

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 739**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/26** (2006.01)

**G01N 27/327** (2006.01)

**G01N 27/416** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.08.2017 PCT/US2017/047048**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2018 WO18067235**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2017 E 17858856 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2024 EP 3523639**

54 Título: **Reactivos de detección y disposiciones de electrodo para elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos, así como procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

**05.10.2016 US 201662404258 P**

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

**31.03.2025**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.00%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BUCK, HARVEY;  
BEATY, TERRY, A. y  
DUVALL, STACY, HUNT**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 3 009 739 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

Reactivos de detección y disposiciones de electrodo para elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos, así como procedimientos de uso de los mismos

5

### Campo técnico

La presente divulgación se refiere en general a la química, ingeniería y medicina/diagnóstico médico y, más en particular, se refiere a elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos, así como procedimientos de análisis de múltiples analitos usando los mismos.

10

### Antecedentes

Los elementos de prueba de diagnóstico desechables se han vuelto comunes para analizar analitos seleccionados en muestras de líquido corporal (es decir, detectar la presencia y/o medir la concentración de los mismos). Por ejemplo, las personas con diabetes típicamente realizan un autocontrol diario de al menos la concentración de glucemia. Después de determinar una concentración de glucemia, puede ser necesario que dicha persona tome una acción correctora para llevar la concentración de glucemia de nuevo dentro de un intervalo aceptable si es demasiado alta o demasiado baja, ya que no tomar una acción correctora puede tener implicaciones médicas graves. Como tal, el autocontrol diario de la concentración de glucemia es una actividad cotidiana para las personas con diabetes, y la exactitud de dicho seguimiento puede marcar la diferencia entre la vida y la muerte. No mantener la concentración de glucemia en el intervalo aceptable de manera regular puede dar como resultado complicaciones relacionadas con la diabetes graves, incluyendo, pero sin limitarse a, cardiovasculopatías, nefropatías, neuropatías y amaurosis.

15

20

25

Están disponibles varios sistemas analíticos, tales como medidores de pruebas y elementos de prueba de diagnóstico asociados, que permiten que una persona mida electroquímica u ópticamente la concentración de glucosa en muestras de líquido corporal. En los medidores de prueba actuales, la información presentada después de una prueba de glucemia exitosa es la respectiva concentración de glucemia, típicamente mostrada en mg/dl o mmol/l (mM), y quizás la hora y la fecha en que se realizó la medición. Esta información, en combinación con el cálculo de ingesta planificada/conocida de carbohidratos y/o actividades planificadas/conocidas y/o el conocimiento de otros factores situacionales o individuales, es en la mayoría de los casos suficiente para permitir que una persona con diabetes ajuste o derive su ingesta dietética y/o una dosis inmediata de insulina para evitar o atenuar la hiperglucemia a corto plazo. Además, en caso de una concentración de glucosa baja, la persona con diabetes puede detectar una necesidad de ingesta de azúcar para evitar la hipoglucemia.

30

35

Una ausencia o cantidad insuficiente de insulina evita que el cuerpo use glucosa como fuente de combustible para producir energía. Cuando se produce esto, el cuerpo usa una fuente de combustible alternativa y produce energía descomponiendo ácidos grasos, lo que da como resultado subproductos cetónicos y un incremento en las concentraciones de cetona. Asimismo, un incremento en las concentraciones de cetona en una persona con diabetes se puede provocar por un infarto de miocardio, apoplejía, consumo de drogas o una enfermedad intercurrente tal como neumonía, gripe, gastroenteritis o una infección urológica.

40

Las concentraciones de cetona excesivas en personas con diabetes pueden dar lugar a cetoacidosis diabética (CAD), que es una urgencia médica que puede provocar la muerte si no se trata. La prevención de CAD se puede lograr midiendo concentraciones de cetona y buscando atención médica si las concentraciones de cetona aumentan por encima de un determinado umbral. La Asociación Estadounidense de Diabetes (ADA) recomienda que las concentraciones de cetona se deben controlar cada 4-6 horas cuando una persona con diabetes tiene una enfermedad (tal como un resfriado o la gripe) o cuando una persona con diabetes tiene una concentración de glucemia de más de 240 mg/dl (disponible en Internet en [diabetes.org/living-with-diabetes/complications/ketoacidosis-dka.html](http://diabetes.org/living-with-diabetes/complications/ketoacidosis-dka.html)).

45

50

Las cetonas típicamente se miden en la orina y/o la sangre. Sin embargo, para personas con diabetes que realizan múltiples pruebas de glucemia por día, realizar pruebas de orina y/o cetona en sangre separadas además de sus pruebas de glucemia resulta lento y oneroso. Además, el uso de pruebas separadas para determinar la concentración de cetona también requiere suministros de diagnóstico adicionales y sus costes asociados, lo que dificulta correlacionar las concentraciones de glucosa y cetona.

55

Más recientemente, se han desarrollado sistemas y procedimientos para determinar tanto concentraciones de glucemia como de cetona en sangre en una única prueba por medio de elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos. Sin embargo, en estos elementos de prueba de múltiples analitos, las pruebas de glucemia se completan más rápidamente que las pruebas de cetona en sangre, de modo que la presentación de la concentración de cetona en sangre se retrasa y, por tanto, se proporciona después de la concentración de glucemia. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.984.307. De forma alternativa, tanto las concentraciones de glucemia como de cetona en sangre se retrasan hasta que se completa la prueba de cetona en sangre.

60

65

En cualquier caso, esperar los resultados de una o ambas pruebas hasta que se completa la prueba de cetona en sangre puede ser bastante oneroso y lento para una persona con diabetes que realiza una cantidad relativamente alta de dichas pruebas cada día, en particular cuando se considera que en algunos casos la prueba de cetona en sangre puede tardar casi el doble de tiempo en completarse que la prueba de glucemia. Además, cuando la concentración de glucemia se proporciona antes y separada de la concentración de cetona en sangre, surge la posibilidad de que la persona interrumpa las pruebas antes de que se complete la prueba de cetona en sangre y/o desvíe la atención a otra parte después de que se hayan proporcionado los resultados de la prueba de glucemia pero antes de que se hayan considerado apropiadamente los resultados de la prueba de cetona en sangre.

Un avance reciente en las pruebas de múltiples analitos es la mejora en las formulaciones de reactivo de cetona que permiten que se proporcionen concentraciones de cetona y glucemia en 7,5 segundos o menos después de que entre en contacto un elemento de prueba con una muestra de líquido corporal e incluso en segundos entre sí. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2014/068022. Otro avance en las pruebas de múltiples analitos incluye una "vigilancia de cetona", que se puede iniciar cuando una concentración de glucemia está en un determinado valor predeterminado para desencadenar un análisis de tendencias de cetona, así como proporcionar automáticamente la concentración de cetona en sangre con la concentración de glucemia si las concentraciones de glucosa y/o cetona están por encima de un valor predeterminado. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2014/068024. De forma alternativa, la vigilancia de cetona se puede iniciar si una persona indica que tiene una enfermedad tal como un resfriado o la gripe. Véase *id.*

Sin embargo, los elementos de prueba de múltiples analitos actuales requieren reactivos de detección completos para cada analito de interés, así como pares separados de electrodos de trabajo y contraelectrodo para cada analito de interés.

Aunque los procedimientos y sistemas conocidos proporcionan muchas ventajas con respecto medir por separado concentraciones de glucosa y cetona, sigue existiendo la necesidad de obtener sistemas y procedimientos adicionales para medir simultáneamente concentraciones de glucosa y cetona en el mismo elemento de prueba de diagnóstico. El documento EP 2292785 A1 describe tiras reactivas de múltiples analitos con un primer electrodo de trabajo, un segundo electrodo de trabajo y un contraelectrodo/electrodo de referencia compartido. El documento WO 2016/030346 A2 describe un procedimiento para detectar al menos un analito en una muestra de prueba con un elemento de prueba. El documento US 2014/127728 A1 describe materiales reactivos y elementos de prueba con funcionalidad doble.

### Breve resumen

Un concepto según la invención descrito en el presente documento incluye usar combinaciones particulares de mediadores en reactivos de detección de múltiples analitos de modo que se puede usar un único contraelectrodo (CE) con una pluralidad de electrodos de trabajo específicos de analito (WE). Este concepto según la invención se logra proporcionando un elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos que tiene un primer par WE y un primer par CE cubiertos con un primer reactivo de detección específico de analito que incluye un primer mediador y que también tiene un segundo WE cubierto con un segundo reactivo de detección específico de analito que incluye un segundo mediador. De esta manera, se puede usar el único CE como el CE tanto para la primera como la segunda mediciones de analito en sus respectivos WE. Además, las concentraciones de mediador, intervalos de medición, diferencias de potencial aplicadas y secuencia en la que se aplican dichas diferencias de potencial a una muestra pueden variar para cada medición específica de analito. Dicho de manera diferente, el concepto según la invención incluye el uso de reactivos de detección para al menos dos analitos diferentes, donde un reactivo de detección incluye un primer mediador que proporciona la función WE y CE para una medición de analito, y donde el mismo CE también proporciona la función CE para cualquier otra medición de analito en otros WE que tienen su propio reactivo de detección específico de analito que incluye un mediador que es distinto del primer mediador. Por lo tanto, este concepto según la invención se puede incorporar en reactivos de detección secos ejemplares, elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos, sistemas de prueba y procedimientos de medición de múltiples analitos como se describe en el presente documento y con más detalle a continuación.

La invención proporciona un elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo (10) que comprende: una cubierta (16); un espaciador (14); y un sustrato de base no conductor (12) que tiene sobre el mismo un primer sistema de electrodos en comunicación con un primer reactivo de detección seco y un segundo sistema de electrodos en comunicación con un segundo reactivo de detección seco, en el que el primer sistema de electrodos comprende un primer electrodo de trabajo y un contraelectrodo y el segundo sistema de electrodos comprende un segundo electrodo de trabajo, en el que el contraelectrodo del primer sistema de electrodos proporciona la función de contraelectrodo para el segundo sistema de electrodos; en el que: el primer reactivo de detección seco es para la detección de un primer analito en una muestra de líquido corporal y se aplica al primer sistema de electrodos; en el que el primer reactivo de detección seco comprende una primera enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la primera enzima, una primera coenzima y un primer mediador; y el segundo reactivo de detección seco es para la detección de un segundo analito en la muestra de líquido corporal y se aplica al segundo sistema de electrodos; en el que el segundo reactivo de detección seco comprende una segunda enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la segunda enzima, una segunda coenzima y un

segundo mediador, que es distinto del primer mediador; y configurado de modo que, en uso, el contraelectrodo se usa como contraelectrodo para la medición del primer analito en el primer electrodo de trabajo y como contraelectrodo para la medición del segundo analito en el segundo electrodo de trabajo; en el que: el sustrato de base no conductor tiene una primera superficie (18) orientada hacia el espaciador y una segunda superficie (20) que está opuesta a la primera superficie; el espaciador se dispone sobre la primera superficie del sustrato de base no conductor; la cubierta se sitúa sobre el espaciador; la cubierta, espaciador y sustrato de base no conductor juntos forman una cámara de muestra (30); la cámara de muestra funciona como un capilar y se define como el espacio entre la cubierta y el sustrato y se une en un lado por el espaciador; el espaciador tiene un borde de extremo (32) sustancialmente paralelo a un primer extremo (22) del sustrato de base no conductor, definiendo de este modo el delimitador de la cámara de muestra extendiéndose a través de todo el ancho del sustrato de base no conductor; y configurado de modo que aplicar una muestra al primer extremo del sustrato de base no conductor permitirá que una muestra llene la cámara de muestra desde el primer extremo del sustrato de base no conductor o desde los lados (26, 28); en el que: (i) la cámara de muestra incluye un par de electrodos de suficiencia de muestra situados a lo largo de un respectivo borde lateral del sustrato de base no conductor, en el que el primer electrodo de trabajo y el contraelectrodo se sitúan contiguos a un electrodo de suficiencia de muestra, y el segundo electrodo de trabajo se sitúa contiguo al otro electrodo de suficiencia de muestra, y el segundo electrodo de trabajo tiene un área de trabajo mayor que el primer electrodo de trabajo; o (ii) la cámara de muestra incluye un par de electrodos de suficiencia de muestra situados a lo largo de un respectivo borde lateral del sustrato de base no conductor, en el que el contraelectrodo se extiende a través de la cámara de muestra y está más cerca del borde lateral que el primer electrodo de trabajo y el segundo electrodo de trabajo, en el que el primer electrodo de trabajo y el segundo electrodo de trabajo tienen áreas de trabajo equivalentes.

Los reactivos de detección para el análisis de múltiples analitos incluyen un primer reactivo de detección para un primer analito de interés y un segundo reactivo de detección para un segundo analito de interés.

El primer reactivo de detección incluye una primera enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la primera enzima, una primera coenzima y un primer mediador. En algunos casos, la primera enzima dependiente de coenzima y la primera coenzima están fijadas, unidas, integradas o enlazadas entre sí.

La primera enzima dependiente de coenzima puede ser una oxidasa o una deshidrogenasa. En algunos casos, la primera enzima dependiente de coenzima es una deshidrogenasa dependiente de dinucleótido de flavina y adenina (FAD), dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) o pirroloquinolina-quinona (PQQ), especialmente una deshidrogenasa dependiente de FAD, NAD o PQQ, así como mutantes enzimáticamente activos de las mismas. En otros casos, la primera enzima dependiente de coenzima es una glucosa deshidrogenasa, una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o una glucosa oxidasa, así como mutantes enzimáticamente activos de las mismas.

Asimismo, la primera coenzima puede ser un FAD, un NAD, un fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADP), un tio-NAD, un tio-NADP, una PQQ, o una coenzima artificial tal como un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal o una forma reducida del mismo. En algunos casos, la primera coenzima es FAD, NAD, NADP o el compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo. En otros casos, la primera coenzima es FAD.

Además, el primer mediador puede ser un compuesto azo o un precursor azo, benzoquinona, azul de meldola, una nitrosoanilina o un precursor basado en nitrosoanilina, una fenacina o un precursor basado en fenacina, una quinona o un derivado de quinona, una tiacina o un derivado de tiacina, un complejo de metal de transición tal como ferricianuro de potasio y derivados de osmio, o una combinación de una fenacina/precursor basado en fenacina y cloruro de hexamina-rutenio, así como derivados de los mismos. En algunos casos, el primer mediador es un derivado de nitrosoanilina o un precursor basado en nitrosoanilina, ferricianuro, hexamina de rutenio o fenacina. En otros casos, el primer mediador es clorhidrato de N,N-bis(hidroxietyl)-3-metoxi-4-nitrosoanilina (llamado BM 31.1144 o NA1144; Roche Diagnostics, Inc.; Indianápolis, IN, EE. UU.).

Por tanto, un primer reactivo de detección ejemplar puede incluir una glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD como enzima; FAD como coenzima; y un precursor basado en nitrosoanilina como mediador, tal como NA1144.

El segundo reactivo de detección también incluye una segunda enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la segunda enzima, una segunda coenzima y un segundo mediador, donde el segundo mediador es distinto del primer mediador (es decir, el segundo mediador no es el mismo que el primer mediador). En algunos casos, la segunda enzima dependiente de coenzima y la segunda coenzima están fijadas, unidas, integradas o enlazadas entre sí.

La segunda enzima dependiente de coenzima puede ser una oxidasa o una deshidrogenasa. En algunos casos, la segunda enzima dependiente de coenzima puede ser una deshidrogenasa dependiente de FAD, NAD o PQQ, especialmente una deshidrogenasa dependiente de FAD, NAD o PQQ, así como mutantes enzimáticamente activos de las mismas. En otros casos, la segunda enzima dependiente de coenzima puede ser una alcohol deshidrogenasa, una glucosa deshidrogenasa, una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, una glucosa oxidasa, una glicerol deshidrogenasa, una hidroxibutirato deshidrogenasa (HBDH), una malato deshidrogenasa, una sorbitol

deshidrogenasa o una aminoácido deshidrogenasa que comprende L-aminoácido deshidrogenasa, así como mutantes enzimáticamente activos de las mismas. En determinados casos, la segunda enzima dependiente de coenzima es una HBDH tal como 3-HBDH, así como mutantes enzimáticamente activos de la misma. De forma alternativa, la segunda enzima dependiente de coenzima puede ser la misma enzima que la primera enzima dependiente de coenzima.

Asimismo, la segunda coenzima puede ser un FAD, un NAD, un NADP, un tio-NAD, un tio-NADP, una PQQ, o una coenzima artificial tal como un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal o una forma reducida del mismo. En algunos casos, la segunda coenzima es tio-NAD, tio-NADP o un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal o una forma reducida del mismo. En otros casos, la segunda coenzima es carba-NAD, carba-NADP, tio-NAD o tio-NADP.

Además, el segundo mediador puede ser un compuesto azo o un precursor azo, benzoquinona, azul de meldola, una nitrosoanilina o un precursor basado en nitrosoanilina, una fenacina o un precursor basado en fenacina, una fenoxacina, una fenotiaccina, una quinona o un derivado de quinona, una tiacina o un derivado de tiacina, un complejo de metal de transición tal como ferricianuro de potasio y derivados de osmio, o una combinación de una fenacina/precursor basado en fenacina y cloruro de hexamina-rutenio, así como derivados de los mismos. En algunos casos, el segundo mediador es azul de meldola, una fenacina o precursor basado en fenacina, o una quinona o un derivado de quinona. En otros casos, el segundo mediador es un derivado de fenacina tal como el llamado 1-(3-carboxi-propionilamino)-5-etil-fenacin-5-io (PG355).

En algunos casos, el primer mediador y el segundo mediador se seleccionan del grupo que consiste en un compuesto azo o un precursor azo, benzoquinona, azul de meldola, una nitrosoanilina o un precursor basado en nitrosoanilina, una fenacina o un precursor basado en fenacina, una quinona o un derivado de quinona, una tiacina o un derivado de tiacina, un complejo de metal de transición tal como ferricianuro de potasio y derivados de osmio, y una combinación de una fenacina/precursor basado en fenacina y cloruro de hexamina-rutenio, así como derivados de los mismos; en el que preferentemente: el primer mediador es un derivado de nitrosoanilina o un precursor basado en nitrosoanilina, ferricianuro, hexamina de rutenio o fenacina; en el que más preferentemente el primer mediador es clorhidrato de N,N-bis(hidroxietyl)-3-metoxi-4-nitrosoanilina; el segundo mediador es azul de meldola, una fenacina o precursor basado en fenacina, o una quinona o un derivado de quinona; en el que más preferentemente el segundo mediador es 1-(3-carboxi-propionilamino)-5-etil-fenacin-5-io; el primer mediador es clorhidrato de N,N-bis(hidroxietyl)-3-metoxi-4-nitrosoanilina y el segundo mediador es 1-(3-carboxi-propionilamino)-5-etil-fenacin-5-io; o tanto el primer mediador como el segundo mediador son clorhidrato de N,N-bis(hidroxietyl)-3-metoxi-4-nitrosoanilina.

