

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 823 199**

51 Int. Cl.:

G01N 27/327 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2008** **E 18176551 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020** **EP 3395954**

54 Título: **Amperometría de pulsos con lectura rápida**

30 Prioridad:

10.12.2007 US 12729

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

06.05.2021

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 2 823 199 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

Amperometría de pulsos con lectura rápida

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los biosensores proporcionan un análisis de un fluido biológico, tal como flujo sanguíneo, suero, plasma, orina, saliva, fluido intersticial o intracelular. En condiciones normales, los biosensores tienen un dispositivo de medida que analiza una muestra que reside en una banda de sensor. La muestra suele estar en forma líquida y, además de ser un fluido biológico, puede ser el derivado de un fluido biológico, tal como un extracto, una dilución, un filtrado o un precipitado reconstituido. El análisis realizado por el biosensor determina la presencia y/o 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 fluido biológico. El análisis puede ser de utilidad en el diagnóstico y tratamiento de anomalías fisiológicas. Por ejemplo, un individuo diabético puede utilizar un biosensor para determinar el nivel de glucosa en el flujo sanguíneo para realizar ajustes en la dieta y/o medicación.

Los biosensores pueden diseñarse para analizar uno o más analitos y pueden utilizar diferentes volúmenes de muestra. Algunos biosensores pueden analizar una sola gota de flujo sanguíneo, por ejemplo, de 0.25 a 15 microlitros (μL) de volumen. Los biosensores se pueden poner en práctica utilizando dispositivos de medida de sobremesa, portátiles y similares. Los dispositivos de medida portátiles pueden ser manuales y permitir la identificación y/o cuantificación de uno o más analitos en una muestra. Ejemplos de dispositivos de medida portátiles incluyen los medidores Ascensia Breeze® y Elite® de Bayer HealthCare en Tarrytown, Nueva York, mientras que los ejemplos de dispositivos de medida de sobremesa incluyen la estación de trabajo electroquímica disponible de CH Instruments en Austin, Texas. Los biosensores que proporcionan tiempos de análisis más cortos, a la vez que proporcionan la exactitud y/o precisión deseadas, proporcionan un beneficio sustancial para el usuario.

Los biosensores pueden utilizar métodos ópticos y/o electroquímicos para analizar la muestra. En algunos sistemas ópticos, la concentración del analito se determina midiendo la luz que ha interactuado o ha sido absorbida por una especie identificable con 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 produce fluorescencia o emite luz en respuesta al analito cuando es iluminado 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 de manera similar a la señal de salida de un método electroquímico. En cualquier sistema óptico, el biosensor mide y correlaciona la luz con la concentración del analito de la muestra.

En los biosensores electroquímicos, la concentración del analito se determina a partir de una señal eléctrica generada por una reacción de oxidación/reducción o redox del analito o una especie que responde al analito cuando se aplica una señal de entrada a la muestra. La señal de entrada puede aplicarse como un único pulso o en múltiples pulsos, secuencias o ciclos. Puede añadirse a la muestra una oxidorreductasa, tal como una enzima o una especie similar, para mejorar la transferencia de electrones desde una primera especie a una segunda especie durante la reacción redox. La enzima o especie similar puede reaccionar con un único analito, proporcionando así especificidad a una parte de la señal de salida generada. En la Tabla I siguiente, se proporcionan ejemplos de algunas oxidorreductasas específicas y los analitos correspondientes.

45 Tabla I

Oxidorreductasa (capa de reactivo)	Analito
Glucosa deshidrogenasa	β -glucosa
Glucosa oxidasa	β -glucosa
Esterasa de colesterol; oxidasa de colesterol	Colesterol
Lipasa de lipoproteína; quina glicerol; glicerol-3-fosfato oxidasa	Triglicéridos
Lactato oxidasa; lactato deshidrogenasa; diaforasa	Lactato
Piruvato oxidasa	Piruvato
Alcohol oxidasa	Alcohol
Bilirrubina oxidasa	Bilirrubina
Uricasa	Ácido úrico
Glutatión reductasa	NAD (P) H
Monóxido de carbono oxidorreductasa	Monóxido de carbono

Se puede utilizar un mediador para mantener el estado de oxidación de la enzima. La Tabla II siguiente proporciona algunas combinaciones convencionales de enzimas y mediadores para su uso con analitos específicos.

Tabla II

Analito	Enzima	Mediador
Glucosa	Glucosa oxidasa	Ferricianuro
Glucosa	Glucosa deshidrogenasa	Ferricianuro
Colesterol	Colesterol oxidasa	Ferricianuro
Lactato	Lactato oxidasa	Ferricianuro
Ácido úrico	Uricasa	Ferricianuro
Alcohol	Alcohol oxidasa	Fenilendiamina

Los biosensores electroquímicos suelen incluir un dispositivo de medida que tiene contactos eléctricos que se conectan con conductores eléctricos en la banda de sensores. Los conductores pueden estar realizados de materiales conductores, tales como metales sólidos, pastas metálicas, carbono conductor, pastas de carbono conductor, polímeros conductores y similares. Los conductores eléctricos por lo general se conectan a electrodos de trabajo, contador, referencia y/u otros que se extienden hasta un depósito de muestra. Uno o más conductores eléctricos también pueden extenderse al interior del depósito de muestra para proporcionar una funcionalidad no proporcionada por los electrodos.

En numerosos biosensores, la banda del sensor puede adaptarse para su uso en el exterior, en el interior o parcialmente dentro de un organismo vivo. Cuando se utiliza fuera de un organismo vivo, se introduce una muestra del fluido biológico en un depósito de muestra en la banda del sensor. La banda del sensor puede colocarse en el dispositivo de medida antes, después o durante la introducción de la muestra para el análisis. Cuando está dentro o parcialmente dentro de un organismo vivo, la banda del sensor puede sumergirse continuamente en la muestra o la muestra puede introducirse de manera intermitente en la banda. La banda del sensor puede incluir un depósito que aísla parcialmente un volumen de la muestra o que esté abierto a la muestra. De manera similar, la muestra puede fluir de manera continua a través de la banda o interrumpirse para su análisis.

El dispositivo de medida aplica una señal de entrada a través de los contactos eléctricos a los conductores eléctricos de la banda del sensor. Los conductores eléctricos transportan la señal de entrada a través de los electrodos a 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 desde la banda puede ser una corriente (generada por amperometría o voltamperometría), un potencial (generada por potenciometría/galvanometría) o una carga acumulada (generada por coulometría). El dispositivo de medida puede tener la capacidad de procesamiento para medir y correlacionar la señal de salida con la presencia y/o concentración de uno o más analitos en el fluido biológico.

