general, como un porcentaje del siguiente modo: % de sesgo de Hct =  $100 \% \times (G_m - G_{ref})/G_{ref}$ , donde  $G_m$  es la concentración de glucosa determinada a un nivel de hematocrito específico y  $G_{ref}$  es la concentración de referencia de glucosa a un nivel de hematocrito de muestra. Cuanto más grande sea valor absoluto del % de sesgo de Hct, más reduce la exactitud del nivel de hematocrito de la muestra (expresado como % de Hct, el porcentaje de volumen de glóbulos rojos/volumen de muestra) la exactitud de la concentración de glucosa determinada del sistema de biosensor.

35 Por ejemplo, si se analizan diferentes muestras de sangre que contienen idénticas concentraciones de glucosa, pero que tienen niveles de hematocrito de 20, 40 y 60 %, se informarán tres concentraciones de glucosa diferentes por un sistema de biosensor basado en un conjunto de constantes de calibración (pendiente y ordenada en el origen de la muestra de sangre que contiene 40 % de hematocrito, por ejemplo). Así, aún cuando la concentración de glucosa de

las diferentes muestras de sangre sea la misma, el sistema informará que la muestra de 20 % de hematocrito contiene más glucosa que la muestra de 40 % de hematocrito, y que la muestra de 60 % de hematocrito contiene menos glucosa que la muestra de 40 % de hematocrito. La "sensibilidad del hematocrito" es una expresión del grado al que los cambios en el nivel de hematocrito de una muestra afectan los valores de sesgo para un análisis realizado con el sistema de biosensor. La sensibilidad del hematocrito se puede definir como los valores numéricos de los porcentajes de sesgo por porcentaje de hematocrito, así sesgo/ % de sesgo por % de Hct.

Los sistemas de biosensor pueden proporcionar una señal de salida durante el análisis del líquido biológico que incluye el error de múltiples fuentes de error. Estas fuentes de error contribuyen al error total, que se puede reflejar en una señal de salida anormal, tal como cuando una o más porciones o toda la señal de salida es insensible o inapropiadamente sensible a la concentración de analito de la muestra.

El error total en la señal de salida se puede originar a partir de uno o más contribuyentes al error, tales como las características físicas de la muestra, los aspectos medioambientales de la muestra, las condiciones de operación del sistema, la variación de la fabricación entre los lotes de sensores de prueba y similares. Las características físicas de la muestra incluyen concentración de hematocrito (glóbulos rojos), sustancias interferentes, tales como lípidos y proteínas, y similares. Las sustancias interferentes para los análisis de glucosa también pueden incluir ácido ascórbico, ácido úrico, acetaminofeno y similares. Los aspectos medioambientales de la muestra incluyen temperatura, contenido de oxígeno del aire y similares. Las condiciones de operación del sistema incluyen condiciones de bajo nivel de llenado cuando el tamaño de la muestra no es suficientemente grande, llenado lento del sensor de prueba por la muestra, contacto eléctrico intermitente entre la muestra y uno o más electrodos del sensor de prueba, degradación de los reactivos que interactúan con el analito después de que se fabricara el sensor de prueba y similares. Las variaciones de fabricación entre los lotes de sensores de prueba incluyen cambios en la cantidad y/o la actividad de los reactivos, cambios en el área del electrodo y/o separación, cambios en la conductividad eléctrica de los conductores y electrodos, y similares. Un lote de sensores de prueba se fabrica preferentemente en una única serie de fabricación donde se reduce o elimina sustancialmente la variación de la fabricación lote a lote. Puede haber otros contribuyentes o una combinación de contribuyentes al error que provoquen error en el análisis.

El porcentaje de sesgo, el porcentaje de sesgo medio, el porcentaje de desviación estándar (DE) del sesgo, el porcentaje de coeficiente de variación (%-CV) y la sensibilidad del hematocrito son formas independientes de expresar el rendimiento de medición de un sistema de biosensor. Se pueden usar formas adicionales para expresar el rendimiento de la medición de un sistema de biosensor.

El porcentaje de sesgo es una representación de la exactitud del sistema de biosensor en relación con una concentración de referencia de analito, mientras que el porcentaje de desviación estándar del sesgo refleja la exactitud de múltiples análisis, con respecto al error que surge de las características físicas de la muestra, los aspectos medioambientales de la muestra, las condiciones de operación del sistema y las variaciones de fabricación entre sensores de prueba. Así, una disminución en el porcentaje de desviación estándar del sesgo representa un aumento en el rendimiento de la medición del sistema de biosensor en múltiples análisis. El porcentaje de coeficiente de variación se puede expresar como  $100 \times (\text{DE de un conjunto de muestras}) / (\text{promedio de múltiples lecturas tomadas del mismo conjunto de muestras})$  y refleja la precisión de múltiples análisis. Así, una disminución en el porcentaje de desviación estándar del sesgo representa un aumento en el rendimiento de la medición del sistema de biosensor en múltiples análisis.

El aumento del rendimiento de la medición del sistema de biosensor por reducción del error de estas u otras fuentes significa que se puede usar más de las concentraciones de analito determinadas por el sistema de biosensor para la terapia precisa por el paciente cuando se monitoriza, por ejemplo, la glucosa en sangre. Además, también puede reducir la necesidad de que el paciente deseche sensores de prueba y repita el análisis.

Los sistemas de biosensor pueden tener una única fuente de señales de salida no compensadas sensibles a una reacción redox o basada en luz del analito, tal como los contraelectrodos y electrodos de trabajo de un sistema electroquímico. Los sistemas de biosensor también pueden tener la capacidad opcional de determinar o estimar la temperatura, tal como con uno o más termopares u otros medios. Además de estos sistemas, los sistemas de biosensor también pueden tener la capacidad de generar señales de salida secundarias externas a las del analito o de un mediador sensible al analito. Por ejemplo, en un sensor de prueba electroquímico, uno o más conductores eléctricos también se pueden extender dentro del depósito de muestra para proporcionar la funcionalidad no proporcionada por los electrodos de trabajo y contraelectrodos. Dichos conductores pueden carecer de uno o más de los reactivos de electrodo de trabajo, tales como el mediador, permitiendo así la resta de una señal interferente de fondo de la señal del electrodo de trabajo.

Muchos sistemas de biosensor incluyen uno o más métodos para compensar los errores asociados a un análisis, intentando así mejorar el rendimiento de la medición del sistema de biosensor. Los métodos de compensación pueden aumentar el rendimiento de la medición de un sistema de biosensor proveyendo el sistema de biosensor con la capacidad de compensar el error en el análisis, aumentando así la exactitud y/o la precisión de los valores de concentración obtenidos del sistema. Los métodos convencionales de compensación de errores para contribuyentes al error físico y medioambiental se desarrollan tradicionalmente en un laboratorio ya que estos tipos de errores pueden ser reproducidos en un entorno controlado.

Cómo se calibra el dispositivo de medición del sistema de biosensor en el laboratorio afecta el rendimiento de la medición del sistema en manos del usuario. Así, una preocupación constante en el contexto del calibrado de un dispositivo de medición es la de todos los parámetros de error que pueden afectar el rendimiento de la medición del dispositivo de medición en uso, parámetros de error que se deben calibrar en el laboratorio antes de que se use el dispositivo de medición para analizar la concentración de analito de muestras.

Los parámetros de error son variables cuyos valores se determinan a partir del análisis, tales como las señales intermedias de la señal de salida primaria, o de señales de salida secundarias independientes de la señal de salida sensible al analito, tales como termopares, electrodos adicionales y similares. Los parámetros de error pueden ser cualquier variable sensible a uno o más errores en la señal de salida. Así, estas variables con sus valores discretos pueden ser las corrientes o potenciales medidos a partir de las señales intermedias de una señal de salida primaria, o de señales de salida secundarias, tales como de las corrientes de termopar o tensiones, corrientes de electrodo adicionales o tensiones, y similares. Se pueden determinar otros parámetros de error a partir de estas u otras señales de salida primarias o secundarias.

Puede resultar un punto de rendimiento decreciente o incluso rendimiento de medición más pobre si el dispositivo de medición se calibra para demasiados parámetros de error o muchos o parámetros de error no óptimos. Además, cuantos más parámetros se consideren en la calibración, menos útil puede ser la información de calibración guardada en el dispositivo de medición para la posterior compensación del análisis a partir de los parámetros de error determinados durante el análisis. Estos problemas de calibración se vuelven incluso más complejos cuando el análisis que se realiza incluye múltiples señales de salida que incluyen señales sensibles a la concentración de analito (señales de salida primarias) y/o señales no sensibles al analito (señales de salida secundarias). La presente invención evita o mejora al menos algunas de las desventajas de los dispositivos de medición usando técnicas de calibración convencionales. El documento WO 2011/156152 A1 desvela un sistema de biosensor que determina la concentración de analito a partir de señales de salida analíticas y/o secundarias, en donde el sistema de biosensor ajusta una correlación para determinar las concentraciones de analito a partir de señales de salida con una o más funciones de índice extraídas de las señales de salida. El documento WO 2011/119533 A1 se refiere a un sistema de biosensor que determina la concentración de analito a partir de una señal de salida generada a partir de una especie identificable por luz o una reacción redox del analito, en donde el sistema de biosensor compensa al menos el 50 % del error total en la señal de salida con una función primaria y compensa una porción del error restantes con una función residual. A partir del documento WO 2009/108239 A2, se conoce un sistema de biosensor que determina la concentración de analito a partir de una señal de salida generada a partir de una especie identificable por la luz o una reacción redox del analito en donde el sistema de biosensor ajusta una correlación para determinar concentraciones de analito a partir de señales de salida con una o más funciones de índice extraídas de las señales de salida. Además, el documento WO 2010/077660 A1 desvela un sistema de biosensor que determina la concentración de analito a partir de una señal de salida generada a partir de una especie identificable por luz o una reacción redox del analito en donde el sistema de biosensor ajusta una correlación para determinar las concentraciones de analito de señales de salida o concentraciones de analito determinadas con una o más funciones de índice complejas extraídas de las señales de salida o de otras fuentes. Con el tiempo, los documentos EP 1978 361 A1 y WO 2013/043839 A1 desvelan sistemas de biosensor adicionales.

## SUMARIO

La invención se define por las reivindicaciones independientes. Un método de calibración de un dispositivo de medición de un sistema de biosensor según la reivindicación 1 comprende para cada una de al menos dos concentraciones de analito diferentes de muestras de referencia, medir al menos dos señales de salida sensibles al analito, estando las señales de salida sensibles al analito afectadas por dos estímulos que incluyen un estímulo primario en forma de una concentración de analito de la muestra de referencia de cada muestra de referencia, y un estímulo externo resultante de una o más de una característica física, un aspecto medioambiental, o un error de variación de la fabricación incorporado en las señales de salida sensibles al analito, en donde la medición se realiza a al menos dos niveles de estímulo externo diferentes; medir, a partir de cada muestra de referencia, una señal de salida sensible asociada al estímulo externo y que está en forma de una señal de salida sensible al estímulo externo; cuantificar la señal de salida sensible al estímulo externo para proporcionar al menos dos valores cuantificados de estímulo externo; determinar una relación de normalización a partir de las señales de salida sensibles al analito y los dos valores cuantificados de estímulo externo, siendo la relación de normalización determinada a una única concentración de analito de la muestra seleccionada de las concentraciones de analito de la muestra de referencia; determinar un valor normalizado a partir de la relación de normalización entrando los valores cuantificados de estímulo externo en la relación de normalización; dividir las señales de salida sensibles al analito entre el valor de normalización para proporcionar señales de salida sensibles al analito normalizadas;

para al menos dos concentraciones de analito diferentes, determinar una correlación de referencia normalizada entre las dos señales de salida sensibles al analito normalizadas y las concentraciones de analito de la muestra de referencia por una técnica de regresión, proporcionando la correlación de referencia normalizada un efecto de estímulo reducido en el que los dos estímulos se reducen solo al estímulo primario; y guardar la relación de normalización y la correlación de referencia normalizada en el dispositivo de medición. En un aspecto, la divulgación proporciona un método de determinación de una concentración de analito en una muestra que incluye generar al menos una señal de salida de una muestra; medir al menos un valor de señal de salida sensible al analito de la al menos una señal de salida, donde

5 el al menos un valor de señal de salida sensible al analito está afectado por al menos un estímulo externo; medir al menos una señal de salida sensible al estímulo externo de la muestra; determinar al menos un valor de estímulo externo cuantificado en respuesta a la al menos una señal de salida del estímulo externo; determinar al menos un valor de normalización de al menos una relación de normalización; determinar al menos un valor de señal de salida sensible al analito normalizada en respuesta a al menos un valor de señal de salida sensible al analito y a al menos un valor de normalización; y determinar al menos una concentración de analito en la muestra en respuesta a la al menos una correlación de referencia normalizada y la al menos una señal de salida sensible al analito normalizada.

10 En otro aspecto de la divulgación, existe un método de calibración de un dispositivo de medición de un sistema de biosensor que incluye medir al menos dos señales de salida sensibles al analito de una muestra, donde las señales de salida sensibles al analito están afectadas por al menos un estímulo externo; determinar una correlación de referencia entre al menos una concentración de analito de la muestra de referencia y las al menos dos señales de salida sensibles al analito; medir al menos una señal de salida sensible al estímulo externo de la muestra; determinar al menos dos valores cuantificados de estímulo externo de la al menos una señal de salida sensible al estímulo externo; determinar una relación de normalización entre las al menos dos señales de salida sensibles al analito y los al menos dos valores cuantificados de estímulo externo; determinar un valor de normalización a partir de la relación de normalización y los al menos dos valores cuantificados de estímulo externo; determinar al menos dos señales de salida sensibles al analito normalizadas a partir de las al menos dos señales de salida sensibles al analito y el valor de normalización; y determinar una correlación de referencia normalizada entre las al menos dos señales de salida sensibles al analito normalizadas y la al menos una concentración de analito de la muestra de referencia.

20 En otro aspecto de la divulgación, existe un dispositivo de medición de analitos que incluye circuitería eléctrica conectada a una interfaz de sensor, donde la circuitería eléctrica incluye un procesador conectado a un generador de señales y un medio de almacenamiento; donde el procesador es capaz de medir al menos un valor de señal de salida sensible al analito de una muestra, donde el al menos un valor de señal de salida sensible al analito está afectado por al menos un estímulo externo; donde el procesador es capaz de medir al menos una señal de salida sensible al estímulo externo de la muestra; donde el procesador es capaz de determinar al menos un valor de estímulo externo cuantificado en respuesta a la al menos una señal de salida del estímulo externo; donde el procesador es capaz de determinar al menos un valor de normalización a partir de al menos una relación de normalización; donde el procesador es capaz de determinar al menos un valor de señal de salida sensible al analito normalizada en respuesta a al menos un valor de señal de salida sensible al analito y a al menos un valor de normalización; y donde el procesador es capaz de determinar al menos una concentración de analito en la muestra en respuesta a la al menos una correlación de referencia normalizada y la al menos una señal de salida sensible al analito normalizada.

35 En otro aspecto de la divulgación, existe un sistema de biosensor para determinar una concentración de analito en una muestra que incluye un sensor de prueba que tiene una interfaz de muestra adyacente a un depósito formado por una base, donde el sensor de prueba es capaz de generar al menos una señal de salida de una muestra; y un dispositivo de medición que tiene un procesador conectado a una interfaz de sensor, teniendo la interfaz de sensor comunicación eléctrica con la interfaz de muestra, y teniendo el procesador comunicación eléctrica con un medio de almacenamiento; donde el procesador es capaz de medir al menos un valor de señal de salida sensible al analito de la al menos una señal de salida, donde el al menos un valor de señal de salida sensible al analito está afectado por al menos un estímulo externo; donde el procesador es capaz de medir al menos una señal de salida sensible al estímulo externo de la muestra; donde el procesador es capaz de determinar al menos un valor de estímulo externo cuantificado en respuesta a la al menos una señal de salida del estímulo externo; donde el procesador es capaz de determinar al menos un valor de normalización a partir de al menos una relación de normalización; donde el procesador es capaz de determinar al menos un valor de señal de salida sensible al analito normalizada en respuesta a el al menos un valor de señal de salida sensible al analito y el al menos un valor de normalización; y donde el procesador es capaz de determinar al menos una concentración de analito en la muestra en respuesta a la al menos una correlación de referencia normalizada y la al menos una señal de salida sensible al analito normalizada.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La invención se puede entender mejor con referencia a los siguientes dibujos y la descripción. Los componentes en las figuras no están necesariamente a escala, poniéndose en su lugar énfasis en ilustrar los principios de la invención.

50 La FIG. A representa un método de calibración de determinación de la información de calibración para incorporación en un dispositivo de medición con un efecto de estímulo externo reducido.

La FIG. B representa un método de calibración óptimo que también considera un segundo estímulo externo con la información de calibración.

55 La FIG. C representa un método de análisis de determinación de la concentración de analito de una muestra con un efecto de estímulo externo reducido usando una correlación de referencia normalizada.

La FIG. 1A muestra las señales de reflectancia de A1c registradas a partir del/de los detector/es de la zona 1 del dispositivo de medición frente a las concentraciones de analito de la muestra de referencia (%-A1c) a cuatro concentraciones de THb (hemoglobina total) (85 mg/mL, 125 mg/mL, 175 mg/mL y 230 mg/mL).

- La FIG. 1B muestra las señales de salida de THb comparativamente constantes a cuatro niveles de concentraciones de muestras de referencia de THb (85 mg/mL, 125 mg/mL, 175 mg/mL y 230 mg/mL) como se determina a partir de los detectores de la zona 2 del dispositivo de medición.
- 5 La FIG. 1C muestra las señales de reflectancia de A1c individuales registradas a partir del/de los detector/es de la zona 1 del dispositivo de medición separados para las cuatro concentraciones de THb diferentes en muestras de sangre.
- La FIG. 1D también proporciona un ejemplo de la determinación de la relación de normalización 140, que establece la correlación entre las señales de salida sensibles al estímulo externo sintetizadas a una única concentración de A1c y las señales de salida secundarias sensibles a las concentraciones de THb de la muestra.
- 10 La FIG. 1E proporciona un ejemplo de la determinación de señales de salida sensibles al analito normalizadas a partir del valor de normalización.
- La FIG. 1F proporciona un ejemplo de la determinación de una correlación de referencia normalizada a partir de la combinación de los valores de señal de salida sensible al analito normalizada de la FIG. 1E.
- 15 La FIG. 1G proporciona otro ejemplo de la determinación de una correlación de referencia normalizada a partir de los valores de señal de salida sensible al analito normalizada de la FIG. 1E.
- La FIG. 1H compara las señales de salida sensibles al analito normalizadas con la correlación de referencia normalizada en forma de una curva de calibración normalizada de la FIG. 1G superponiendo los valores de señal de salida sensible al analito normalizada sobre la curva.
- 20 La FIG. 2A representa las relaciones de normalización para ambos canales de un dispositivo de medición de A1c que tiene dos canales de detección.
- La FIG. 2B representa las curvas de calibración normalizadas individuales para Ch1 y Ch3 del dispositivo de medición de A1c.
- La FIG. 2C muestra las señales de reflectancia de A1c normalizadas de los dos canales individuales (Ch1 y Ch3) para las muestras de referencia.
- 25 La FIG. 3A representa las corrientes obtenidas del dispositivo de medición frente a las concentraciones de analito de la muestra de referencia para glucosa a diferentes temperaturas y 40 % de Hct.
- La FIG. 3B separa estas corrientes de señales de salida primarias por la temperatura a la que se registraron.
- La FIG. 3C muestra las correlaciones entre las señales de salida sensibles al estímulo externo sintetizadas obtenidas a dos concentraciones de glucosa individuales separadas de 100 y 500 mg/dL frente al estímulo externo cuantificado (temperaturas) para determinar las relaciones de normalización.
- 30 La FIG. 3D proporciona un ejemplo de la determinación de señales de salida sensibles al analito normalizadas a partir del valor de normalización a 100 mg/dL.
- La FIG. 3E proporciona un ejemplo de la determinación de una correlación de referencia normalizada a partir de los valores de señal de salida sensible al analito normalizada de la FIG. 3D.
- 35 La FIG. 3F representa el % de sesgo atribuible a las diferentes temperaturas (6,0 °C, 10,9 °C, 15,9 °C, 22,0 °C, 30,4 °C, 35,1 °C y 40,0 °C) antes y después de la normalización.
- La FIG. 4A muestra las corrientes de señales de salida del dispositivo de medición para muestras de referencia que incluyen concentraciones de glucosa conocidas para las temperaturas probadas (6,0 °C, 10,9 °C, 15,9 °C, 22,0 °C, 30,4 °C, 35,1 °C y 40,0 °C) y para las concentraciones de muestra de referencia de Hct probadas (0 %, 20 %, 40 %, 55 %, 70 %).
- 40 La FIG. 4B representa las relaciones de normalización de temperatura a 40 % de Hct y a dos concentraciones de glucosa individuales separadas de 100 y 500 mg/dL en muestra de sangre, y es la misma que se representó previamente en la FIG. 3C, ya que se está realizando la misma reducción del estímulo de temperatura.
- La FIG. 4C representa los valores de temperatura de las señales de salida sensibles al analito normalizadas de la FIG. 4A frente a la concentración de analito de la muestra de referencia para glucosa a las concentraciones de muestra de referencia de Hct probadas en este ejemplo.
- 45 La FIG. 4D representa las señales sintetizadas determinadas a partir de la señal de salida secundaria sensible a la concentración de hematocrito de la muestra frente a la temperatura para muestras de referencia que incluyen un 40 % de concentración de hematocrito.