Cuando el primer analito es glucosa, el segundo analito puede ser un analito relacionado con el metabolismo de los ácidos grasos libres tal como ácidos grasos libres, cetonas, glicerol o cualquier otro analito representativo de lipólisis, especialmente cetonas y cuerpos cetónicos. Por tanto, un segundo reactivo de detección ejemplar puede incluir una HBDH como enzima; un carba-NAD, carba-NADP, tio-NAD o tio-NADP como coenzima; y una fenacina/precursor basado en fenacina como mediador, tal como PG355. Más específicamente, el segundo reactivo de detección puede ser 3-HBDH, carba-NAD y PG355.

De forma alternativa, y cuando el primer y segundo analitos son el mismo analito tal como glucosa, un segundo reactivo de detección ejemplar puede incluir una glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD como enzima; FAD como coenzima; y un ferricianuro o una nitrosoanilina distinta de NA1144 como mediador.

En algunos casos, la primera enzima dependiente de coenzima y la segunda enzima dependiente de coenzima se seleccionan del grupo que consiste en una alcohol deshidrogenasa, una glucosa deshidrogenasa, una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, una glucosa oxidasa, una glicerol deshidrogenasa, una hidroxibutirato deshidrogenasa, una malato deshidrogenasa, una sorbitol deshidrogenasa, una aminoácido deshidrogenasa que comprende L-aminoácido deshidrogenasa y una oxidasa o deshidrogenasa dependiente de dinucleótido de flavina y adenina (FAD), dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) o pirroloquinolina-quinona (PQQ). Preferentemente, la primera enzima dependiente de coenzima es glucosa deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o glucosa oxidasa; la segunda enzima dependiente de coenzima es hidroxibutirato deshidrogenasa; la primera enzima dependiente de coenzima es glucosa deshidrogenasa y la segunda enzima dependiente de coenzima es hidroxibutirato deshidrogenasa; o tanto la primera enzima dependiente de coenzima como la segunda enzima dependiente de coenzima son glucosa deshidrogenasa, glucosa oxidasa o hidroxibutirato deshidrogenasa.

En algunos casos, la primera enzima dependiente de coenzima es glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD, la primera coenzima es FAD y el primer mediador es clorhidrato de N,N-bis(hidroxietyl)-3-metoxi-4-nitrosoanilina, y en los que la segunda enzima dependiente de coenzima es hidroxibutirato deshidrogenasa, la segunda coenzima es carba-NAD, carba-NADP, tio-NAD o tio-NADP, y el segundo mediador es 1-(3-carboxi-propionilamino)-5-etil-fenacin-5-io; o la primera enzima dependiente de coenzima es glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD, la primera coenzima es FAD, y el primer mediador es clorhidrato de N,N-bis(hidroxietyl)-3-metoxi-4-nitrosoanilina (NA1144), y en los que la segunda enzima dependiente de coenzima es glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD o una glucosa oxidasa, la segunda coenzima es FAD o PQQ, y el segundo mediador es un ferricianuro o una

nitrosoanilina distinta de NA1144 como mediador.

Los elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo proporcionados incluyen un sustrato de base no conductor que tiene sobre él un primer sistema de electrodos en comunicación con un primer reactivo de detección como se describe en el presente documento y un segundo sistema de electrodos en comunicación con un segundo reactivo de detección como se describe en el presente documento. El primer sistema de electrodos incluye un par CE y WE, así como trazas conductoras y almohadillas de contacto relacionadas. Asimismo, el segundo sistema de electrodos incluye un WE, así como una traza conductora y almohadilla de contacto relacionadas. En algunos casos, se pueden incluir sistemas de electrodos y reactivos de detección adicionales para otros analitos, siempre que los reactivos de detección adicionales tengan un mediador diferente del mediador en el primer reactivo de detección. En otros casos, los sistemas de electrodos adicionales también incluyen otros electrodos de suficiencia de muestra y/o electrodos de integridad.

El elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo se puede definir además en el que: el primer sistema de electrodos se proporciona sobre el sustrato de base no conductor (12), comprendiendo el primer sistema de electrodos el primer contraelectrodo, el primer electrodo de trabajo, un primer cable de contraelectrodo, un primer cable de electrodo de trabajo, una primera almohadilla de contacto de contraelectrodo y una primera almohadilla de contacto de electrodo de trabajo, en el que el primer cable de contraelectrodo conecta eléctricamente el primer contraelectrodo a la primera almohadilla de contacto de contraelectrodo y el primer cable de electrodo de trabajo conecta eléctricamente el primer electrodo de trabajo a la primera almohadilla de contacto de electrodo de trabajo, y en el que al menos el primer contraelectrodo y el primer electrodo de trabajo se localizan en un área del canal capilar; el segundo sistema de electrodos se proporciona sobre el sustrato no conductor pero en una localización distinta de una localización del primer sistema de electrodos, comprendiendo el segundo sistema de electrodos el segundo electrodo de trabajo, un segundo cable de electrodo de trabajo y una segunda almohadilla de contacto de electrodo de trabajo, en el que el segundo cable de electrodo de trabajo conecta eléctricamente el segundo electrodo de trabajo a la segunda almohadilla de contacto de electrodo de trabajo, y en el que al menos el segundo electrodo de trabajo se localiza en un área del canal capilar; y el primer reactivo de detección seco se aplica al primer sistema de electrodos y el segundo reactivo de detección seco se aplica al segundo sistema de electrodos, el reactivo de detección seco se localiza en un área del canal capilar.

El elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo se puede definir además en el que el borde de la cubierta se extiende a través del primer cable de contraelectrodo, el primer cable de electrodo de trabajo y el segundo cable de electrodo de trabajo de modo que el primer contraelectrodo, el primer electrodo de trabajo y el segundo contraelectrodo se localizan completamente dentro del canal capilar; o el primer electrodo de trabajo tiene un área de trabajo que es equivalente o menor que un área de trabajo del segundo electrodo de trabajo.

También se describen en el presente documento sistemas que incluyen (1) un medidor de prueba configurado para analizar una muestra de líquido corporal y (2) uno o más elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos como se describe en el presente documento. El medidor se adapta para recibir los elementos de prueba de múltiples analitos y por tanto incluye un controlador configurado para proporcionar una secuencia de prueba y para determinar la concentración de uno o más analitos en la muestra de líquido corporal en base a información de respuesta obtenida de los elementos de prueba de múltiples analitos. Para ayudar a transmitir resultados de prueba a un usuario, el medidor también puede incluir uno o más dispositivos de entrada y/o dispositivos de salida.

En vista de lo anterior, se proporcionan procedimientos de análisis de múltiples analitos que incluyen aplicar o poner en contacto un elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos como se describe en el presente documento con una muestra de líquido corporal; aplicar una primera secuencia de prueba eléctrica al primer electrodo de trabajo y al contraelectrodo obteniendo de este modo información de respuesta relacionada con el primer analito; aplicar una segunda secuencia de prueba eléctrica al segundo electrodo de trabajo y al contraelectrodo obteniendo de este modo información de respuesta relacionada con el segundo analito; determinar una primera concentración de analito en la muestra a partir de la respectiva información de respuesta a la secuencia de prueba, determinar una segunda concentración de analito en la muestra a partir de la respectiva información de respuesta a la secuencia de prueba, y presentar información a un usuario con respecto a una o ambas concentraciones de analito.

También se proporciona un procedimiento para medir electroquímicamente la concentración de un primer analito y un segundo analito en una muestra de líquido corporal, comprendiendo el procedimiento las etapas de: aplicar una muestra de líquido corporal que tiene o se sospecha que tiene el uno o más analitos de interés a un elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo de acuerdo con la presente invención de modo que la muestra de líquido corporal esté en contacto fluido con el reactivo de detección seco para hidratar el reactivo de detección seco; aplicar una secuencia de prueba eléctrica al elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo por medio de un medidor de prueba configurado para interactuar con el elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo, en el que la secuencia de prueba comprende: a. un primer componente de corriente continua

(CC) fijo que comprende una diferencia de potencial aplicada entre el primer contraelectrodo y el primer electrodo de trabajo para medir un primer analito de interés; y b. un segundo componente de CC fijo que comprende una diferencia de potencial aplicada entre el primer contraelectrodo y el segundo electrodo de trabajo para medir un segundo analito de interés; medir información de respuesta a cada componente de la secuencia de prueba eléctrica con el medidor de prueba; y determinar una o más concentraciones de analito con el medidor de prueba usando la información de respuesta; y opcionalmente comprendiendo además la etapa de transmitir un mensaje a al menos uno de un usuario del elemento de prueba, profesional sanitario, cuidador y padre o tutor para ajustar un tratamiento o modificar una dieta en base a la una o más concentraciones de analito.

La secuencia de prueba eléctrica puede comprender además: un retraso después de aplicar la muestra de líquido corporal al elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos para permitir que la muestra de líquido corporal hidrate el reactivo de detección seco, y en el que el retraso comprende una diferencia de potencial abierta o cercana a 0 V mantenida entre el primer contraelectrodo y el primer electrodo de trabajo así como entre el primer contraelectrodo y el segundo electrodo de trabajo; o entre el primer componente de CC fijo y el segundo componente de CC fijo, una diferencia de potencial de CC cercana a 0 V mantenida entre el primer par de electrodos para permitir que una corriente de respuesta regrese a 0.

El primer componente de CC fijo puede ser una pluralidad de pulsos de potencial aumentados hasta o de aproximadamente 0 V a aproximadamente +450 mV, estando separado cada pulso por un intervalo de recuperación durante el que se aplica una diferencia de potencial de aproximadamente 0 mV entre el primer contraelectrodo y el primer electrodo de trabajo, en el que: el segundo componente de CC fijo sigue un intervalo de recuperación final y es una diferencia de potencial de aproximadamente +175 mV aplicada entre el primer contraelectrodo y el segundo electrodo de trabajo, en el que los pulsos e intervalos de recuperación del primer componente de CC fijo son cada uno durante de aproximadamente 50 ms a aproximadamente 500 ms, y en el que el segundo componente de CC fijo es durante al menos aproximadamente 500 ms; o el segundo componente de CC fijo sigue un intervalo de recuperación final y es una pluralidad de pulsos de potencial que aumentados hasta o de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +175 mV, estando separado cada pulso por un intervalo de recuperación durante el que se aplica una diferencia de potencial de aproximadamente 0 mV entre el primer contraelectrodo y el segundo electrodo de trabajo, en el que los pulsos e intervalos de recuperación del primer componente de CC fijo y del segundo componente de CC fijo son cada uno durante de aproximadamente 50 ms a aproximadamente 500 ms; y en el que preferentemente los pulsos de potencial del primer componente de CC fijo se incrementan durante aproximadamente 10 ms.

La secuencia de prueba eléctrica puede comprender además: un tercer componente de CC fijo, comprendiendo el tercer componente de CC fijo una pluralidad de pulsos de potencial que alterna entre aproximadamente -450 mV a aproximadamente +450 mV, y en el que el tercer componente de CC fijo se aplica entre el primer componente de CC fijo y el segundo componente de CC fijo; o un intervalo de depósito durante el que se aplica una diferencia de potencial positiva entre el primer contraelectrodo y el primer electrodo de trabajo y opcionalmente entre el primer contraelectrodo y el segundo electrodo de trabajo para reducir una cantidad de mediador reducido presente en el reactivo de detección seco antes de una contribución significativa del uno o más analitos de interés, en el que el intervalo de depósito se aplica durante de aproximadamente 0,5 segundos a aproximadamente 1,0 segundo; o un componente de corriente alterna (CA), comprendiendo el componente de CA una pluralidad de señales de CA de baja amplitud; en el que preferentemente el componente de CA comprende frecuencias de aproximadamente 10 kHz, aproximadamente 20 kHz, aproximadamente 10 kHz, aproximadamente 2 kHz y aproximadamente 1 kHz, y en el que cada frecuencia se aplica durante de aproximadamente 0,5 segundos a aproximadamente 1,5 segundos; el componente de CA comprende frecuencias de aproximadamente 20 kHz, aproximadamente 10 kHz, aproximadamente 2 kHz y aproximadamente 1 kHz, y en el que cada frecuencia se aplica durante de aproximadamente 0,5 segundos a aproximadamente 1,5 segundos; o el componente de CA se aplica antes del primer componente de CC fijo y del segundo componente fijo.

El procedimiento se puede definir además en el que la muestra de líquido corporal comprende sangre, y/o: el primer analito es glucosa y el segundo analito es hidroxibutirato, en el que preferentemente: la primera enzima dependiente de coenzima es glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD, la primera coenzima es FAD, y el primer mediador es clorhidrato de N,N-bis(hidroxi-etil)-3-metoxi-4-nitrosoanilina, y la segunda enzima dependiente de coenzima es hidroxibutirato deshidrogenasa, la segunda coenzima es carba-NAD, carba-NADP, tio-NAD o tio-NADP, y el segundo mediador es 1-(3-carboxi-propionilamino)-5-etil-fenacin-5-ilo; o ii) el primer analito y el segundo analito son el mismo; en el que preferentemente el analito es glucosa; y en el que más preferentemente la primera enzima dependiente de coenzima es glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD, la primera coenzima es FAD, y el primer mediador es clorhidrato de N,N-bis(hidroxi-etil)-3-metoxi-4-nitrosoanilina (NA1144), y la segunda enzima dependiente de coenzima es glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD o una glucosa oxidasa, la segunda coenzima es FAD o PQQ, y el segundo mediador es un ferricianuro o una nitrosoanilina distinta de NA1144 como mediador.

Los procedimientos pueden incluir opcionalmente determinar concentraciones de analito adicionales cuando se proporcionan electrodos de trabajo y reactivos de detección adicionales en el elemento de prueba. Los procedimientos también pueden incluir opcionalmente ajustar un tratamiento (por ejemplo, insulina) o modificar

una dieta en base a la una o más concentraciones de analito. Los procedimientos también pueden incluir opcionalmente transmitir un mensaje a al menos uno de un usuario del elemento de prueba, profesional sanitario, cuidador y padre o tutor para ajustar un tratamiento o modificar una dieta en base a la una o más concentraciones de analito.

5 En algunos casos, ambas concentraciones de analito se presentan al usuario; sin embargo, en otros casos, solo se presenta una concentración de analito, mientras que la otra concentración de analito se presenta solo si se cumple un umbral o condición predeterminado para un analito, el otro analito o ambos analitos. En determinados casos, el primer analito es glucosa y el segundo analito es cetona, donde la concentración de glucosa se presenta al usuario y la concentración de cetona se presenta solo si se cumple(n) el/los umbral(es) o condición/condiciones predeterminado(s), y donde el/los umbral(es) o condición/condiciones predeterminado(s) puede(n) ser una concentración de glucosa de aproximadamente 240 mg/dl o una concentración de cetona de aproximadamente 0,6 mM a aproximadamente 3,0 mM o incluso de aproximadamente 0,6 mM a aproximadamente 1,5 mM.

15 En otros casos, los procedimientos pueden incluir una etapa de presentar información a un usuario cuando se cumple(n) el/los umbral(es) o condición/condiciones predeterminado(s) tal como al menos uno de presentar la segunda concentración de analito, proporcionar una advertencia, proporcionar una lista de acciones a tomar en respuesta a que la segunda concentración de analito sea superior al valor predeterminado o transmitir un mensaje a al menos uno de un usuario del elemento de prueba, profesional sanitario, cuidador y padre o tutor.

20 En resumen, se proporcionan elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo y procedimientos de medición de múltiples analitos que se pueden usar para determinar la concentración de varios analitos incluyendo, pero sin limitarse a, aminoácidos, anticuerpos, bacterias, carbohidratos, fármacos, lípidos, marcadores, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, toxinas, virus y otros analitos, así como combinaciones de los mismos.

### Breve descripción de los dibujos

30 Las ventajas, efectos, rasgos característicos y objetivos distintos de los expuestos anteriormente resultarán más fácilmente evidentes cuando se considera la descripción detallada a continuación. Dicha descripción detallada hace referencia a los siguientes dibujos, en los que:

La FIG. 1 muestra una configuración de elemento de prueba ejemplar.

35 Las FIGS. 2A y 2B muestran configuraciones de sistema de electrodos ejemplares para elementos de prueba de múltiples analitos.

La FIG. 3 muestra un sistema de prueba que incluye un medidor y un elemento de prueba de múltiples analitos como se describe en el presente documento.

40 Las FIGS. 4A-F muestran secuencias de pruebas eléctricas ejemplares para mediciones de múltiples analitos. Específicamente, la FIG. 4A muestra una secuencia de prueba ejemplar que tiene dos componentes de corriente continua (CC) para mediciones de múltiples analitos (panel izquierdo) y una respuesta de corriente ejemplar a la misma (panel derecho). La FIG. 4B muestra una secuencia de prueba ejemplar que tiene dos componentes de CC precedidos por un componente de reposo para mediciones de múltiples analitos (panel izquierdo) y una respuesta de corriente ejemplar a la misma (panel derecho). La FIG. 4C muestra una secuencia de prueba ejemplar que tiene un primer componente de reposo, un primer componente de CC, un segundo componente de reposo y un segundo componente de CC para mediciones de múltiples analitos (panel izquierdo) y una respuesta de corriente ejemplar a la misma (panel derecho). La FIG. 4D muestra una secuencia de prueba ejemplar que tiene un primer componente de reposo, un primer componente de CC que está pulsado y un segundo componente de CC para mediciones de múltiples analitos (panel izquierdo) y una respuesta de corriente ejemplar a la misma (panel derecho). La FIG. 4E muestra una secuencia de prueba ejemplar que tiene un componente de reposo inicial, un componente de corriente alterna (CA), un primer componente de CC que está pulsado, un segundo componente de CC que está pulsado de manera diferente del primer componente de CC y un tercer componente de CC para mediciones de analito secundario (panel izquierdo) y una respuesta de corriente ejemplar a la misma (panel derecho). La FIG. 4F muestra una secuencia de prueba ejemplar que tiene un componente de reposo, un componente de CA, un primer componente de CC que está pulsado, un segundo componente de CC que está pulsado de manera diferente del primer componente de CC y un tercer componente de CC que está pulsado de manera diferente del primer y segundo componente de CC para mediciones de múltiples analitos (panel izquierdo) y una respuesta de corriente ejemplar a la misma (panel derecho).

60 La FIG. 5 muestra una curva de respuesta a la dosis para un reactivo de detección de cetona ejemplar que tiene un HBDH mutante, un alto contenido de mediador (PG355) y un alto contenido de polímero (Natrassol). Se sometieron a prueba ocho niveles diferentes de 3-hidroxiacetato (3-HB) (0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM y 8 mM).

Las FIGS. 6A-B muestran resultados de experimentos de interferencia en los que los elementos de prueba se dosificaron con muestras que contenían tanto 3-HB como glucosa con concentraciones variables. Específicamente, la FIG. 6A muestra el impacto sobre la corriente de glucosa en presencia de diferentes niveles de 3-HB (0 mM, 1 mM, 3 mM y 8 mM). Se sometieron a prueba dos niveles de glucosa (0 mg/dl y 300 mg/dl), cada uno con diferentes niveles de 3-HB. La FIG. 6B muestra el impacto sobre la corriente de 3-HB en presencia de diferentes niveles de glucosa (0 mg/dl y 300 mg/dl). Se sometieron a prueba cuatro niveles diferentes de 3-HB (0 mM, 1 mM, 3 mM y 8 mM), cada uno con diferentes niveles de glucosa.