En la amperometría convencional, la corriente se mide durante un pulso de lectura cuando se aplica un potencial (tensión) constante a través de los electrodos de trabajo y contraelectrodos de la banda del sensor. La corriente medida se utiliza para cuantificar el analito en la muestra. La amperometría mide la velocidad a la que una especie de forma electroquímica activa, por lo tanto, medible, se oxida o reduce en o cerca del electrodo de trabajo. Se han descrito muchas variaciones del método amperométrico para biosensores, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 5.620.579; 5,653,863; 6,153,069; y 6.413.411.

Un inconveniente de los métodos amperométricos convencionales es la naturaleza no estable de la corriente después de que se aplica un potencial. La tasa de cambio actual con respecto al tiempo es muy rápida inicialmente y se hace más lenta a medida que avanza el análisis debido a la naturaleza cambiante del proceso de difusión subyacente. Hasta que la tasa de consumo de las especies medibles ionizadas en la superficie del electrodo sea igual a la tasa de difusión, no se puede obtener una corriente de estado estacionario. Por tanto, los métodos de amperometría convencionales que miden la corriente durante el período transitorio antes de que se alcance una condición de estado estable, pueden proporcionar más inexactitud que si la medición se toma durante un período de tiempo de estado estable.

El rendimiento de medición de un biosensor se define en términos de exactitud y/o precisión. Los aumentos en la exactitud y/o precisión proporcionan un aumento en el rendimiento de medición del biosensor. La precisión puede expresarse en términos de sesgo de la lectura del analito del biosensor en comparación con una lectura del analito de referencia, con valores de sesgo mayores que representan menor precisión, mientras que la precisión puede expresarse en términos de la dispersión o de la varianza entre múltiples lecturas del analito en relación con una media. El sesgo es la diferencia entre un valor determinado por el biosensor y el valor de referencia aceptado y puede expresarse en términos de "sesgo absoluto" o "sesgo relativo". El sesgo absoluto puede expresarse en las unidades de la medida, tal como mg/dL, mientras que el sesgo relativo puede expresarse como un porcentaje del valor de sesgo absoluto sobre el valor de referencia. Los valores de referencia se pueden obtener con un instrumento de referencia, tal como el YSI 2300 STAT PLUS™ disponible de YSI Inc., Yellow Springs, Ohio.

Numerosos biosensores incluyen uno o más métodos para corregir el error asociado con un análisis. Los valores de concentración obtenidos a partir de un análisis con error pueden ser inexactos. La capacidad de corregir estos análisis

inexactos puede aumentar la precisión de los valores de concentración obtenidos. Un sistema de corrección de errores puede compensar uno o más errores, tal como el contenido de hematocrito de la muestra, que es diferente de una muestra de referencia. Por ejemplo, los biosensores convencionales pueden configurarse para informar concentraciones de glucosa suponiendo un contenido de hematocrito del 40% (v/v) para una muestra de flujo sanguíneo, independientemente del contenido de hematocrito real de la muestra. En estos sistemas, cualquier medición de glucosa realizada en una muestra de flujo sanguíneo que contenga menos o más del 40% de hematocrito incluirá un error o sesgo atribuible al "efecto del hematocrito".

En las bandas sensoras de biosensores convencionales para determinar las concentraciones de glucosa, la glucosa puede ser oxidada por una enzima, que luego transfiere el electrón a un mediador. Este mediador reducido luego se desplaza al electrodo de trabajo donde se oxida de forma electroquímica. La cantidad de mediador que se oxida puede correlacionarse con la corriente que fluye entre los electrodos de trabajo y los contraelectrodos de la banda del sensor. De manera cuantitativa, la corriente medida en el electrodo de trabajo es directamente proporcional al coeficiente de difusión del mediador. El efecto del hematocrito interfiere con este proceso porque los glóbulos rojos bloquean la difusión del mediador al electrodo de trabajo. Posteriormente, el efecto del hematocrito influye en la cantidad de corriente medida en el electrodo de trabajo sin ninguna relación con la cantidad de glucosa en la muestra.

El sesgo de hematocrito se refiere a la diferencia entre la concentración de glucosa de referencia obtenida con un instrumento de referencia y una lectura de glucosa experimental obtenida desde un biosensor para muestras que contienen diferentes niveles de hematocrito. La diferencia entre la referencia y los valores obtenidos del biosensor resulta de los niveles variables de hematocrito entre muestras de flujo sanguíneo específicas.

Además del efecto del hematocrito, también pueden surgir imprecisiones de medición cuando la concentración de especies medible no se correlaciona con la concentración del analito. Por ejemplo, cuando un sistema sensor determina la concentración de un mediador reducido generado en respuesta a la oxidación de un analito, cualquier mediador reducido no generado por la oxidación del analito dará lugar a que el sistema sensor indique que hay más analito presente en la muestra que es correcta debido a los antecedentes del mediador. Por tanto, el "fondo del mediador" es el sesgo introducido en la concentración medida del analito atribuible a especies medibles que no responden a la concentración del analito subyacente.

En un intento de superar una o más de estos inconvenientes, los biosensores convencionales han intentado múltiples técnicas, no solamente con respecto al diseño mecánico de la banda del sensor y la selección del reactivo, sino también con respecto a la manera en que el dispositivo de medida aplica el potencial eléctrico a la banda. Por ejemplo, los métodos convencionales para reducir el efecto del hematocrito para sensores amperométricos incluyen el uso de filtros, tal como se describe en las patentes de EE.UU. 5.708.247 y 5.951.836; invertir la polaridad de la corriente aplicada, tal como se describe en el documento WO 2001/57510; y por métodos que maximizan la resistencia inherente de la muestra.

Se han utilizado múltiples métodos para aplicar la señal de entrada a la banda, comúnmente denominados métodos de pulso, secuencias o ciclos, para abordar las imprecisiones en la concentración determinada del analito. Por ejemplo, en la patente de EE.UU. 4.897.162, la señal de entrada incluye una aplicación continua de potenciales de tensión ascendente y descendente que se mezclan para dar una onda de forma triangular. Además, en el documento WO 2004/053476 y en las patentes de EE.UU. Docs. 2003/0178322 y 2003/0113933 se describen señales de entrada que incluyen la aplicación continua de potenciales de tensión ascendentes y descendentes que también cambian la polaridad.

Otros métodos convencionales combinan una configuración de electrodo específica con una señal de entrada adaptada a esa configuración. Por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.942.102 combina la configuración de electrodo específica proporcionada por una celda de capa delgada con un pulso continuo para que los productos de reacción del contraelectrodo lleguen al electrodo de trabajo. Esta combinación se utiliza para impulsar la reacción hasta que el cambio de corriente frente al tiempo se vuelve constante, alcanzando así una verdadera condición de estado estable para el mediador que se desplaza entre los electrodos de trabajo y los contraelectrodos durante la etapa de potencial. Si bien cada uno de estos métodos equilibra varias ventajas y desventajas, ninguno es ideal.