La FIG. 4E muestra la correlación de referencia normalizada a la temperatura para Hct donde se representó el % de concentraciones de Hct de la muestra de referencia frente a las corrientes de salida del electrodo de Hct normalizadas a la temperatura.

5 La FIG. 4F representa la segunda relación de normalización determinada entre las señales de salida sensibles al analito normalizadas a la temperatura resultantes y los valores de % de Hct de la muestra de referencia - el segundo estímulo externo.

La FIG. 4G representa gráficamente la reducción en el error introducida por el estímulo externo de hematocrito como se representa en la FIG. 4C proporcionada mediante el uso de la temperatura y los valores de Hct de las señales de salida sensibles al analito normalizadas a la concentración de glucosa seleccionada de 100 mg/dL.

10 La FIG. 4H proporciona un ejemplo de la determinación de una correlación de referencia normalizada a partir de la combinación de la temperatura y los valores de hematocrito de las señales de salida sensibles al analito normalizadas de la FIG. 4G.

15 La FIG. 4I representa gráficamente el % de sesgo de las concentraciones de analito que se determinaron por un dispositivo de medición usando un correlación de referencia convencional (% sesgo\_bruto), una correlación de referencia normalizada a la temperatura (% sesgo\_T) y una correlación de referencia normalizada a la temperatura y Hct (% sesgo\_T/Hct).

La FIG. 5 representa una representación esquemática de un sistema de biosensor que determina una concentración de analito en una muestra de un líquido biológico.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

20 Los dispositivos de medición en sistemas de biosensor que se usan para determinar la presencia y/o la concentración de un analito en una muestra incluyen la información de calibración normalizada que se relaciona con la señal o las señales de salida que el dispositivo genera en respuesta a la concentración de analito de la muestra a concentraciones de analito de la muestra de referencia previamente determinadas. Los dispositivos de medición usan esta la información de calibración normalizada para relacionar una o más señales de salida de un análisis electroquímico u óptico de una muestra con la presencia y/o la concentración de uno o más analitos en la muestra.

La presente solicitud desvela métodos para determinar la información de calibración normalizada en una fábrica, laboratorio o entorno similar para su uso en el análisis de muestras de concentración (concentraciones) de analito, métodos para determinar la concentración (concentraciones) de analito de una muestra usando la información de calibración normalizada que se almacena en un dispositivo de medición de un sistema de biosensor para su uso durante el análisis de muestras, y un sistema de biosensor que usa la información de calibración normalizada para determinar la presencia y/o la concentración del (de los) analito(s) en la muestra. Esta información de calibración normalizada incluye una relación de normalización usada para determinar señales de salida normalizadas de señales de salida medidas y una correlación de referencia normalizada que relaciona las señales de salida normalizadas determinadas durante el análisis con una concentración de analito de la muestra de referencia. La información de calibración normalizada es útil en sistemas de biosensor que generan al menos una señal de salida primaria sensible a un analito, pero incluyen o están afectadas por error de al menos un estímulo externo y que generan al menos una señal de salida secundaria sensible a al menos un estímulo externo.

40 Durante el análisis de muestras, el estímulo primario y uno o más estímulos externos afectan la una o más señales de salida analizadas por el dispositivo de medición. El estímulo primario es la concentración de analito de la muestra. El estímulo externo incluye todos los otros estímulos (excepto la concentración de analito) que afectan la señal de salida, tal como las características físicas de la muestra, los aspectos medioambientales de la muestra, las variaciones de fabricación entre los lotes de sensores de prueba y similares. La una o más señales de salida analizadas por el dispositivo de medición pueden incluir señales de salida primarias y señales de salida secundarias. Las señales de salida primarias incluyen un efecto importante del estímulo primario, la concentración de analito de la muestra, pero también incluyen algún efecto de uno o más estímulos externos. A diferencia, las señales de salida secundarias incluyen un efecto importante de los estímulos externos, y puede o puede no incluir un efecto importante del estímulo primario. Preferentemente, las señales de salida secundarias son únicamente sensibles al uno o más estímulos externos.

50 La medición de %-A1c en muestras de sangre, así la concentración de hemoglobina glicada (%-A1c o A1c) en el contenido de hemoglobina total (THb) de una muestra de sangre, se puede llevar a cabo por un método de inmunoensayo usando un análisis de flujo laminar. Convencionalmente, en el análisis de flujo laminar se miden dos señales independientes, las señales de salida primarias para A1c y las señales de salida secundarias para THb. En este tipo de sistema de A1c, los detectores de la zona 1 proporcionan la señal de salida primaria mientras que los detectores de la zona 2 proporcionan la señal de salida secundaria. Las señales de salida primarias del/de los detector/es de la zona 1 dependen de la concentración de A1c de la muestra, pero también de la concentración de THb de la muestra. Las señales de salida secundarias del/de los detector/es de la zona 2 dependen de la concentración de THb de la muestra, pero son sustancialmente independientes de la concentración de A1c de la muestra.

La calibración convencional en estos sistemas se centra en establecer una relación entre el valor de %-A1c conocido de muestras de referencia, las señales de salida primaria de reflectancia determinadas a partir del/de los detector/es de la zona 1 del dispositivo de medición sensible a A1c cuando estas muestras se analizan por el sistema de biosensor, y las señales de salida secundaria de reflectancia determinadas del/de los detector/es de la zona 2 del dispositivo de medición sensible al contenido de THb de la muestra cuando estas muestras se analizan por el sistema de biosensor. Así, existen tres estímulos para la posible consideración en la determinación de la información de calibración a guardar en el dispositivo de medición para uso posterior durante un análisis (concentración de analito de la muestra de referencia, señales de salida primarias del dispositivo de medición y las señales de salida secundarias del dispositivo de medición).

A diferencia de dichos métodos convencionales, un beneficio significativo de los métodos de calibración presentemente desvelados en un sistema de biosensor de A1c surge de la capacidad para usar la información de calibración determinada en el laboratorio después de las técnicas de compensación cuando dos de los estímulos (concentración de analito de la muestra de referencia (%-A1c, estímulo primario) y señales de salida secundarias de THb (un estímulo externo)) se reducen a uno (concentración de analito de la muestra de referencia para %-A1c). Un método de realización de esta reducción de estímulos es mediante los métodos de normalización descritos.

El método de normalización reduce la dependencia de la señal de salida primaria de A1c del dispositivo de medición sobre la concentración de THb de la muestra generando una señal de salida normalizada de los valores de reflectancia sensibles a A1c determinados por el dispositivo de medición. Entonces, se determina una correlación de referencia normalizada entre las señales de salida normalizadas generadas y las concentraciones de analito de la muestra de referencia. La relación de normalización usada para determinar las señales de salida normalizadas y la correlación de referencia normalizada se guardan en el dispositivo de medición. En uso, las señales de salida primarias medidas del/de los detector/es de la zona 1 del dispositivo de medición como se normalizaron por el procedimiento de normalización descrito siguen siendo sensibles a A1c, pero llegan a ser sustancialmente independientes de las señales de salida secundarias medidas del/de los detector/es de la zona 2 sensible/s al contenido de hemoglobina total (THb) de la muestra.

En un sistema de análisis de glucosa, la calibración se basa, en general, en establecer una relación entre las concentraciones de analito conocidas de la muestra de referencia para glucosa, las señales de salida primarias eléctricas u ópticas determinadas de la muestra y las señales de salida secundarias sensibles a la temperatura y/o el contenido de hematocrito (Hct) de la muestra. Estas señales de salida secundarias se pueden determinar de un termistor, un electrodo de Hct dedicado y similares, o de una o más estimaciones de estos valores que se originan a partir de las señales de salida primarias.

En estos sistemas de análisis de glucosa, las señales de salida primarias eléctricas u ópticas sensibles a la concentración de glucosa de la muestra también dependen de la temperatura de la muestra y/o el contenido de Hct de la muestra. La información de temperatura y de Hct proporcionada por las señales de salida secundarias del dispositivo de medición es sustancialmente independiente de la concentración de glucosa de la muestra. Así, además de la concentración de analito de la muestra de referencia, existen al menos dos (señales sensibles a glucosa y temperatura) o tres (señales sensibles a glucosa, temperatura y Hct) estímulos a considerar para determinar la información de calibración para guardar en el dispositivo de medición para uso posterior durante un análisis.

Un ejemplo de un método convencional de tratamiento de esta calibración en un sistema de glucosa es generar una línea o curva que representa la correlación de referencia entre múltiples concentraciones de analito de la muestra de referencia para glucosa y las señales de salida correspondientes del dispositivo de medición a una temperatura conocida, y/o concentración de hematocrito. Esta correlación de referencia se guarda en el dispositivo de medición para uso posterior durante el análisis. A medida que los detectores ópticos convierten la luz en una tensión y/o amperaje, este proceso es similar para sistemas de biosensor ópticos o electroquímicos. Así, se puede determinar una correlación de referencia para la concentración de analito conocida de la muestra de referencia a 20 °C y un 40 % de Hct de muestra, por ejemplo, y guardar en el dispositivo de medición. Este proceso se puede repetir para múltiples concentraciones de muestra de Hct a la temperatura seleccionada, por ejemplo, y estas correlaciones de referencia también se guardan en el dispositivo de medición. Sin embargo, en esta técnica convencional, durante el análisis, el dispositivo de medición debe seleccionar las múltiples correlaciones de referencia a usar o entre las que interpolar para un análisis específico. Así, el dispositivo de medición está intentando seleccionar la mejor correlación de referencia de las que tiene para ajustar el análisis actual - un proceso cargado de posibles problemas. El objetivo del análisis posterior de una muestra por el sistema de biosensor es transformar la señal de salida determinada por el dispositivo de medición en la concentración de analito de la muestra usando la correlación o correlaciones de referencia previamente determinadas guardadas en el dispositivo.

A diferencia de una conversión directa convencional de la señal de salida en una concentración por la correlación de referencia, surge un beneficio significativo de los métodos de calibración presentemente desvelados de la capacidad de usar la información de calibración determinada en el laboratorio guardada en el dispositivo de medición en posteriores técnicas de compensación si al menos dos de estos estímulos (concentración de analito de la muestra de referencia para señales de salida secundarias de glucosa y temperatura) se reducen a uno (concentración de analito de la muestra de referencia para glucosa). Por ejemplo, la dependencia de la temperatura de la correlación de referencia de la temperatura se puede reducir o preferentemente retirar mediante los métodos de normalización

descritos para hacer la correlación de referencia adimensional. Similarmente, también se pueden reducir o preferentemente retirar la dependencia de Hct de la correlación de referencia mediante los métodos de normalización descritos.

5 El método de normalización reduce la dependencia de la señal de salida primaria de glucosa del dispositivo de medición de la temperatura o la temperatura y el %-Hct de muestra generando una señal de salida normalizada a partir de los valores de corriente sensibles a la glucosa determinados por el dispositivo de medición. Entonces, se determina una correlación de referencia normalizada entre las señales de salida normalizadas generadas y las concentraciones de analito de la muestra de referencia. La relación de normalización usada para determinar las señales de salida normalizadas y la correlación de referencia normalizada se guardan en el dispositivo de medición. En uso, las señales de salida primarias sensibles a la glucosa como se mide por el dispositivo de medición como se normalizaron por el procedimiento de normalización descrito siguen siendo sensibles a la glucosa, pero se vuelven sustancialmente independientes de las señales de salida secundarias sensibles a la temperatura o la temperatura y el %-Hct de la muestra.

15 Para cualquier tipo de análisis, el método de normalización se puede representar por la siguiente expresión: Señal de salida normalizada = (señal sensible al analito que incluye el efecto de un estímulo primario y al menos un estímulo externo)/(al menos una señal de estímulo externo) donde el efecto del estímulo primario es el efecto que está intentado detectar y/o cuantificar el dispositivo de medición. Así, mientras que dos o más factores afectan el resultado del análisis, se normalizan uno o más factores para reducir los factores que afectan el resultado del análisis a uno. La señal de salida primaria sensible al analito puede ser la salida de reflectancia del/de los detector/es de la zona 1 de un sistema de análisis de A1c o la salida de corriente sensible a la reacción redox electroquímica de la glucosa o un mediador sensible a la concentración de glucosa en un sistema de análisis electroquímico, por ejemplo. También se pueden usar señales de salida primarias de otros tipos de análisis con el método de normalización. El estímulo externo puede ser THb en un sistema de análisis de A1c, por ejemplo, o temperatura y/o hematocrito en un sistema de análisis de glucosa, por ejemplo. Así, el estímulo externo surge de las señales de salida secundarias del análisis.

25 La FIG. A representa un método de calibración **100** de determinación de la información de calibración normalizada para incorporación en un dispositivo de medición de un sistema de biosensor con un efecto de estímulo reducido. Preferentemente, el método de calibración **100** se realiza durante la calibración de fábrica del dispositivo de medición. El método de calibración **100** también se puede realizar en un laboratorio o entorno similar. El método de calibración se puede realizar por el dispositivo de medición, uno o más dispositivos analíticos tales como un ordenador, o una combinación de los dispositivos de medición y analíticos.

35 En la medición de señales de salida sensibles al analito **110**, se miden señales de salida sensibles al analito de una muestra de referencia, donde las señales de salida sensibles al analito están afectadas por al menos un estímulo externo resultante de una característica física, un aspecto medioambiental y/o un error de variación de la fabricación que se incorpora en las señales de salida sensibles al analito. Se miden al menos dos señales de salida sensibles al analito. Preferentemente, se miden al menos cuatro, y más preferentemente al menos 6 señales de salida sensibles al analito, de la muestra de referencia. Se pueden usar métodos ópticos y/o electroquímicos para analizar las muestras de referencia. La FIG. 1A, como se trata más adelante, proporciona un ejemplo de la medición de las señales de salida sensibles al analito **110** en un sistema de análisis de A1c. La FIG. 3A, como se trata más adelante, proporciona un ejemplo de la medición de señales de salida sensibles al analito **110** en un sistema de análisis de glucosa.

40 En la determinación de la correlación de referencia **120**, se determina una correlación de referencia **122** entre una o más concentraciones de analito de la muestra de referencia **124** y una o más señales de salida. La correlación de referencia **122** relaciona las concentraciones de analito de la muestra de referencia **124** con las señales de salida como se ha determinado por el dispositivo de medición **126**. La concentración de analito de la muestra de referencia de las muestras de referencia se puede determinar usando un instrumento de referencia, mezclando o alterando concentraciones de analito de muestras conocidas, y similares.

45 En la cuantificación de estímulos externos **130**, se miden una o más señales de salida sensibles al estímulo externo a partir de las muestras de referencia y se cuantifica el estímulo externo para determinar al menos dos valores del estímulo externo cuantificado **132**. Las señales de salida sensibles al estímulo se pueden medir simultáneamente con las señales de salida sensibles al analito o en momentos diferentes. Preferentemente, las señales de salida sensibles al estímulo se miden simultáneamente con las señales de salida sensibles al analito. La FIG. 1B, como se trata más adelante, proporciona un ejemplo de estimulación del estímulo externo **130** en un sistema de análisis de A1c. En un sistema de glucosa, por ejemplo como se representa en la Tabla 3, cuando la temperatura es el estímulo externo, se realizan múltiples análisis a una temperatura diana y se promedia la temperatura real para cada análisis.

55 Las señales de estímulo externo pueden ser directamente cuantificadas, tal como cuando un detector óptico o electrodo genera una tensión específica y/o amperaje. Las señales de estímulo externo pueden ser indirectamente cuantificadas, tal como cuando un termistor proporciona una tensión específica y/o amperaje que se informa como una temperatura en grados Celsius, por ejemplo. Las señales de estímulo externo también pueden ser indirectamente cuantificadas, tal como cuando se determina la concentración de Hct de una muestra de una tensión específica y/o amperaje medido de un electrodo de Hct, por ejemplo. Las señales de estímulo externo pueden ser directa o indirectamente cuantificadas y luego modificadas para proporcionar los valores cuantificados de estímulo externo **132**,

60

tal como cuando el valor de estímulo externo directamente o indirectamente cuantificado se transforma en una concentración. Los valores cuantificados de estímulo externo **132** se pueden determinar promediando múltiples valores, tales como múltiples lecturas de temperatura registradas a la misma temperatura diana. El estímulo externo se puede cuantificar mediante otras técnicas. Por ejemplo, el método de análisis **200**, como se describe más adelante, proporciona un ejemplo de la cuantificación de estímulos externos.

En la determinación de la relación de normalización **140**, se determina una relación de normalización **142** entre las señales de salida sensibles al analito y los valores cuantificados de estímulo externo **132** para la concentración de analito de la una o más concentraciones de analito de la muestra de referencia seleccionada. Preferentemente, se aplica una técnica de regresión a las señales de salida sensibles al analito y los valores cuantificados de estímulo externo **132** para determinar la relación de normalización a una única concentración de analito seleccionada. La FIG. 1C, como se trata más adelante, proporciona un ejemplo de cómo una única concentración de analito se seleccionó en un sistema de análisis de A1c y se usó para determinar señales de salida sensibles al estímulo externo sintetizadas sensibles a las señales de estímulo externo cuantificadas para THb. La FIG. 3B, como se trata más adelante, proporciona un ejemplo de cómo se seleccionó una de las dos concentraciones de analito en un sistema de análisis de glucosa y se usó para determinar las señales de salida sensibles al estímulo externo sintetizadas sensibles a las señales de estímulo externo cuantificadas para temperatura. Así, se determinó una señal de salida sensible al estímulo externo sintetizada a partir de las señales de salida primarias a una única concentración de analito de la muestra seleccionada. La señal de salida sensible al estímulo externo sintetizada se puede considerar la señal de salida sensible al estímulo externo extraída de la señal de salida primaria combinada del dispositivo de medición que incluye tanto el estímulo primario como el externo. Similarmente, la relación de normalización **142** se puede considerar una correlación de referencia para el estímulo externo.

La FIG. 1D, como se trata más adelante, proporciona un ejemplo de cómo la determinación de la relación de normalización **140** se puede implementar en un sistema de análisis de A1c usando los valores de señal de salida sensible al estímulo externo sintetizada. Una relación de normalización de ejemplo como se determina para el sistema de análisis de A1c también se muestra en la FIG. 1D. La FIG. 3C, como se trata más adelante, proporciona un ejemplo de cómo la determinación de la relación de normalización **140** se puede implementar en un sistema de análisis de glucosa usando las señales de salida primarias sensibles al estímulo externo sintetizadas. Las relaciones de normalización de ejemplo como se determinan para el sistema de análisis de glucosa también se muestran en la FIG. 3C.

Se pueden usar técnicas de regresión lineal o no lineal (tal como polinómica) para determinar la relación de normalización **142**. Las técnicas de regresión lineal o no lineal incluyen las disponibles en los paquetes estadísticos versión 14 o versión 16 de MINITAB® (MINITAB, INC., State College, PA), Microsoft Excel, u otros paquetes de análisis estadístico que proporcionan técnicas de regresión. Preferentemente, se usa regresión polinómica para determinar la relación de normalización **142**. Por ejemplo, en la versión 2010 de MS Excel, se puede seleccionar la opción Línea de tendencia lineal accesible mediante la herramienta Gráfico de disposición de líneas de tendencia para realizar la regresión lineal, mientras que se puede elegir la opción Línea de tendencia polinómica para realizar una regresión polinómica no lineal. Se pueden usar otras técnicas de regresión para determinar la relación de normalización **142**. La relación de normalización **142** se almacena preferentemente en el dispositivo de medición como una porción de la información de calibración.