Las FIGS. 7A-B muestran curvas de respuesta a la dosis para otro reactivo de detección de cetona ejemplar que tiene un HBDH mutante, un bajo contenido de mediador (PG355), un bajo contenido de polímero y un alto contenido de cofactor (NAD o cNAD). Específicamente, la FIG. 7A muestra curvas de respuesta a la dosis de NAD y cNAD en las que los elementos de prueba se dosificaron con muestras que contenían 3-HB con concentraciones variables (0 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM y 4 mM). La FIG. 7B muestra curvas de respuesta a la dosis de NAD y cNAD en las que los elementos de prueba que tenían el reactivo de detección de cetona y un reactivo de detección de glucosa se dosificaron con muestras que contenían glucosa con concentraciones variables (0 mg/dl, 57 mg/dl, 123 mg/dl, 520 mg/dl y 1000 mg/dl).

La FIG. 8 muestra una curva de respuesta a la dosis para elementos de prueba de múltiples analitos que no solo tienen un reactivo de detección de glucosa sino que también tienen un reactivo de detección de cetona ejemplar que incluye un mediador diferente (cPES) que los reactivos de detección de cetona anteriores. Los elementos de prueba se dosificaron con muestras que contenían 3-HB con concentraciones variables (0 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,25 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM y 8,0 mM).

Las FIGS. 9A-9F muestran el efecto de diferentes enzimas HBDH en un reactivo de detección de cetona ejemplar. Específicamente, la FIG. 9A muestra la corriente de 3-HB en presencia de glucosa con HBDH natural; la FIG. 9B muestra la corriente de 3-HB en presencia de glucosa con un mutante HBDH AFDH3; la FIG. 9C muestra la corriente de 3-HB en presencia de glucosa con un mutante HBDH AFDH4; la FIG. 9D muestra la corriente de glucosa en presencia de glucosa con HBDH natural; la FIG. 9E muestra la corriente de glucosa en presencia de glucosa con el mutante HBDH AFDH3; y la FIG. 9F muestra la corriente de glucosa en presencia de glucosa con el mutante HBDH AFDH4.

Las FIGS. 10A-B muestran los resultados de experimentos de interferencia para un reactivo de detección doble ejemplar alternativo en el que los elementos de prueba se dosificaron desde la parte superior del lado con muestras que contenían glucosa (300 mg/dl) y 3-HB. Específicamente, la FIG. 10A muestra el impacto sobre la corriente de glucosa en presencia de diferentes niveles de 3-HB. La FIG. 6B muestra el impacto sobre la corriente de 3-HB. Se sometieron a prueba cinco niveles diferentes de 3-HB (0 mM, 0,5 mM, 1,5 mM, 4 mM y 8 mM), cada uno con diferentes niveles de glucosa.

Las FIGS. 11A-B muestran los resultados de experimentos de interferencia en los que los reactivos de detección de cetona y glucosa se depositaron por medio de un recubrimiento por ranura en lugar de una distribución discreta PicoJet®, que se dosificaron con muestras que contenían tanto 3-HB como glucosa con concentraciones variables. Específicamente, la FIG. 11A muestra el impacto sobre la corriente de 3-HB en presencia de diferentes niveles de glucosa (0 mg/dl, 150 mg/dl y 300 mg/dl). Se sometieron a prueba tres niveles diferentes de 3-HB (0,5 mM, 1,5 mM y 3 mM), cada uno con diferentes niveles de glucosa. La FIG. 11B muestra el impacto sobre la corriente de glucosa en presencia de diferentes niveles de glucosa 3-HB (0,5 mM, 1,5 mM y 3 mM). Se sometieron a prueba tres niveles de glucosa (0 mg/dl, 150 mg/dl y 300 mg/dl), cada uno con diferentes niveles de 3-HB.

Las FIGS. 12A-B muestran los resultados de experimentos de interferencia en los que los reactivos de detección de glucosa doble se depositaron por medio de impresión por inyección de tinta en lugar de recubrimiento por ranura o distribución discreta PictoJet, lo que se hizo con muestras que contenían 350 mg/dl de glucosa, 350 mg/dl de maltosa o 350 mg/dl de xilosa. Específicamente, la FIG. 12A muestra la respuesta de un electrodo que tiene un reactivo de detección con una PQQ-GDH mutante con baja sensibilidad a la maltosa. No se observó respuesta de xilosa significativa con el electrodo PQQ-GDH mutante. La FIG. 12B muestra la respuesta de un electrodo que tiene un reactivo de detección con FAD-GDH.

Los correspondientes caracteres de referencia indican las partes correspondientes a lo largo de las diversas vistas de los dibujos.

#### Descripción de modos de realización ejemplares

Los elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo y procedimientos de medición de múltiples analitos se describirán ahora con más detalle con referencia a los dibujos adjuntos.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la

divulgación. Aunque se puede usar cualquier procedimiento y material similar a o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos y procedimientos de medición de múltiples analitos, en el presente documento se describen los procedimientos y materiales preferentes.

Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de un elemento, a menos que el contexto requiera claramente que exista un y solo un elemento. Por tanto, el artículo indefinido "un" o "una" normalmente quiere decir "al menos un/a". Asimismo, los términos "tienen", "comprenden" o "incluyen" o cualquier variación gramatical arbitraria de los mismos se usan de forma no excluyente. Por tanto, estos términos se pueden referir tanto a una situación en la que, además del rasgo característico introducido por estos términos, no están presentes otros rasgos característicos en la entidad descrita en este contexto como a una situación en la que están presentes uno o más de otros rasgos característicos. Por ejemplo, las expresiones "A tiene B", "A comprende B" y "A incluye B" se pueden referir tanto a una situación en la que, además de B, no está presente ningún otro elemento en A (es decir, una situación en la que A consiste única y exclusivamente en B) o a una situación en la que, además de B, uno o más de otros elementos están presentes en A, tales como elemento C, elementos C y D o incluso otros elementos.

### Visión general

Se proporcionan elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo y procedimientos de medición de múltiples analitos que se basan en un concepto según la invención que incluye usar combinaciones particulares de mediadores en reactivos de detección para elementos de prueba de múltiples analitos de modo que se puede usar un único CE con una pluralidad de WE específicos de analito. Por ejemplo, un reactivo de detección que tiene un primer mediador proporciona una función WE y CE para un analito de interés y también proporciona la función CE para uno o más de otros analitos de interés que tienen cada uno su propio reactivo de detección que tiene un mediador diferente del primer mediador (es decir, el primer mediador no es el mismo que los mediadores subsiguientes).

Los elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo y procedimientos de medición de múltiples analitos son útiles en una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, los elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos se pueden usar para realizar el seguimiento de una pluralidad de concentraciones de analito en enfermedades o trastornos tales como diabetes (por ejemplo, glucosa y cetona) o cardiopatías (por ejemplo, colesterol/lípidos y glucosa). Asimismo, los elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos se pueden usar para realizar el seguimiento del progreso de un tratamiento tal como un tratamiento con insulina en la diabetes.

En lo que respecta en general a reactivos de detección, elementos de prueba de diagnóstico y procedimientos de medición de analitos, se puede hacer referencia, por ejemplo, a Hönes *et al.* (2008) *Diabetes Technol. Ther.* 10:S10-S26, Habermüller *et al.* (2000) *Fresenius J. Anal. Chem.* 366:560-568, y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2009/0246808.

Aunque esta divulgación se refiere a elementos de prueba de diagnóstico y procedimientos de medición de glucosa y cetona, un experto en la técnica apreciará que otros reactivos de detección de múltiples analitos, elementos de prueba de diagnóstico, sistemas de prueba y procedimientos de medición de múltiples analitos también pueden ser beneficiosos, tales como, por ejemplo, una prueba doble para glucosa y 1,5-anhidroglucitol o HbA1c, una prueba doble para glucosa y colesterol, una prueba doble para glucosa y lactato, o incluso una prueba doble para glucosa y fructosamina. Se contempla además que se pueden medir más de dos analitos por medio de elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo único. Como tal, los analitos de interés incluyen, pero no se limitan a, alcoholes, aminoácidos, 1,5-anhidroglucitol, colesterol, fructosamina, glucosa, gliceras, HbA1c, cetonas HDL/cuerpos cetónicos, lactatos, lactato deshidrogenasa, malatos, piruvatos, sorbitol, triglicéridos y ácido úrico. Como se usa en el presente documento, "cetona" quiere decir cuerpos cetónicos tales como acetoacetato e hidroxibutirato (HB).

De forma ventajosa, los elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo y procedimientos de medición de múltiples analitos descritos en el presente documento se pueden usar para proporcionar a un usuario información sobre múltiples analitos que proporcionan información de diagnóstico específica para una enfermedad o trastorno tal como diabetes. Las evaluaciones pueden variar desde la detección de la presencia de dos o más analitos hasta determinar la concentración de dos o más analitos. Específicamente, los procedimientos en el presente documento permiten a personas con diabetes cumplir más fácilmente con las recomendaciones de pruebas y un tratamiento más seguro midiendo simultáneamente, por ejemplo, concentraciones de glucosa y cetona. Además, los procedimientos en el presente documento permiten a un profesional sanitario ayudar a iniciar y/o modificar un tratamiento para una enfermedad o trastorno tal como diabetes.

### 65 Reactivos de detección

Los reactivos de detección incluyen un primer reactivo de detección específico de analito y un segundo reactivo de detección específico de analito, aunque se contemplan reactivos de detección adicionales cuando se deben detectar más de dos analitos. Como se usa en el presente documento, "reactivo de detección" o "reactivos de detección" quieren decir una sustancia química o una mezcla de sustancias químicas, que en presencia del al menos un analito cambia al menos una propiedad detectable, en particular una propiedad física y/o químicamente detectable. Típicamente, el cambio de propiedad tiene lugar en presencia del al menos un analito que se va a detectar, no en presencia de otras sustancias. Sin embargo, en la práctica, un cambio de propiedad no específico se puede tolerar hasta cierto punto en presencia de otras sustancias químicas, con una presencia que en la muestra del líquido corporal es por regla general improbable y/o que solo están presentes en concentraciones muy bajas.

En general, los componentes del primer y segundo reactivos de detección se disuelven o suspenden en una matriz de modo que una muestra de líquido corporal hidrata o disuelve la matriz, y los analitos de interés en la muestra de líquido corporal se difunden a través de la matriz para reaccionar con uno o más de los componentes activos de los respectivos reactivos de detección.

Con respecto al primer reactivo de detección específico de analito, incluye al menos una primera enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la primera enzima, al menos una primera coenzima y al menos un primer mediador.

Por lo tanto, un componente del primer reactivo de detección específico de analito es la primera enzima dependiente de coenzima. Como se usa en el presente documento, "enzima dependiente de coenzima" quiere decir una enzima que requiere un cofactor orgánico o inorgánico llamado coenzima para la actividad catalítica.

En algunos casos, la primera enzima dependiente de coenzima puede ser una deshidrogenasa. Como se usa en el presente documento, "deshidrogenasa" quiere decir un polipéptido que puede catalizar una oxidación de un sustrato por transfiriendo hidruros (H<sup>-</sup>) como equivalentes redox de una molécula aceptora, tal como un cofactor redox como se hace referencia en otra parte en el presente documento. Los ejemplos de deshidrogenasas incluyen, pero no se limitan a, alcohol deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.1 o 1.1.1.2), glucosa deshidrogenasas, glicerina deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.6), HBDH, tal como 3-HBDH (E.C. 1.1.1.30) o beta-HBDH, alfa-HBDH y gamma-HBDH, lactato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.27 o 1.1.1.28), L-aminoácido deshidrogenasa (E.C. 1.4.1.5), malato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.37) o sorbitol deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.14), especialmente una deshidrogenasa dependiente de NAD(P)/NAD(P)H.

En algunos casos, la deshidrogenasa es una glucosa deshidrogenasa (GDH). Los ejemplos de GDH incluyen, pero no se limitan a, glucosa deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.47), quinoproteína glucosa deshidrogenasa (E.C. 1.1.5.2) tal como glucosa deshidrogenasa dependiente de pirroloquinolina quinona (PQQ) (E.C. 1.1.99.17; GDH-PQQ, también conocida como glucosa-tinte-oxidoreductasa GlucDOR; véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 7.749.437 y 9.017.544), hexocinasa (E.C. 2.7.1.1), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.49), glucosa deshidrogenasa dependiente de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) (E.C. 1.1.1.119) y glucosa deshidrogenasa dependiente de dinucleótido de flavina y adenina (FAD) (E.C. 1.1.99.10), o mutantes enzimáticamente activos de las mismas.

Como se usa en el presente documento, enzima dependiente de coenzima "mutada" o "mutante" quiere decir una variante genéticamente alterada de una enzima dependiente de coenzima natural (por ejemplo, enzima natural), teniendo la variante aproximadamente la misma cantidad de aminoácidos que la enzima dependiente de coenzima natural pero una secuencia de aminoácidos diferente que por tanto difiere de la enzima dependiente de coenzima natural en al menos un aminoácido. En general, la enzima dependiente de coenzima mutante tiene un incremento en la estabilidad térmica y/o hidrolítica en comparación con la enzima dependiente de coenzima natural.

Las enzimas dependientes de coenzima mutantes se pueden obtener mutando (es decir, sustituyendo, añadiendo o delecionando) una enzima dependiente de coenzima natural que se origina de cualquier fuente biológica. Como se usa en el presente documento, "fuente biológica" quiere decir tanto procariotas como eucariotas. La introducción de la(s) mutación/mutaciones puede ser localizada o no localizada; sin embargo, en algunos casos las mutaciones localizadas resultan de procedimientos recombinantes conocidos en la técnica, donde se introduce al menos un intercambio de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos de la enzima natural. Como tal, las mutaciones se pueden introducir de manera específica de sitio o no específica de sitio usando procedimientos recombinantes conocidos en la técnica, donde, de acuerdo con los respectivos requisitos y condiciones, al menos un intercambio de aminoácidos resulta dentro de la secuencia de aminoácidos de la enzima natural. A este respecto, el mutante puede tener un incremento en la estabilidad térmica o hidrolítica en comparación con la enzima natural.

En algunos casos, la enzima dependiente de coenzima mutante es una glucosa deshidrogenasa mutante (E.C. 1.1.1.47) o una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa mutante (E.C. 1.1.1.49). Los de GDH mutantes específicas se pueden encontrar, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente internacional n.ºs WO 2005/045016, WO 2009/103540, WO 2010/094632 y WO 2011/020856; así como en Baik *et al.* (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3285-3293 y Vásquez-Figueroa *et al.* (2007) *ChemBioChem* 8:2295-2301. Específicamente, el mutante GDH

5 puede tener una mutación al menos en las posiciones de aminoácidos 96, 170 y/o 252. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente internacional n.ºs WO 2009/103540 y WO 2010/094632; y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2014/0322737. Las sustituciones de aminoácidos particulares son Glu96Gly, Glu170Arg, Glu170Lys y/o Lys252Leu, en particular Glu170Arg y Gln252Leu en la glucosa deshidrogenasa de *Bacillus subtilis*. Otro de dicho mutante es una GDH dependiente de PQQ que tiene una mejora en la especificidad de sustrato en comparación con su homólogo natural (por ejemplo, mejora en la sensibilidad a la glucosa con sensibilidad reducida o atenuada hacia un glúcido competidor tal como maltosa). Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 7.132.270; 7.547.535 y 7.732.179.

10 Independientemente de la mutación, el mutante tiene esencialmente la misma actividad que la enzima natural. Además, los mutantes de las enzimas naturales mencionadas anteriormente se deben codificar por moléculas de ácido nucleico que estén en una posición para hibridar en condiciones de hibridación rigurosas con las moléculas de ácido nucleico que codifican las enzimas naturales. Como se usa en el presente documento, "condiciones de hibridación rigurosas" quiere decir una hibridación en la que los ácidos nucleicos que se van a hibridar se incuban a aproximadamente 65 °C en tampón Church (NaPO<sub>4</sub> 0,5 M (pH 7,15), SDS al 7 %; EDTA 1 mM) durante 15 aproximadamente 12 horas y posteriormente se lavan dos veces durante aproximadamente 30 min en tampón de lavado (NaPO<sub>4</sub> 40 mM (pH 7,15), SDS al 1 %; EDTA 1 mM). Uno de los ácidos nucleicos que se va a hibridar se inmoviliza y al otro se le proporciona un marcador detectable. Si los ácidos nucleicos se hibridan entre sí, esta hibridación se puede detectar por medio del marcador detectable en el ácido nucleico inmovilizado. Son conocidos 20 en la técnica procedimientos para llevar a cabo reacciones de hibridación.

Otras primeras enzimas dependientes de coenzima adecuadas incluyen, pero no se limitan a, oxidasas tales como aminotransferasas tales como aspartato o alanina aminotransferasa, 5'-nucleotidasa, colesterol oxidasa (E.C. 1.1.3.6), colina oxidasa (E.C. 1.1.3.17), creatina cinasa, glucosa oxidasa (E.C.1.1.3.4; GOx) y lactato oxidasa (E.C. 1.1.3.2; LOx), así como mutantes enzimáticamente activos de las mismas. 25

Además de la primera enzima dependiente de coenzima, el primer reactivo de detección específico de analito incluye la primera coenzima, que puede ser una coenzima natural o una coenzima artificial/estabilizada. Como se usa en el presente documento, "coenzima" o "cofactor redox" quiere decir una molécula que puede servir como 30 aceptor de equivalentes redox transferidos enzimáticamente, tales como hidruros (H<sup>-</sup>), que se transfieren desde un sustrato (por ejemplo, el analito de interés) a la enzima a la coenzima. Como se usa en el presente documento, "equivalentes redox" se refiere a un concepto comúnmente usado en química redox que es bien conocido para un experto en la técnica. En particular, se refiere a electrones que se transfieren desde un sustrato de la enzima dependiente de coenzima (es decir, el analito de interés) a la coenzima o electrones transferidos a un electrodo o 35 reactivo indicador desde la coenzima. Los ejemplos de coenzimas incluyen, pero no se limitan a, FAD, NAD, NADP, PQQ, tio-NAD, tio-NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I).

Como se indica en otra parte, la primera enzima dependiente de coenzima y la primera coenzima pueden estar fijadas, unidas, integradas o enlazadas entre sí. Como tales, es posible que no sean componentes físicamente 40 separados del reactivo de detección, sino que pueden estar juntos como un solo componente (por ejemplo, un complejo unido covalente o iónicamente). Los ejemplos de dichas enzimas dependientes de coenzimas/coenzimas incluyen, pero no se limitan a, GOx (coenzima FAD), GDH dependiente de FAD (FAD-GDH), GDH dependiente de PQQ, colesterol oxidasa (coenzima FAD) y diaforasa (coenzima FMN o FAD).