Tal como puede observarse a partir de la descripción anterior, existe una necesidad continua de biosensores mejorados, especialmente aquellos que pueden proporcionar una determinación cada vez más precisa de la concentración del analito en menos tiempo. Los sistemas y métodos de la presente invención superan al menos una de las desventajas asociadas con los sistemas convencionales.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención está definida por las reivindicaciones independientes. Un aspecto es un sistema de biosensor según la reivindicación 1 y otro aspecto es un método según la reivindicación 12.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La invención puede entenderse mejor con referencia a los siguientes dibujos y descripción. Los componentes de las figuras no están necesariamente a escala, sino que se hace hincapié en ilustrar los principios de la invención.

La Figura 1 representa un método analítico electroquímico para determinar la presencia y/o concentración de un analito en una muestra.

La Figura 2 es un gráfico que ilustra las señales de salida generadas a partir de una señal de entrada amperométrica de pulsos.

La Figura 3A muestra el sesgo de hematocrito presente en los valores de concentración del analito determinados a partir de cada uno de los tres valores de corriente medidos en función de cada uno de los siete pulsos representados en la Figura 2.

La Figura 3B muestra el intervalo de sesgo de hematocrito para muestras que incluyen 50, 100 y 400 mg/dL de glucosa.

La Figura 4 muestra el sesgo del hematocrito para el primer y tercer valores de corriente de P5 en la Figura 3A para múltiples muestras de flujo sanguíneo.

La Figura 5 muestra una representación esquemática de un biosensor que determina una concentración del analito en una muestra.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En el documento WO 2007/013915, titulado "Amperometría de pulsos", se utilizan señales de entrada pulsadas para analizar analitos en muestras. Las señales de entrada incluyen períodos alternos de excitación y relajación. La presente invención se refiere a un sistema y método para analizar las señales de salida a partir de las señales de entrada pulsadas para reducir el sesgo, tal como el que surge del fondo del mediador y el efecto del hematocrito. Al correlacionar los valores de la señal de salida medidos dentro de los 300 ms del inicio de un pulso de excitación, se puede mejorar la exactitud y/o precisión del análisis.

La Figura 1 representa un análisis electroquímico 100 para determinar la presencia y/o concentración de un analito en una muestra. En 110, la muestra se introduce en el biosensor. En 120, una parte del analito de la muestra se somete a una reacción redox. En 130, los electrones se transfieren, de manera opcional, desde el analito a un mediador. En 140, una especie medible se excita de forma electroquímica con una señal de entrada. En 150, se genera y mide una señal de salida. En 160, se deja que la muestra se relaje, y en 170, se introducen pulsos de excitación adicionales. En 180, la presencia y/o concentración de la muestra se determina a partir de la señal de salida, y en 190, la concentración puede mostrarse, almacenarse o ser objeto de una función similar.

En 110, la muestra se introduce en la parte del sensor del biosensor, tal como una banda de sensor. La banda del sensor incluye al menos un electrodo de trabajo y al menos un contraelectrodo. Los electrodos pueden incluir una o más capas de reactivo. El electrodo de trabajo puede incluir una capa de barrera a la difusión que es integral a una capa de reactivo o que es distinta de la capa de reactivo. Cuando el electrodo de trabajo incluye una capa de barrera de difusión distinta, la capa de reactivo puede, o no, estar dispuesta sobre la capa de barrera de difusión.

Una capa de barrera contra la difusión proporciona un espacio poroso que tiene un volumen interno donde puede residir una especie medible. Los poros de la capa de barrera de difusión pueden seleccionarse de modo que las especies medibles puedan difundirse en la capa de barrera de difusión, mientras que los constituyentes de muestra físicamente más grandes, tal como los glóbulos rojos, están prácticamente excluidos. Aunque las bandas de sensores convencionales han utilizado varios materiales para filtrar los glóbulos rojos desde la superficie del electrodo de trabajo, una capa de barrera de difusión proporciona un espacio poroso interno para contener y aislar una parte de las especies medibles de la muestra. Se puede encontrar un tratamiento más detallado de las capas de barrera de difusión en la publicación de la patente de EE.UU. nº 2007/0246357.

En la referencia 120 de la Figura 1, una parte del analito presente en la muestra se oxida o reduce de forma química o bioquímica, tal como por una oxidoreductasa. Lo que antecede ocurre cuando la muestra hidrata los reactivos. Tras la oxidación o reducción, los electrones pueden transferirse de manera opcional entre el analito y un mediador en la referencia 130. Por tanto, se forma una especie ionizada medible, tal como a partir del analito o un mediador. Puede ser ventajoso proporcionar un retardo de tiempo inicial, o "período de incubación", para que los reactivos reaccionen con el analito. De manera preferible, el retardo de tiempo inicial puede ser de 1 a 10 segundos. Puede encontrarse un tratamiento más detallado de los retardos de tiempo iniciales en las patentes de EE.UU. números 5.620.579 y 5.653.863.

En la referencia 140 de la Figura 1, una especie medible, que puede ser el analito cargado desde 120 o el mediador cargado desde 130, se excita (oxida o reduce) de forma electroquímica con una señal de entrada. Las señales de

entrada pueden ser señales eléctricas, tal como la corriente o el potencial, que pulsan o se activan y desactivan en una secuencia establecida. La señal de entrada es una secuencia de pulsos de excitación separados por relajaciones. Durante un pulso amperométrico, el potencial eléctrico aplicado durante la excitación se aplica, de manera preferible, a una tensión y polaridad prácticamente constantes durante toda su duración. Esto contrasta directamente con algunas excitaciones convencionales en donde la tensión cambia o es "barrida" a través de múltiples potenciales de tensión y/o polaridades durante el registro de datos.

Durante una relajación, la señal eléctrica está desactivada. La desactivación incluye periodos de tiempo en donde no está presente una señal eléctrica y preferiblemente no incluye periodos de tiempo en donde está presente una señal eléctrica pero esencialmente no tiene amplitud. La señal eléctrica puede cambiar entre activada y desactivada cerrando y abriendo un circuito eléctrico, respectivamente. El circuito eléctrico puede abrirse y cerrarse de forma mecánica, eléctrica o mediante otros métodos.

Las señales de entrada pueden tener uno o más intervalos de pulso. Un intervalo de pulso es la suma de un pulso y la relajación que constituye un ciclo de servicio. Cada pulso tiene una amplitud y un ancho. La amplitud indica la intensidad del potencial, la intensidad de corriente o similar de la señal eléctrica. La amplitud puede variar o ser prácticamente constante, tal como durante la amperometría, durante el pulso. El ancho del pulso es la duración del pulso. Los anchos de pulso en una señal de entrada pueden variar o ser prácticamente los mismos. Cada relajación tiene un ancho de relajación, que es el tiempo de duración de la relajación. Los anchos de relajación en una señal de entrada pueden variar o ser prácticamente los mismos.