Cuando se usa regresión lineal, la relación de normalización **142** estará en forma de  $Y=mX + b$ , donde  $m$  es la pendiente y  $b$  es la ordenada en el origen de la línea de regresión. Cuando se usa regresión no lineal, la relación de normalización **142** estará en una forma de  $Y=b_2 \cdot X^2 + b_1 \cdot X + b_0$ , y similar, donde  $b_2$ ,  $b_1$  y  $b_0$  son los coeficientes del polinomio. En tanto las ecuaciones de regresión lineales como polinómicas,  $Y$  es la señal de salida sensible al estímulo externo sintetizada calculada sensible a la porción de estímulo externo de la señal de salida primaria a una única concentración de analito seleccionada, y  $X$  es las señales/valores de estímulo externo cuantificado. Cuando un valor de  $X$  (el valor de la señal de estímulo externo cuantificado) se entra en una cualquiera de las relaciones (ecuaciones lineales o polinómicas), se genera un valor  $Y$  de salida, que representa el valor de normalización (NV) a partir de la relación de normalización.

Si un segundo estímulo externo afecta adversamente las señales de salida sensibles al analito y se tratará por la información de calibración, la determinación de la relación de normalización **140** se repite para un segundo estímulo externo. Un ejemplo de cómo se puede determinar una segunda relación de normalización para tratar un segundo estímulo externo se encuentra con respecto a la FIG. 4, como se trata más adelante.

En la determinación del valor de normalización **150**, se determina un valor de normalización **152** a partir de la relación de normalización **142** entrando los valores cuantificados de estímulo externo **132** en la relación de normalización **142** y resolviendo para el valor de normalización **152**.

En la determinación de señales de salida normalizadas **160**, se determinan una o más señales de salida sensibles al analito normalizadas a partir de una o más señales de salida sensibles al analito y el valor de normalización. Preferentemente, las señales de salida sensibles al analito se dividen entre el valor de normalización **152** para proporcionar señales de salida sensibles al analito normalizadas **162**. Esto reduce preferentemente el efecto del estímulo externo sobre las señales de salida sensibles al analito. La FIG. 1E, como se trata más adelante, proporciona

un ejemplo de la determinación de señales de salida normalizadas **160** en un sistema de análisis de A1c. La FIG. 3D, como se trata más adelante, proporciona un ejemplo de la determinación de señales de salida normalizadas **160** en un sistema de análisis de glucosa a una única concentración de analito de la muestra seleccionada (100 mg/dL).

5 En la determinación de la correlación de referencia normalizada **170**, se determina una correlación de referencia normalizada **172** entre las señales de salida sensibles al analito normalizadas **162** y las concentraciones de analito de la muestra de referencia **124**. Preferentemente, se aplica una técnica de regresión a las señales de salida sensibles al analito normalizadas **162** y las concentraciones de analito de la muestra de referencia **124** para determinar la correlación de referencia normalizada **172**. Se pueden usar técnicas de regresión lineales o no lineales (tales como polinómicas), tales como las disponibles en los paquetes estadísticos de versión 14 o versión 16 de MINITAB® (MINTAB, INC., Estado College, PA), Microsoft Excel, u otro paquete de análisis estadístico que proporciona técnicas de regresión. Preferentemente, se usa regresión polinómica para determinar la correlación de referencia normalizada **172**.

15 Por ejemplo, en la versión 2010 de MS Excel, se puede seleccionar la opción Línea de tendencia lineal accesible mediante la herramienta Gráfico de disposición de líneas de tendencia para realizar análisis lineal, mientras que se puede elegir la opción Línea de tendencia polinómica para realizar un análisis polinómico no lineal. Se pueden usar otras técnicas de regresión para determinar la correlación de referencia normalizada **172**. La FIG. 1F, como se trata más adelante, proporciona un ejemplo de la determinación de la correlación de referencia normalizada **170** en un sistema de análisis de A1c. La FIG. 1G representa la correlación de referencia normalizada determinada **172** expresada como una curva de calibración normalizada. La FIG. 3E, como se trata más adelante, proporciona un ejemplo de la determinación de la correlación de referencia normalizada **170** en un sistema de análisis de glucosa.

20 Cuando se usa regresión lineal, la correlación de referencia normalizada **172** estará en forma de  $Y=mX + b$ , donde  $m$  es la pendiente y  $b$  es una ordenada en el origen de la línea de regresión. Cuando se usa regresión no lineal, tal como una polinómica, la correlación de referencia normalizada **172** pueden estar en una forma de  $Y=b_2 \cdot X^2 + b_1 \cdot X + b_0$ , y similares, donde  $b_2$ ,  $b_1$  y  $b_0$  son los coeficientes del polinomio. La correlación de referencia normalizada **172** se almacena preferentemente en el dispositivo de medición como una porción de la información de calibración para uso posterior durante el análisis de una muestra. En el dispositivo de medición,  $Y$  es el valor de la señal de salida sensible al analito normalizada determinado durante el análisis, y  $X$  es la concentración de analito de la muestra como se determina a partir de la correlación de referencia normalizada **172**. Como se trata más adelante, para la correlación de referencia normalizada lineal, se puede resolver un valor de  $X$  (la concentración de analito de la muestra) para cuando se entra un valor  $Y$  (un valor de la señal de salida normalizada) en la ecuación. Para una correlación de referencia normalizada en forma de un polinomio de 2º orden, la correlación de referencia normalizada **172** se puede expresar en forma de una curva de calibración normalizada como  $X = c_2 \cdot Y^2 + c_1 \cdot Y + c_0$  donde  $c_2$ ,  $c_1$  y  $c_0$  son los coeficientes para la ecuación. Una entrada de señal de salida normalizada a esta relación generará una concentración de analito.

25 La FIG. B representa un método de calibración óptimo **102** que considera un segundo estímulo externo con la información de calibración normalizada. El método de calibración **102** proporciona la información de calibración normalizada del segundo estímulo externo para incorporación en un dispositivo de medición de un sistema de biosensor con un efecto de estímulo reducido. Preferentemente, el método de calibración **102** también se realiza durante la calibración de fábrica del dispositivo de medición. El método de calibración **102** también se puede realizar en un laboratorio o entorno similar. El método de calibración se puede realizar por el dispositivo de medición, uno o más dispositivos analíticos tales como un ordenador, o una combinación de los dispositivos de medición y analíticos. El método de calibración **102** combina el método de calibración **100** para proporcionar la información de calibración normalizada de un primer estímulo externo y un segundo estímulo externo. Así, se pueden combinar la FIG. A y la FIG. B cuando se determina la información de calibración para el dispositivo de medición del sistema de biosensor.

30 Si se considera que un segundo estímulo externo afecta adversamente las señales de salida sensibles al analito, tal como la concentración de hematocrito de la muestra cuando el primer estímulo externo es la temperatura, se pueden determinar al menos dos valores cuantificados del segundo estímulo externo **134** de acuerdo con la cuantificación de estímulos externos **130**. La FIG. 4D y la FIG. 4E, como se trata más adelante, proporcionan un ejemplo de la determinación de valores cuantificados del segundo estímulo externo **134** en un sistema de análisis de glucosa.

35 Entonces se puede determinar una segunda relación de normalización **147** de acuerdo con la determinación de la relación de normalización **140**, pero donde la segunda relación de normalización **147** se determina entre las señales de salida sensibles al analito normalizadas **162** y los valores cuantificados del segundo estímulo externo **134** a una única concentración de analito de la muestra seleccionada. La segunda relación de normalización **147** se almacena preferentemente en el dispositivo de medición como una porción de la información de calibración. La FIG. 4F, como se trata más adelante, proporciona un ejemplo de la determinación de una segunda relación de normalización **147** en un sistema de análisis de glucosa.

40 En el caso del segundo estímulo externo, se realiza una determinación del segundo valor de normalización **155**. Se determina un segundo valor de normalización **157** a partir de la segunda relación de normalización **147** entrando los valores cuantificados del segundo estímulo externo **134** en la segunda relación de normalización **147** y resolviendo para el segundo valor de normalización **157**.

En el caso del segundo estímulo externo, se realiza una determinación de la segunda señal de salida normalizada **165**. Las segundas señales de salida sensibles al analito normalizadas **167** se determinan dividiendo las señales de salida sensibles al analito normalizadas **162** entre el segundo valor de normalización **157**. La FIG. 4G, como se trata más adelante, proporciona un ejemplo de determinación de las segundas señales de salida sensibles al analito normalizadas **167** en un sistema de análisis de glucosa.

En el caso del segundo estímulo externo, se realiza una determinación de la segunda correlación de referencia normalizada **175**. Se determina una segunda correlación de referencia normalizada **177** entre las segundas señales de salida sensibles al analito normalizadas **167** y las concentraciones de analito de la muestra de referencia **124** por una técnica de regresión, como se describe previamente. La FIG. 4H, como se trata más adelante, proporciona un ejemplo de determinación de una segunda correlación de referencia normalizada **177** en un sistema de análisis de glucosa.

La segunda correlación de referencia normalizada **177** se guarda preferentemente en el dispositivo de medición como una porción de la información de calibración. En este caso, la correlación de referencia normalizada **172** no se necesita guardar en el dispositivo de medición y preferentemente no se usa durante el análisis. Similarmente, se pueden considerar tres o más estímulos externos por la información de calibración, donde cada estímulo externo se representa por una relación de normalización individual guardada en el dispositivo de medición, además de una única correlación de referencia normalizada preparada para el estímulo externo combinado representado por las relaciones de normalización individuales.

La FIG. C representa un método de análisis **200** de determinación de la concentración de analito de una muestra con un efecto de estímulo externo reducido usando una correlación de referencia normalizada. El método de análisis **200** se realiza preferentemente cuando un usuario activa un dispositivo de medición de un sistema de biosensor para analizar una muestra, tal como sangre. Preferentemente, la muestra es sangre que incluye glóbulos rojos. Se pueden usar métodos ópticos y/o electroquímicos para analizar la muestra.

En la medición de señales de salida sensibles al analito de análisis **220**, se miden uno o más valores de señal de salida sensible al analito **222** de la muestra, donde los valores de señal de salida sensible al analito están afectados por uno o más estímulos externos, tales como una característica física, un aspecto medioambiental y/o una variación de fabricación, que da como resultado un error que se incorpora en los valores de señal de salida sensible al analito. Los valores de señal de salida sensible al analito **222** se miden a partir de una o más señales de salida generadas de la muestra usando métodos ópticos y/o electroquímicos, tales como amperometría controlada, voltametría controlada, o similares.

En la cuantificación de estímulos externos de análisis **230**, se miden una o más señales de salida sensibles al estímulo externo. Se determinan uno o más valores cuantificados de estímulo externo en respuesta a las señales de salida sensibles al estímulo externo. A partir del método **100**, se puede determinar un único o primer valor de estímulo externo cuantificado **232** en respuesta a un primer estímulo externo. Los métodos **100** y **102** se pueden combinar para determinar un primer valor de estímulo externo cuantificado **232** en respuesta a un primer estímulo externo y un segundo valor de estímulo externo cuantificado **234** en respuesta a un segundo estímulo externo. Se pueden determinar otros valores cuantificados de estímulo externo. Así, se determina un valor de estímulo externo cuantificado para cada estímulo externo tratado por la información de calibración. Se miden las señales de salida sensibles al estímulo externo cuantificado a partir de una o más señales de salida generadas de la muestra usando métodos ópticos y/o electroquímicos, tales como amperometría controlada, voltametría controlada, o similares.

En la determinación del valor de normalización de análisis **250**, se usan una o más relaciones de normalización previamente determinadas para determinar uno o más valores de normalización. Los ejemplos de relaciones de normalización previamente determinadas son la relación de normalización **142** previamente descrita y la segunda relación de normalización **147** previamente descrita. Por ejemplo, se entran uno o más de los valores de señal de salida sensible al analito **222** y el valor de estímulo externo cuantificado **232** en la relación de normalización **142**. Similarmente, se entran uno o más de los valores de señal de salida sensible al analito **222** y el valor de estímulo externo cuantificado **234** en la segunda relación de normalización **147**. De esta forma, se pueden entrar el valor de estímulo externo **232** o **234** a la relación de normalización **142** o **147** para determinar el valor de normalización. Así, se entran uno o más valores de señal de salida sensible al analito y uno o más valores cuantificados de estímulo externo en una o más relaciones de normalización para determinar uno o más valores de normalización.

En la determinación de señales de salida sensibles al analito normalizadas **260**, al menos un valor de señal de salida sensible al analito normalizada se determina en respuesta al uno o más valores de señal de salida sensible al analito y uno o más valores de normalización. El uno o más valores de señal de salida sensible al analito **222** se dividen entre el valor de normalización para determinar uno o más valores de señal de salida sensible al analito normalizada **262** (en el caso de un estímulo externo) o **267** (en el caso de dos estímulos externos). Preferentemente, se usa un valor de señal de salida sensible al analito para determinar un valor de señal de salida sensible al analito normalizado.

En la determinación de la concentración de analito de análisis **280**, se determinan una o más concentraciones de analito en la muestra en respuesta a una o más correlaciones de referencia normalizada y una o más señales de salida sensibles al analito normalizadas. Preferentemente, una correlación de referencia normalizada previamente

determinada, tal como la correlación de referencia normalizada **172** o **177** previamente descrita, transforma el uno o más valores de señal de salida sensible al analito normalizada **262** o **267** en una concentración de analito de la muestra **282**. Preferentemente, la correlación de referencia normalizada **172** o **177** previamente descrita transforma un valor de señal de salida sensible al analito normalizada en una concentración de analito de la muestra. Cuando se determinan dos o más concentraciones de analito de la muestra, las concentraciones de analito se pueden promediar para proporcionar una concentración de analito de la muestra promedio.

En **290**, la concentración de analito de la muestra **282** se puede presentar, guardar para futura referencia, compensar y/o usar para cálculos adicionales.

Así, en el método de análisis **200** la correlación de referencia normalizada **172** o **177** se incorpora en el dispositivo de medición y se usa similarmente a como se usaría una correlación de referencia convencional para traducir los valores de señal de salida primaria en concentraciones de analito determinadas de la muestra. Excepto en el método de análisis **200**, en lugar de los valores de señal de salida primaria que se transforman por la correlación de referencia **122**, el/los valor/es de señal de salida sensible al analito normalizada **262** o **267** se transforman por la correlación de referencia normalizada **172** o **177**, respectivamente, para proporcionar la concentración de analito de la muestra con efecto reducido de uno o más estímulos externos.

Un ejemplo del método de calibración **100** para determinar la información de calibración con un efecto de estímulo externo reducido para incorporación en el dispositivo de medición usando este proceso de normalización para la calibración se muestra en la FIG. 1 para un sistema de análisis A1c. En este ejemplo, la muestra es sangre; el analito de muestra es A1c en las muestras de sangre y la concentración de analito de la muestra es el %-A1c de la muestra. A1c es el estímulo primario mientras que THb es el estímulo externo. Los valores numéricos calculados en todas las FIG. 1 serían diferentes para un sistema de análisis diferente o incluso un sistema de análisis de A1c diferente. Este método se representa con los gráficos en la FIG. 1B a FIG. 1H.

La FIG. 1A muestra las señales de reflectancia de A1c registradas a partir del/de los detector/es de la zona 1 del dispositivo de medición frente a las concentraciones de analito de la muestra de referencia (%-A1c) a cuatro concentraciones de THb (85 mg/mL, 125 mg/mL, 175 mg/mL y 230 mg/mL). Se repitió dos veces la medición de %-A1c para cada muestra de referencia de sangre que incluye una concentración conocida de A1c. Debido a que las señales de reflectancia de A1c medidas del/de los detector/es de la zona 1 del dispositivo de medición dependen de THb, las señales de reflectancia de A1c se extienden para la misma concentración de analito de la muestra de referencia %-A1c. Así, aún cuando la concentración real de A1c era idéntica para un conjunto de muestras de referencia, las señales de reflectancia medidas de A1c medidas a partir del/de los detector/es de la zona 1 para el conjunto de muestras de referencia fue diferente debido al estímulo externo THb. La ecuación mostrada en la figura representa una correlación de referencia convencional para este análisis donde las señales de salida del dispositivo de medición se traducen directamente en concentraciones de analito por esta ecuación. Obsérvese la correlación  $R^2$  relativamente baja de 0,6272 entre la correlación de referencia determinada ( $Y = -0,0006x^2 + 0,0263x + 0,2239$ ) y las señales de salida de las muestras de referencia.

La FIG. 1B muestra las señales de salida de THb comparativamente constantes a las cuatro concentraciones de muestras de referencia de THb (85 mg/mL, 125 mg/mL, 175 mg/mL y 230 mg/mL) como se determina a partir de los detectores de la zona 2 del dispositivo de medición. Así, para cada concentración de THb, se determinó un valor de señal promedio del estímulo externo THb. Por ejemplo, se determinó un valor de señal de estímulo externo cuantificado de  $\sim 0,76$  de la FIG. 1B a la concentración de muestra de 85 mg/mL de THb promediando. Se pueden usar métodos distintos de promediado para cuantificar el estímulo externo a partir de las señales de salida secundarias.

La FIG. 1C muestra las señales de reflectancia de A1c individuales registradas a partir del/de los detector/es de la zona 1 del dispositivo de medición separados para las cuatro concentraciones de THb diferentes en muestras de sangre. Esto permite seleccionar una única concentración de analito de muestra a partir de la cual se pueden sintetizar valores de señal de salida sensible al estímulo externo de las señales de salida primarias. En este ejemplo, se determinaron líneas de regresión lineal a cada una de las 4 concentraciones de muestra de THb usando la relación general ( $R_{A1c} = \text{Pendiente} \cdot \text{\%-A1c} + \text{Int}$ , donde  $R_{A1c}$  es la señal de salida del dispositivo de medición, Pendiente y Int son la pendiente y la ordenada en el origen, respectivamente, de las líneas de regresión lineal en cada concentración de muestra de THb, y %-A1c es la concentración de analito de la muestra). Se pueden usar otras técnicas de regresión.

Se muestran en la figura las ecuaciones de regresión determinadas a 85 mg/mL de THb y 230 mg/mL de THb, pero también se determinaron ecuaciones de regresión a 127 y 175 mg/mL de THb. En este ejemplo, se seleccionó la única concentración de analito de la muestra seleccionada de 9 %-A1c para determinar los valores de señal de salida sensible al estímulo externo sintetizada a partir de las señales de salida primarias. Así, en este ejemplo, la concentración de analito de la muestra de referencia de 9 % proporcionó un valor de señal de salida sensible al estímulo externo sintetizada de  $\sim 0,36$  A1c para las muestras de 85 mg/mL de THb a partir de la línea de regresión de 85 mg/mL de THb y un valor de señal de salida sensible al estímulo externo sintetizada de  $\sim 0,44$  A1c para las muestras de 230 mg/mL de THb a partir de la línea de regresión de 230 mg/mL de THb.

Se pueden determinar los valores de señal de salida sensible al estímulo externo sintetizada de otras formas distintas a determinar las líneas de regresión y "determinar de nuevo" un valor de señal de salida primaria de una concentración

de analito de la muestra de referencia seleccionada. Por ejemplo, se pueden seleccionar valores de señal de salida sensible al estímulo externo sintetizada de los valores de señal de salida primaria medida en una concentración %-A1c de muestra de referencia para los cuatro niveles de THb. Se empareja una única señal de reflectancia de THb medida simultáneamente con la señal de reflectancia de A1c para formar los cuatro pares de datos de A1c y THb y para construir el gráfico de reflectancia de A1c frente a la reflectancia de THb, que también conducirá a la relación de normalización.

Mientras que la única concentración de analito de la muestra seleccionada de 9 %-A1c se eligió en la FIG. 1C, también se pueden seleccionar preferentemente concentraciones de analito de la muestra de referencia de 6 a 11 %-A1c. Así, la única concentración de analito de la muestra seleccionada a la que se determinan los valores de señal de salida sensible al estímulo externo sintetizada está preferentemente cerca del centro del intervalo de concentraciones de analito de la muestra de referencia, pero pueden estar en cualquier lado del centro para proporcionar el rendimiento de medición deseado al sistema de análisis.