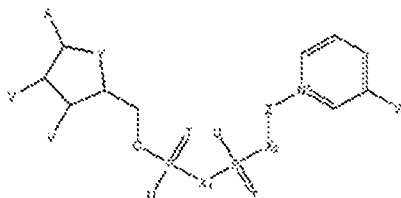
Se entenderá que la primera coenzima incluida en los reactivos de detección en el presente documento descritos depende de las propiedades de la enzima dependiente de coenzima. Por ejemplo, PQQ se puede combinar con una GDH dependiente de PQQ, NAD se puede combinar con una GDH dependiente de NAD y FAD se puede 45 combinar con una GDH dependiente de FAD. Los derivados del NAD (por ejemplo, derivados NAD/NADH y/o NADP/NADPH) incluyen carba-NAD (cNAD). Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2007/012494. 50

En algunos casos, la primera coenzima es una coenzima artificial/estabilizada. Como se usa en el presente documento, "coenzima artificial" o "coenzima estabilizada" quiere decir una coenzima que está alterada químicamente con respecto a la coenzima natural y que a presión atmosférica tiene una mayor estabilidad que la 55 coenzima natural frente a humedad, temperaturas en una región de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 50 °C, ácidos y bases en un intervalo de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 10, y/o nucleófilos tales como alcoholes o aminas, y por tanto puede producir su efecto durante un tiempo más prolongado en comparación con la coenzima natural en condiciones ambientales idénticas. En algunos casos, la coenzima artificial tiene una estabilidad hidrolítica mayor que la coenzima natural, siendo en particular ventajosa la estabilidad hidrolítica completa en condiciones de prueba. Asimismo, la coenzima artificial puede tener una constante de unión menor 60 que la coenzima natural para la enzima dependiente de coenzima, tal como, por ejemplo, una constante de unión reducida por un factor de 2 o más.

Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" quiere decir dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor o valores tales como, por ejemplo, una concentración, longitud, ancho, altura, ángulo, peso, 65 peso molecular, pH, identidad de secuencia, margen de tiempo, temperatura o volumen establecido. Dicho valor o

intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, típicamente dentro de un 20 %, más típicamente dentro de un 10 % e incluso más típicamente dentro de un 5 % de un valor o intervalo dado. La variación admisible englobada por "aproximadamente" dependerá del sistema particular en estudio y se puede apreciar fácilmente por un experto en la técnica.

5 Los ejemplos de coenzimas artificiales incluyen, pero no se limitan a, compuestos NAD(P)/NAD(P)H artificiales, que son derivados químicos de NAD/NADH natural o de NADP/NADPH natural. En algunos casos, las coenzimas artificiales incluyen, pero no se limitan a, compuestos de acuerdo con la fórmula (I) como se muestra a continuación:



(I)

en la que:

15 A = adenina o un análogo de la misma,

T = en cada caso indica independientemente O o S,

20 U = en cada caso indica independientemente OH, SH, BH<sub>3</sub><sup>-</sup> o BCNH<sub>2</sub><sup>-</sup>,

V = en cada caso indica independientemente OH o un grupo fosfato,

W = COOR, CON(R)<sub>2</sub>, COR o CSN(R)<sub>2</sub> en el que R en cada caso indica independientemente H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>,

25 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> = en cada caso indican independientemente O, CH<sub>2</sub>, CHCH<sub>3</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH o NCH<sub>3</sub>,

Y = NH, S, O o CH<sub>2</sub>,

30 Z = un residuo que comprende un grupo cíclico con 5 átomos de C que opcionalmente contiene un heteroátomo seleccionado de O, S y N y opcionalmente uno o más sustituyentes, y un residuo CR<sub>4</sub><sub>2</sub> en el que CR<sub>4</sub><sub>2</sub> está unido al grupo cíclico y a X<sub>2</sub>, y

donde R<sub>4</sub> = en cada caso indica independientemente H, F, Cl o CH<sub>3</sub>, siempre que Z y el residuo piridina no estén enlazados por un enlace glucosídico,

35 o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo.

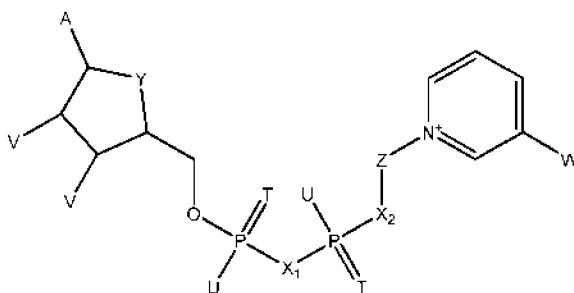
Los sustituyentes ejemplares en Z pueden ser OH, F, Cl y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> que están opcionalmente fluorados o clorados y/o sustituidos con OH, O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>.

40 De forma alternativa, un primer residuo V es OH, y un segundo residuo V es un grupo fosfato. Opcionalmente, el un grupo OH y el un grupo fosfato pueden formar un anillo conjuntamente con los átomos de carbono a los que están unidos.

45 Los ejemplos de análogos de adenina incluyen, pero no se limitan a, adenina sustituida con C<sub>8</sub> y sustituida con N<sub>6</sub>, variantes desaza tales como variantes 7-desaza tales como 8-aza o combinaciones tales como 7-desaza u 8-aza o análogos carbocíclicos tales como formicina donde las variantes 7-desaza pueden estar sustituidas en la posición 7 con halógeno, alquino C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. De forma alternativa, los compuestos incluyen análogos de adenosina que contienen 2-metoxidesoxirribosa, 2'-fluorodesoxirribosa, hexitol, altritol o análogos policíclicos tales como glúcidos bicíclicos, LNA y tricíclicos en lugar de ribosa. En una forma, los oxígenos (di)fosfato también pueden estar sustituidos isoelectrónicamente tal como por ejemplo O<sup>-</sup> por S<sup>-</sup> y/o por BH<sub>3</sub><sup>-</sup>, O por NH, NCH<sub>3</sub> y/o por CH<sub>2</sub> y =O por =S. Además, al menos un residuo U de un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) es diferente de OH y de forma alternativa al menos un residuo U = BH<sub>3</sub><sup>-</sup>. En algunos casos, la primera coenzima y la segunda coenzima se seleccionan del grupo que consiste en un dinucleótido de flavina y adenina (FAD), un dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), una pirroloquinolina-quinona (PQQ), un tio-NAD, un tio-NADP, una PQQ o una coenzima artificial tal como un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal o una forma reducida del mismo, y en el que el compuesto de acuerdo con la fórmula (I) es como se define anteriormente. Preferentemente, la primera coenzima es FAD, NAD, NADP o el compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una

sal u opcionalmente una forma reducida del mismo; la primera coenzima es FAD; la segunda coenzima es carba-NAD, carba-NADP, tio-NAD o tio-NADP; la primera coenzima es FAD y la segunda coenzima es carba-NAD; o tanto la primera coenzima como la segunda coenzima son carba-NAD o PQQ.

- 5 De forma alternativa, las coenzimas artificiales incluyen, pero no se limitan a, compuestos de acuerdo con la fórmula (I) como se muestra a continuación:



(I)

10

En la que:

A = adenina,

15

T = en cada caso indica O,

U = en cada caso indica OH,

V = en cada caso indica OH,

20

W =  $\text{CON}(\text{R})_2$  en el que R indica H,

$\text{X}_1 = \text{O}$ ,

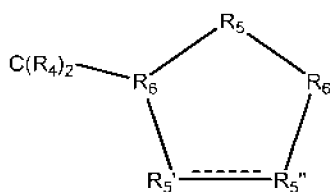
25

$\text{X}_2 = \text{O}$ ,

Y = O, y

Z = un anillo de 5 miembros carbocíclico de fórmula general (II)

30



(II)

en la que hay un enlace sencillo entre  $\text{R}_5'$  y  $\text{R}_5''$ , y en la que

35

$\text{R}_4 = \text{H}$ ,

$\text{R}_5 = \text{CHOH}$ ,

40

$\text{R}_5'' = \text{CHOH}$ ,

$\text{R}_5 = \text{CR}_4$ ,

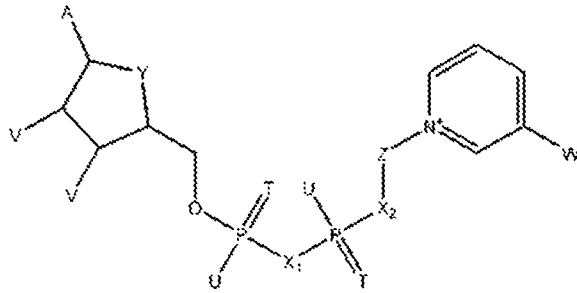
$\text{R}_6 = \text{CH}$ , y

45

$\text{R}_6' = \text{CH}$ .

Todavía de forma alternativa, las coenzimas artificiales incluyen, pero no se limitan a, compuestos de acuerdo con

la fórmula (I) como se muestra a continuación:



(I)

5

en la que:

A = adenina,

10

T = en cada caso indica O,

U = en cada caso indica OH,

15

V = en un primer caso indica OH y en un segundo caso indica un grupo fosfato,

W = CON(R)<sub>2</sub> en el que R indica H,

X<sub>1</sub> = O,

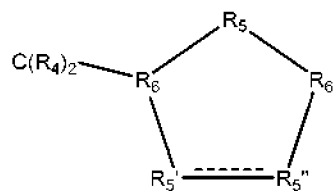
20

X<sub>2</sub> = O,

Y = O, y

25

Z = un anillo de 5 miembros carbocíclico de fórmula general (II):



(II)

30

en la que hay un enlace sencillo entre R<sub>5</sub>' y R<sub>5</sub>'', y en la que

R<sub>4</sub> = H,

R<sub>5</sub>' = CHOH,

35

R<sub>5</sub>'' = CHOH,

R<sub>5</sub> = CR<sub>4</sub>2,

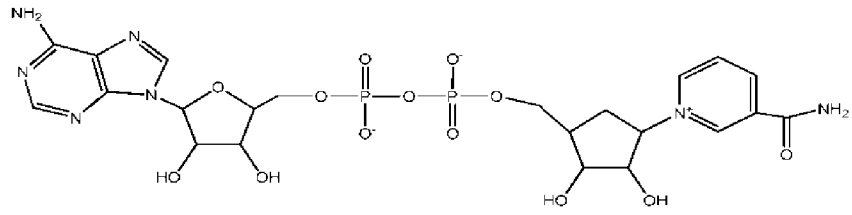
R<sub>6</sub> = CH, y

40

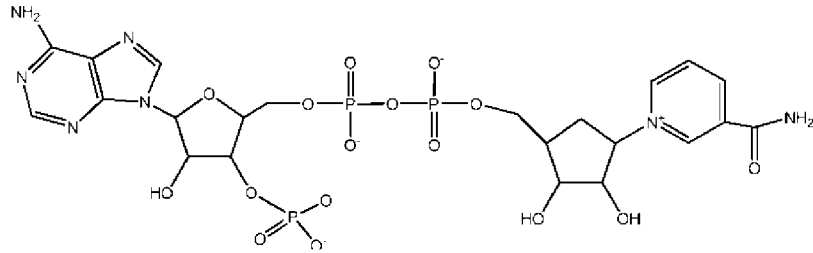
R<sub>6</sub>' = CH.

45

En determinados casos, la coenzima artificial puede ser carba-NAD o carba-NADP. Véase, Slama y Simmons (1988) *Biochem.* 27:183-193; y Slama y Simmons (1989) *Biochem.* 28:7688-7694. Carba-NAD tiene la siguiente estructura:

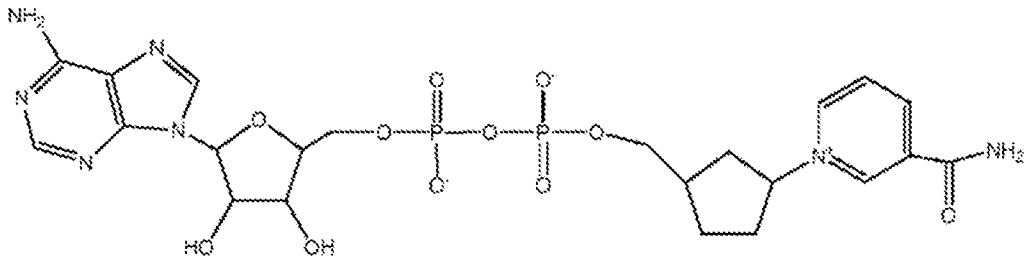
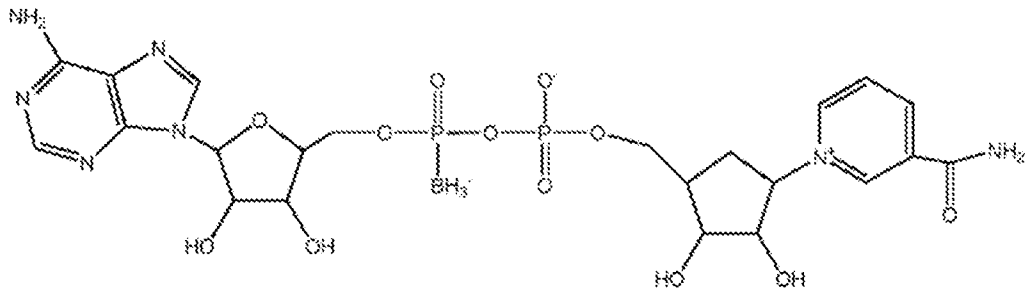


Carba-NADP tiene la siguiente estructura:

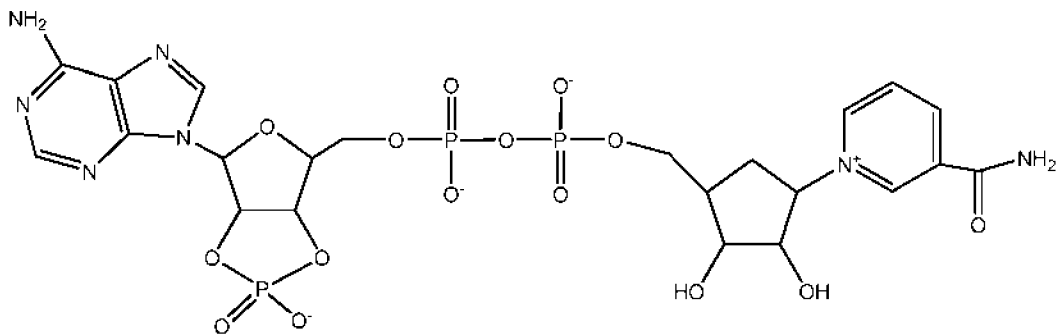


5

Otros compuestos de acuerdo con la fórmula (I) incluyen borano carba-NAD, ciclopentil-NAD y carba-NAD ciclofosfato. Estos compuestos tienen las siguientes estructuras:



10



15

Otros detalles con respecto a compuestos de acuerdo con la fórmula (I) y la síntesis de los mismos se divulgan en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2007/012494; así como en la patente de EE. UU. n.º 7.553.615.

Otras coenzimas artificiales que se pueden usar en los reactivos de detección descritos en el presente documento se divulgan en las publicaciones de solicitud de patente internacional n.ºs WO 1998/033936, WO 2001/049247, WO 2009/103540 y WO 2011/020856; patente de EE. UU. n.º 5.801.006; y Hutchinson *et al.* (1996) *Chem. Commun.* 24:2765-2766.

Además de la primera enzima dependiente de coenzima y la primera coenzima, el primer reactivo de detección específico de analito incluye el primer mediador. Como se usa en el presente documento, "mediador" quiere decir un compuesto químico que aumenta la reactividad de una coenzima reducida obtenida por reacción con el analito y que transfiere electrones a un sistema de electrodos o a un indicador óptico/sistema de indicador óptico adecuado.

El mediador puede ser cualquier especie química (en general electroactiva) que puede participar en un esquema de reacción que implica a un analito, una enzima dependiente de coenzima, una coenzima y productos de reacción de los mismos, para producir un producto de reacción electroactivo detectable. Típicamente, la participación del mediador en la reacción implica un cambio en su estado de oxidación (por ejemplo, una reducción) tras la interacción con uno cualquiera del analito, la enzima dependiente de la coenzima, la coenzima o una especie que sea un producto de reacción de uno de estos (por ejemplo, una coenzima reaccionó a un estado de oxidación diferente). Una variedad de mediadores presentan un comportamiento electroquímico adecuado. Un mediador también puede ser estable en su forma oxidada, puede presentar opcionalmente electroquímica redox reversible, puede presentar buena solubilidad en soluciones acuosas y puede reaccionar rápidamente para producir un producto de reacción electroactivo. Una revisión de mediadores que transfieren directamente equivalentes redox a un sistema de detección adecuado y que se pueden usar para determinar electroquímicamente la glucemia se puede encontrar, por ejemplo, en Takaminami (2008) *Mater. Integr.* 21:317-323 y Heller *et al.* (2008) *Chem. Rev.* 108:2482-2505.

Los ejemplos de primeros mediadores incluyen, pero no se limitan a, un compuesto azo o un precursor azo, benzoquinona, azul de meldola, una nitrosoanilina o un precursor basado en nitrosoanilina, una tiacina o un derivado de tiacina, un complejo de metal de transición tal como ferricianuro de potasio, complejos de rutenio tales como cloruro de hexamina de rutenio, derivados de osmio, una quinona o un derivado de quinona, una fenacina o un precursor basado en fenacina, y una combinación de un derivado de fenacina y cloruro de hexamina-rutenio, así como derivados de los mismos. Véanse, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 1998/035225; y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.286.362 y 8.008.037; así como Gorton y Domínguez (2002) *Rev. Mol. Biotechnol.* 82:371-392.

Los ejemplos de compuestos azo y precursores azo incluyen, pero no se limitan a, los compuestos descritos en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2014/0212903, especialmente aquellos compuestos azo que no forman dímeros azoxi.

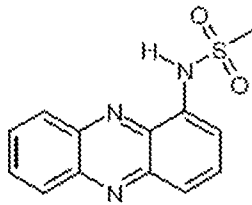
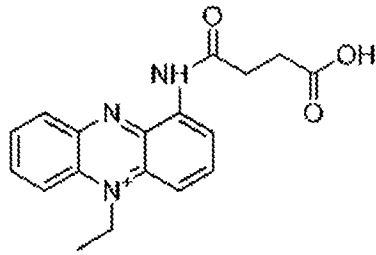
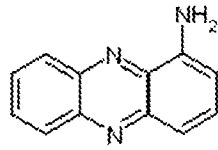
Los ejemplos de compuestos basados en nitrosoanilina que pueden actuar como precursor mediador incluyen, pero no se limitan a, los compuestos descritos en las patentes EP n.ºs 0620283 y 0831327; las patentes de EE. UU. n.ºs 5.206.147 y 5.286.362; y la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2013/131885. De esta manera, el precursor mediador basado en nitrosoanilina se descompone en componentes mediadores reversibles cuando se pone en contacto con una muestra de líquido corporal.