Al ajustar la anchura de la excitación y relajación de los ciclos de servicio, las señales de entrada de pulsos pueden aumentar la exactitud y/o precisión del análisis. Si bien no se desea ceñirse a ninguna teoría en particular, este aumento en exactitud y/o precisión puede resultar de extraer las especies medibles excitadas en el electrodo de trabajo desde el interior de una capa de barrera de difusión. A diferencia de las especies medibles externas a la capa de barrera de difusión, que pueden tener una tasa de difusión variable debido a los glóbulos rojos y otros constituyentes de la muestra, las especies medibles dentro de la capa de barrera de difusión pueden tener una tasa de difusión relativamente constante al conductor. Por ejemplo, y tal como se describe en la patente de EE. UU número 2007/0246357, titulada "Determinación de la concentración en una capa de barrera de difusión", se puede seleccionar un ancho de pulso para limitar prácticamente la excitación de especies medibles a una capa de barrera de difusión.

Las señales de entrada incluyen al menos 3 ciclos de servicio aplicados en 30 segundos. Más preferiblemente, se aplican al menos 3 ciclos de servicio en 10 segundos. Las señales de entrada que incluyen al menos 4 ciclos de servicio aplicados en menos de 7 segundos son especialmente preferidas en la actualidad. Actualmente, los anchos de pulso de la señal de entrada se seleccionan de forma independiente entre 0.3 y 0.8 segundos. Los intervalos de pulso preferibles están en el margen de menos de 3, 2.5 o 1.5 segundos. Actualmente, se prefieren especialmente las señales de entrada que tienen anchos de pulso de 0.3 a 0.5 segundos e intervalos de pulso de 0.7 a 2 segundos.

En la referencia 150 de la Figura 1, el biosensor genera una señal de salida en respuesta a la especie medible y la señal de entrada. La señal de salida, tal como uno o más valores de corriente, se puede medir de forma continua o intermitente y se puede registrar en función del tiempo. Las señales de salida pueden incluir las que disminuyen de manera inicial, las que aumentan y luego disminuyen, las que alcanzan un estado estable y las que son transitorias. Las corrientes en estado estacionario se observan cuando el cambio de corriente con respecto al tiempo es prácticamente constante, tal como dentro de ± 10 o $\pm 5\%$. En lugar de corrientes convencionales de estado estacionario o de disminución lenta, se pueden obtener valores de corriente transitorios (que disminuyen rápidamente) a partir de señales de entrada pulsadas.

La Figura 2 es un gráfico que ilustra las señales de salida generadas a partir de una señal de entrada amperométrica de pulsos. Cuando se traza como una función del tiempo, cada pulso de excitación da como resultado un perfil de caída transitoria que tiene un valor de corriente alto inicial que se reduce. La señal de entrada aplicada por el biosensor incluye ocho pulsos y siete relajaciones, para un total de siete ciclos de servicio. La Figura 2 omite el primer ciclo de servicio y muestra que el octavo pulso no fue seguido por una relajación. Los pulsos se aplicaron a aproximadamente 200 mV y tenían un ancho de pulso de aproximadamente 0.4 segundos. El intervalo de pulso para los ciclos de servicio fue de aproximadamente 1.4 segundos, proporcionando anchos de relajación de aproximadamente 1 segundo. Las relajaciones fueron proporcionadas por un circuito abierto. Si bien se utilizaron pulsos de onda cuadrada, también se pueden utilizar otros tipos de ondas compatibles con el sistema de sensor y la muestra de prueba.

El biosensor midió la señal de salida de forma intermitente durante cada pulso en la Figura 2 y registró tres valores de corriente en un dispositivo de memoria. Los valores de la señal de salida se registraron a intervalos de aproximadamente 125 milisegundos (ms) comenzando a aproximadamente 125 ms después del inicio de cada pulso. Los intervalos entre registros sucesivos pueden ser iguales o diferentes. En la Figura 2, se registraron tres valores de corriente a partir de la señal de salida y se etiquetaron con la letra I, que muestra el número de pulso y el número de medición mediante un subíndice. Por lo tanto, el tercer valor de corriente medido para el quinto pulso se etiqueta como $I_{5,3}$.

La Figura 3A muestra el sesgo de hematocrito presente en los valores de concentración del analito determinados a partir de cada uno de los tres valores de corriente medidos a partir de cada uno de los siete pulsos mostrados en la Figura 2, con un error de hematocrito más grande representado por valores numéricos absolutos mayores en el eje Y. Para cada pulso, el primer valor de corriente mostró el menor sesgo de hematocrito de los tres valores, con la diferencia de sesgo entre el primer y el tercer valor siendo mayor con cada pulso sucesivo. También se observó un sesgo de hematocrito promedio más bajo a través de las corrientes medidas para cada pulso sucesivo; sin embargo, cada pulso adicional prolongó la duración del análisis. Por tanto, aunque los valores de corriente de P8 casi no incluían error de hematocrito, el primer valor de corriente de P5 puede proporcionar un equilibrio preferido entre el error de hematocrito y el tiempo de análisis. También es de interés que el primer valor de corriente medido para P5 tenía aproximadamente el mismo error de hematocrito que el tercer valor de corriente de P8, tomado más de 3 segundos después. Estos resultados establecen que los valores de corriente medidos antes en el ancho del pulso incluyen el menor error de hematocrito.

La Figura 3B muestra el intervalo de sesgo de hematocrito para muestras que incluyen 50, 100 y 400 mg/dL de glucosa, con valores de intervalo mayores en el eje Y que representan un error de hematocrito mayor. Tal como en la Figura 3A, el primer valor de corriente mostró el menor sesgo de hematocrito de los cuatro valores de corriente medidos durante cada pulso, con la diferencia de sesgo entre el primer y cuarto valor haciéndose mayor con cada pulso sucesivo. El sesgo de hematocrito inesperadamente más bajo en el primer valor de corriente medido para cada pulso fue más pronunciado en el nivel más alto de concentración de glucosa de 400 mg/dL. Por tanto, la mejora de la precisión obtenida de las mediciones de corriente tomadas al principio de la reducción aumentó a medida que aumentaba la concentración de glucosa de las muestras de flujo sanguíneo.