La Tabla A, a continuación, muestra los pares de datos recogidos de promediar las señales de THb al mismo nivel de THb y las señales de salida sensibles a THb sintetizadas correspondientes calculadas a una única concentración de 10 %-A1c (en este ejemplo 9 % de A1c) en la relación de regresión general anterior ( $R_{A1c} = \text{Pendiente} \cdot \% \text{-A1c} + \text{Int}$ ) como en la FIG. 1C.

**Tabla A:** Valores de las señales de THb sintetizadas y promedio

THb (mg/mL)	85	125	175	230
THb/70 (mg/mL)*	1,214	1,786	2,5	3,286
Señal de salida secundaria cuantificada (promedio) de la Fig. 1B	0,7572	0,7302	0,7069	0,6796
Valores de señal de salida sensible a THb sintetizada a la conc. de A1c (9) de la Fig 1C	0,3659	0,3964	0,4183	0,4400
*Las muestras se diluyeron para obtener señales apropiadas para los detectores.				

La FIG. 1D es un gráfico de correlación de estos cuatro pares de datos donde las señales de salida sensibles al estímulo externo sintetizadas sacadas de la señal de salida de A1c en el eje Y se representan frente a las señales de THb (señales de salida secundarias) en el eje X, el estímulo externo. La FIG. 1D también proporciona un ejemplo de determinación de la relación de normalización **140**, que establece la correlación entre las señales de salida sensibles al estímulo externo sintetizadas a una única concentración de A1c y las señales de salida secundarias sensibles a las concentraciones de THb de la muestra.

Entonces se usó una técnica de regresión, en este caso polinómica ( $a_2 \cdot \text{THb}^2 + a_1 \cdot \text{THb} + a_0$ , donde  $a_2$ ,  $a_1$  y  $a_0$  son los coeficientes de la función de normalización polinómica de 2º orden a partir del ajuste de la curva y THb es el valor del estímulo externo cuantificado para THb) para determinar la relación de normalización **142** entre las señales de salida sensibles al estímulo externo sintetizadas a una única concentración de analito de la muestra seleccionada y las señales de estímulo externo cuantificado. La relación de normalización específica para los datos de análisis de A1c de este ejemplo se muestra en la FIG. 1D como  $Y = -3,34X^2 + 3,85X - 0,63$ , así que muestra los coeficientes polinómicos de 2º orden específicos para este ejemplo, donde Y es la señal de salida sensible al estímulo externo sintetizada calculada sensible al estímulo externo a una única concentración de analito seleccionada, y X es las señales/valores de estímulo externo cuantificado. Un análisis diferente tendría diferentes coeficientes de regresión. Cuando un valor de X (el valor de señal de estímulo externo cuantificado) se entra en el polinomio de 2º orden, se genera un valor de Y mediante esta relación de normalización, que es el valor de normalización (NV).

La FIG. 1E proporciona un ejemplo de la determinación de señales de salida sensibles al analito normalizadas **162** usando el valor de normalización. Así, las señales de reflectancia de A1c de la FIG. 1C se convierten en valores de señal de salida primaria normalizada usando la relación de normalización de la FIG. 1D y el valor de normalización. La determinación de señales de salida sensibles al analito normalizadas a partir de la relación de normalización y el valor de normalización se pueden representar por la relación  $NR_{A1c} = R_{A1c} / NV_{A1c}$ , donde  $NR_{A1c}$  son las señales de salida sensibles al analito normalizadas THb,  $R_{A1c}$  son las señales de reflectancia de A1c del dispositivo de medición y  $NV_{A1c}$  es el valor de normalización.

Preferentemente, la determinación de señales de salida sensibles al analito normalizadas se realiza para todas o la mayoría de las señales de salida sensibles al analito para determinar la información de calibración. Sin embargo, se puede usar un subconjunto de señales de salida sensibles al analito dependiendo del sistema de análisis. Así, en la FIG. 1E, los valores de señal de salida sensible al analito de la FIG. 1C se normalizaron dividiéndose entre los valores de normalización correspondientes mediante la relación de normalización determinada en la FIG. 1D usando el valor de normalización de la FIG. 1F para proporcionar los valores de señal de salida sensible al analito normalizada mostrados en la FIG. 1E, que entonces se combinan en la FIG. 1F.

La FIG. 1F proporciona un ejemplo de la determinación de una correlación de referencia normalizada a partir de las señales de salida sensibles al analito normalizadas de la FIG. 1E. Se representó  $NR_{A1c}$  frente a las concentraciones de analito de la muestra de referencia (%-A1c) y se ajustaron a la curva por una técnica de regresión para proporcionar la correlación de referencia normalizada. Se usó una técnica de regresión, en este caso el polinomio de 2º orden ( $a_2 \cdot \text{\%-A1c}^2 + a_1 \cdot \text{\%-A1c} + a_0$ , donde  $a_2$ ,  $a_1$  y  $a_0$  son los coeficientes del polinomio y %-A1c es la concentración de analito de las muestras de referencia) para determinar la correlación de referencia normalizada.

La correlación de referencia normalizada específica para los datos de análisis de A1c de este ejemplo se muestra en la FIG. 1F como  $y = -0,1119X^2 + 0,0697X + 0,538$ , mostrando así los coeficientes polinómicos de 2º orden específicos para este ejemplo. Un análisis diferente tendría coeficientes diferentes. También se muestra en la FIG. 1F  $R^2 = 0,9663$ , que muestra la excelente concordancia entre las señales de salida primarias normalizadas y las concentraciones de analito de la muestra de referencia para %-A1c. En esta determinación de la correlación de referencia normalizada, la señal de salida normalizada primaria era la variable dependiente, mientras que las concentraciones de analito de la muestra de referencia para %-A1c era la variable independiente para la regresión. Así, esta correlación de referencia normalizada se puede considerar la salida de los valores de señal de salida sensible al analito normalizada de las concentraciones de analito de la muestra de referencia para %-A1c.

La FIG. 1G proporciona otro ejemplo de la determinación de una correlación de referencia normalizada a partir de los valores de señal de salida sensible al analito normalizada de la FIG. 1E. En la FIG. 1G, la señal de salida sensible al analito normalizada era la variable independiente, mientras que la concentración de analito de la muestra de referencia para %-A1c era la variable dependiente para la regresión. Así, los ejes x horizontal e y vertical están invertidos. En este ejemplo, la correlación de referencia normalizada determinada era  $y = 28,26X^2 - 28,996X + 0,522$  y la correlación  $R^2$  era 0,962, que muestra nuevamente la excelente concordancia entre las señales de salida sensibles al analito normalizadas y las concentraciones de analito de la muestra de referencia para %-A1c. Un análisis diferente tendría coeficientes de regresión diferentes. Así, esta correlación de referencia normalizada puede ser considerada la salida de las concentraciones de analito de la muestra de referencia para %-A1c a partir de los valores de señal de salida sensible al analito normalizada.

Una correlación de referencia normalizada expresada de esta forma se puede considerar una "curva de calibración normalizada". Se prefiere dicha curva de calibración normalizada que proporciona concentraciones de analito de la muestra para el almacenamiento en el dispositivo de medición para su uso durante el análisis **200** ya que el sistema de biosensor determina una concentración de analito a partir de la señal de salida primaria, y no la inversa como se obtendría de la correlación de referencia normalizada de la FIG. 1F. Así, cuando un valor de X (la señal de salida normalizada) se entra en la ecuación polinómica de 2º orden, se obtiene un valor de Y (la concentración de analito).

La FIG. 1H compara las señales de salida sensibles al analito normalizadas con la correlación de referencia normalizada en forma de una curva de calibración normalizada a partir de la FIG. 1G superponiendo los valores de señal de salida sensible al analito normalizada en la curva. Otro punto de interés es la comparación del valor de correlación de  $R^2$  de 0,6272 determinado en la FIG. 1A para la correlación de referencia convencional y el valor de correlación de  $R^2$  de 0,9663 determinado en la FIG. 1F para la correlación de referencia normalizada. La mejora de aproximadamente el 54 % ( $0,9663 - 0,6272 / 0,6272 \cdot 100$ ) en la correlación de referencia normalizada establece la superioridad de los valores de señal de salida normalizada / correlación de referencia normalizada en la determinación de las concentraciones de analito de la muestra en comparación con los valores de señal de salida medidos convencionales/correlación de referencia.

La información de calibración resultante que incluye la relación de normalización y la correlación de referencia normalizada en el dispositivo de medición se puede guardar en forma de una tabla de consulta, una o más ecuaciones, y similares. También se pueden guardar otras relaciones en el dispositivo de medición. La información de calibración se usa por el procesador del dispositivo de medición durante el análisis de muestras para determinar la concentración de analito de la muestra.

En un dispositivo de medición con una señal de salida primaria, se pueden usar las técnicas anteriores para determinar la información de calibración para la señal de salida primaria. Sin embargo, para dispositivos de medición con más de una señal de salida primaria, la información de calibración se puede determinar para cada señal de salida primaria, y las concentraciones de analito determinadas a partir de la diferente información de calibración combinada. Por ejemplo, en un dispositivo de medición de A1c que tiene más de un detector para la zona 1 con la que determinar el estímulo primario, la información de calibración se puede determinar para cada canal de detector y entonces se determina la concentración de analito final promediando la concentración de analito inicial determinada a partir de cada canal de detector.

Alternativamente, para dispositivos de medición con más de una señal de salida primaria del mismo estímulo primario, se pueden combinar inicialmente las señales de salida y se puede determinar la información de calibración para la señal combinada. Entonces se pueden transformar las señales de salida independientes en concentraciones de analito usando la información de calibración combinada para proporcionar concentraciones de analito iniciales que entonces se combinan para proporcionar la concentración de analito de la muestra, o se pueden transformar las señales de salida combinadas por la información de calibración determinada para la señal combinada para proporcionar la concentración de analito de la muestra. Por ejemplo, en un dispositivo de medición de A1c que tiene más de un

detector para la zona 1, se pueden promediar las señales de salida de ambos detectores y determinar la información de calibración para las señales de salida promediadas de ambos detectores. Entonces, la señal de salida promediada se puede transformar en la concentración de analito de la muestra por la información de calibración determinada a partir de la señal de salida promediada o la señal de salida de ambos canales transformados por la información de calibración determinada a partir de la señal de salida promediada para proporcionar dos concentraciones de analito iniciales, que entonces se promedian para proporcionar la concentración de analito final de la muestra.

Los ejemplos descritos con respecto a la FIG. 2 muestran el beneficio de determinar la información de calibración independiente para cada uno de los dos canales de detector individuales de un dispositivo de medición, donde cada uno de los dos canales de señales de salida incluye tanto información sensible de A1c como de THb. Los valores numéricos calculados en todas las FIG. 2 serían diferentes para un sistema de análisis diferente o incluso un sistema de análisis de A1c diferente.

La FIG. 2A representa las relaciones de normalización para ambos canales de un dispositivo de medición de A1c que tiene dos canales de detección. Así, para este Ejemplo, la FIG. 2A muestra las dos relaciones de normalización separadas para las señales de salida primarias del detector del canal de la zona 1 (Ch1) y las señales de salida secundarias del detector del canal de la zona 2 (Ch2); y para las señales de salida primarias del detector del canal de la zona 1 (Ch3) y las señales de salida secundarias del detector del canal cuatro de la zona 2 (Ch4). Así, Ch1 y Ch3 proporcionan señales de salida sensibles a A1c, mientras que Ch2 y Ch4 proporcionan señales de salida sensibles a THb.

La FIG. 2B representa las curvas de calibración normalizadas individuales para Ch1 y Ch3 del dispositivo de medición de A1c. También se representan en la figura las señales de salida normalizadas determinadas a partir de Ch1/Ch2, las señales de salida normalizadas determinadas a partir de Ch3/Ch4 y el promedio de estas señales de salida normalizadas. Se usó una técnica de regresión polinómica para determinar las correlaciones de referencia normalizadas en forma de curvas de calibración normalizadas, como se describe previamente.

La FIG. 2C muestra las señales de reflectancia de A1c normalizadas a partir de los dos canales individuales (Ch1 y Ch3) para las muestras de referencia. Se puede realizar el promediado para las dos concentraciones iniciales de %-A1c para proporcionar la concentración de A1c final. Los valores medios y de porcentaje de desviación estándar del sesgo (DE) en la Tabla 1 y en la Tabla 2 a continuación muestran los resultados de canales individuales separados, así como los resultados de A1c promedio para la calibración y los análisis de muestras con el dispositivo de medición, respectivamente. Para tanto la calibración, usando muestras de referencia, como el análisis, realizado con el dispositivo de medición usando la información de calibración, las concentraciones de analito determinadas promediadas mejoran con respecto a los resultados de canales individuales. A partir de la Tabla 2, la desviación estándar del sesgo de Ch1 se redujo en casi el nueve por ciento (8,8 %) (5,58-5,09/5,58\*100), mientras que la desviación estándar del sesgo de Ch2 se redujo en más de 18 % (18,3 %) (6,23-5,09/6,23\*100) para el promedio. Así, la desviación estándar del sesgo se redujo por un promedio de más de 10 % (13,5 %) (8,8+18,3/2) para las concentraciones de analito determinadas promediadas.

**Tabla 1: Calibración**

	%-sesgo1	%-sesgo3	%-Prom_sesgo
Media	0,274	0,295	0,156
DE	5,25	5,52	3,97

**Tabla 2: Análisis**

	%-sesgo1	%-sesgo3	%-Prom_sesgo
Media	0,055	0,184	0,120
DE	5,58	6,23	5,09

Además de determinar la información de calibración para cada canal, y luego combinar las concentraciones de muestra intermedias determinadas para cada canal, primero se pueden combinar las señales de salida de cada canal y luego usar para determinar la información de calibración para la señal combinada. La relación de normalización se determina promediando primero las señales de salida de reflectancia de A1c a partir de Ch1 y Ch3 del dispositivo de medición. Así, se promediaron primero las mismas señales de salida usadas para determinar las dos relaciones de normalización representadas en la FIG. 2A. La correlación de referencia normalizada en forma de una curva de calibración normalizada se determina para las señales de reflectancia promediadas de A1c a partir de Ch1 y Ch3 del dispositivo de medición. Entonces se pueden convertir las señales de salida de cada canal del dispositivo de medición en

concentraciones de analito iniciales con esta información de calibración y se promediaron las concentraciones de analito iniciales para determinar una concentración de analito de la muestra final.

5 Un ejemplo del método de calibración **100** para determinar la información de calibración con un efecto de estímulo externo reducido para la temperatura sobre la señal de salida primaria de un sistema de análisis electroquímico de glucosa se muestra en la FIG. 3. En este ejemplo, la muestra es la sangre y el analito de muestra es la glucosa (el estímulo primario). La concentración de analito de la muestra es la concentración de glucosa de la muestra y el estímulo externo son la temperatura y el hematocrito.

10 Para el efecto de la temperatura, se normalizaron las corrientes medidas por el dispositivo de medición a partir de las muestras de referencia al 40 % de Hct (se determinó el %-Hct al que la correlación de referencia convencional se relaciona con las corrientes de salida y las concentraciones de analito de la muestra de referencia) y a diferentes temperaturas. En este tipo de sistema de glucosa, los electrodos de trabajo y los contraelectrodos proporcionan la señal de salida primaria mientras que el sensor de temperatura proporciona la señal de salida secundaria. Este proceso se representa con los gráficos en la FIG. 3A a FIG. 3F. Los valores numéricos calculados en todas las FIG. 3 serían diferentes para un sistema de análisis diferente o incluso un sistema de análisis de glucosa diferente.

15 La FIG. 3A representa las corrientes obtenidas del dispositivo de medición frente a las concentraciones de analito de la muestra de referencia para glucosa a diferentes temperaturas y 40 % de Hct. Las corrientes se extienden más ampliamente debido a los cambios en la temperatura a concentraciones de glucosa de la muestra más altas. Aunque las corrientes determinadas por el dispositivo de medición a partir de las muestras de referencia que incluyen ~80 mg/dL de glucosa en sangre se agruparon estrechamente alrededor de ~75 nA, se separaron ampliamente las corrientes determinadas por el dispositivo de medición de muestras de referencia que incluyen ~320 mg/dL y ~580 mg/dL de glucosa. En realidad, como se muestra en la FIG. 3A, una línea de regresión lineal determinada a partir de estas corrientes mostró una correlación de R<sup>2</sup> de solo 0,6. Se puede considerar que esta cifra muestra el efecto de un estímulo externo sobre las señales de salida sensibles al analito como se observó previamente en la FIG. 1C. En la FIG. 1C, el estímulo externo muestra THb, mientras que en la FIG. 3A era la temperatura.

25 La FIG. 3B separa estas corrientes de señales de salida primarias por la temperatura a la que se registraron. Así, la temperatura es el estímulo externo que afecta adversamente las corrientes de señales de salida sensibles al analito del dispositivo de medición, aún cuando las concentraciones de analito de las muestras de referencia son idénticas a cada temperatura. En este ejemplo, se determinaron líneas de regresión lineal a cada una de las 5 temperaturas usando la relación general  $i_G = \text{Pendiente} \cdot G_{\text{Ref}} + \text{Int}$ , donde  $i_G$  es la corriente sensible a glucosa del dispositivo de medición y  $G_{\text{Ref}}$  es la concentración de analito de la muestra de referencia para la glucosa a partir de la cual se determinan los valores de señal de salida sensible al estímulo externo sintetizada. Se pueden usar otras técnicas para determinar los valores de señal de salida sensible al estímulo externo sintetizada.

35 En la FIG. 3B, se seleccionaron dos concentraciones de glucosa de muestra de 100 y 500 mg/dL a las que determinar los valores de señal de salida sensible al estímulo externo sintetizada a sus temperaturas correspondientes. Así, a diferencia de en el sistema de A1c donde se seleccionó la única concentración de analito de la muestra seleccionada de 9 %, este ejemplo muestra que los valores de señal de salida sensible al estímulo externo sintetizada se pueden determinar a más de una única concentración de analito de la muestra seleccionada. Se pueden usar concentraciones de analito de muestra seleccionadas únicas distintas de 100 y 500 mg/dL.

40 La Tabla 3, a continuación, proporciona los valores de señal de salida sensible al estímulo externo sintetizada obtenido para cada temperatura a 100 y 500 mg/dL de concentración de analito de muestra de glucosa a partir de las líneas de regresión individuales usando las ecuaciones de regresión similares a las previamente descritas con respecto al ejemplo de A1c ( $i_G = \text{Pendiente} \cdot G_{\text{Ref}} + \text{Int}$ ). Los valores de temperaturas en la tabla son promedios de todas las temperaturas medidas cuando se realiza el análisis de las muestras de referencia a las temperaturas diana. Así, la Tabla 3 forma dos conjuntos de pares a la concentración de glucosa única seleccionada de 100 o 500 mg/dL, conteniendo cada conjunto siete pares de señales de datos de temperaturas de salida.

**Tabla 3:** Valores de señal de salida sintetizada

Temp prom., C	6,0	10,9	15,9	22,0	30,4	35,1	40,0
500 mg/dL	205,78	283,53	373,96	462,61	639,89	705,54	809,11
100 mg/dL	41,16	56,71	74,79	92,52	127,98	141,11	161,82

50 Así, la FIG. 3B separa las corrientes de salida del dispositivo de medición por temperatura, a diferencia de la concentración de muestra de THb como se describe en la FIG. 1C. Solo se representaron cinco líneas de correlación para cinco de las siete temperaturas probadas, con el fin de no llenar el gráfico.

La FIG. 3C muestra las correlaciones entre las señales de salida sensibles al estímulo externo sintetizadas obtenidas en dos concentraciones de glucosa únicas separadas de 100 y 500 mg/dL frente al estímulo externo

cuantificado (temperaturas) para determinar las relaciones de normalización. La FIG. 3C también proporciona un ejemplo de determinación de la relación de normalización **140**, que considera la temperatura para la normalización de las señales de salida sensibles al analito. El eje Y vertical de la FIG. 3C muestra los valores sensibles al estímulo externo como se sintetizan a partir de las líneas de regresión de la FIG. 3B y se determinan a las concentraciones de analito de muestra seleccionadas únicas de 100 y 500 mg/dL de glucosa para las cinco temperaturas. El eje X horizontal de la FIG. 3C muestra el valor promedio determinado a cada temperatura diana para el estímulo externo temperatura.