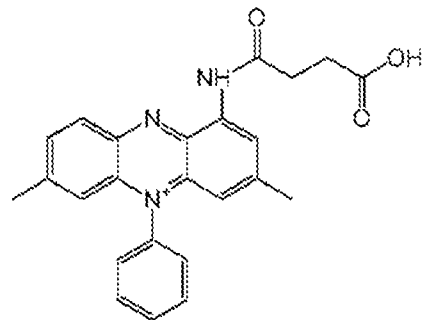
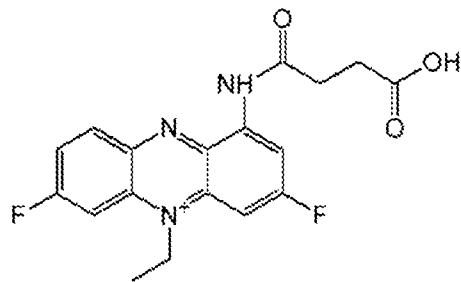
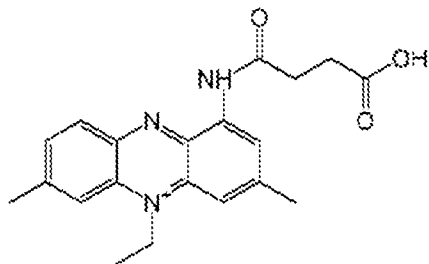
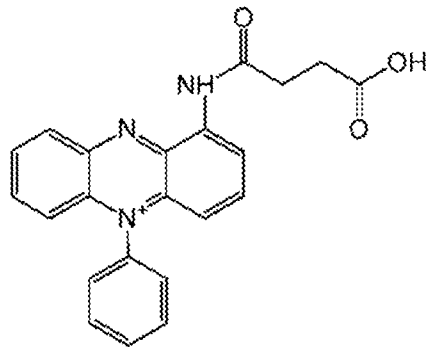
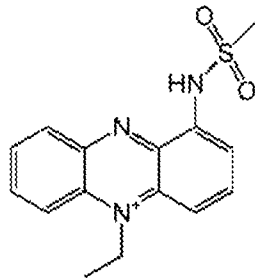
Otros ejemplos de precursores de mediadores basados en nitrosoanilina incluyen, pero no se limitan a, N-(2-hidroxi-etil)-N'-p-nitrosfenil-piperacina, N,N-bis-(2-hidroxi-etil)-p-nitrosoanilina, o-metoxi-[N,N-bis-(2-hidroxi-etil)]-p-nitrosoanilina, p-hidroxinitrosobenceno, N-metil-N'-(4-nitrosfenil)-piperacina, p-quinona dioxima, N,N-dimetil-p-nitrosoanilina, N,N-di-etil-p-nitrosoanilina, N-(4-nitrosfenil)-morfolina, N-bencil-N-(5'-carboxipentil)-p-nitrosoanilina, N,N-dimetil-4-nitroso-1-naftilamina, N,N,3-trimetil-4-nitrosoanilina, N-(2-hidroxi-etil)-5-nitrosoindolina, N,N-bis-(2-hidroxi-etil)-3-cloro-4-nitrosoanilina, 2,4-dimetoxi-nitrosobenceno, N,N-bis-(2-metoxietil)-4-nitrosoanilina, 3-metoxi-4-nitrosfenil, N-(2-hidroxi-etil)-6-nitroso-1,2,3,4-tetrahidroquinolina, N,N-dimetil-3-cloro-4-nitrosoanilina, N,N-bis-(2-hidroxi-etil)-3-fluoro-4-nitrosoanilina, clorhidrato de N,N-bis(hidroxi-etil)-3-metoxi-4-nitrosoanilina (NA114), N,N-bis-(2-hidroxi-etil)-3-metiltio-4-nitrosoanilina, N-(2-hidroxi-etil)-N-(2-(2-metoxietoxi)-etil)-4-nitrosoanilina, N-(2-hidroxi-etil)-N-(3-metoxi-2-hidroxi-1-propil)-4-nitrosoanilina, N-(2-hidroxi-etil)-N-(3-(2-hidroxi-etoxi)-2-hidroxi-1-propil)-4-nitrosoanilina, N-(2-hidroxi-etil)-N-(2-(2-hidroxi-etoxi)-etil)-4-nitrosoanilina y clorhidrato de [(4-nitrosfenil)imino]dimetanol.

Los ejemplos de derivados de osmio incluyen, pero no se limitan a, los compuestos divulgados en la patente EP n.º 1457572 y la publicación de solicitud de patente internacional n.º 1998/035225.

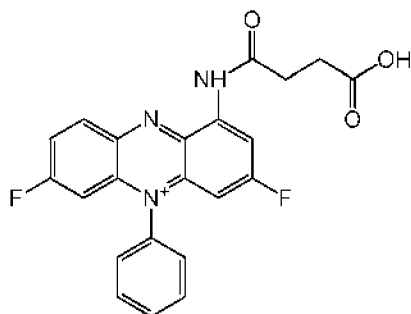
Los ejemplos de fenacinas o precursores basados en fenacina incluyen, pero no se limitan a, fenacinetosulfato (PES), fenacinmetosulfato (PMS), 1-(3-carboxipropoxi)-5-etilfenaciotrifluorometansulfonato, 1-(3-carboxipropoxi)-5-etil-fenacin-5-io) (cPES), 1-(3-carboxi-propionilamino)-5-etil-fenacin-5-io (PG355) o 1-metoxifenacinmetosulfato. Véanse, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente EP n.º 0654079; y Gorton (1986) *Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 82:1245-1258. En algunos casos, la fenacina puede ser un derivado de 1-amino-fenacina. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2015/158645. En

determinados casos, la fenacina puede ser una de las siguientes estructuras o derivados de las mismas:





, 0



Los ejemplos de quinonas o derivados de quinona incluyen, pero no se limitan a, orto y para quinonas, así como quinonediiminas. Véanse, por ejemplo, Gorton (1986), *supra*; Degrand y Miller (1980) *J. Am. Chem. Soc.* 102:5728-5732; Kitani y Miller (1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103:3595-3597; y Baldwin (1983) *Anal. Chem.* 55:1588-1591.

En algunos casos, el primer mediador es clorhidrato de N,N-bis(hidroxietyl)-3-metoxi-4-nitrosoanilina (NA1144).

Con respecto a la concentración del primer mediador, en general es un mediador muy estable (es decir, al menos más estable que el segundo mediador) y se proporciona en una concentración mayor que el segundo mediador (es decir, el segundo mediador se proporciona en una concentración menor que el primer mediador). Sin embargo, un experto en la técnica entiende que las concentraciones de mediador relativas se determinan, en parte, por los intervalos de concentración de analito que se espera detectar. Por ejemplo, cuando se realiza el seguimiento de glucosa y cetonas, el intervalo de concentración de 3-HB es significativamente más pequeño que el intervalo de concentración de glucosa. Por tanto, el mediador de cetona puede estar en una concentración menor que el mediador de glucosa. Más específicamente, la consideración principal para la concentración de mediador de glucosa (es decir, el primer mediador) es que sea lo suficientemente alta como para soportar una señal en el intervalo de glucosa alto y proporcionar por tanto suficiente mediador oxidado (por ejemplo, forma nitroso y forma quinonediimina) para apoyar una reacción de contraelectrodo. Dependiendo de la formulación de reactivo, y en base a un elemento de prueba de solo glucosa, la primera concentración de mediador puede ser de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 35 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 25 mM. De forma alternativa, la primera concentración de mediador puede ser de aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM o aproximadamente 40 mM. De forma alternativa, la primera concentración de mediador puede ser de aproximadamente 10 mM, aproximadamente 12 mM, aproximadamente 14 mM, aproximadamente 16 mM, aproximadamente 18 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 22 mM, aproximadamente 24 mM, aproximadamente 26 mM, aproximadamente 28 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 32 mM, aproximadamente 34 mM, aproximadamente 36 mM, aproximadamente 38 mM o aproximadamente 40 mM.

Cuando la coenzima es NAD/NADH, el mediador puede ser una quinona (tal como una orto o paraquinona), una quinonediimina, una fenacina, una fenoxacina o una fenotiacina.

Asimismo, y cuando la coenzima es cNAD/cNADH, el mediador puede ser PG355, cPES, PES, PMS o clorhidrato de N,N-bis(hidroxietyl)-3-metoxi-4-nitrosoanilina.

Los ejemplos no limitantes adicionales de materiales reactivos operables para detectar la presencia y/o concentración de glucosa se divulgan en las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0146113 y 2014/0212903; y las patentes de EE. UU. n.ºs 7.727.467 y 8.008.037, así como Huang *et al.* (2014) *Clin. Chim. Acta.* 433:28-33.

Con respecto al segundo reactivo de detección específico de analito, incluye al menos una segunda enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la segunda enzima, al menos una segunda coenzima y al menos un segundo mediador, donde el al menos un segundo mediador es distinto del al menos un primer mediador incluido en el primer reactivo de detección específico de analito. Como anteriormente, los componentes del segundo reactivo de detección específico de analito se disuelven o suspenden en una matriz de modo que una muestra de líquido corporal hidrata o disuelve la matriz y los analitos se difunden a través de la matriz para reaccionar con uno o más de los componentes activos de los reactivos de detección.

La segunda enzima dependiente de coenzima puede ser una enzima como se enumera anteriormente e incluso puede ser la misma enzima que la primera enzima dependiente de coenzima cuando se desea realizar una medición de analito duplicada en el mismo elemento de prueba de diagnóstico. De forma alternativa, la primera y la segunda enzima dependientes de coenzima no son la misma.

Como se indica en otra parte, la segunda enzima dependiente de coenzima y la segunda coenzima pueden estar fijadas, unidas, integradas o enlazadas entre sí. Como tales, es posible que no sean componentes físicamente separados del reactivo de detección, sino que pueden estar juntos como un solo componente (por ejemplo, un complejo unido covalente o iónicamente).

En algunos casos, la segunda enzima dependiente de coenzima es una HBDH. Los ejemplos de HBDH incluyen, pero no se limitan a, alfa-HBDH, beta o 3-HBDH y gamma-HBDH.

Además de la segunda enzima dependiente de la coenzima, el segundo reactivo de detección específico de analito puede incluir la segunda coenzima, que puede ser una coenzima natural o una coenzima artificial/estabilizada. La segunda coenzima puede ser una coenzima como se enumera anteriormente e incluso puede ser la misma coenzima que la primera coenzima. De forma alternativa, la primera y la segunda coenzima no son la misma.

Como anteriormente para el primer reactivo de detección específico de analito, los ejemplos de segundas coenzimas incluyen, pero no se limitan a, FAD, NAD, NADP, PQQ, tio-NAD, tio-NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I). En algunos casos, tal como cuando el segundo analito es una cetona, la segunda coenzima puede ser tio-NAD, tio-NADP o un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo, especialmente carba-NAD o carba-NADP.

Además de la segunda enzima dependiente de coenzima y la segunda coenzima, el segundo reactivo de detección específico de analito incluye el segundo mediador. Como anteriormente para el primer reactivo de detección específico de analito, los ejemplos de segundos mediadores incluyen, pero no se limitan a, un compuesto azo o un precursor azo, benzoquinona, azul de meldola, una nitrosoanilina o un precursor basado en nitrosoanilina, una tiacina o un derivado de tiacina, un complejo de metal de transición tal como ferricianuro de potasio, cloruro de hexamina de rutenio y derivados de osmio, una quinona o un derivado de quinona, una fenacina o un precursor basado en fenacina y una combinación de un derivado de fenacina y cloruro de hexamina-rutenio, así como derivados de los mismos, con la condición de que el segundo mediador no sea el mismo que el primer mediador. En algunos casos, tal como cuando el segundo analito es una cetona, el segundo mediador puede ser una fenacina o un derivado basado en fenacina, especialmente derivados de 1-amino-fenacina como PG355. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º 2015/057933.

Con respecto a la concentración del segundo mediador, en general es un mediador menos estable (es decir, al menos menos estable que el primer mediador) y se proporciona en una concentración menor que el primer mediador (es decir, el primer mediador se proporciona en una concentración mayor que el segundo mediador). Como se indica anteriormente, un experto en la técnica entiende que las concentraciones de mediador relativas se determinan, en parte, por los intervalos de concentración de analito que se espera detectar. Por ejemplo, y cuando se realiza el seguimiento de glucosa y cetona, el intervalo de concentración de 3-HB es significativamente más pequeño que el intervalo de concentración de glucosa. Por tanto, el mediador de cetona puede estar en una concentración menor que el mediador de glucosa. Más específicamente, con respecto a concentraciones "bajas" y "altas" del segundo mediador, la concentración puede ser de aproximadamente 2,5 mM a aproximadamente 8,5 mM, de aproximadamente 3,0 mM a aproximadamente 7,5 mM, de aproximadamente 3,5 mM a aproximadamente 7,0 mM, de aproximadamente 4,0 mM a aproximadamente 6,5 mM, de aproximadamente 4,5 mM a aproximadamente 6,0 mM, o de aproximadamente 5,0 mM a aproximadamente 5,5 mM. De forma alternativa, la segunda concentración de mediador puede ser de aproximadamente 2,5 mM, aproximadamente 3,0 mM, aproximadamente 3,5 mM, aproximadamente 4,0 mM, aproximadamente 4,5 mM, aproximadamente 5,0 mM, aproximadamente 5,5 mM, aproximadamente 6,0 mM, aproximadamente 6,5 mM, aproximadamente 7,0 mM, aproximadamente 7,5 mM, aproximadamente 8,0 mM o aproximadamente 8,5 mM.

Dicho de forma diferente, las proporciones del segundo con respecto al primer mediador podrían estar en el intervalo de aproximadamente 1:1,5, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:2,5, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:3,5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:4,5, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:5,5, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:6,5, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1:7,5, aproximadamente 1:8, aproximadamente 1:8,5, aproximadamente 1:9, aproximadamente 1:9,5 o aproximadamente 1:10. Una proporción ejemplar puede ser 1:1,6 (por ejemplo, PG355 7,5 mM : NA1144 16 mM) a aproximadamente 1:8 (PG355 5 mM : NA1144 40 mM).

Los ejemplos no limitantes adicionales de materiales reactivos operables para detectar la presencia y/o concentración de cetonas se divulgan en las patentes de EE. UU. n.ºs 8.920.628 y 8.921.061.

Además de las enzimas dependientes de coenzima, coenzimas y mediadores, los reactivos de detección pueden incluir otras sustancias usadas para análisis cualitativo y/o determinación cuantitativa de los analitos de interés. Por ejemplo, los reactivos de detección pueden incluir una variedad de adyuvantes para potenciar diversas propiedades o características de los mismos. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.749.437. Además, los reactivos de detección pueden incluir materiales para facilitar su colocación sobre los respectivos sustratos y mejorar su adherencia a los mismos o para incrementar la tasa de hidratación de los materiales reactivos por el

líquido de muestra. Además, los reactivos de detección pueden incluir componentes para potenciar las propiedades físicas de la capa de reactivo seco resultante y mejorar la absorción de una muestra de líquido corporal para análisis. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2013/131885.

5 Los ejemplos de materiales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, tampones, sustancias portadoras, agentes colorantes, solutos compatibles, materiales delicuescentes, detergentes, rellenos, formadores de película, abridores de película, agentes gelificantes, pigmentos, partículas sólidas, estabilizantes, agentes de hinchamiento, espesantes, agentes tixotrópicos y moduladores de viscosidad.

10 Los ejemplos de tampones incluyen, pero no se limitan a, solución salina tamponada con fosfato, tampón Tris, tampón de citrato, tampón de fosfato de glicerina y tampón de Good. Detalles adicionales con respecto a tampones en reactivos de detección se pueden encontrar, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente internacional n.º 2012/010308.

15 Los ejemplos de materiales delicuescentes incluyen, pero no se limitan a, uno o más de cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de cinc, carbonato de potasio, fosfato de potasio, carnalita, citrato de amonio férrico, hidróxido de potasio e hidróxido de sodio. Detalles adicionales con respecto a materiales delicuescentes en reactivos de detección se pueden encontrar, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2014/037372.

20 Los ejemplos de detergentes que se pueden incluir en los reactivos de detección incluyen, pero no se limitan a, jabones solubles en agua, así como compuestos tensioactivos sintéticos solubles en agua, tales como sales alcalinas, alcalinotérricas o de amonio opcionalmente sustituidas de ácidos grasos superiores (por ejemplo, ácido oleico o esteárico), mezclas de ácidos grasos naturales (por ejemplo, aceite de coco o de sebo), sulfatos grasos, ésteres de ácidos sulfónicos, sales de ácidos alquilsulfónicos, sales de taurina de ácidos grasos, amidas de ácidos grasos y amidas de ésteres. Los detergentes adicionales incluyen un éster-amida de N-metil-N-oleoiltaurato de sodio, N-octanoil-N-metil-glucamida, Mega 8 (N-metil-N-octanoilglucamida), dioctilsulfosuccinato de sodio (DONS), RHODAPEX® (especialmente CO-433 o CO-436), TEGO® Wet 265 (Evonik Resource Efficiency GmbH; Essen, Alemania), TERGITOL® 15-s-19 (Dow Chemical Corp.; Midland, MI, EE. UU.), y una sal de ácido graso, sal de sodio de N-metil-oleoiltaurato, vendida bajo el nombre comercial GEROPON® T77 (Rhodia HPCII (Home, Personal Care & Industrial Ingredients)).

Los ejemplos de formadores de película y agentes tixotrópicos incluyen, pero no se limitan a, polímeros y sílices tales como dispersiones de poli(propionato de vinilo), poli(ésteres de vinilo), poli(acetatos de vinilo), poli(ésteres acrílicos), poli(ácido metacrílico), poli(amidas de vinilo), poliamidas, poliestireno y polimerizados mixtos tales como butadieno, estireno o éster de ácido maleico.

35 Un agente tixotrópico más específico incluye sílices vendidas bajo el nombre comercial KIESELSAURE SIPEMATE FK 320 DS (Degussa AG), mientras que un agente formador de película más específico incluye polivinilpirrolidona (PVP), vendida bajo la marca comercial polivinilpirrolidona KOLLIDON 25 (BASF) y dispersión de poli(propionato de vinilo).

45 Los ejemplos de partículas sólidas incluyen, pero no se limitan a, partículas de sílice tales como dióxido de silicio, silicatos de sodio o silicatos de aluminio, tierra de diatomeas, óxidos metálicos tales como óxido de titanio y/o óxido de aluminio, materiales de óxido sintético tales como nanopartículas de materiales de óxido tales como nanopartículas de dióxido de silicio, óxido de aluminio u óxido de titanio, caolín, vidrio en polvo, sílice amorfa, sulfato de calcio y sulfato de bario.

50 Los ejemplos de estabilizantes para las enzimas dependientes de coenzima incluyen, pero no se limitan a, sacáridos y sales de ácidos mono o digrasos. Otros estabilizantes incluyen trehalosa vendida bajo el nombre comercial dihidrato de D-(+)-trehalosa (Sigma Chemical Co) y succinato de sodio.

55 Los ejemplos de agentes de hinchamiento incluyen, pero no se limitan a, copolímero de anhídrido de ácido maleico y éter metil-vinílico, goma xantana y copolímero de ácido maleico y éter metil-vinílico. Los ejemplos de espesantes incluyen, pero no se limitan a, almidones, gomas (por ejemplo, pectina, goma guar, goma de algarroba, goma de Konjac, goma xantana, alginatos y agar), caseína, gelatina y ficocoloides; celulosa y derivados de celulosa semisintéticos (carboximetilcelulosa, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa); poli(alcohol vinílico) y carboxivinilatos; y bentonita, silicatos y sílice coloidal. Las formas más específicas de espesantes incluyen una combinación de goma xantana vendida bajo el nombre comercial KELTROL® F (CP Kelco US, Inc.) y carboximetilcelulosa vendida bajo el nombre comercial AQUALON® CMC 7F PH (Hercules Inc., Aquaion Division).