La Figura 4 muestra el sesgo del hematocrito para el primer y tercer valores de corriente de P5 en la Figura 3A para múltiples muestras de flujo sanguíneo, incluyendo el contenido variable de hematocrito y glucosa. El primer valor de corriente $i_{5,1}$ mostró una correlación R^2 de 0.18, mientras que el tercer valor de corriente $i_{5,3}$ mostró una correlación R^2 de 0.08, una reducción superior al 50%. La precisión mejorada de la concentración del analito obtenida a partir de los valores de corriente tomados con anterioridad en el periodo de reducción es inesperada y contrasta directamente con las enseñanzas anteriores de que la precisión se logra a partir de las mediciones tomadas en la parte posterior del estado estable de una reducción. Estos resultados establecen, de manera contradictoria, que se puede obtener una exactitud y/o precisión mejoradas a partir de mediciones tomadas al principio de la parte transitoria que cambia rápidamente en el periodo de reducción.

El valor de la corriente de salida a partir del cual se determina la concentración del analito se mide en menos de 300 ms desde la aplicación del pulso de excitación. Más preferiblemente, el valor de la corriente de salida utilizado para determinar la concentración del analito de la muestra se mide en menos de 175 ms desde la aplicación de un pulso de excitación o dentro de 10 a 150 ms desde la aplicación del pulso. Aún más preferiblemente, el valor de la corriente de salida a partir del cual se determina la concentración se mide dentro de los 30 a 150 ms desde la aplicación de un pulso de excitación. En la actualidad, se prefiere especialmente determinar la concentración del analito a partir de un valor de corriente de salida medido entre 60 y 150 ms después de aplicar un pulso de excitación. Preferiblemente, el pulso a partir del cual se mide el valor de la corriente de salida analítica para determinar la concentración del analito en la muestra se aplica dentro de los 11 segundos o menos de aplicar el pulso de excitación inicial y más preferiblemente dentro de los 7 segundos o menos aplicando el pulso inicial.

En la referencia 160 de la Figura 1, la muestra se somete a relajación. El dispositivo de medida puede abrir el circuito a través de la banda del sensor, permitiendo así la relajación. Durante la relajación 160, la corriente presente durante la excitación 140 se reduce prácticamente en al menos la mitad, preferiblemente en un orden de magnitud y más preferiblemente a cero. De manera preferible, se proporciona un estado de corriente cero mediante un circuito abierto u otro método conocido por los expertos en esta técnica para proporcionar un flujo de corriente prácticamente cero. Preferiblemente, la señal de salida no se registra durante la relajación 160.

Durante la relajación 160, un agente ionizante, tal como una oxidorreductasa, puede reaccionar con el analito para generar especies medibles adicionales sin los efectos de un potencial eléctrico. Por ejemplo, un biosensor de glucosa que incluye glucosa oxidasa y un mediador de ferricianuro como reactivos producirán ferrocianuro adicional (mediador reducido) en respuesta a la concentración del analito de la muestra sin interferencia de un potencial eléctrico durante la relajación 160.

En la referencia 170 de la Figura 1, el biosensor continúa aplicando pulsos desde la señal de entrada a los electrodos de trabajo y contraelectrodos durante el periodo de tiempo deseado. El ciclo de servicio que incluye la excitación 140 y la relajación 160 puede repetirse o puede aplicarse un ciclo de servicio que tenga diferentes anchos de pulso y/o intervalos.

En la referencia 180 de la Figura 1, el biosensor analiza el valor de la señal de salida registrado dentro de los 300 ms de aplicar un pulso para determinar la concentración del analito en la muestra. También se pueden analizar valores adicionales de corriente, tiempo y/o de otros valores. En la referencia 190, el valor de la concentración del analito puede visualizarse, almacenarse para referencia futura y/o utilizarse para cálculos adicionales.

La Figura 5 ilustra una representación esquemática de un biosensor 500 que determina una concentración del analito en una muestra de un fluido biológico utilizando una señal de entrada pulsada. El biosensor 500 incluye un dispositivo de medida 502 y una banda de sensor 504, que puede ponerse en práctica en cualquier instrumento analítico, incluyendo un dispositivo de sobremesa, un dispositivo portátil o manual, o similar. El biosensor 500 se puede utilizar para determinar las concentraciones del analito, incluyendo las de glucosa, ácido úrico, lactato, colesterol, bilirrubina y similares. Si bien se muestra una configuración particular, el biosensor 500 puede tener otras configuraciones, incluyendo aquellas con componentes adicionales.

La banda de sensor 504 tiene una base 506 que forma un depósito 508 y un canal 510 con una abertura 1212. El depósito 508 y el canal 510 pueden estar cubiertos por una tapa con un respiradero. El depósito 508 define un volumen parcialmente cerrado. El depósito 508 puede contener una composición que ayude a retener una muestra líquida tal como polímeros miscibles en agua o matrices poliméricas porosas. Los reactivos pueden depositarse en el depósito 508 y/o canal 510. Los reactivos pueden incluir una o más enzimas, aglutinantes, mediadores y especies similares. La banda de sensor 504 también puede tener una interfaz de muestra 514 dispuesta adyacente al depósito 508. La interfaz de muestra 514 puede rodear parcial o completamente el depósito 508. La banda de sensor 504 puede tener otras configuraciones.

La interfaz de muestra 514 tiene conductores conectados a un electrodo de trabajo y a un contraelectrodo. Los electrodos pueden estar prácticamente en el mismo plano o en más de un plano. Pueden utilizarse otras distancias de separación entre los electrodos y la tapa. Los electrodos pueden disponerse sobre una superficie de la base 506 que forma el depósito 508. Los electrodos pueden extenderse o sobresalir en el interior del depósito 508. Una capa dieléctrica puede cubrir parcialmente los conductores y/o los electrodos. La interfaz de muestra 514 puede tener otros electrodos y conductores.

El dispositivo de medida 502 incluye circuitos eléctricos 516 conectados a una interfaz de sensor 518 y una pantalla 520. Los circuitos eléctricos 516 incluyen un procesador 522 conectado a un generador de señal 524, un sensor de temperatura opcional 526 y un medio de almacenamiento 528.

El generador de señales 524 proporciona una señal de entrada eléctrica a la interfaz de sensor 518 en respuesta al procesador 522. La señal de entrada eléctrica puede ser transmitida por la interfaz de sensor 518 a la interfaz de muestra 514 para aplicar la señal de entrada eléctrica a la muestra del fluido biológico. La señal de entrada eléctrica puede ser un potencial o una 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 señal de CC. La señal de entrada eléctrica se puede aplicar como un único pulso o en múltiples pulsos, secuencias o ciclos. El generador de señales 524 también puede registrar una señal de salida desde la interfaz del sensor tal como un generador-registrador.