Entonces se usó una técnica de regresión, en este caso polinómica ( $a_2 \cdot T^2 + a_1 \cdot T + a_0$ , donde  $a_2$ ,  $a_1$  y  $a_0$  son los coeficientes de la función de normalización polinómica de 2º orden del ajuste a la curva y T es el valor de estímulo externo cuantificado para la temperatura) para determinar la relación de normalización **142** entre las señales de salida sensibles al estímulo externo sintetizadas a una única concentración de analito de la muestra seleccionada y las señales de estímulo externo cuantificado. La relación de normalización específica para los datos del análisis de la glucosa de 100 y 500 mg/dL de este ejemplo se muestra en la FIG. 3C como  $y = 0,0104X^2 + 3,0646x + 22,366$  (100 mg/dL) y  $y = 0,05214X^2 + 15,3228x + 111,832$  (500 mg/dL), mostrando así los coeficientes polinómicos específicos de 2º orden para este ejemplo, donde Y es la señal de salida sensible externa sintetizada calculada sensible a la señal de estímulo externo a una concentración de analito seleccionada única, y X es las señales/valores de estímulo externo cuantificado. Un análisis diferente tendría diferentes coeficientes. Cuando un valor de X (el valor de señal del estímulo externo cuantificado) se entra en el polinomio de 2º orden, se genera un valor de Y en toda esta relación de normalización, que es el valor de normalización (NV). Esta cifra se puede considerar similarmente a la FIG. 1D; sin embargo, en este ejemplo, se pueden determinar valores de normalización a dos concentraciones de analito de la muestra de referencia.

La FIG. 3D proporciona un ejemplo de la determinación de señales de salida sensibles al analito normalizadas **162** a partir del valor de normalización a 100 mg/dL. Así, las señales de salida sensibles al analito del eje y vertical de la FIG. 3B se convirtieron en valores de señal de salida primaria normalizada dividiendo las señales de salida sensibles al analito con sus valores de normalización correspondientes obtenidos a partir de la relación de normalización de la FIG. 3C. La determinación de las señales de salida sensibles al analito normalizadas a partir de la relación de normalización y el valor de normalización se pueden representar por la relación  $Ni_G = I_{medida} / NV_{Temp}$ , donde  $Ni_G$  son las señales de salida sensibles al analito normalizadas para la temperatura,  $I_{medida}$  son las corrientes sensibles a la glucosa del dispositivo de medición, y  $NV_{Temp}$  es el valor de normalización determinado a partir de la normalización de la temperatura. Así, las cinco líneas individuales de la FIG. 3B para las diferentes temperaturas colapsaron en un grupo de líneas estrechamente comprimidas como se representa en la FIG. 3D. Como se ha tratado previamente, preferentemente, la determinación de señales de salida sensibles al analito normalizadas se realiza para todas o la mayoría de las señales de salida sensibles al analito para determinar la información de calibración.

La FIG. 3E proporciona un ejemplo de la determinación de una correlación de referencia normalizada a partir de los valores de señal de salida sensible al analito normalizada de la FIG. 3D. Se representó  $Ni_G$  frente a las concentraciones de analito de la muestra de referencia y se ajustó la curva por una técnica de regresión para proporcionar la correlación de referencia normalizada. Se usó una técnica de regresión, en este caso lineal ( $Y = Pendiente \cdot X + Int$ ), para determinar la correlación de referencia normalizada, donde durante el análisis **200** Y es la señal de salida normalizada primaria determinada por el dispositivo de medición y X es la concentración de referencia de analito de la muestra. Así, cuando un valor de Y (la señal de salida normalizada) se entra en la ecuación de regresión lineal, se obtiene un valor de X (la concentración de analito) resolviendo la ecuación.

La correlación de referencia normalizada específica para los datos de análisis de glucosa de este ejemplo se muestra en FIG. 3E como  $Y = 0,01033X - 0,14082$ , así que muestra los coeficientes lineales específicos para este ejemplo. Un análisis diferente tendría coeficientes diferentes. También se muestra en la FIG. 3E  $R^2 = 0,9946$ , que muestra la excelente concordancia entre las señales de salida primaria normalizadas y las concentraciones de analito de la muestra de referencia. Así, se puede considerar que esta correlación de referencia normalizada proporciona las concentraciones del analito de la muestra para glucosa a partir de los valores de señal de salida sensible al analito normalizada.

Para las temperaturas medidas (6,0 °C, 10,9 °C, 15,9 °C, 22,0 °C, 30,4 °C, 35,1 °C y 40,0 °C), a continuación se tabulan en la Tabla 4 las temperaturas promedio, la pendiente de regresión obtenida a cada temperatura usando una correlación de referencia convencional y la pendiente de regresión obtenida a cada temperatura usando la correlación de referencia normalizada a la concentración de analito de la muestra de referencia de 100 mg/dL de glucosa.

**Tabla 4:** Resumen de normalización para el estímulo de temperatura

Temp °C	Pendientes de la correlación de referencia convencional	Pendientes de la correlación de referencia normalizada
6,0	0,412	0,0103
10,9	0,567	0,0099
15,9	0,748	0,0101
22,0	0,925	0,0097
30,4	1,280	0,0102
35,1	1,411	0,0099
40,0	1,618	0,0100
<b>Pendiente media</b>	0,9944	0,0100147
<b>DE, pendiente</b>	0,4532	0.00023014
<b>%-CV</b>	45,6	2,3

Se puede apreciar la mejora en el rendimiento de la medición mirando las pendientes de respuesta media y el %-CV de las pendientes antes y después de la normalización. El %-CV de las pendientes de respuesta determinadas con las señales de salida primarias a partir del dispositivo de medición y una correlación de referencia convencional fue 45,6 %. A diferencia, el %-CV de las pendientes de respuesta determinadas con las señales de salida primarias normalizadas descritas y la correlación de referencia normalizada se redujo al 2,3 %, una reducción aproximada del 95 % ( $45,6 - 2,3 / 45,6 * 100$ ). Esta reducción se representa gráficamente cuando las corrientes de señales de salida normalizadas se transforman en las concentraciones de analito de la muestra con la correlación de referencia normalizada de la FIG. 3E en comparación con cuando las corrientes subyacentes del dispositivo de medición se transforman por la correlación de referencia convencional de la FIG. 3A.

La FIG. 3F representa el %-sesgo de las concentraciones de glucosa determinadas atribuibles a las diferentes temperaturas (6,0 °C, 10,9 °C, 15,9 °C, 22,0 °C, 30,4 °C, 35,1 °C y 40,0 °C) antes y después de la normalización. Las corrientes medidas mostraron una diseminación del %-sesgo de aproximadamente  $\pm 60$  cuando se transformaron por la correlación de referencia convencional, mientras que las corrientes normalizadas mostraron una diseminación del %-sesgo de aproximadamente  $\pm 20$ . Así, cabría una reducción aproximada de 3X en %-sesgo para las concentraciones de analito de la muestra determinadas con un sistema de biosensor que incluye un dispositivo de medición que incluye la información de calibración de acuerdo con el presente método en comparación con las concentraciones de analito de la muestra determinadas con un dispositivo de medición que incluye la información de calibración proporcionada por un método convencional que carece de la reducción de normalización del estímulo de temperatura.

Una vez se reduce el efecto de la temperatura, también se puede reducir sustancialmente el efecto de un segundo estímulo externo, tal como el hematocrito de la muestra, usando un proceso de normalización de dos etapas, así la combinación de la FIG. A y FIG. B. En este tipo de sistema de glucosa, los electrodos de trabajo y los contraelectrodos proporcionan la señal de salida primaria mientras que un sensor de temperatura proporciona preferentemente una señal de salida secundaria y un electrodo de hematocrito proporciona preferentemente una señal de salida secundaria adicional. Las señales de salida secundarias sensibles a la temperatura y al hematocrito pueden surgir de otras formas, como se ha tratado previamente. Se realizó la normalización escalonada por temperatura y entonces por el hematocrito de la muestra, en general, normalizando las corrientes de salida del dispositivo de medición a múltiples temperaturas (como se ha descrito anteriormente) y luego normalizando las corrientes de señales de salida normalizadas a la temperatura resultantes para múltiples concentraciones de muestra de Hct usando una relación de normalización de hematocrito.

Se muestra en la FIG. 4 un ejemplo del método de calibración **102** para determinar la información de calibración con un efecto de estímulo externo secundario reducido para hematocrito sobre la señal de salida primaria de un sistema de análisis de glucosa electroquímico. En este ejemplo, el analito de muestra es la glucosa (el estímulo primario) y la concentración de analito de muestra es la concentración de glucosa en la muestra de sangre. La concentración de hematocrito en la muestra de sangre es el segundo estímulo externo, además del primer estímulo externo, la temperatura. Este método se representa con los gráficos en la FIG. 4A a FIG. 4I. Los valores numéricos calculados en todas las FIG. 4 serán diferentes para un sistema de análisis diferente o incluso un sistema de análisis de glucosa diferente.

La FIG. 4A muestra las corrientes de señales de salida del dispositivo de medición para muestras de referencia que incluyen concentraciones de glucosa conocidas para las temperaturas probadas (6,0 °C, 10,9 °C, 15,9 °C, 22,0 °C, 30,4 °C, 35,1 °C y 40,0 °C) y para las concentraciones de muestra de referencia de Hct probadas (0 %, 20 %, 40 %, 55 %, 70 %). Se usaron las señales de salida secundarias obtenidas a partir de un electrodo de hematocrito para obtener las corrientes de salida sensibles a Hct de las muestras de referencia que tienen concentraciones de hematocrito conocidas. Como era de esperar, las corrientes determinadas por el dispositivo de medición a partir de las muestras de referencia que incluyen concentración de analito de ~80 mg/dL de glucosa se agruparon estrechamente alrededor de ~75 nA, mientras se separaron ampliamente las corrientes determinadas por el dispositivo de medición a partir de las muestras de referencia que incluyen las concentraciones de analito de ~320 mg/dL y ~580 mg/dL de glucosa.

La FIG. 4B representa las relaciones de normalización a la temperatura a 40 % de Hct y a dos concentraciones de glucosa individuales separadas de 100 y 500 mg/dL en la muestra de sangre, y es la misma que se representó previamente en la FIG. 3C, ya que se realiza la misma reducción del estímulo de temperatura. La normalización a la temperatura fue la primera etapa realizada en este ejemplo para reducir el efecto del estímulo externo de la temperatura, ya que se realizó la misma reducción del estímulo de temperatura. A partir de la FIG. 4B, se determinaron señales de salida sensibles al analito normalizadas con una reducción en el efecto del estímulo de temperatura como se describe previamente.

La FIG. 4C representa los valores de señal de salida sensible al analito normalizada a la temperatura de la FIG. 4A frente a la concentración de analito de la muestra de referencia para glucosa a las concentraciones de muestra de referencia de Hct probadas en este ejemplo. Como era de esperar, se observa una diseminación significativa en las corrientes normalizadas a mayores concentraciones de glucosa para las diferentes concentraciones de Hct, aún cuando la concentración de analito de la muestra subyacente sea la misma. Se puede considerar que la FIG. 4C es similar a la FIG. 3B, pero que muestra el efecto del segundo estímulo externo, el hematocrito, a diferencia de la temperatura.

La temperatura como parámetro de error o estímulo externo se mide preferentemente simultáneamente con el estímulo primario y su valor es independiente de otros factores. La concentración de hematocrito en las muestras de sangre se proporciona junto con la concentración de glucosa, pero las señales de salida secundarias sensibles al hematocrito son dependientes de la temperatura. Por tanto, la temperatura también es un estímulo externo para las señales de salida sensibles al Hct y el efecto de la temperatura se reduce preferentemente por la normalización. El procedimiento implicado es primero construir el gráfico de corrientes sensibles al Hct frente a la temperatura a una concentración de Hct seleccionada única. Entonces, se determina una curva de calibración normalizada al Hct que proporciona los valores de %-Hct calculados a partir de las señales de salida de Hct normalizadas a la temperatura para su uso posterior.

Se generaron valores de señal de salida de Hct sintetizada similarmente a como se describió previamente para A1c y glucosa con respecto a la FIG. 1C y FIG. 3B, respectivamente. En esta determinación, que no se muestra en una figura, la corriente registrada a partir del electrodo de Hct para las muestras de referencia a cada concentración de hematocrito de la muestra de referencia se representó en el eje Y vertical mientras que las concentraciones de hematocrito de la muestra de referencia se representaron en el eje X horizontal. Se representó una línea de regresión para cada temperatura (6,0 °C, 10,9 °C, 15,9 °C, 22,0 °C, 30,4 °C, 35,1 °C y 40,0 °C) y se determinó un valor de señal de salida de Hct sintetizada a una concentración de hematocrito de la muestra de 40 % para cada temperatura.

La FIG. 4D representa las señales sintetizadas determinadas a partir de la señal de salida secundaria sensible a la concentración de hematocrito de la muestra frente a la temperatura para muestras de referencia que incluyen una concentración de hematocrito de 40 %. A partir de la operación anterior, se analizaron siete pares de las señales de salida de Hct sintetizadas a partir de una concentración de Hct seleccionada única de 40 % y se obtuvieron y representaron las temperaturas a las que se analizaron las muestras de referencia. Entonces se usó una técnica de regresión, en este caso polinómica, para determinar una relación de normalización específica para Hct como se muestra en la figura, pero que tiene la forma general  $NV_{Hct} = (b_2 * T^2 + b_1 * T + b_0)$ , donde  $b_2$ ,  $b_1$  y  $b_0$  son los coeficientes de la función de normalización polinómica de 2º orden a partir del ajuste a curva y T es la temperatura). Se determinó un valor de normalización de Hct, y se determinaron corrientes de electrodo de Hct normalizadas con la relación general  $Ni_{Hct} = i_{Hct}/NV_{Hct}$ , donde  $Ni_{Hct}$  son las corrientes del electrodo de Hct normalizadas a la temperatura,  $i_{Hct}$  son las corrientes sensibles a Hct a partir del electrodo de Hct y  $NV_{Hct}$  es el valor de normalización de Hct.

La FIG. 4E muestra la correlación de referencia normalizada a la temperatura para Hct donde las concentraciones de % de Hct de la muestra de referencia se representaron frente a las corrientes de salida del electrodo de Hct normalizado a la temperatura. Se pueden tratar similarmente otros interferentes si el sistema de biosensor proporciona una señal de salida secundaria sensible al interferente.

La FIG. 4F representa la segunda relación de normalización determinada entre las señales de salida resultantes sensibles al analito normalizadas a la temperatura y los valores de %-Hct de la muestra de referencia - el segundo estímulo externo. La FIG. 4F estableció la correlación entre las señales de salida normalizadas a la temperatura y las concentraciones de %-Hct de la muestra. Es decir, a la concentración de glucosa seleccionada única de 0 100 o

500 mg/dL, las señales de salida normalizadas a la temperatura son sustantivamente sensibles a la concentración de Hct, el segundo estímulo externo.

Entonces se usó una técnica de regresión, en este caso polinómica ( $c_2 \cdot \text{Hct}^2 + c_1 \cdot \text{Hct} + c_0$ , donde  $c_2$ ,  $c_1$  y  $c_0$  son los coeficientes de la función de normalización polinómica de 2º orden a partir del ajuste a curva y Hct es el valor del segundo estímulo externo cuantificado para Hct), para determinar la relación de normalización entre las señales de salida sensibles al segundo estímulo externo sintetizadas a una única concentración de analito de la muestra seleccionada y los valores del segundo estímulo externo cuantificados (concentraciones de hematocrito de la muestra de referencia de 0 %, 20 %, 40 %, 55 % y 70 %). La relación de normalización específica para los datos de análisis de glucosa de 100 y 500 mg/dL de este ejemplo se muestra en la FIG. 4F como  $y = -0,00008X^2 - 0,00456X + 1,31152$  (100 mg/dL) y  $y = -0,0004X^2 - 0,0228X + 6,5577$  (500 mg/dL), así que muestran los coeficientes polinómicos de 2º orden específicos para este ejemplo, donde Y es la señal de salida sensible al segundo estímulo externo sintetizada calculada sensible al segundo estímulo externo (Hct) a una única concentración de analito seleccionada, y X es los valores del segundo estímulo externo cuantificados. Un análisis diferente tendría coeficientes diferentes. Cuando un valor de X (el valor de señal del segundo estímulo externo cuantificado) se entra en el polinomio de 2º orden, se genera un valor de Y en esta relación de normalización, que es el valor de normalización (NV).

Entonces se determinaron segundas señales de salida sensibles al analito normalizadas **167** a partir del valor de normalización a 100 mg/dL. Así, las señales de salida normalizadas a la temperatura a partir del eje Y vertical de la FIG. 4C se convirtieron entonces en los valores de la segunda señal primaria normalizada usando la relación de normalización de la FIG. 4F con sus valores de normalización correspondientes. La determinación de las señales sensibles al analito normalizadas a partir del valor de normalización se puede representar por la relación  $Ni_G = i_{\text{medida}} / NV_{\text{Temp-Hct}}$ , donde  $Ni_G$  son las señales sensibles al analito normalizadas a la temperatura y hematocrito,  $i_{\text{medida}}$  son las corrientes sensibles a la glucosa a partir del dispositivo de medición y  $NV_{\text{Temp-Hct}}$  es el valor de normalización determinado a partir de la normalización a la temperatura y al hematocrito.

La FIG. 4G representa gráficamente la reducción en el error introducido por el estímulo externo de hematocrito como se representa en la FIG. 4C proporcionado mediante el uso de los valores de señal de salida sensible al analito normalizada a la temperatura y al Hct a la concentración de glucosa seleccionada de 100 mg/dL. Así, esta figura se puede considerar similarmente a la FIG. 3C; sin embargo, en este ejemplo, se usan corrientes normalizadas tanto a la temperatura como al hematocrito. Se muestran ecuaciones de regresión para las concentraciones de Hct de límite inferior (0 %) y superior (70 %). En relación con la FIG. 4C, la divergencia entre los límites de Hct superior e inferior se ha reducido desde aproximadamente 4 unidades de señal de salida normalizada (FIG. 4C) hasta aproximadamente 0,25 unidades de señal de salida (FIG. 4 g) a ~600 mg/dL, una reducción aproximada de 93 % ( $4 - 0,25 / 4 \cdot 100$ ) en la divergencia entre las líneas de regresión.

La FIG. 4H proporciona un ejemplo de la determinación de una correlación de referencia normalizada a partir de la combinación de valores de señal de salida sensible al analito normalizada a la temperatura y el hematocrito de la FIG. 4G. Se representaron las señales normalizadas a la temperatura y al hematocrito en el eje Y vertical frente a las concentraciones de analito de la muestra de referencia para glucosa y se ajustaron a curva por una técnica de regresión para proporcionar la correlación de referencia normalizada. Se usó una técnica de regresión, en este caso lineal ( $Y = \text{Pendiente} \cdot X + \text{Int}$ ), para determinar la correlación de referencia normalizada, donde durante el análisis **200** Y es un valor de señal de salida primaria normalizada determinada por el dispositivo de medición y X es la concentración de analito determinada de la muestra.

La correlación de referencia normalizada específica para los datos del análisis de glucosa de este ejemplo se muestra en la FIG. 4H como  $Y = 0,0104X - 0,1339$ , mostrando así los coeficientes lineales específicos para este ejemplo. Un análisis diferente tendría coeficientes diferentes. También se muestra en la FIG. 4H  $R^2 = 0,9828$ , que muestra la excelente concordancia entre las señales de salida primarias normalizadas y las concentraciones de analito de la muestra de referencia para glucosa. Así, la correlación de referencia normalizada se refiere a las señales de salida normalizadas y la concentración de analito de la muestra. Cuando una señal de salida normalizada se entra en la correlación de referencia normalizada, se genera una concentración de analito de muestra. Se puede considerar que la FIG. 4H es similar a la FIG. 3E, excepto que incorpora tanto la normalización a la temperatura como al Hct en la información de calibración.

Para las concentraciones de hematocrito proporcionadas de las muestras de sangre (0 %, 20 %, 40 %, 55 % y 70 %), las pendientes de las correlaciones de referencia con la temperatura y las normalizaciones a la temperatura/hematocrito se tabulan en la Tabla 5, donde Pendiente/T es la pendiente de la correlación de referencia normalizada a la temperatura y Pendiente/T/H es la pendiente de la correlación de referencia normalizada a la temperatura y al hematocrito.