65 Detalles adicionales con respecto a reactivos de detección y componentes de los mismos que se pueden usar en el presente documento se pueden encontrar, por ejemplo, en Hones *et al.* (2008), *supra*, las publicaciones de solicitud de patente internacional n.ºs WO 2007/012494, WO 2009/103540, WO 2010/094426, WO 2010/094427, WO 2011/012269, WO 2011/012270 y WO 2011/012271. Se puede hacer referencia adicional a las publicaciones

de solicitud de patente EP n.ºs 0354441, 0431456, 0302287, 0547710 y 1593434 para sustancias de prueba que se pueden usar en el presente documento.

5 Aunque los reactivos de detección se han descrito en general como para su uso en elementos de prueba electroquímicos, los reactivos de detección en el presente documento también pueden ser para su uso en elementos de prueba ópticos. En este caso, los reactivos de detección también pueden incluir un indicador. Como se usa en el presente documento, "indicador" quiere decir cualquier sustancia deseada que se ve influenciada por el curso de la reacción de detección de la detección de analito, en particular de la reacción enzimática, de modo que al menos un cambio de propiedad del indicador se puede registrar en el curso de la reacción de detección. En algunos casos, esta propiedad puede ser una propiedad óptica. Por tanto, el indicador puede ser al menos un tinte. Se pueden encontrar detalles adicionales con respecto a elementos de prueba ópticos, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2014/0363835.

15 Como indicador óptico o como sistema indicador óptico, en particular, se puede usar cualquier sustancia deseada que sea reducible y que durante la reducción experimente un cambio detectable de sus propiedades ópticas tales como, por ejemplo, color, fluorescencia, reflectancia, transmisión, polarización o/y índice de refracción. La determinación de la presencia o/y de la cantidad del analito en la muestra puede tener lugar a simple vista o/y por medio de un dispositivo de detección usando un procedimiento fotométrico que parezca adecuado para un experto en la técnica. En algunos casos, se usan heteropolíácidos tales como ácido 2,18-fosformolíbido como indicadores ópticos, que se reducen al correspondiente heteropoliazul.

25 Adicionalmente, el uso de fluoróforos para detectar concentraciones de glucosa en elementos de prueba de diagnóstico en general es conocido, por ejemplo, en la patente EP n.º 1780288 y la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2009/015870. También son conocidos cambios inducidos por glucosa en la fluorescencia de proteínas y otros fluoróforos. Véase, Pickup *et al.* (2005) *Biosens. Bioelectron.* 20:2555-2565; y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2012/0053429.

30 Se debe apreciar que la química del esquema de reacción de los reactivos de detección en el presente documento se puede elegir en vista de diversos factores químicos relacionados con el sistema, incluyendo la identidad del analito y de la sustancia de muestra. Incluso entonces, para un analito o sustancia dada, diversos componentes reactivos diferentes pueden ser útiles en términos de catalizador (a menudo, será útil una variedad de enzimas), coreactivos (por ejemplo, puede ser útil una variedad de mediadores) y cofactores (si es necesario, puede ser útil una variedad). Son conocidos muchos de dichos reactivos de detección y sus componentes reactivos y productos de reacción, y los ejemplos de algunas enzimas diferentes incluyen los que se enumeran en la tabla 1.

35 Tabla 1: reactivos de detección ejemplares para elementos de prueba de diagnóstico.

Analito	Enzimas	Mediadores (forma oxidada)	Mediadores adicionales
Glucosa	glucosa deshidrogenasa y diaforasa	ferricianuro, cloruro de osmio (III)-(bipiridil)-2-imidazolilo, azul de meldola, [Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> Melm] Cl <sub>3</sub> [OS(III)(NH <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> pyz] <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> , derivados de nitrosoanilina	ND
Glucosa	glucosa oxidasa	(véase anteriormente)	ND
Colesterol	colesterol esterasa y colesterol oxidasa	(véase glucosa)	2,6-dimetil-1,4-benzoquinona, 2,5-dicloro-1,4-benzoquinona o etosulfato de fenacina (véase anteriormente)
Colesterol HDL	colesterol esterasa y colesterol oxidasa	(véase glucosa)	
Cetona	hidroxibutirato deshidrogenasa	metosulfato de fenacina, etosulfato de fenacina	
Triglicéridos	lipoproteína lipasa, glicerol cinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa	(véase glucosa)	metosulfato de fenacina, etosulfato de fenacina
Triglicéridos	lipoproteína lipasa, glicerol cinasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y diaforasa	(véase glucosa)	(véase anteriormente)
Lactato	lactato oxidasa	(véase glucosa)	2,5-dicloro-1,4-benzoquinona
Lactato	lactato deshidrogenasa y diaforasa	(véase glucosa)	ND

Analito	Enzimas	Mediadores (forma oxidada)	Mediadores adicionales
Lactato deshidrogenasa	diaforasa	(véase glucosa)	ND
Piruvato	piruvato oxidasa	(véase glucosa)	ND
Alcohol	alcohol oxidasa	(véase glucosa)	ND
Alcohol	alcohol deshidrogenasa y diaforasa	(véase glucosa)	ND
Ácido úrico	uricasa	(véase glucosa)	ND
3-HB (cuerpos cetónicos)	3-HBDH y diaforasa	(véase glucosa)	ND

En vista de lo anterior, los reactivos de detección doble ejemplares para el análisis de múltiples analitos pueden incluir, pero no se limitan a, los enumerados en la tabla 2.

5 Tabla 2: reactivos de detección de analito doble ejemplares para elementos de prueba de diagnóstico.

Glucosa y cetona	
1. <sup>a</sup> enzima	GDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o GOx
1. <sup>a</sup> coenzima	FAD, NAD o NADP
1. <sup>er</sup> mediador	un derivado de nitrosoanilina o precursor basado en nitrosoanilina, ferricianuro, hexamina de rutenio o fenacina
2. <sup>a</sup> enzima	HBDH
2. <sup>a</sup> coenzima	carba-NAD, carba-NADP, tio-NAD o tio-NADP
2. <sup>o</sup> mediador	azul de meldola, una fenacina o precursor basado en fenacina, o una quinona o un derivado de quinona
Glucosa y cetona	
1. <sup>a</sup> enzima	FAD-GDH
1. <sup>a</sup> coenzima	FAD
1. <sup>er</sup> mediador	NA1144
2. <sup>a</sup> enzima	HBDH/diaforasa
2. <sup>a</sup> coenzima	carba-NAD/FAD o FMN
2. <sup>o</sup> mediador	NA1144
Glucosa y cetona	
1. <sup>a</sup> enzima	GDH
1. <sup>a</sup> coenzima	carba-NAD
1. <sup>er</sup> mediador	una fenacina, un precursor basado en fenacina, fenacinas modificadas, azul de meldola, quinona o un derivado de quinona
2. <sup>a</sup> enzima	HBDH
2. <sup>a</sup> coenzima	carba-NAD
2. <sup>o</sup> mediador	una fenacina, un precursor basado en fenacina, fenacinas modificadas, azul de meldola, quinona o un derivado de quinona
Glucosa doble	
1. <sup>a</sup> enzima	FAD-GDH, NAD-GDH, PQQ-GDH o GOx
1. <sup>a</sup> coenzima	FAD para FAD-GDH y GOx, NAD, NADP, cNAD, cNADP, tio-NAD, tio-NADP para NAD-GDH, o PQQ para PQQ-GDH
1. <sup>er</sup> mediador	un derivado de nitrosoanilina o precursor basado en nitrosoanilina, ferricianuro, hexamina de rutenio, azul de meldola, una fenacina o precursor basado en fenacina, o una quinona o un derivado de quinona
2. <sup>a</sup> enzima	FAD-GDH, NAD-GDH, PQQ-GDH o GOx
2. <sup>a</sup> coenzima	FAD para FAD-GDH y GOx, NAD, NADP, cNAD, cNADP, tio-NAD, tio-NADP para NAD-GDH, o PQQ para PQQ-GDH
2. <sup>o</sup> mediador	un derivado de nitrosoanilina o precursor basado en nitrosoanilina, ferricianuro, hexamina de rutenio, azul de meldola, una fenacina o precursor basado en fenacina, o una quinona o un derivado de quinona
Glucosa doble	
1. <sup>a</sup> enzima	PQQ-GDH o GDH
1. <sup>a</sup> coenzima	PQQ
1. <sup>er</sup> mediador	un derivado de nitrosoanilina o precursor basado en nitrosoanilina, ferricianuro, hexamina de rutenio o fenacina, azul de meldola, una fenacina o precursor basado en fenacina, o una quinona o un derivado de quinona

2. <sup>a</sup> enzima	una variante mutante de la quinoproteína GDH (por ejemplo, una PQQ-GDH mutante con baja sensibilidad a la maltosa; véase, por ejemplo, Igarashi <i>et al.</i> (1999) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 264:820-824 y Igarashi <i>et al.</i> (2004) <i>Biomol. Eng.</i> 21:81-89)
2. <sup>a</sup> coenzima	PQQ
2. <sup>o</sup> mediador	un derivado de nitrosoanilina o precursor basado en nitrosoanilina, ferricianuro, hexamina de rutenio o fenacina, azul de meldola, una fenacina o precursor basado en fenacina, o una quinona o un derivado de quinona

Los reactivos de detección adicionales que se pueden combinar con uno de los reactivos de detección descritos anteriormente incluyen, pero no se limitan a, (1) un reactivo de detección de lactato, donde LDH es la enzima dependiente de coenzima, carba-NAD es la coenzima y PG355 es el mediador; (2) un reactivo de detección de lactato, donde lactato oxidasa (LOx) es la enzima dependiente de coenzima, mononucleótido de flavina es la coenzima y NA1144 es el mediador; (3) un reactivo de detección de fructosamina, donde fructosamina oxidasa (FOx) es la enzima dependiente de coenzima, FAD es la coenzima y NA1144 es el mediador; (4) un reactivo de detección de colesterol, donde colesterol oxidasa (CHOx) es la enzima dependiente de coenzima, FAD es la coenzima y NA1144 es el mediador; y (5) un reactivo de detección de colina, donde colina oxidasa (COx) es la enzima dependiente de coenzima, FAD es la coenzima y NA1144 es el mediador.

### Elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos

Los elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo incluyen un sistema de electrodos que tiene al menos dos WE y al menos un CE en conexión con otros componentes de sistema de electrodos que se disponen sobre un sustrato. Los reactivos de detección descritos anteriormente se incorporan en una matriz de reactivo de detección de película seca que se proporciona sobre un sustrato o base de soporte inerte para los elementos de prueba y están en contacto físico y/o eléctrico con el sistema de electrodos para analizar electroquímicamente una muestra de líquido corporal para determinar la presencia o concentración de uno o más analitos de interés.

Los elementos de prueba de diagnóstico en general son conocidos y están disponibles en diferentes formas. Por ejemplo, los elementos de prueba en forma de tiras reactivas, cintas de prueba, discos de prueba, elementos de prueba plegables (por ejemplo, de acuerdo con el principio de Leporello) y otras formas son conocidas para un experto en la técnica.

Los elementos de prueba de diagnóstico típicamente se proporcionan en forma de una tira reactiva desechable que tiene una construcción laminar que incluye un sustrato de base no conductor, un espaciador y una cubierta. Otros detalles de elementos de prueba que incluyen una construcción laminar similar se proporcionan en las patentes de EE. UU. n.ºs 7.727.467 y 8.992.750. De esta manera, los elementos de prueba pueden ser uno cualquiera de una pluralidad producido a partir de rollos de material, láminas de material o cualquier otro surtido de material de acuerdo con los principios de la presente divulgación. En general, la selección de material para fabricar los elementos de prueba incluye cualquier material que es suficientemente flexible para el procesamiento en rollo, pero que es lo suficientemente rígido para dar una rigidez útil a los elementos de prueba terminados. Además, los elementos de prueba pueden incluir uno o más gráficos para proporcionar al usuario orientación sobre el manejo y uso apropiados.

En vista de esto, una parte de los elementos de prueba de diagnóstico en el presente documento es un sustrato de base no conductor sobre el que se pueden construir, depositar y/o disponer los diversos componentes. El sustrato incluye una primera superficie orientada hacia un espaciador y una segunda superficie que está opuesta a la primera superficie. Además, el sustrato tiene un primer y segundo extremos opuestos (por ejemplo, un extremo de dosificación y un extremo de inserción de medidor, respectivamente) y bordes laterales opuestos que se extienden entre el primer y segundo extremos. En algunos casos, el primer y segundo extremos y los bordes laterales opuestos del sustrato forman por tanto una conformación en general rectangular; sin embargo, también se contempla una cualquiera de varias formas que permiten que los elementos de prueba funcionen como se describe en el presente documento.

Típicamente, el sustrato se fabrica a partir de un polímero flexible que incluye, pero no se limitan a, un poliéster o poliimida, tal como poli(naftalato de etileno) (PEN) o poli(tereftalato de etileno) (PET). De forma alternativa, el sustrato se puede fabricar a partir de cualquier otro material adecuado que permita que el sustrato funcione como se describe en el presente documento.

Además del sustrato, los elementos de prueba de diagnóstico en el presente documento incluyen un espaciador que se dispone sobre la primera superficie del sustrato, donde el espaciador incluye al menos un borde que define un delimitador de un canal capilar formado entre una cubierta y el sustrato. Al igual que el sustrato, el espaciador se puede fabricar a partir de un material aislante tal como, por ejemplo, un polímero flexible que incluye un PET recubierto de adhesivo. En algunos casos, el espaciador puede ser una película de PET, de la que ambos lados se recubren con un adhesivo sensible a la presión. Por tanto, el espaciador incluye una superficie acoplada a la primera superficie del sustrato usando uno cualquiera o una combinación de una amplia variedad de adhesivos

disponibles comercialmente. De forma alternativa, el sustrato se puede acoplar al espaciador por soldadura, tal como soldadura térmica o ultrasónica.

5 Además del sustrato y el espaciador, los elementos de prueba de diagnóstico en el presente documento incluyen una cubierta que se sitúa sobre el espaciador. La cubierta en general se dimensiona y se conforma para coincidir con el sustrato y por tanto se extiende entre los bordes laterales opuestos del sustrato y se extiende hasta el primer y segundo extremos del sustrato. De forma alternativa, una de las cubiertas o el sustrato se puede extender más allá del otro hasta una distancia predefinida que permite que los elementos de prueba funcionen como se describe en el presente documento (es decir, los elementos de prueba incluyen un saliente/voladizo en el extremo de muestreo). En consecuencia, la cámara de muestra, que funciona como un capilar, se define por lo tanto como un espacio entre la cubierta y el sustrato que se delimita por un borde del espaciador.

15 Al igual que el sustrato y el espaciador, la cubierta se puede fabricar a partir de un material aislante tal como, por ejemplo, un polímero flexible que incluye un PET recubierto de adhesivo. Un ejemplo no limitante particular de un material adecuado incluye una película de PET transparente o translúcida. La cubierta incluye por tanto una superficie inferior que se puede acoplar al espaciador usando uno cualquiera o una combinación de una amplia variedad de adhesivos disponibles comercialmente. De forma alternativa, la cubierta se puede acoplar al espaciador por soldadura, tal como soldadura térmica o ultrasónica.

20 Juntos, el sustrato, espaciador y cubierta forman la cámara de muestra, en la que una parte del sistema de electrodos y los reactivos de detección son accesibles a la muestra de líquido corporal para realizar una medición. Los elementos de prueba son elementos de prueba de dosis de extremo de ancho completo ("FWED"; que tienen un canal capilar delimitado en un lado), que permiten que una muestra llene la cámara de muestra desde el primer extremo (es decir, parte frontal) del elemento de prueba o desde sus lados. En los elementos de prueba FWED, el espaciador se extiende entre los bordes laterales opuestos del sustrato para formar la cámara de muestra en parte con una cubierta. Se contempla que el espaciador se pueda fabricar de un único componente o incluso una pluralidad de componentes. Independientemente, el espaciador debe incluir un borde de extremo sustancialmente paralelo a y orientado hacia el primer extremo del sustrato, definiendo de este modo un delimitador de la cámara de muestra extendiéndose a través de todo el ancho del sustrato.

30 Adicionalmente al uso de la acción capilar, la cámara de muestra se puede ampliar por otros medios, tales como aplicando presión sobre el líquido de muestra para empujarlo hacia la cámara de muestra y/o creando un vacío en la cámara de muestra para atraer el líquido de muestra corporal hacia la cámara de muestra. Además, una o más superficies de la cámara de muestra se pueden formar a partir de un material hidrófilo, provistas de un recubrimiento de un material hidrófilo o sometidas a un tratamiento de incremento de hidrofiliia para facilitar el llenado de la cámara de muestra con la muestra de líquido corporal.

35 Por ejemplo, la cámara de muestra puede incluir un material absorbente. Los ejemplos de materiales absorbentes incluyen, pero no se limitan a, poliéster, nailon, celulosa y derivados de celulosa tales como nitrocelulosa. Cuando se incluye, el material absorbente facilita la absorción del líquido de muestra corporal ayudando a la absorción capilar del líquido en la cámara de muestra. El uso de un material absorbente también sirve para reducir además el volumen vacío de la cámara de muestra que recibe el líquido de muestra corporal.

40 La FIG. 1 es una vista en perspectiva de un elemento de prueba de diagnóstico ejemplar 10. En el modo de realización ejemplar, el elemento de prueba 10 incluye un sustrato de soporte no conductor 12, un conductor eléctrico (no mostrado) formado sobre el sustrato de soporte 12 que define una pluralidad de trazas de electrodos (no mostrado), un espaciador 14 situado sobre el sustrato de soporte 12 y una cubierta 16 situada sobre el espaciador 14. En algunos casos, el conductor eléctrico puede formar cualquier número de trazas de electrodos, electrodos y almohadillas de contacto que permiten que el elemento de prueba 10 funcione como se describe en el presente documento y que se describen con más detalle a continuación.

50 Como también se muestra en la FIG. 1, el elemento de prueba de diagnóstico 10 puede tener una conformación sustancialmente rectangular; sin embargo, también se contemplan una cualquiera de varias formas que permiten que el elemento de prueba 10 funcione como se describe en el presente documento. Además, el elemento de prueba 10 puede ser uno cualquiera de una pluralidad producido a partir de rollos de material, láminas de material o cualquier otro surtido de material de acuerdo con los principios de la presente divulgación. En general, la selección de material para la fabricación del elemento de prueba 10 incluye cualquier material que es suficientemente flexible para el procesamiento en rollo, pero que es lo suficientemente rígido para dar una rigidez útil al elemento de prueba terminado 10.

60 En el modo de realización ejemplar, el sustrato de base no conductor de soporte 12 del elemento de prueba de diagnóstico 10 incluye una primera superficie 18 orientada hacia el espaciador 14 y una segunda superficie 20 opuesta a la primera superficie 18. Además, el sustrato de soporte 12 tiene primer y segundo extremos opuestos 22, 24 y bordes laterales opuestos 26, 28 que se extienden entre el primer y segundo extremos 22, 24. En algunos casos, el primer y segundo extremos 22, 24 y los bordes laterales opuestos 26, 28 del sustrato de soporte 12 forman una conformación en general rectangular. De forma alternativa, el primer y segundo extremos 22, 24 y los

bordes laterales opuestos 26, 28 se pueden disponer para formar una cualquiera de una variedad de conformaciones y tamaños que permiten que el elemento de prueba 10 funcione como se describe en el presente documento. En algunos casos, el sustrato de soporte 12 se puede fabricar de un polímero flexible que incluye, pero sin limitarse a, un poliéster o poliimida, tal como poli(naftalato de etileno) (PEN). De forma alternativa, el sustrato de soporte 12 se puede fabricar a partir de cualquier otro material adecuado que permite que el sustrato de soporte 12 funcione como se describe en el presente documento.