El sensor de temperatura opcional 526 determina la temperatura de la muestra en el depósito de la banda de sensor 504. La temperatura de la muestra puede medirse, calcularse a partir de la señal de salida o suponerse que es igual o similar a una medición de la temperatura ambiente o la temperatura de un dispositivo que pone en práctica el sistema de biosensor. La temperatura se puede medir utilizando un termistor, un termómetro u otro dispositivo sensor de temperatura. Pueden utilizarse otras técnicas para determinar la temperatura de la muestra.

El medio de almacenamiento 528 puede ser una memoria magnética, óptica o de semiconductores, otro dispositivo de almacenamiento o similar. El medio de almacenamiento 528 puede ser un dispositivo de memoria fijo, un dispositivo de memoria extraíble, tal como una tarjeta de memoria, al que se accede de forma distante o similar.

El procesador 522 pone en práctica el análisis del analito y el tratamiento de datos utilizando código de software legible por ordenador y datos almacenados en el medio de almacenamiento 528. El procesador 522 puede iniciar el análisis del analito en respuesta a la presencia de la banda de sensor 504 en la interfaz de sensor 518, la aplicación de una muestra a la banda de sensor 504, en respuesta a la entrada del usuario, o similar. El procesador 522 dirige el generador de señales 524 para que proporcione la señal de entrada eléctrica a la interfaz de sensor 518. El procesador 522 puede recibir la temperatura de la muestra desde el sensor de temperatura opcional 526. El procesador 522 recibe la señal de salida desde la interfaz de sensor 518. La señal de salida se genera en respuesta a la reacción redox del analito en la muestra. El procesador 522 mide la señal de salida dentro de los 300 ms desde la aplicación de un pulso de excitación del generador de señal 524. La señal de salida se correlaciona con la concentración del analito de la muestra utilizando una o más ecuaciones de correlación en el procesador 522. Los resultados del análisis de analitos se pueden enviar a la pantalla 520 y se pueden memorizar en el medio de almacenamiento 528.

Las ecuaciones de correlación que relacionan las concentraciones del analito y las señales de salida pueden representarse de manera gráfica, matemática, una de sus combinaciones o similares. Las ecuaciones de correlación pueden estar representadas por una tabla de números de programa (PNA), otra tabla de consulta o similar que se memoriza en el medio de almacenamiento 528. Las instrucciones relativas a la puesta en práctica del análisis de analitos pueden ser proporcionadas por el código de software legible por ordenador memorizado en el medio de almacenamiento 528. El código puede ser un código objeto o cualquier otro código que describa o controle la funcionalidad aquí descrita. Los datos del análisis de analitos pueden someterse a uno o más tratamientos de datos, que incluyen la determinación de tasas de disminución, constantes K, relaciones y similares en el procesador 522.

5 La interfaz de sensor 518 tiene contactos que se conectan o se comunican de manera eléctrica con los conductores en la interfaz de muestra 514 de la banda de sensor 504. La interfaz de sensor 518 transmite la señal de entrada eléctrica desde el generador de señal 524 a través de los contactos a los conectores en el interfaz de muestra 514. La interfaz de sensor 518 también transmite la señal de salida desde la muestra a través de los contactos al procesador 522 y/o al generador de señal 524.

10 La pantalla 520 puede ser analógica o digital. La pantalla puede ser una pantalla LCD adaptada para mostrar una lectura numérica.

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

20 La banda de sensor 502 está dispuesta adyacente al dispositivo de medida 502. De forma adyacente se incluye posiciones en donde la interfaz de muestra 514 está en comunicación eléctrica y/o óptica con la interfaz de sensor 508. La comunicación eléctrica incluye la transferencia de señales de entrada y/o de 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 508. La comunicación óptica también incluye la transferencia de luz entre un portal óptico en la interfaz de muestra 502 y una fuente de luz en la interfaz de sensor 508.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de biosensor (500), que comprende:
 - 5 una banda de sensor (504) que tiene una interfaz de muestra (514) adyacente a un depósito (508) formado por la banda de sensor (504); y
 - un dispositivo de medida (502) que tiene un procesador (522) conectado a una interfaz de sensor (518),
 - 10 en donde la interfaz de sensor (518) tiene comunicación eléctrica con la interfaz de muestra (514),
 - en donde el procesador (522) tiene comunicación eléctrica con un medio de almacenamiento (528),
 - 15 en donde el procesador (522) está programado para determinar al menos un valor de señal de salida en respuesta a la concentración de un analito en una muestra a partir de la interfaz del sensor (518) en menos de 300 milisegundos de aplicar un pulso de excitación a la interfaz de la muestra (514), teniendo el pulso de excitación aplicado un ancho de pulso de 0.3 a 0.8 segundos, y
 - 20 donde el pulso de excitación es parte de una señal de entrada que tiene al menos 3 ciclos de servicio en 30 segundos, donde cada ciclo de servicio incluye un pulso de excitación y una relajación, y donde el procesador está, además, programado para determinar la concentración del analito en la muestra en respuesta al determinado al menos un valor de señal de salida.
- 25 2. El sistema de biosensor (500) según la reivindicación 1, en donde el dispositivo de medida (502) es portátil.
3. El sistema de biosensor (500) según la reivindicación 1, en donde el pulso de excitación tiene una tensión prácticamente constante.
- 30 4. El sistema de biosensor (500) según la reivindicación 1, en donde el procesador (522) está programado para determinar el valor de la señal de salida en respuesta a la concentración del analito en la muestra durante una parte transitoria de una disminución de la corriente.
5. El sistema de biosensor (500) según la reivindicación 1, en donde un intervalo de pulso de al menos uno de los al menos 3 ciclos de servicio es inferior a 3 segundos.
- 35 6. El sistema de biosensor (500) según la reivindicación 1, en donde un ancho de pulso del pulso de excitación es de 0.3 a 0.5 segundos, y donde un intervalo de pulso de al menos uno de los al menos 3 ciclos de servicio es desde 0.7 a 2 segundos.
- 40 7. El sistema de biosensor (500) según la reivindicación 1, en donde la relajación incluye una reducción del flujo de corriente a al menos la mitad del flujo de corriente presente durante el pulso de excitación.
8. El sistema de biosensor (500) según la reivindicación 1, en donde la relajación incluye una reducción del flujo de corriente a al menos un orden de magnitud menor que el flujo de corriente presente durante el pulso de excitación.
- 45 9. El sistema de biosensor (500) según la reivindicación 1, en donde la relajación incluye un flujo de corriente prácticamente nulo.
10. El sistema de biosensor (500) según la reivindicación 1, en donde el procesador (522) está programado para determinar el valor de la señal de salida en respuesta a la concentración del analito en la muestra dentro de un intervalo de 60 a 150 milisegundos de aplicar el pulso de excitación a la interfaz de la muestra. (514).
- 50 11. El sistema de biosensor (500) según la reivindicación 1, en donde la relajación es de al menos 0.5 segundos y responde a un circuito abierto.
- 55 12. Un método para determinar la concentración de un analito en una muestra, que comprende:
 - 60 aplicar una señal de entrada a la muestra, comprendiendo la señal de entrada al menos 3 ciclos de servicio en 30 segundos, incluyendo cada ciclo de servicio un pulso de excitación y una relajación;
 - medir una señal de salida que responde a una especie medible en menos de 300 milisegundos de aplicar el pulso de excitación de al menos uno de los ciclos de servicio; y
 - 65 determinar la concentración del analito en la muestra en respuesta a dicha señal de salida medida, en donde el pulso de excitación del ciclo de servicio a partir del cual se mide dicha señal de salida tiene un ancho de pulso de 0.3 a 0.8 segundos.