**Tabla 5:** Resumen de la normalización para los estímulos de temperatura y hematocrito

% de Hct	Pendiente/T FIG. 4C	Pendiente/T/H FIG. 4G
0	0,0133	0,0105
20	0,0126	0,0107
40	0,0105	0,0105
55	0,0082	0,0101
70	0,0058	0,0102
<b>Pendiente media</b>	0,0101	0,0104
<b>DE, pendiente</b>	0,0031	0,0002
<b>% de CV</b>	30,7	2,3

5 La mejora en el rendimiento de medición se puede apreciar mejor mirando las pendientes medias de respuesta y el %-  
 CV de las pendientes para la normalización de temperatura solo y después de la normalización para tanto la  
 temperatura como el hematocrito. En este ejemplo, el %-CV de las pendientes de respuesta determinada con una  
 correlación de referencia normalizada a la temperatura fue 30,7 %. A diferencia, el %-CV de las pendientes de  
 respuesta determinadas con la correlación de referencia normalizada a la temperatura y el hematocrito descrita se  
 redujo al 2,3 %, una reducción aproximada de 92 % ( $30,7 - 2,3 / 30,7 * 100$ ) en %-CV que proporciona un aumento  
 10 sustancial en el rendimiento de medición al sistema de biosensor.

15 La FIG. 4I representa gráficamente el %-sesgo de las concentraciones de analito (glucosa) determinadas por el  
 dispositivo de medición de un sistema de biosensor usando una correlación de referencia convencional (%  
 sesgo\_bruto), una correlación de referencia normalizada a la temperatura (% sesgo\_T) y una correlación de referencia  
 normalizada a la temperatura y el Hct (% sesgo\_T/Hct). La figura establece que las corrientes de salida que incluyen  
 los estímulos de temperatura y hematocrito en combinación muestran un %-sesgo de casi  $\pm 100$  % cuando se  
 transforma directamente con una correlación de referencia convencional a las concentraciones de analito de la  
 muestra. La retirada del estímulo de temperatura de la información de calibración permite que el dispositivo de  
 medición determine concentraciones de analito con un %-sesgo de aproximadamente  $\pm 50$  %, mientras que la retirada  
 20 adicional del estímulo de Hct reduce el %-sesgo hasta aproximadamente  $\pm 30$  %. Así, se observó una reducción de  
 aproximadamente 70 % en el %-sesgo con la información de calibración normalizada descrita en relación con la  
 información de calibración convencional. Esto es una mejora sustancial en relación con los sistemas convencionales  
 con respecto al rendimiento de medición que el sistema de biosensor puede proporcionar a partir de la información de  
 calibración sin compensación adicional.

25 La FIG. 5 representa una representación esquemática de un sistema de biosensor **500** que determina una  
 concentración de analito en una muestra de un líquido biológico. El sistema de biosensor **500** incluye un dispositivo  
 de medición **502** y un sensor de prueba **504**. El dispositivo de medición **502** se puede implementar en un instrumento  
 analítico, que incluye un dispositivo de mesa, un dispositivo portátil o de mano, o similares. Preferentemente, el  
 dispositivo de medición **502** se implementa en un dispositivo de mano. El dispositivo de medición **502** y el sensor de  
 prueba **504** se pueden adaptar para implementar un sistema de sensor electroquímico, un sistema de sensor óptico,  
 30 una combinación de los mismos, o similares.

El sistema de biosensor **500** determina la concentración de analito de la muestra usando la información de calibración  
 desarrollada de acuerdo con las técnicas de normalización previamente descritas y se guarda en el dispositivo de  
 medición **502**. La información de calibración de uno o ambos de los métodos de calibración **100** y **102** se puede  
 almacenar en el dispositivo de medición **502**. La información de calibración incluye una o más relaciones de  
 normalización y una o más correlaciones de referencia normalizadas. Se pueden guardar uno o ambos métodos de  
 calibración **100** y **102** en el dispositivo de medición **502**, por lo que la información de calibración normalizada se puede  
 determinar por el dispositivo de medición **502**. El método de análisis **200** se puede almacenar en el dispositivo de  
 medición para implementación por el sistema de biosensor **500**. El método de calibración del dispositivo de medición  
 puede mejorar el rendimiento de la medición del sistema de biosensor **500** en la determinación de la concentración de  
 35 analito de la muestra. Se puede utilizar el sistema de biosensor **500** para determinar las concentraciones de analito,  
 que incluyen las de glucosa, A1c, ácido úrico, lactato, colesterol, bilirrubina y similares. Aunque se muestra una  
 configuración particular, el sistema de biosensor **500** puede tener otras configuraciones, que incluyen aquellas con  
 componentes adicionales.  
 40

- 5 El sensor de prueba **504** tiene una base **506** que forma un depósito **508** y un canal **510** con una abertura **512**. El depósito **508** y el canal **510** se pueden cubrir por una tapa con una ventilación. El depósito **508** define un volumen parcialmente encerrado. El depósito **508** puede contener una composición que ayuda en la retención de una muestra líquida tal como polímeros hinchables en agua o matrices de polímero poroso. Los reactivos se pueden depositar en el depósito **508** y/o el canal **510**. Los reactivos pueden incluir una o más enzimas, aglutinantes, mediadores y especies tipo. Los reactivos pueden incluir un indicador químico para un sistema óptico. El sensor de prueba **504** tiene una interfaz de muestra **514** adyacente al depósito **508**. El sensor de prueba **504** puede tener otras configuraciones.
- 10 En un sistema de sensor óptico, la interfaz de muestra **514** tiene un portal óptico o abertura para ver la muestra. El portal óptico se puede cubrir por un material esencialmente transparente. La interfaz de muestra **514** puede tener portales ópticos en lados opuestos del depósito **508**.
- 15 En un sistema electroquímico, la interfaz de muestra **514** tiene conductores conectados a un electrodo de trabajo **532** y un contraelectrodo **534** de los que se puede medir la señal de salida analítica. La interfaz de muestra **514** también puede incluir conductores conectados a uno o más electrodos **536** adicionales a partir de los que se pueden medir las señales de salida secundarias. Los electrodos pueden estar sustancialmente en el mismo plano o en más de un plano. Los electrodos pueden estar dispuestos sobre una superficie de la base **506** que forma el depósito **508**. Los electrodos se pueden extender o proyectar dentro del depósito **508**. Una capa de dieléctrico puede cubrir parcialmente los conductores y/o los electrodos. La interfaz de muestra **514** puede tener otros electrodos y conductores.
- 20 El dispositivo de medición **502** incluye circuitería eléctrica **516** conectada a una interfaz de sensor **518** y una pantalla opcional **520**. La circuitería eléctrica **516** incluye un procesador **522** conectado a un generador de señales **524**, un sensor de temperatura opcional **526** y un medio de almacenamiento **528**.
- 25 El generador de señales **524** es capaz de proporcionar una señal de entrada eléctrica a la interfaz de sensor **518** en respuesta al procesador **522**. En sistemas ópticos, se puede usar la señal de entrada eléctrica para operar o controlar el detector y la fuente de luz en la interfaz de sensor **518**. En sistemas electroquímicos, la señal de entrada eléctrica se puede transmitir por la interfaz de sensor **518** a la interfaz de muestra **514** para aplicar la señal de entrada eléctrica a la muestra de líquido biológico. La señal de entrada eléctrica puede ser un potencial o corriente y puede ser constante, variable, o una combinación de las mismas, tal como cuando se aplica una señal de CA con un desplazamiento de la señal de CC. La señal de entrada eléctrica se puede aplicar continuamente o como múltiples excitaciones, secuencias o ciclos. El generador de señales **524** también puede ser capaz de registrar una señal de salida de la interfaz de sensor como regenerador-grabador.
- 30 El sensor de temperatura **526** opcional es capaz de determinar la temperatura ambiente del dispositivo de medición **502**. La temperatura de la muestra se puede estimar a partir de la temperatura ambiente del dispositivo de medición **502**, calcular a partir de la señal de salida, o suponer que es la misma o similar a la temperatura ambiente del dispositivo de medición **502**. La temperatura se puede medir usando un termistor, termómetro, u otro dispositivo de detección de temperatura. Se pueden usar otras técnicas para determinar la temperatura de la muestra.
- 35 El medio de almacenamiento **528** puede ser una memoria magnética, magnética, óptica o de semiconductor, otro dispositivo de almacenamiento, o similares. El medio de almacenamiento **528** puede ser un dispositivo de memoria fijo, un dispositivo de memoria extraíble, tal como una tarjeta de memoria, a la que se accede de forma remota, o similares.
- 40 El procesador **522** es capaz de implementar el método de análisis de analito usando código de software legible por ordenador y la información de calibración guardada en el medio de almacenamiento **528**. El procesador **522** puede empezar el análisis del analito en respuesta a la presencia del sensor de prueba **504** en la interfaz de sensor **518**, la aplicación de una muestra al sensor de prueba **504**, en respuesta a la entrada de usuario, o similares. El procesador **522** es capaz de dirigir el generador de señales **524** para proporcionar la señal de entrada eléctrica a la interfaz de sensor **518**. El procesador **522** es capaz de recibir la temperatura de la muestra del sensor de temperatura **526**. El procesador **522** es capaz de recibir las señales de salida de la interfaz de sensor **518**.
- 45 En sistemas electroquímicos, la señal de salida primaria sensible al analito se genera a partir de los electrodos de trabajo y contraelectrodos **532**, **534** en respuesta a la reacción del analito en la muestra. Las señales de salida secundarias también se pueden generar a partir de electrodos adicionales **536**. En sistemas ópticos, el detector o los detectores de la interfaz de sensor **518** reciben las señales de salida primarias y cualquier señal secundaria. Las señales de salida se pueden generar usando un sistema óptico, un sistema electroquímico, o similares. El procesador **522** es capaz de determinar las concentraciones de analito de señales de salida usando la información de calibración guardada en el medio de almacenamiento **528**. Los resultados del análisis de analitos pueden ser la salida a la pantalla **520**, un receptor remoto (no mostrado), y/o se pueden almacenar en el medio de almacenamiento **528**.
- 50 La información de calibración referente a las concentraciones de analito de la muestra de referencia y señales de salida del dispositivo de medición **502** se pueden representar gráficamente, matemáticamente, una combinación de los mismos, o similares. La información de calibración se representa preferentemente como ecuaciones de correlación, que se pueden representar por un tabla de números de programa (PNA), otra tabla de consulta, o similares, que se almacena en el medio de almacenamiento **528**.
- 55

También se pueden proporcionar instrucciones referentes a la implementación del análisis de analitos por el código de software legible por ordenador en el medio de almacenamiento **528**. El código puede ser código de objeto o cualquier otro código que describa o controle la funcionalidad descrita. Los datos del análisis de analitos se pueden someter a uno o más tratamientos de datos, que incluyen la determinación de las tasas de decaimiento, constantes K, relaciones, funciones y similares en el procesador **522**.

En los sistemas electroquímicos, la interfaz de sensor **518** tiene contactos que conectan o comunican eléctricamente con los conductores en la interfaz de muestra **514** del sensor de prueba **504**. La interfaz de sensor **518** es capaz de transmitir la señal de entrada eléctrica desde el generador de señales **524** mediante los contactos hasta los conectores en la interfaz de muestra **514**. La interfaz de sensor **518** también es capaz de transmitir la señal de salida de la muestra a través de los contactos al procesador **522** y/o generador de señales **524**.

En los sistemas ópticos de absorción de luz y generados por luz, la interfaz de sensor **518** incluye un detector que recoge y mide luz. El detector recibe luz del sensor de prueba **504** a través del portal óptico en la interfaz de muestra **514**. En un sistema óptico de absorción de luz, la interfaz de sensor **518** también incluye una fuente de luz tal como un láser, un diodo emisor de luz, o similares. La haz incidente puede tener una longitud de onda seleccionada para absorción por el producto de reacción. La interfaz de sensor **518** dirige un haz incidente desde la fuente de luz a través del portal óptico en la interfaz de muestra **514**. El detector se puede situar a un ángulo tal como 45° con respecto al portal óptico para recibir la luz reflejada de nuevo de la muestra. El detector se puede situar adyacente a un portal óptico en el otro lado de la muestra desde la fuente de luz para recibir la luz transmitida a través de la muestra. El detector se puede situar en otra localización para recibir la luz reflejada y/o transmitida.

La pantalla opcional **520** puede ser analógica o digital. La pantalla **520** puede incluir una LCD, un LED, un OLED, una pantalla fluorescente al vacío, u otra pantalla adaptada para mostrar una lectura numérica. Se pueden usar otras tecnologías de pantallas. La pantalla **520** comunica eléctricamente con el procesador **522**. La pantalla **520** puede estar separada del dispositivo de medición **502**, tal como cuando está en comunicación inalámbrica con el procesador **522**. Alternativamente, la pantalla **520** se puede retirar del dispositivo de medición **502**, tal como cuando el dispositivo de medición **502** comunica eléctricamente con un dispositivo informático remoto, bomba dosificadora de medicación y similares.

En uso, una muestra líquida para análisis se transfiere al depósito **508** introduciendo el líquido a la abertura **512**. La muestra de líquido circula a través del canal **510**, llenando el depósito **508**, mientras que expulsa el aire previamente contenido. La muestra líquida reacciona químicamente con los reactivos depositados en el canal **510** y/o depósito **508**.

El sensor de prueba **502** se dispone en relación con el dispositivo de medición **502**, de forma que la interfaz de muestra **514** esté en comunicación eléctrica y/u óptica con la interfaz de sensor **518**. La comunicación eléctrica incluye la transferencia de señales de entrada y/o salida entre contactos en la interfaz de sensor **518** y conductores en la interfaz de muestra **514**. La comunicación óptica incluye la transferencia de luz entre un portal óptico en la interfaz de muestra **514** y un detector en la interfaz de sensor **518**. La comunicación óptica también incluye la transferencia de luz entre un portal óptico en la interfaz de muestra **514** y una fuente de luz en la interfaz de sensor **518**.

El procesador **522** es capaz de dirigir el generador de señales **524** para proporcionar una señal de entrada a la interfaz de sensor **518** del sensor de prueba **504**. En un sistema óptico, la interfaz de sensor **518** es capaz de operar el detector y la fuente de luz en respuesta a la señal de entrada. En un sistema electroquímico, la interfaz de sensor **518** es capaz de proporcionar la señal de entrada a la muestra a través de la interfaz de muestra **514**. El sensor de prueba **504** es capaz de generar una o más señales de salida en respuesta a la señal de entrada. El procesador **522** es capaz de recibir las señales de salida generadas en respuesta a la reacción redox del analito en la muestra como se ha tratado previamente.

El procesador **522** es capaz de transformar la señal de salida usando el método de análisis y la información de calibración guardada en el medio de almacenamiento **528** para determinar una concentración de analito inicial de la muestra. El procesador **522** puede entonces informar esta concentración de analito inicial como la concentración de analito final de la muestra. Alternativamente, el procesador **522** puede además procesar esta concentración de analito inicial de la muestra usando un sistema de compensación. El procesador **522** también puede implementar más de una compensación y/u otras funciones.

Para proporcionar un entendimiento claro y más coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones de la presente solicitud, se proporcionan las siguientes definiciones.

"Promedio" o "promediado" o "promediando" incluye la combinación de dos o más variables para formar una variable promedio. Una variable puede ser un valor numérico, una expresión algebraica o científica, o similares. Por ejemplo, el promediado se puede realizar sumando las variables y dividiendo la suma entre el número de variables; tal como en la ecuación  $AVG = (a + b + c) / 3$ , donde AVG es la variable promedio y a, b y c son las variables. En otro ejemplo, el promediado incluye modificar cada variable por un coeficiente de promediado y luego sumar las variables modificadas para formar un promedio ponderado; tal como en la ecuación  $W_{AVG} = 0,2 \cdot a + 0,4 \cdot b + 0,4 \cdot c$ , donde  $W_{AVG}$  es el promedio ponderado, 0,2, 0,4 y 0,4 son los coeficientes de promediado, y a, b y c son las variables. Los coeficientes de

promediado son números entre 0 y 1; y si se suman, proporcionarán una suma de 1 o sustancialmente 1. Se pueden usar otros métodos de promediado.

5 "Especie medible" trata una especie para la que el sistema de biosensor se diseña para determinar la presencia y/o la concentración en la muestra y puede ser el analito de interés o un mediador cuya concentración en la muestra es sensible a la del analito de interés.

Aunque se han descrito diversas realizaciones de la invención, será evidente para los expertos habituales en la técnica que son posibles otras realizaciones e implementaciones dentro del alcance de la invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de calibrado de un dispositivo de medida de un sistema de biosensor, comprendiendo el método:
  - 5 para cada una de las al menos dos concentraciones de analito diferentes de muestras de referencia, medir al menos dos señales de salida sensibles al analito, estando las señales de salida sensibles al analito afectadas por dos estímulos que incluyen
    - un estímulo primario en forma de una concentración de analito de la muestra de referencia de cada muestra de referencia, y
    - 10 un estímulo externo resultante de una o más de una característica física, un aspecto medioambiental o un error de variación de la fabricación incorporado en las señales de salida sensibles al analito, en donde la medición se realiza a al menos dos niveles de estímulo externo diferentes;
      - medir, a partir de cada muestra de referencia, una señal de salida sensible asociada al estímulo externo y que está en forma de una señal de salida sensible al estímulo externo;
      - 15 cuantificar la señal de salida sensible al estímulo externo para proporcionar al menos dos valores cuantificados de estímulo externo;
        - determinar una relación de normalización a partir de las señales de salida sensibles al analito y los dos valores cuantificados de estímulo externo, siendo la relación de normalización determinada a una única concentración de analito de la muestra seleccionada de las concentraciones de analito de la muestra de referencia;
        - determinar un valor normalizado a partir de la relación de normalización entrando los valores cuantificados de estímulo externo en la relación de normalización;
        - 20 dividir las señales de salida sensibles al analito entre el valor de normalización para proporcionar señales de salida sensibles al analito normalizadas;
          - 25 para al menos dos concentraciones de analito diferentes, determinar una correlación de referencia normalizada entre las dos señales de salida sensibles al analito normalizadas y las concentraciones de analito de la muestra de referencia por una técnica de regresión, proporcionando la correlación de referencia normalizada un efecto de estímulo reducido en el que los dos estímulos se reducen solo al estímulo primario; y
            - guardar la relación de normalización y la correlación de referencia normalizada en el dispositivo de medición.
  2. El método de la reivindicación 1, que comprende además determinar, mediante el dispositivo de medición después de la medición de las al menos dos señales de salida sensibles al analito, una correlación de referencia relacionando el estímulo primario con las dos señales de salida sensibles al analito.
  - 30 3. El método de la reivindicación 1, en donde la medición de las al menos dos señales de salida sensibles al analito incluye medir al menos seis señales de salida sensibles al analito.
  4. El método de la reivindicación 1, en donde la medición de las al menos dos señales de salida sensibles al analito es simultánea con la medición de la señal de salida sensible al estímulo externo.
  - 35 5. El método de la reivindicación 1, en donde la cuantificación de la señal de salida sensible al estímulo externo es la cuantificación directa.
  6. El método de la reivindicación 1, en donde la cuantificación de la señal de salida sensible al estímulo externo es la cuantificación indirecta.
  7. El método de la reivindicación 1, en donde la correlación de referencia normalizada incluye una curva de calibración normalizada.
  - 40 8. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra incluye sangre.
  9. El método de la reivindicación 1, en donde el estímulo externo incluye al menos uno de temperatura, hemoglobina total o hematocrito.
  10. Un sistema de biosensor de calibración de un dispositivo de medición, comprendiendo el sistema:
    - 45 un sensor de prueba que tiene una interfaz de muestra adyacente a un depósito formado por una base, estando el sensor de prueba configurado para generar al menos una señal de salida de una muestra; y
      - un dispositivo de medición que tiene un procesador conectado a una interfaz de sensor, estando la interfaz de sensor en comunicación eléctrica con la interfaz de muestra, estando el procesador en comunicación eléctrica con un medio de almacenamiento y que está configurado para,

- para cada una de al menos dos concentraciones de analito diferentes de muestras de referencia, medir al menos dos señales de salida sensibles al analito, estando las señales de salida sensibles al analito afectadas por dos estímulos que incluyen
- 5 un estímulo primario en forma de una concentración de analito de la muestra de referencia de cada muestra de referencia, y
- un estímulo externo resultante de una o más de una característica física, un aspecto medioambiental o un error de variación de la fabricación incorporado en las señales de salida sensibles al analito, en donde la medición se realiza a al menos dos niveles de estímulo externo diferentes;
- 10 medir, de cada muestra de referencia, una señal de salida sensible asociada al estímulo externo y que está en forma de una señal de salida sensible al estímulo externo,
- cuantificar la señal de salida sensible al estímulo externo para proporcionar al menos dos valores cuantificados de estímulo externo,
- 15 determinar una relación de normalización a partir de las señales de salida sensibles al analito y los dos valores cuantificados de estímulo externo, siendo la relación de normalización determinada a una única concentración de analito de la muestra seleccionada de las concentraciones de analito de la muestra de referencia,
- determinar un valor normalizado a partir de la relación de normalización entrando los valores cuantificados de estímulo externo en la relación de normalización,
- 20 dividir las señales de salida sensibles al analito entre el valor de normalización para proporcionar señales de salida sensibles al analito normalizadas,
- para al menos dos concentraciones de analito diferentes, determinar una correlación de referencia normalizada entre las dos señales de salida sensibles al analito normalizadas y las concentraciones de analito de la muestra de referencia por una técnica de regresión, proporcionando la correlación de referencia normalizada un efecto de estímulo reducido en el que los dos estímulos se reducen solo al estímulo primario, y
- guardar la relación de normalización y la correlación de referencia normalizada en el dispositivo de medición.
- 25 11. El sistema de la reivindicación 10, en donde la medición de las al menos dos señales de salida sensibles al analito es simultánea con la medición de la señal de salida sensible al estímulo externo.
12. El sistema de la reivindicación 10, en donde la correlación de referencia normalizada incluye una curva de calibración normalizada.
13. El sistema de la reivindicación 10, en donde la muestra incluye sangre.