Un conductor eléctrico que forma trazas de electrodos se proporciona en la primera superficie 18 del sustrato de soporte 12. El conductor eléctrico se puede fabricar a partir de materiales que incluyen, pero no se limitan a, aluminio, carbono (por ejemplo, grafito), cobalto, cobre, galio, oro, indio, iridio, hierro, plomo, magnesio, mercurio (como amalgama), níquel, niobio, osmio, paladio, platino, renio, rodio, selenio, silicio (por ejemplo, silicio policristalino altamente dopado), plata, tantalio, estaño, titanio, tungsteno, uranio, vanadio, cinc, circonio y combinaciones de los mismos. En algunos casos, las trazas de electrodos se aíslan del resto del conductor eléctrico por ablación con láser o trazado con láser, de los que ambos son bien conocidos en la técnica. De esta manera, las trazas de electrodos se pueden fabricar retirando el conductor eléctrico de un área que se extiende alrededor de los electrodos, ampliamente, tal como por ablación de campo amplio, o bien mínimamente, tal como por trazado de línea. De forma alternativa, las trazas de electrodos se pueden fabricar por otras técnicas tales como, por ejemplo, laminación, serigrafía, fotolitografía, etc.

El elemento de prueba de diagnóstico 10 es un elemento de prueba FWED, que tiene un canal capilar 30 o una entrada en el primer extremo 22 del sustrato de soporte. En un elemento de prueba FWED, el espaciador 14 se extiende entre los bordes laterales opuestos 26, 28 del sustrato de soporte 12 para formar el canal capilar 30 en parte con una cubierta. Se contempla que el espaciador 14 se pueda fabricar de un único componente o incluso una pluralidad de componentes. Independientemente, el espaciador 14 debe incluir un borde de extremo 32 sustancialmente paralelo a y orientado hacia el primer extremo 22 del sustrato de soporte 12, definiendo de este modo un delimitador de un canal capilar 30 extendiéndose a través de todo el ancho del sustrato de soporte 12.

El espaciador 14 se fabrica a partir de un material aislante tal como, por ejemplo, un polímero flexible que incluye un poli(tereftalato de etileno) (PET)-poliéster recubierto de adhesivo. Un ejemplo no limitante particular de un material adecuado incluye una película de PET blanca, de la que ambos lados se recubren con un adhesivo sensible a la presión. El espaciador 14 se puede construir de una variedad de materiales e incluye una superficie interior 34 que se puede acoplar a la primera superficie 18 del sustrato de soporte 12 usando uno cualquiera o una combinación de una amplia variedad de adhesivos disponibles comercialmente. Adicionalmente, cuando la primera superficie 18 del sustrato de soporte 12 se expone y no se cubre por el conductor eléctrico, la cubierta 16 se puede acoplar para soportar el sustrato 12 por soldadura, tal como soldadura por calor o ultrasonidos. También se contempla que la primera superficie 18 del sustrato de soporte 12 se puede imprimir con, por ejemplo, instrucciones o ficha técnica (no mostrado) para el uso de los elementos de prueba 10.

Además, en el modo de realización ejemplar, la cubierta 16 se extiende entre los bordes laterales opuestos 26, 28 del sustrato de soporte 12 y se extiende hasta el primer extremo 22 del sustrato de soporte 12. De forma alternativa, la cubierta 16 se puede extender más allá del primer extremo 22 una distancia predefinida que permite que el elemento de prueba 10 funcione como se describe en el presente documento. Por lo tanto, el canal capilar 30 se define como el espacio entre la cubierta 16 y el sustrato de soporte 12, delimitado por el primer extremo 22 y los bordes laterales opuestos 26, 28 del sustrato de soporte 12 y el borde de extremo 32 del espaciador 14.

La cubierta 16 se puede fabricar a partir de un material aislante tal como, por ejemplo, un polímero flexible que incluye un poliéster PET recubierto de adhesivo. Un ejemplo no limitante particular de un material adecuado incluye una película de PET transparente o translúcida. La cubierta 16 se puede construir de una variedad de materiales e incluye una superficie inferior 36 que se puede acoplar al espaciador 14 usando uno cualquiera o una combinación de una amplia variedad de adhesivos disponibles comercialmente. Adicionalmente, la cubierta 16 se puede acoplar al espaciador 14 por soldadura, tal como soldadura por calor o por ultrasonidos.

Los elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo incluyen un sistema de electrodos que tiene un par de electrodos CE/WE, uno o más WE separados y una o más vías eléctricamente conductoras y almohadillas de contacto de un material eléctricamente conductor provisto en la primera superficie del soporte de modo que los sistemas de electrodos son coplanares. El material eléctricamente conductor típicamente se dispone sobre el sustrato de tal forma que proporciona la una o más vías eléctricamente conductoras. Se pueden proporcionar disposiciones particulares de material eléctricamente conductor usando varias técnicas incluyendo depósito químico de vapor, ablación láser, laminación, serigrafía, fotolitografía y combinaciones de estas y otras técnicas. Un procedimiento particular para retirar porciones del material conductor incluye ablación con láser o trazado con láser, y más en particular ablación con láser de campo amplio, como se divulga, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.073.246. De esta manera, el sistema de electrodos se puede fabricar retirando material eléctricamente conductor del sustrato ampliamente, tal como por ablación de campo amplio, o mínimamente, tal como por trazado de línea. De forma alternativa, el sistema de electrodos se puede fabricar por otras técnicas tales como, por ejemplo, laminación, serigrafía, fotolitografía, etc.

En resumen, las técnicas de ablación con láser típicamente incluyen la ablación de un material conductor tal como una capa metálica o una composición multicapa que incluye un material aislante y un material conductor (por ejemplo, un laminado metálico de una capa metálica recubierta sobre o laminada sobre un material aislante). La capa metálica puede contener metales puros, aleaciones u otros materiales, que sean conductores metálicos. Los ejemplos de metales o conductores similares a metales incluyen, pero no se limitan a, aluminio, carbono (como grafito y/o grafeno), cobre, oro, indio, níquel, paladio, platino, plata, titanio, mezclas de los mismos y aleaciones o soluciones sólidas de estos materiales. En un aspecto, los materiales se seleccionan para que sean esencialmente no reactivos a los sistemas biológicos, con ejemplos no limitantes que incluyen, pero no se limitan a, oro, platino, paladio, carbono y óxido de estaño e iridio. La capa metálica puede tener cualquier espesor deseado, que en una forma particular es de aproximadamente 500 Å.

Con respecto a los elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo en el presente documento descritos, las vías eléctricamente conductoras ejemplares incluyen dos WE, almohadillas de contacto para cada WE y respectivas porciones de trazas conductoras de WE que se extienden entre y acoplan eléctricamente cada WE a su almohadilla de contacto. Asimismo, las vías eléctricamente conductoras incluyen un CE, una almohadilla de contacto para el CE y porciones de trazas conductoras de CE que se extienden entre y acoplan eléctricamente el CE a su almohadilla de contacto. Como se usa en el presente documento, un "electrodo de trabajo" o "WE" quiere decir un electrodo en el que un analito se electrooxida o electrorreduce con o sin la intervención de un mediador, mientras que el término "contraelectrodo" o "CE" quiere decir un electrodo que se empareja con uno o más WE y a través del que pasa una corriente electroquímica igual en magnitud y opuesta en signo a la corriente que pasa a través del WE. CE también incluye contraelectrodos que también funcionan como electrodos de referencia (es decir, contraelectrodos/electrodos de referencia).

El sistema de electrodos también incluye un par de electrodos de suficiencia de muestra (SSE). También se pueden incluir otras almohadillas de contacto de suficiencia de muestra y respectivas porciones de trazas conductoras que se extienden entre y acoplan eléctricamente los SSE y las almohadillas de contacto de SSE. Los SSE se pueden usar para implementar varias técnicas para determinar la suficiencia de una muestra de líquido corporal aplicada a los elementos de prueba. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente internacional n.ºs WO 2014/140170 y WO 2015/187580.

El sistema de electrodos también puede incluir uno o más electrodos de integridad de elemento de prueba (IE) que se pueden usar para verificar que los sistemas de electrodos están intactos, como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2015/187580.

El sistema de electrodos también puede incluir un circuito de información en forma de una pluralidad de elementos resistivos seleccionables que forman una red de resistencia, como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2013/017218 y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2015/0362455. La información codificada en la red de resistencia se puede relacionar con un atributo de los elementos de prueba incluyendo, pero sin limitarse a, información de calibración, tipo de elemento de prueba, información de fabricación y similares.

La FIG. 2A muestra una configuración de sistema de electrodos de múltiples analitos ejemplar para un elemento de prueba de diagnóstico. En la FIG. 2A, la cámara de muestra del elemento de prueba tiene un sistema de electrodos de material eléctricamente conductor que incluye un par de SSE situados a lo largo de un respectivo borde lateral del sustrato no conductor, un par CE/WE para medir un primer analito situado contiguo a uno de los SSE y WE para medir un segundo analito situado contiguo al otro SSE, donde el WE para medir el segundo analito tiene un área de trabajo mayor que el WE para el primer analito.

La FIG. 2B muestra otra configuración de sistema de electrodos de múltiples analitos ejemplar para un elemento de prueba de diagnóstico. En la FIG. 2B, la cámara de muestra del elemento de prueba tiene un sistema de electrodos de material eléctricamente conductor que incluye un par de SSE situados a lo largo de un respectivo borde lateral del sustrato no conductor, un par CE/WE para medir un primer analito y un WE para medir el segundo analito. A diferencia de la FIG. 2A, el CE en la FIG. 2B se extiende a través de la cámara de muestra frente a ambos WE. Además, los WE tienen áreas de trabajo equivalentes.

Los reactivos de detección que se pueden aplicar a los sistemas de electrodos se describen en detalle anteriormente.

Los reactivos de detección descritos anteriormente se pueden formular como una solución viscosa que incluye espesantes y agentes tixotrópicos para potenciar sus propiedades físicas. Los espesantes se seleccionan para proporcionar una matriz líquida espesa que tiene los componentes restantes dispersados homogéneamente en la misma. Los agentes espesantes y tixotrópicos también inhiben que el material líquido o semipastoso se escurra o se disperse sobre la superficie del sustrato después de que cada uno se haya depositado y antes de que se seque. Después de que los reactivos de detección se depositan, se secan rápidamente formando una matriz de reactivo fácilmente hidratable.

Como tal, se pueden proporcionar reactivos de detección secos disolviendo estos componentes primero en un solvente o mezcla de solventes y posteriormente retirando el solvente o mezcla de solventes por un tratamiento adecuado como se describe con más detalle a continuación.

5 Como se usa en el presente documento, "seco" quiere decir que la composición de reactivo está esencialmente libre de un disolvente o una mezcla de disolventes. Como se usa en el presente documento, "esencialmente libre" quiere decir que al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 % o incluso al menos el 98 % del disolvente o mezcla de disolventes que originalmente estaba presente en una solución de la composición de reactivo se retira de la composición. En consecuencia, se contempla que el disolvente o mezcla de disolventes está presente en la composición de reactivo seco en una cantidad de hasta aproximadamente un 15 %, hasta aproximadamente un 10 %, hasta aproximadamente un 9 %, hasta aproximadamente un 8 %, hasta aproximadamente un 7 %, hasta aproximadamente un 6 %, hasta aproximadamente un 5 %, hasta aproximadamente un 4 %, hasta aproximadamente un 3 % o hasta aproximadamente un 2 %. Los valores en porcentaje mencionados anteriormente y los otros valores en porcentaje a los que se hace referencia en el presente documento se refieren a porcentaje en peso (p/p).

20 Por ejemplo, los reactivos de detección se pueden aplicar por medio de inyección de tinta sobre su(s) respectivo(s) electrodo(s). Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 9.157.109. De forma alternativa, los reactivos de detección se pueden aplicar por medio de impresión por goteo sobre su(s) respectivo(s) electrodo(s). Todavía de forma alternativa, los reactivos de detección se pueden aplicar por medio de un sistema de distribución PicoJet® (Nordson EFD) para depositar el/los reactivo(s) de detección en áreas discretas de la cámara de muestra. También se pueden usar otros sistemas de distribución de contacto o sin contacto, que se describen en los párrafos a continuación.

25 De forma alternativa, los reactivos de detección se pueden aplicar por medio de un recubrimiento por ranura asistido por vacío sobre su(s) respectivo(s) electrodo(s). Los procedimientos para controlar el espesor y uniformidad de reactivo de detección por recubrimiento por ranura asistida por vacío se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2012/139767 y la patente de EE. UU. n.º 7.749.437.

30 Los detalles adicionales con respecto a configuraciones de elemento de prueba de diagnóstico ejemplares que se pueden usar en el presente documento se divulgan, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente internacional números WO 2014/037372, 2014/068022 y 2014/068024; las publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. n.ºs 2003/0031592 y 2006/0003397; las patentes de EE. UU. n.ºs 5.694.932; 5.271.895; 5.762.770; 5.948.695; 5.975.153; 5.997.817; 6.001.239; 6.025.203; 6.162.639; 6.207.000; 6.245.215; 6.271.045; 6.319.719; 6.406.672; 6.413.395; 6.428.664; 6.447.657; 6.451.264; 6.455.324; 6.488.828; 6.506.575; 6.540.890; 6.562.210; 6.582.573; 6.592.815; 6.627.057; 6.638.772; 6.755.949; 6.767.440; 6.780.296; 6.780.651; 6.814.843; 6.814.844; 6.858.433; 6.866.758; 7.008.799; 7.025.836; 7.063.774; 7.067.320; 7.238.534; 7.473.398; 7.476.827; 7.479.211; 7.510.643; 7.727.467; 7.780.827; 7.820.451; 7.867.369; 7.892.849; 8.180.423; 8.298.401; 8.329.026, así como los documentos RE42560, RE42924 y RE42953.

45 Asimismo, los elementos de prueba de diagnóstico pueden incluir una o más capas de reflexión de uno o más pigmentos que tengan propiedades reflectantes tales como, por ejemplo, pigmentos blancos tales como partículas de dióxido de titanio. En algunos casos, la al menos una capa de reflexión puede estar en una superficie del sustrato que se orienta opuesta a los reactivos de detección, que pueden tener la forma de campos de prueba, sirviendo por tanto como un lado de aplicación de muestra. De esta manera, la detección del al menos un analito puede tener lugar a través del sustrato desde un lado opuesto al lado de aplicación de muestra. Para facilitar este diseño, el sustrato puede ser total o parcialmente transparente ópticamente para al menos una luz de excitación irradiada en los reactivos de detección y/o transparente para al menos una luz de detección reflejada y/o emitida por los reactivos de detección, donde una transparencia se entiende como una transparencia de al menos aproximadamente un 70 %. En otros casos, la muestra líquida se puede introducir lateralmente en los reactivos de detección (es decir, paralela a la estructura de capa).

55 Una preocupación en los elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos es controlar la interferencia cruzada potencial en las señales que se pueden producir entre los diversos reactivos de detección. Varios procedimientos para atenuar o evitar la interferencia son conocidos en la técnica y se pueden usar en relación con los elementos de prueba de múltiples analitos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, se puede controlar la difusión de componentes de una matriz de reactivo de detección a la otra (1) usando formulaciones de reactivo de detección que se hinchan pero no son completamente solubles (por ejemplo, los materiales de matriz descritos anteriormente); (2) espaciando los reactivos de detección entre sí; (3) usando barreras físicas entre los reactivos de detección (es decir, dejando material conductor residual u otros materiales; marcado láser sobre el sustrato); y/o (4) usando un margen de tiempo corto para completar la medición de modo que se limite la difusión del reactivo.

65

**Dispositivos, aparatos y sistemas de prueba de medición de analito**

También se describen en el presente documento sistemas de prueba que incluyen un dispositivo de medición de analito y al menos un elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos como se describe anteriormente.

5 La FIG. 3 muestra un sistema de medición de analito ejemplar que incluye un dispositivo de medición de analito tal como un medidor de prueba 38 acoplado operativamente con un elemento de prueba de diagnóstico electroquímico 10. En particular, el elemento de prueba es un elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos como se describe en detalle anteriormente.

10 Típicamente, el medidor 38 y el elemento de prueba de diagnóstico 10 son operables para determinar la concentración de una pluralidad de analitos en una muestra de líquido corporal proporcionada al elemento de prueba 10. En algunos casos, la muestra puede ser una muestra de líquido corporal tal como, por ejemplo, sangre completa, plasma, suero, orina o saliva. En otros casos, la muestra puede ser otro tipo de muestra de líquido que se va a someter a prueba para determinar la presencia o concentración de uno o más analitos electroquímicamente reactivos, tal como una muestra ambiental acuosa.

15 En la FIG. 3, el elemento de prueba de diagnóstico 10 es una tira reactiva de un solo uso insertada de manera extraíble en un terminal de conexión (o puerto de elemento de prueba) 40 del medidor 38. En algunos casos, el elemento de prueba 10 se configura como un elemento de prueba de analito doble (glucosa y cetona) e incluye rasgos característicos y funcionalidades para medir electroquímicamente glucosa y cetonas. En otros casos, el elemento de prueba 10 se configura para medir electroquímicamente otros analitos tales como, por ejemplo, aminoácidos, anticuerpos, bacterias, carbohidratos, fármacos, lípidos, marcadores, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, toxinas, virus y otros analitos.

25 El medidor 38 en general incluye un medio de entrada 44, un controlador, una memoria asociada con el controlador/microcontrolador y un procesador programable asociado con el controlador y conectado con la memoria. Además, el medidor incluye una salida tal como una pantalla electrónica 42 que se conecta al procesador y se usa para presentar diversos tipos de información al usuario incluyendo la(s) concentración/concentraciones de analito u otros resultados de prueba. Además, el medidor 38 incluye además circuitos de generación y medición de señales de prueba asociados (no mostrado) que son operables para generar una señal de prueba, para aplicar la señal al elemento de prueba 10 y para medir una o más respuestas del elemento de prueba 10 a la señal de prueba. El procesador también se conecta con un puerto de elemento de prueba y puede procesar y registrar datos en la memoria relacionados con la detección de la presencia y/o concentración de los analitos obtenidos a través del uso de un elemento de prueba de múltiples analitos como se describe en el presente documento. El puerto de elemento de prueba incluye conectores configurados para acoplarse con almohadillas de contacto del sistema eléctrico. Además, el medidor incluye un medio de entrada de usuario conectado con el procesador, que es accesible por un usuario para proporcionar una entrada al procesador, donde el procesador es además programable para recibir comandos de entrada de un medio de entrada de usuario y proporcionar una salida que responde a los comandos de entrada.