13. El método según la reivindicación 12, en donde la señal de entrada comprende al menos 4 ciclos de servicio dentro del intervalo de los 7 segundos de aplicar la señal de entrada.

5 14. El método según la reivindicación 12, en donde un ancho de pulso de cada uno de los pulsos de excitación de los al menos 3 ciclos de servicio está comprendido entre 0.3 y 0.8 segundos.

15. El método según la reivindicación 12, en donde la señal de salida se mide en menos de 175 milisegundos después de aplicar el pulso de excitación de uno de los ciclos de servicio.

10

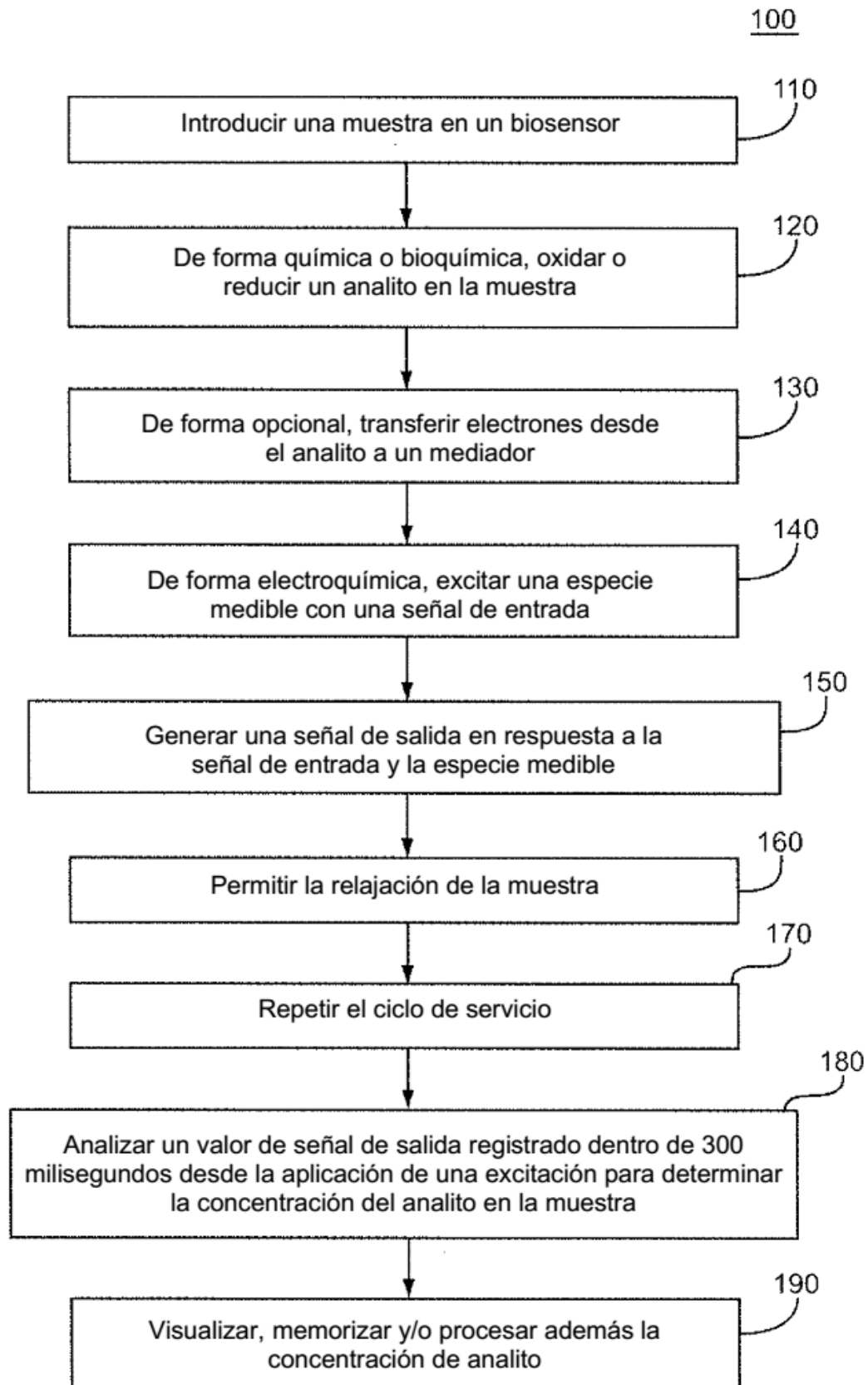


Fig.1

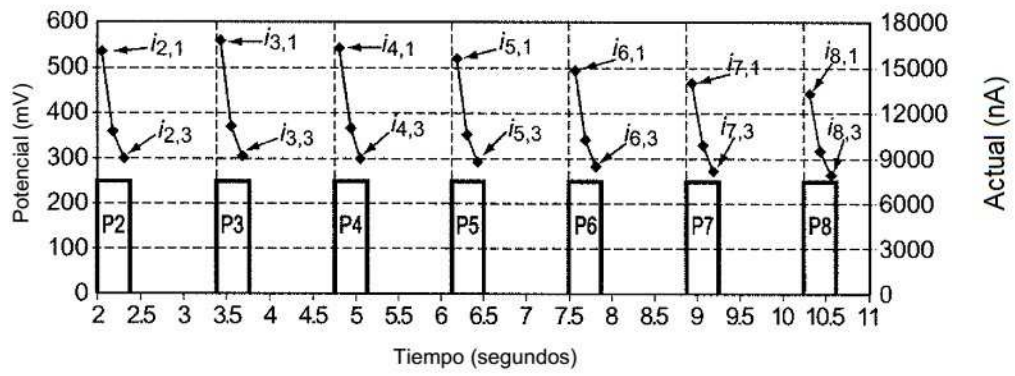


Fig.2

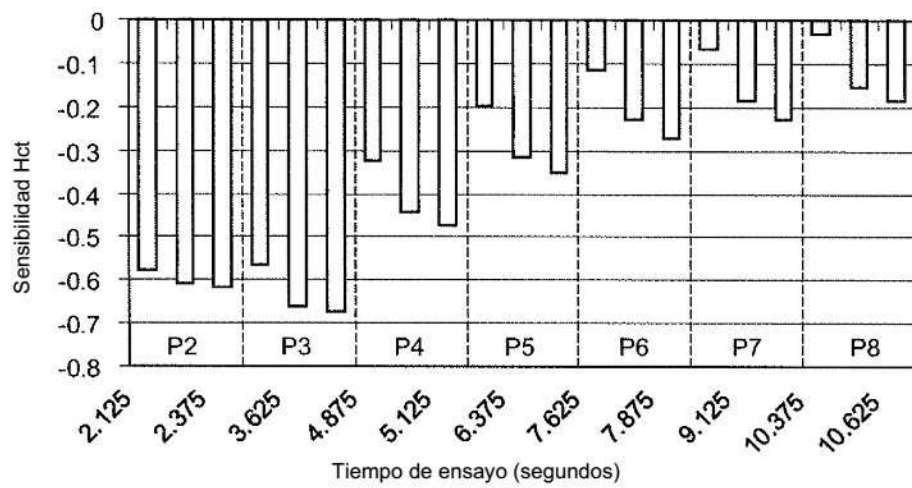


Fig.3A

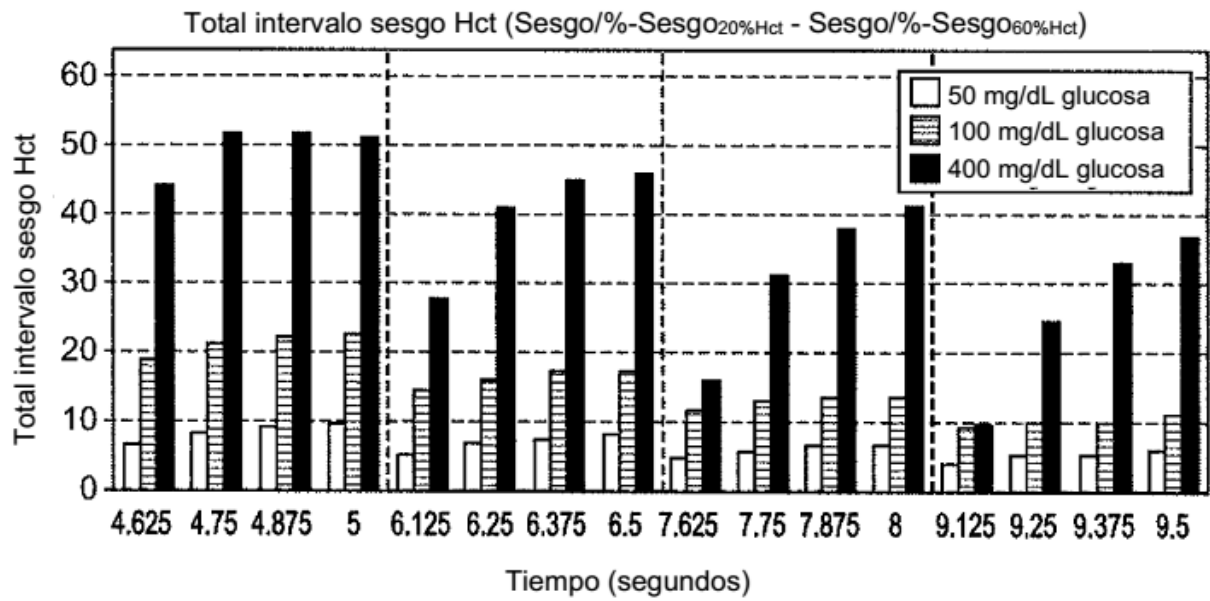


Fig.3B

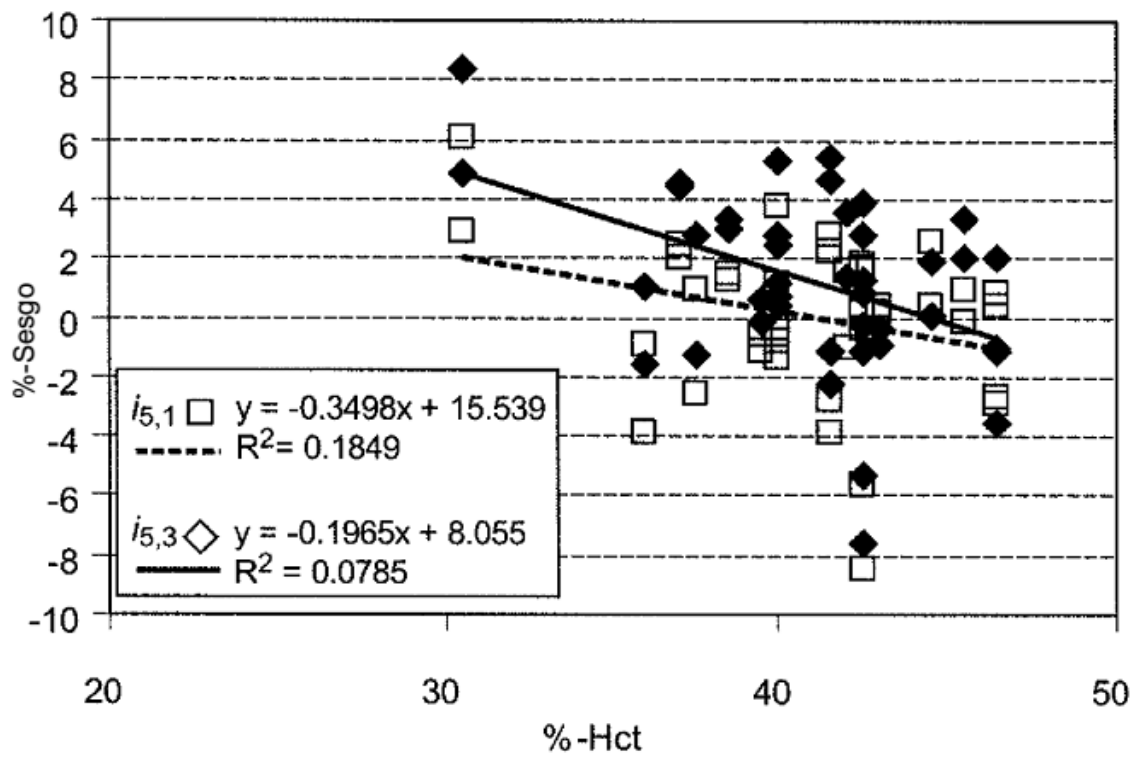


Fig.4