30

100

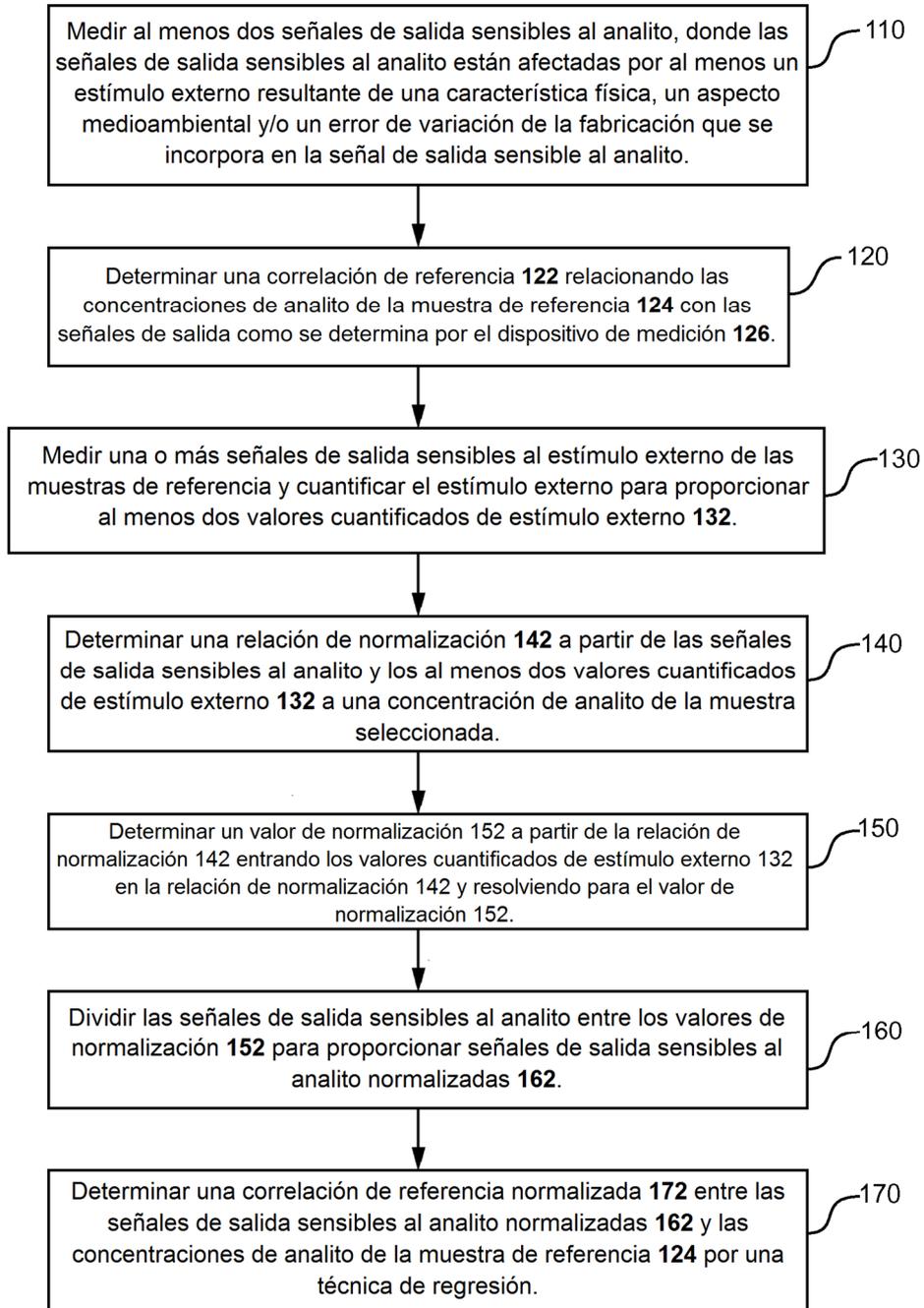


FIG.A

102

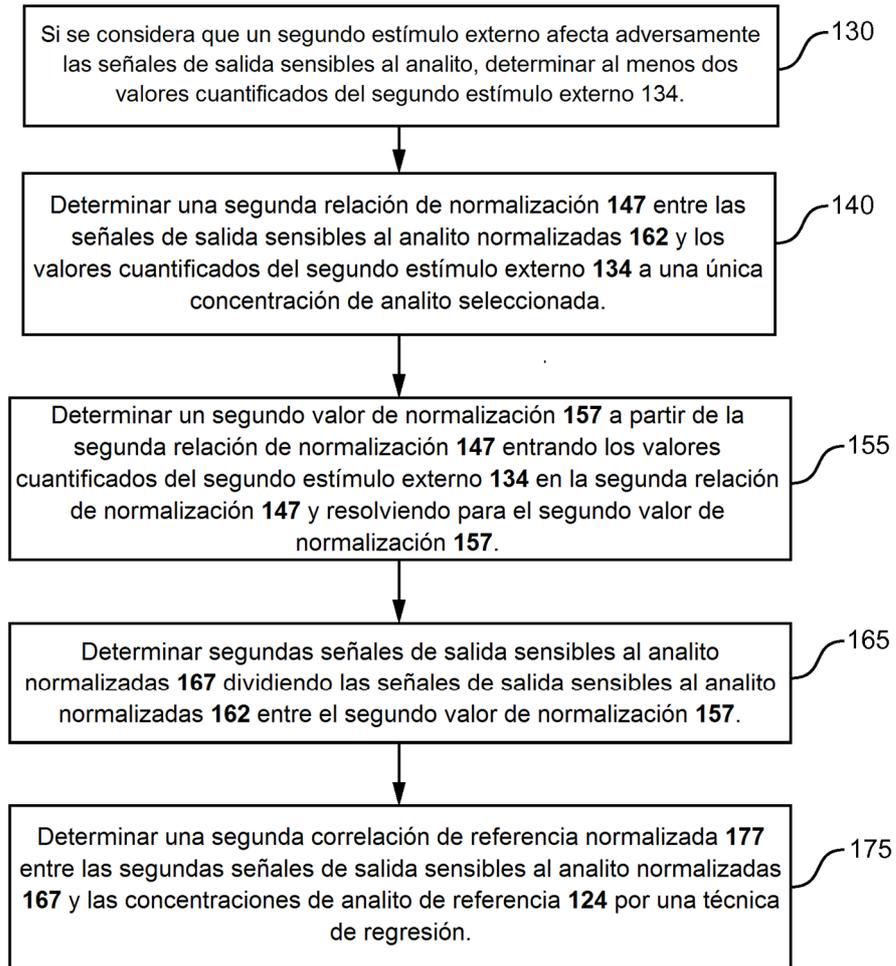


FIG. B

200

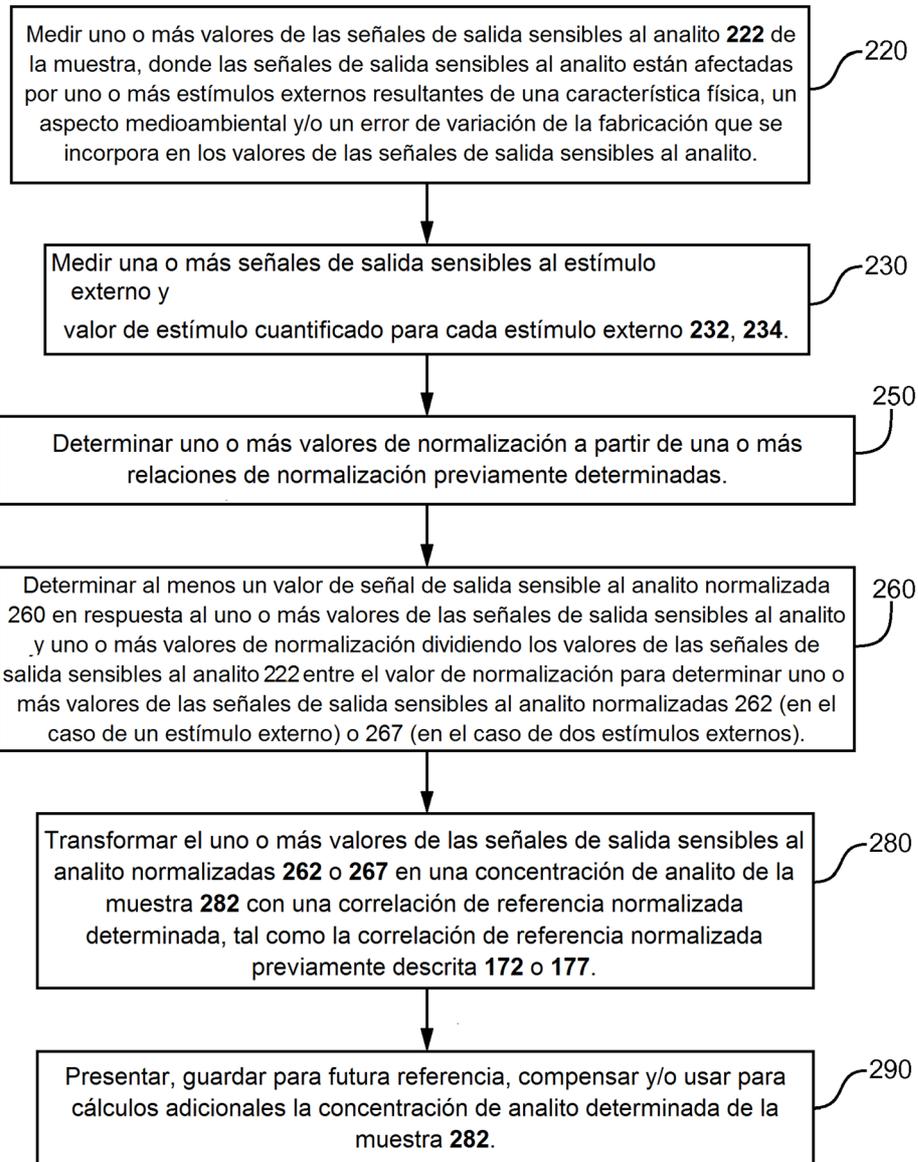


FIG. C

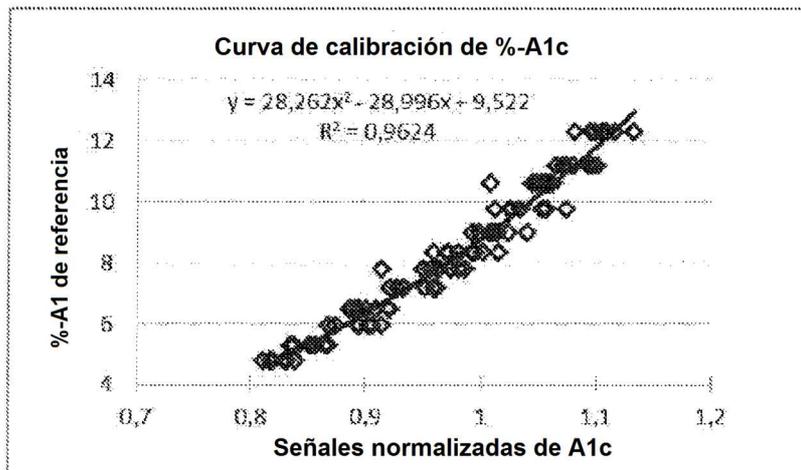


FIG.1G

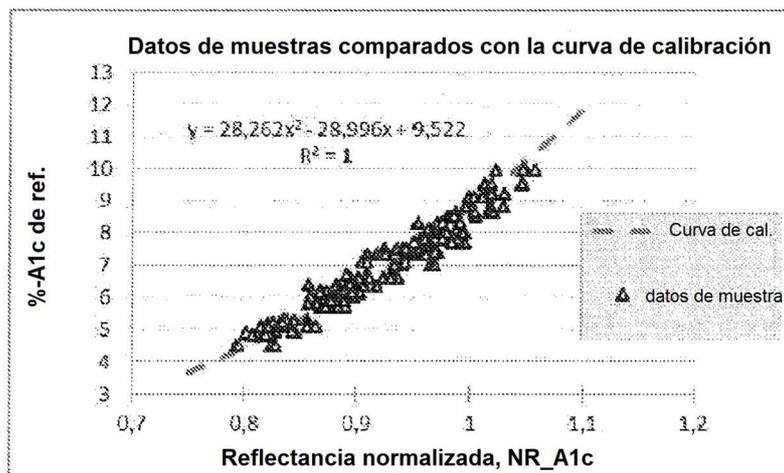


FIG.1H

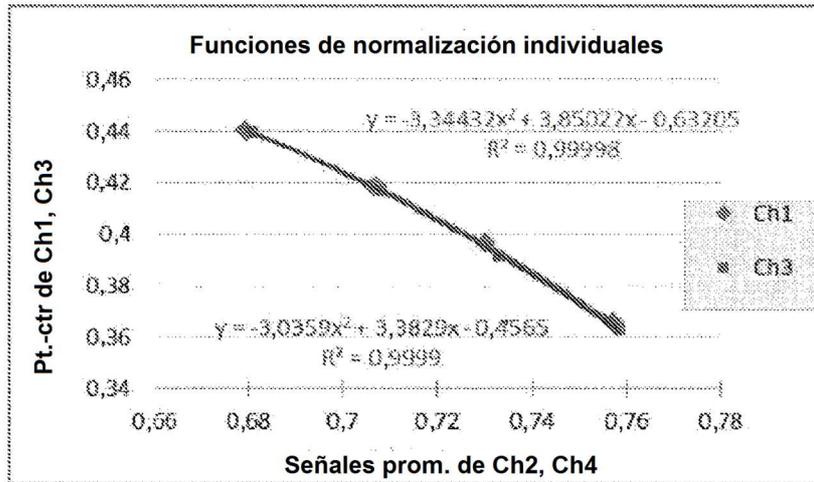


FIG. 2A

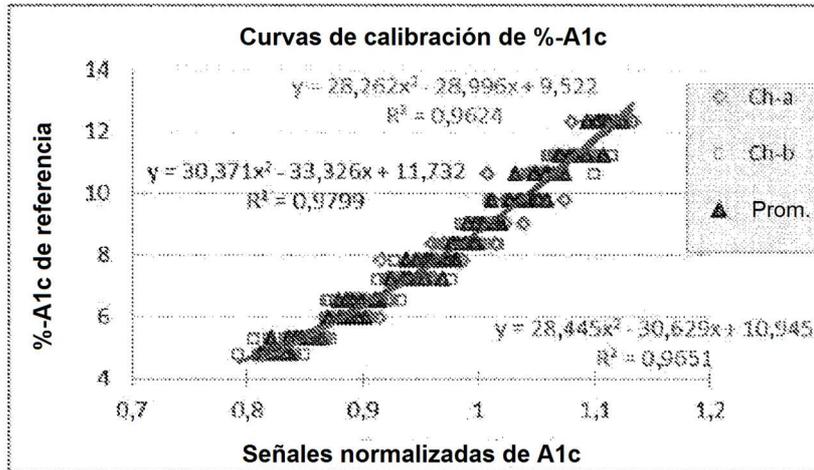


FIG. 2B

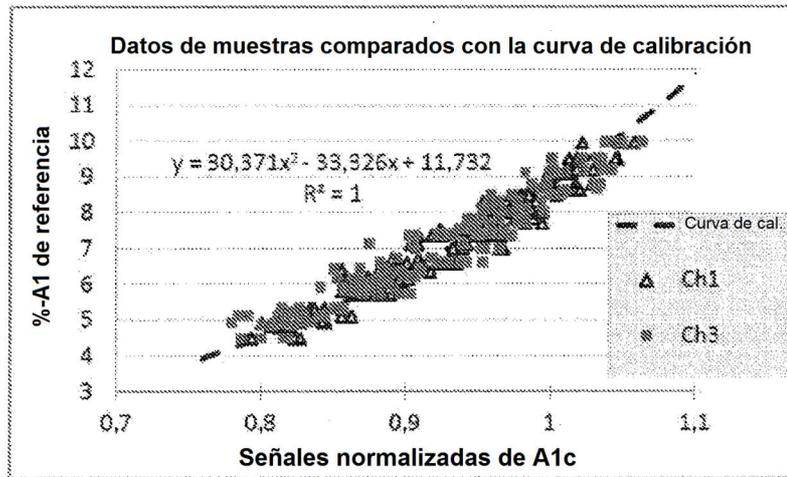


FIG.2C

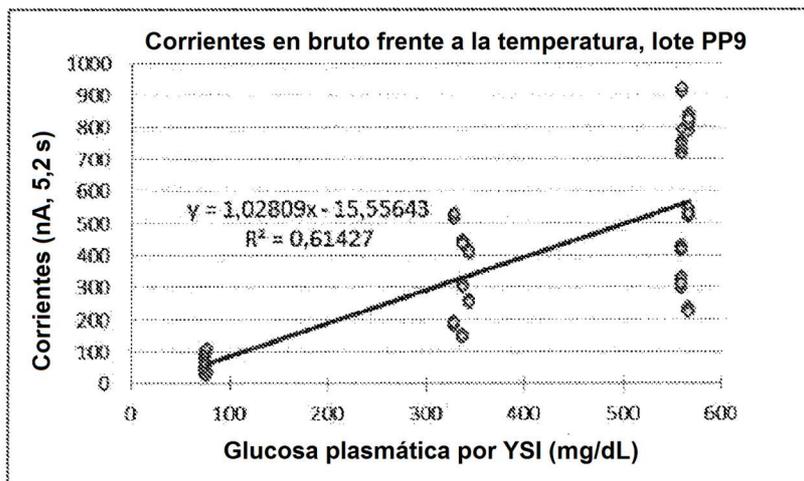


FIG.3A

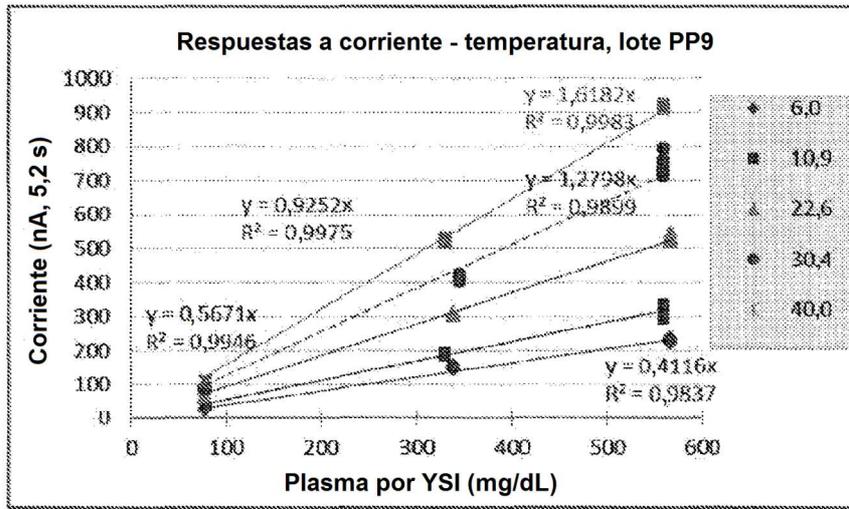


FIG.3B

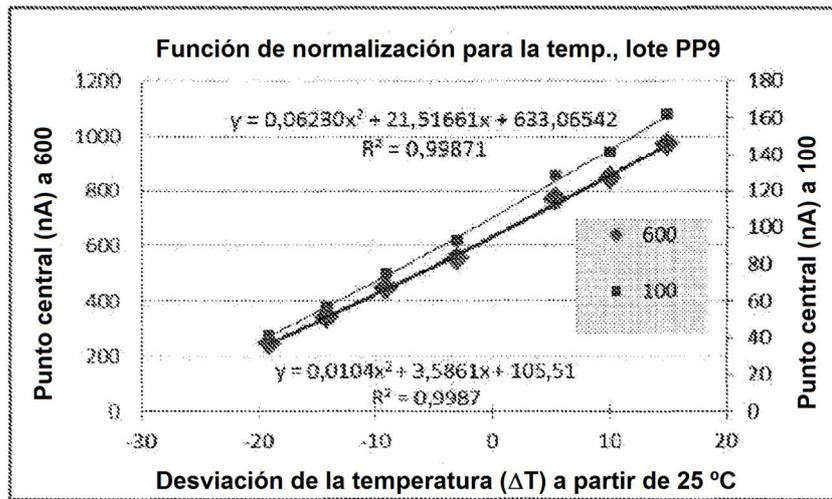


FIG.3C

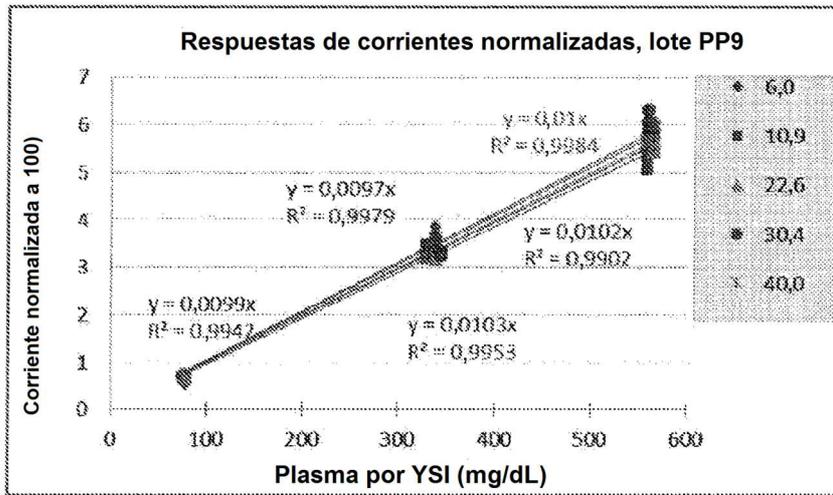


FIG.3D

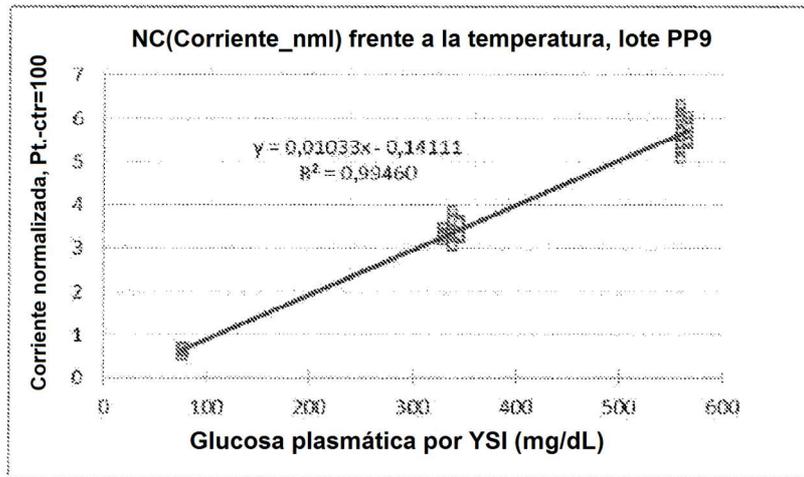


FIG.3E

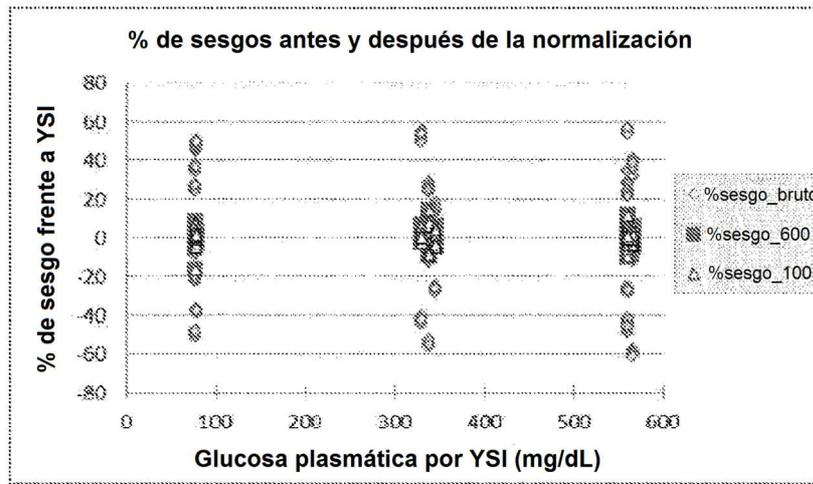


FIG.3F

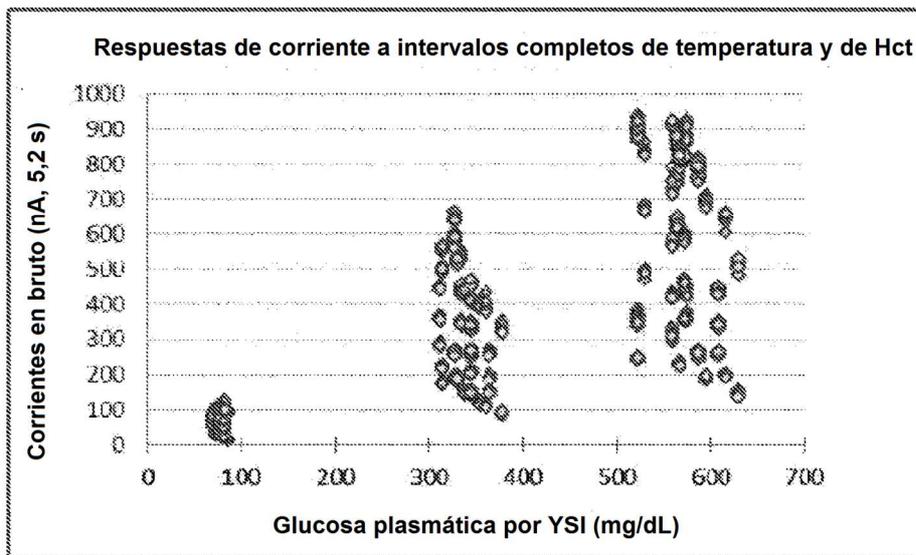


FIG.4A

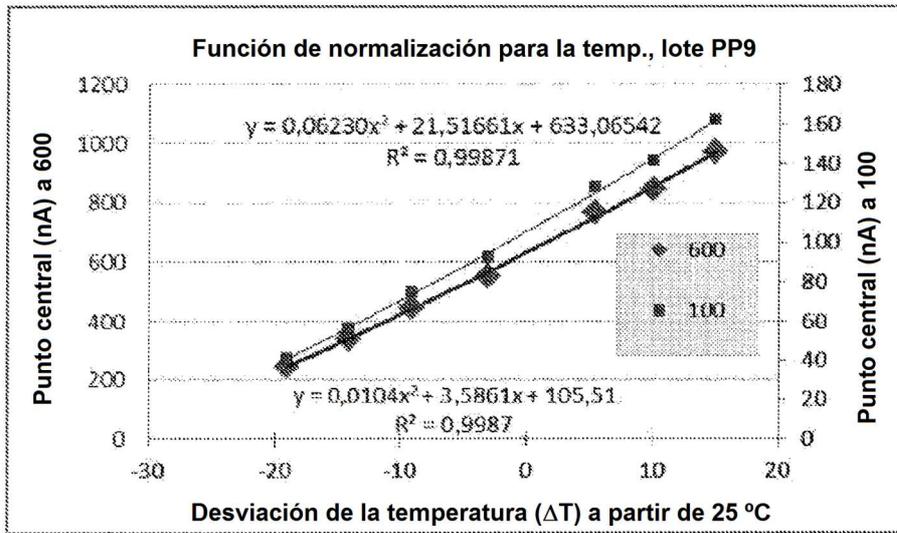


FIG. 4B

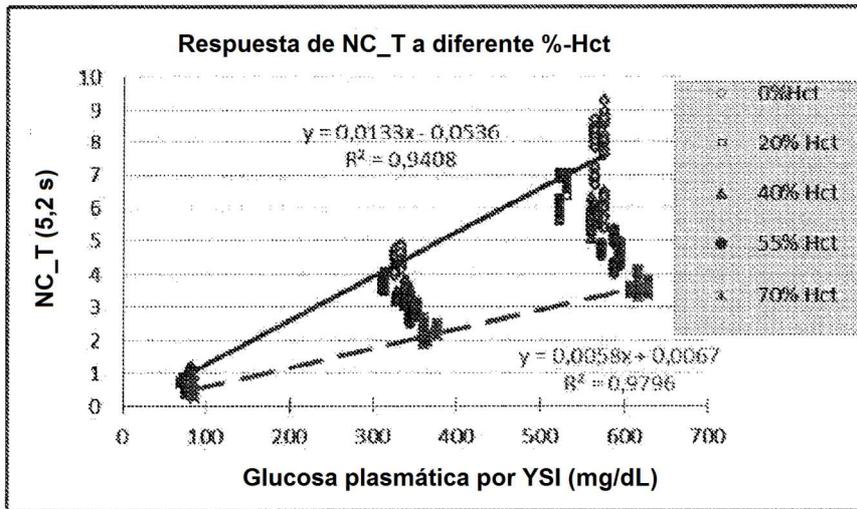


FIG. 4C

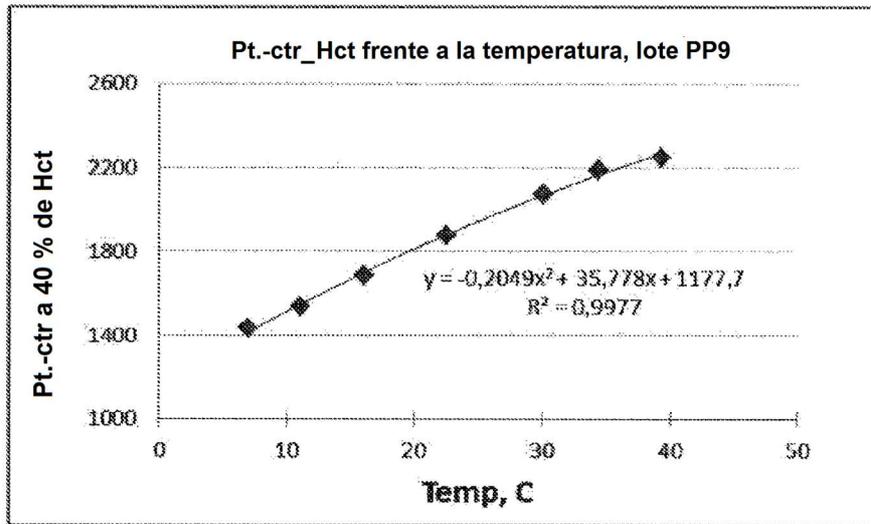


FIG. 4D

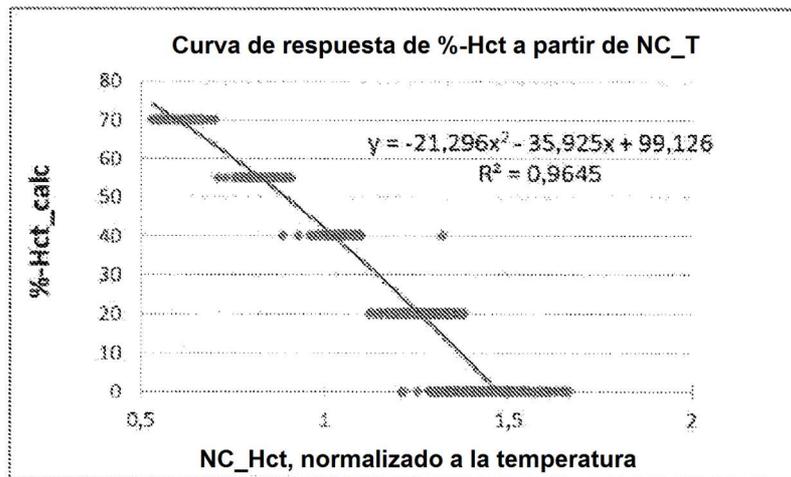


FIG. 4E

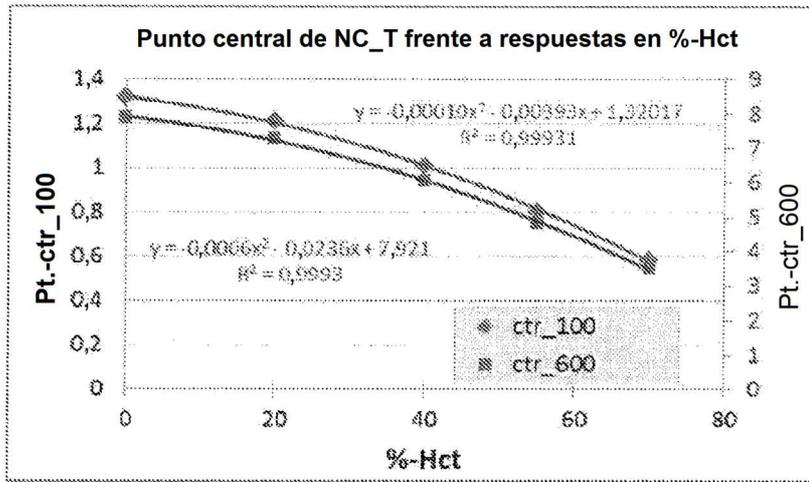


FIG.4F

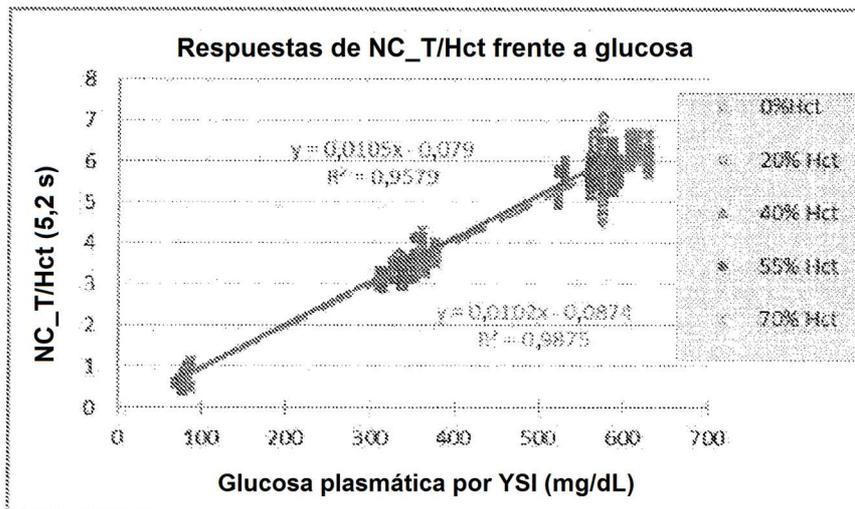


FIG.4G

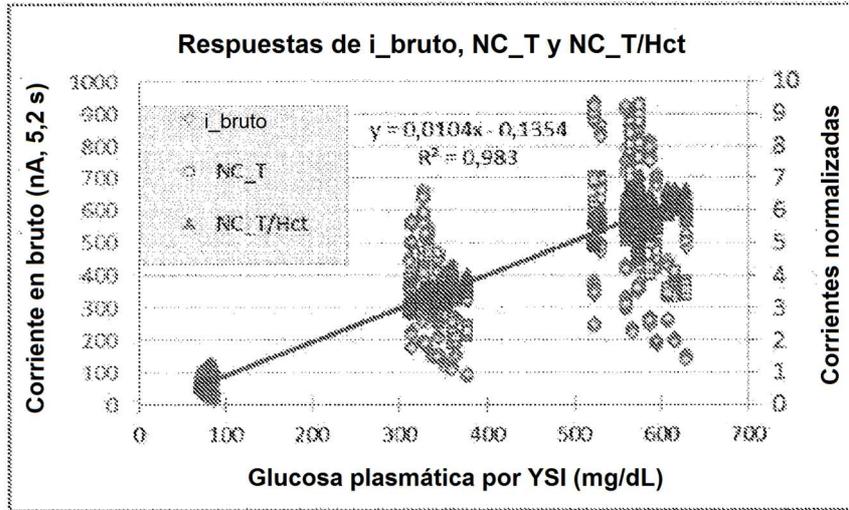


FIG.4H

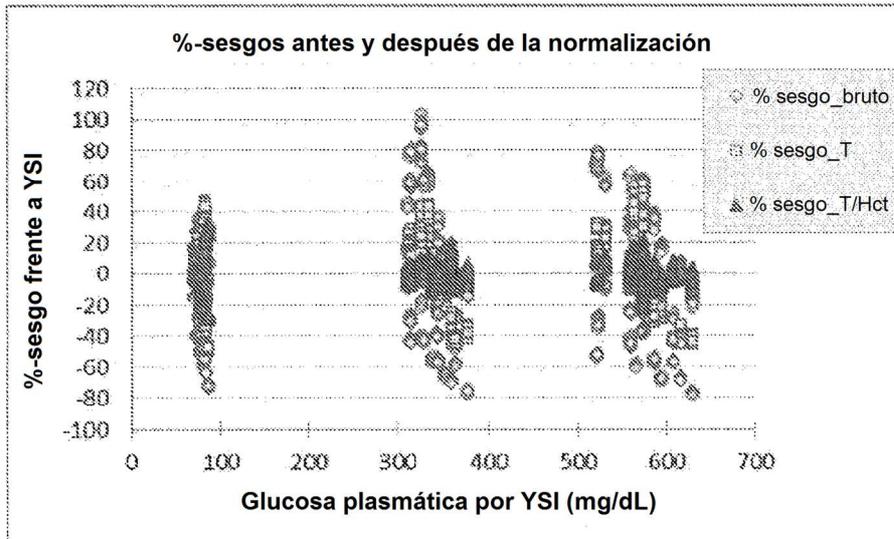


FIG.4I

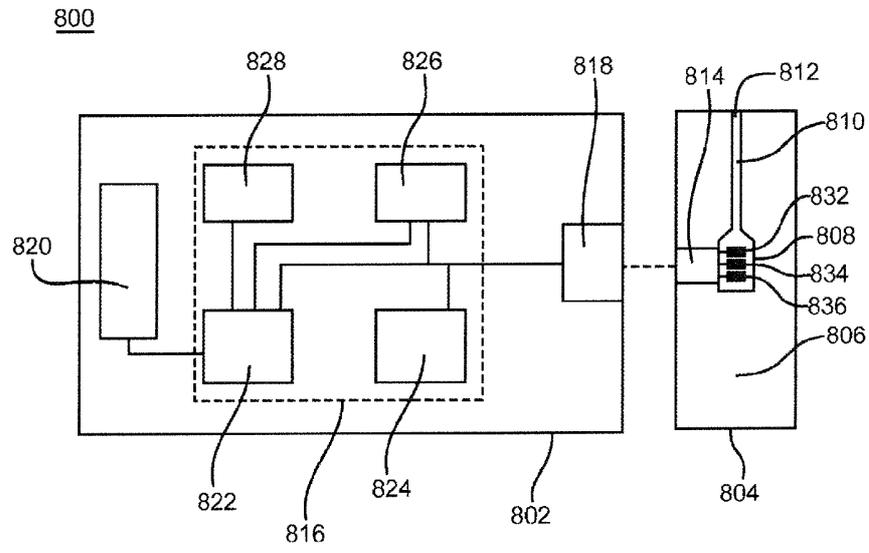


FIG. 8