40 El procesador también se conecta con un módulo o enlace de comunicación para facilitar las transmisiones inalámbricas con el medidor 38. En una forma, el enlace de comunicación se puede usar para intercambiar mensajes, advertencias u otra información entre el medidor 38 y otro dispositivo o tercero, tal como un asistente social, cuidador, padre, tutor o profesional sanitario, incluyendo personal de enfermería, farmacéuticos, médicos de atención primaria o secundaria y profesionales médicos de urgencias, solo para proporcionar unas pocas posibilidades. El enlace de comunicación también se puede utilizar para descargar actualizaciones de programación para el medidor 38. A modo de ejemplo no limitante, el enlace de comunicación se puede configurar para enviar y recibir información a través de tecnología estándar de telefonía móvil, incluyendo tecnologías de tercera generación (3G) y cuarta generación (4G), o a través de estándares BLUETOOTH®, ZIGBEE®, Wibree, banda ultra ancha (UWB), red inalámbrica de área local (WLAN), servicio general de radio por paquetes (GPRS), interoperabilidad mundial para acceso por microondas (WiMAX o WiMAN), telemetría médica inalámbrica (WMTS), bus en serie universal inalámbrico (WUSB), sistema global para comunicaciones móviles (GSM), servicio de mensajes cortos (SMS) o WLAN 802.11x.

55 Por lo tanto, el controlador puede incluir uno o más componentes configurados como una sola unidad o en forma de múltiples componentes y puede ser programable, una máquina lógica de estado u otro tipo de *hardware* dedicado, o una combinación híbrida de *hardware* programable y dedicado. Uno o más componentes del controlador pueden ser de la variedad electrónica que define circuitos digitales, circuitos analógicos o ambos. Como adición o alternativa a los circuitos electrónicos, el controlador puede incluir uno o más elementos de control mecánicos u ópticos.

60 En algunos casos, que incluyen circuitos electrónicos, el controlador incluye un procesador integrado acoplado operativamente a uno o más dispositivos de memoria de estado sólido que definen, al menos en parte, la memoria. De esta manera, la memoria contiene la lógica operativa que se va a ejecutar por el procesador, que es un microprocesador, y está dispuesta para leer y escribir datos en la memoria de acuerdo con una o más rutinas de un programa ejecutado por el microprocesador.

Además, la memoria puede incluir uno o más tipos de memoria electrónica de estado sólido y adicionalmente o de forma alternativa puede incluir la variedad magnética u óptica. Por ejemplo, la memoria puede incluir memoria de acceso aleatorio (RAM) electrónica de estado sólido, memoria de acceso secuencial (SAM) (tal como la variedad primero en entrar, primero en salir (FIFO) o la variedad último en entrar, primero en salir (LIFO)), memoria de solo lectura programable (PROM), memoria de solo lectura programable eléctricamente (EEPROM) o memoria de solo lectura programable y borrrable eléctricamente (EEPROM); o una combinación de cualquiera de estos tipos. Además, la memoria puede ser volátil, no volátil o una combinación híbrida de variedades volátiles y no volátiles. Parte o la totalidad de la memoria puede ser de tipo portátil, tal como un disco, una cinta, una memoria USB, un cartucho, un chip de código o similar. La memoria puede estar al menos parcialmente integrada con el procesador y/o puede estar en forma de uno o más componentes o unidades.

En algunos casos, el medidor 38 puede utilizar una llave de memoria extraíble, que se puede enchufar en un enchufe u otro medio de recepción y que se comunica con la memoria o controlador para proporcionar información relacionada con códigos de calibración, procedimientos de medición, técnicas de medición y gestión de información. Los ejemplos de dichas claves de memoria extraíbles se divulgan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.366.609 y 5.053.199.

El controlador también puede incluir acondicionadores de señal, filtros, limitadores, convertidores de analógico a digital (A/D), convertidores de digital a analógico (D/A), puertos de comunicación u otros tipos de operadores como se le ocurriría a un experto en la técnica.

Volviendo al medio de entrada 44, se puede definir por una pluralidad de dispositivos de entrada de botón pulsador, aunque el medio de entrada 44 puede incluir uno o más tipos diferentes de dispositivos de entrada como un teclado, un ratón u otro dispositivo señalador, pantalla táctil, panel táctil, rodillo de bola o un subsistema de entrada de reconocimiento de voz.

Asimismo, la pantalla 42 puede incluir uno o más medios de salida como una pantalla de operario que puede ser de tipo tubo de rayos catódicos (CRT), tipo pantalla de cristal líquido (LCD), tipo plasma, tipo diodo orgánico emisor de luz (OLED), una impresora o similar. Se pueden incluir otros medios de entrada y presentación, tales como altavoces, generadores de voz, sistemas de reconocimiento de voz y habla, pantallas hápticas, subsistemas electrónicos de comunicación por cable o inalámbrica y similares.

Como se indica anteriormente, el puerto de elemento de prueba 40 incluye conectores configurados para acoplarse con almohadillas de contacto del sistema de electrodos de los elementos de prueba descritos en el presente documento. La conexión entre el medidor 38 y el elemento de prueba de diagnóstico 10 se usa para aplicar una señal de prueba que tiene un potencial o una serie de potenciales a través de los electrodos del sistema de electrodos y para recibir posteriormente señales electroquímicas que se producen por los reactivos de detección en presencia de los analitos de interés y se pueden correlacionar con la concentración de los analitos. De esta manera, el procesador se configura para evaluar las señales electroquímicas para evaluar la presencia y/o concentración de los analitos, donde los resultados de los mismos se pueden almacenar en la memoria.

En algunos casos, el medidor 38 se puede configurar como un medidor de medición de glucemia e incluye rasgos característicos y funcionalidades del medidor ACCU-CHEK® AVIVA® como se describe en el folleto "Folleto del propietario del glucómetro Accu-Chek® Aviva" (2007), del que partes se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 6.645.368. En otros casos, el medidor 38 se puede configurar para medir electroquímicamente uno o más analitos tales como, por ejemplo, aminoácidos, anticuerpos, bacterias, carbohidratos, fármacos, lípidos, marcadores, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, toxinas, virus y otros analitos. Los detalles adicionales con respecto a medidores ejemplares configurados para su uso con procedimientos de medición electroquímica se divulgan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.ºs 4.720.372; 4.963.814; 4.999.582; 4.999.632; 5.243.516; 5.282.950; 5.366.609; 5.371.687; 5.379.214; 5.405.511; 5.438.271; 5.594.906; 6.134.504; 6.144.922; 6.413.213; 6.425.863; 6.635.167; 6.645.368; 6.787.109; 6.927.749; 6.945.955; 7.208.119; 7.291.107; 7.347.973; 7.569.126; 7.601.299; 7.638.095 y 8.431.408.

Además del medidor, los sistemas de prueba incluyen uno o más elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos como se describe en detalle anteriormente.

Otro componente que se puede incluir en los sistemas de prueba incluye dispositivos de punción para obtener una muestra de líquido corporal. Los ejemplos de dispositivos de punción se describen, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente internacional n.ºs WO 2012/089523 y WO 2012/089524. En algunos casos, el dispositivo de punción se puede integrar en el medidor. Véase, por ejemplo, *id.*

#### **Procedimientos de medición de múltiples analitos**

Los procedimientos de medición divulgados en el presente documento utilizan en gran medida amperometría; sin embargo, se contempla que los procedimientos se pueden usar con otras técnicas de medición electroquímica (por

ejemplo, culombimetría, potenciometría o voltamperometría). Además, los procedimientos de medición se pueden implementar usando procedimientos y algoritmos basados en microprocesadores avanzados que dan como resultado una mejora drástica en el rendimiento del sistema. Estos procedimientos de medición también ofrecen flexibilidad y varias formas de crear algoritmos que pueden lograr una mejora en el rendimiento tal como un rendimiento 10/10. Como se usa en el presente documento, "rendimiento 10/10" quiere decir, por ejemplo, que una concentración de glucemia medida está dentro de aproximadamente  $\pm 10\%$  de la concentración de glucemia real para concentraciones de glucosa  $>100$  mg/dl, y dentro de  $\pm 10$  mg/dl de la concentración de glucemia real para concentraciones de glucosa  $<100$  mg/dl.

Los procedimientos de medición pueden incluir las etapas descritas en el presente documento, y estas etapas se pueden llevar a cabo, aunque no necesariamente, en la secuencia como se describe. Sin embargo, también son concebibles otras secuencias. Además, se pueden llevar a cabo etapas individuales o múltiples en paralelo y/o superpuestas en el tiempo y/o individualmente o bien en múltiples etapas repetidas. Además, los procedimientos pueden incluir etapas adicionales no especificadas.

En general, los procedimientos de medición comienzan obteniendo una muestra de líquido corporal que tiene o se sospecha que tiene uno o más analitos de interés en el mismo. Los ejemplos de líquidos corporales incluyen, pero no se limitan a, sangre, líquido intersticial, saliva, lágrimas y orina. Como se usa en el presente documento, "sangre" quiere decir sangre completa y sus componentes sin células, es decir, plasma y suero.

Cuando los elementos de prueba de diagnóstico de múltiples analitos se configuran para someter a prueba glucosa y cetonas, el líquido de muestra corporal puede ser sangre capilar recién obtenida por punción en la punta de un dedo o sitios alternativos aprobados (por ejemplo, antebrazo, palma, lóbulo de oreja, brazo, pantorrilla y muslo). Además, la muestra de líquido corporal que contiene el/los analito(s) de interés se puede adquirir y suministrar a los elementos de prueba de cualquier forma. Como tal, los procedimientos de medición se refieren principalmente a procedimientos *in vitro*. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de sangre de forma convencional haciendo una incisión en la piel, como con una lanceta, aguja o bisturí, y a continuación poniendo en contacto el elemento de prueba con la muestra de sangre que aparece en la superficie de la piel. De forma alternativa, los elementos de prueba se pueden usar en conexión con líquidos de control que se usan de forma convencional para verificar la integridad del sistema de prueba.

En general, los elementos de prueba de diagnóstico son operables para evaluar los analitos seleccionados usando solo un volumen muy pequeño de una muestra de líquido corporal. De esta manera, solo es necesaria una pequeña incisión en la piel para producir el volumen de líquido corporal requerido para la prueba, y el dolor y otras preocupaciones con dicho procedimiento se pueden minimizar o eliminar.

Después de que la muestra de líquido corporal se ha aplicado al extremo de dosificación del elemento de prueba de diagnóstico y rehidrata los reactivos de detección, los procedimientos incluyen aplicar una secuencia de prueba eléctrica al sistema de electrodos del elemento de prueba. Dicha secuencia de prueba se puede suministrar por el medidor desde sus terminales de conexión a una o más almohadillas de contacto del sistema de electrodos.

En general, las secuencias de pruebas eléctricas incluyen uno o más bloqueos de CA (opcionales) y/o uno o más bloqueos de CC como es conocido en la técnica. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente internacional n.ºs WO 2014/140718; WO 2014/140164; WO 2014/140170; WO 2014/140172; WO 2014/140173; y WO 2014/140177.

Si se incluye, el bloqueo de CA de señales de baja amplitud en conexión con un bloqueo de CC y medición de respuestas de corriente al mismo. Las FIGS. 4A-F muestran secuencias de prueba ejemplares que se pueden usar en conexión con SMBG y otros sistemas de prueba. Como se muestra en las FIGS. 4A-B, la secuencia de prueba puede incluir uno o más bloqueos de potenciales de CA y/o CC, que se describen con más detalle a continuación.

Con respecto al bloqueo de CA, puede incluir una pluralidad de segmentos de CA tales como, por ejemplo, de aproximadamente 2 segmentos a aproximadamente 10 segmentos, de aproximadamente 3 segmentos a aproximadamente 9 segmentos, de aproximadamente 4 segmentos a aproximadamente 8 segmentos, de aproximadamente 5 segmentos a aproximadamente 7 segmentos, o aproximadamente 6 segmentos. En otros casos, el bloqueo de CA puede incluir aproximadamente 2 segmentos, aproximadamente 3 segmentos, aproximadamente 4 segmentos, aproximadamente 5 segmentos, aproximadamente 6 segmentos, aproximadamente 7 segmentos, aproximadamente 8 segmentos, aproximadamente 9 segmentos o aproximadamente 10 segmentos. En otros casos, el bloqueo de CA puede tener más de 10 segmentos, es decir, aproximadamente 15 segmentos, aproximadamente 20 segmentos o aproximadamente 25 segmentos. En otros casos, el bloqueo de CA puede incluir 1 segmento, donde el segmento tiene múltiples señales de CA de baja frecuencia aplicadas simultáneamente.

Un experto en la técnica entiende que el número de segmentos de CA se limitará por la complejidad de la respuesta, el intervalo de frecuencia asociado y el tiempo disponible para realizar las mediciones. Las frecuencias más altas en general requieren una electrónica de gran ancho de banda y un muestreo más rápido, mientras que

las frecuencias más bajas llevan más tiempo y típicamente son más ruidosas. Por lo tanto, el número máximo de segmentos será un compromiso de estos parámetros, eligiendo el recuento mínimo y el rango de frecuencia necesarios para discriminar la muestra y los factores ambientales y/o de confusión de interés.

- 5 La frecuencia de cada señal en cada segmento del bloqueo de CA puede ser de aproximadamente 1 kHz a aproximadamente 20 kHz, de aproximadamente 2 kHz a aproximadamente 19 kHz, de aproximadamente 3 kHz a aproximadamente 18 kHz, de aproximadamente 4 kHz a aproximadamente 17 kHz, de aproximadamente 5 kHz a aproximadamente 16 kHz, de aproximadamente 6 kHz a aproximadamente 15 kHz, de aproximadamente 7 kHz a aproximadamente 14 kHz, de aproximadamente 8 kHz a aproximadamente 13 kHz, de aproximadamente 9 kHz a aproximadamente 12 kHz o de aproximadamente 10 kHz a aproximadamente 11 kHz. En otros casos, la frecuencia de cada segmento en el bloqueo de CA puede ser de aproximadamente 1 kHz, aproximadamente 2 kHz, aproximadamente 3 kHz, aproximadamente 4 kHz, aproximadamente 5 kHz, aproximadamente 6 kHz, aproximadamente 7 kHz, aproximadamente 8 kHz, aproximadamente 9 kHz, aproximadamente 10 kHz, aproximadamente 11 kHz, aproximadamente 12 kHz, aproximadamente 13 kHz, aproximadamente 14 kHz, aproximadamente 15 kHz, aproximadamente 16 kHz, aproximadamente 17 kHz, aproximadamente 18 kHz, aproximadamente 19 kHz o aproximadamente 20 kHz. En otros casos, la frecuencia de cada señal en cada segmento del bloqueo de CA puede ser más de 20 kHz, es decir, aproximadamente 30 kHz, aproximadamente 40 kHz o aproximadamente 50 kHz. En algunos casos, uno o más de los segmentos pueden tener la misma frecuencia, mientras que en otros casos cada segmento tiene una frecuencia distinta de la de los otros segmentos.
- 10 Sin embargo, en general es adecuado cuatro frecuencias. Las frecuencias exactas empleadas se pueden generar fácilmente por una simple división entera de la frecuencia máxima del reloj de un sistema de medición.

25 Sin embargo, un límite de frecuencia máximo para una señal en un segmento del bloqueo de CA puede ser de hasta aproximadamente 100 kHz para un instrumento portátil económico alimentado por batería, tal como el medidor. Más allá de eso, las crecientes demandas de ancho de banda analógico, frecuencia de muestreo, velocidad de almacenamiento y procesamiento se acumulan rápidamente, mientras que la porción imaginaria de una respuesta de biosensor típica se vuelve cada vez más pequeña con la frecuencia. Las frecuencias menores tienen períodos más largos y requieren más tiempo para muestrearse con exactitud comparable.

30 El bloqueo de CA típicamente incluye al menos dos señales de baja amplitud diferentes. Por ejemplo, el bloqueo de CA puede incluir dos (2) segmentos en dos (2) frecuencias tales como, por ejemplo, aproximadamente 10 kHz o aproximadamente 20 kHz seguido de aproximadamente 1 kHz o aproximadamente 2 kHz. En otros casos, el bloqueo de CA incluye una pluralidad de señales de baja amplitud. Por ejemplo, el bloqueo de CA puede tener cinco (5) segmentos en cuatro (4) frecuencias tales como, por ejemplo, aproximadamente 10 kHz, aproximadamente 20 kHz, aproximadamente 10 kHz, aproximadamente 2 kHz y aproximadamente 1 kHz. De forma alternativa, el bloqueo de CA puede tener cuatro (4) segmentos en cuatro (4) frecuencias tales como, por ejemplo, aproximadamente 20 kHz, aproximadamente 10 kHz, aproximadamente 2 kHz y aproximadamente 1 kHz. De forma alternativa, el bloqueo de CA puede tener cuatro (4) frecuencias aplicadas simultáneamente a aproximadamente 10 kHz, aproximadamente 20 kHz, aproximadamente 10 kHz, aproximadamente 2 kHz y aproximadamente 1 kHz. De forma alternativa, el bloqueo de CA puede tener una forma de onda de excitación multifrecuencia que aplica simultáneamente las señales de CA de baja amplitud deseadas. Las frecuencias de CA se pueden aplicar secuencialmente o combinarse y aplicarse simultáneamente y analizarse por medio de la transformada de Fourier.

45 El bloqueo de señales de CA de baja amplitud se puede aplicar durante de aproximadamente 500 ms a aproximadamente 1,5 s, de aproximadamente 600 ms a aproximadamente 1,25 s, de aproximadamente 700 ms a aproximadamente 1000 ms o de aproximadamente 800 ms a aproximadamente 900 ms. De forma alternativa, el bloqueo de señales de CA de baja amplitud se puede aplicar durante aproximadamente 500 ms, aproximadamente 600 ms, aproximadamente 700 ms, aproximadamente 800 ms, aproximadamente 900 ms, aproximadamente 1000 ms, aproximadamente 1,25 s o aproximadamente 1,5 s. En particular, el bloqueo de señales de CA de baja amplitud se puede aplicar durante de aproximadamente 100 ms a aproximadamente 300 ms.

55 Sin embargo, un experto en la técnica entiende que el número, frecuencia, duración y orden de los segmentos de CA se pueden variar.

La información de respuesta de corriente CA se puede obtener en cualquier momento durante una secuencia de prueba. Los resultados de impedancia a frecuencias menores se pueden ver influenciados por la concentración de analito si se obtienen después de que una celda electroquímica se polariza en CC. En algunos casos, se puede obtener una serie de mediciones de respuesta de corriente CA al principio de la secuencia de prueba. Las mediciones tomadas poco después de que se aplica una muestra fluidica a un elemento de prueba se verán influenciadas por la difusión, temperatura y solubilidad del reactivo. En otros casos, las mediciones de corriente de respuesta de CA se pueden obtener en un tiempo suficiente después de que se haya aplicado una muestra adecuada para permitir que la respuesta se estabilice y evitar la respuesta transitoria en el primer segundo. Asimismo, se pueden realizar mediciones de corriente de respuesta en una o más frecuencias. Debido a su naturaleza capacitiva, múltiples mediciones de CA separadas por una octava o década de frecuencia pueden ofrecer diferentes sensibilidades o una manipulación más fácil.

La información de respuesta a dicho bloqueo de CA se puede usar para evaluar la difusión, temperatura y solubilidad de reactivo antes de iniciar las mediciones de analito. En consecuencia, la información de respuesta al bloqueo de CA se puede usar para corregir variables de confusión tales como Hct y/o temperatura o para determinar la condición del elemento de prueba y su idoneidad para proporcionar un resultado exacto.

Los detalles adicionales con respecto a bloqueos de CA ejemplares en procedimientos de medición electroquímica se divulgan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.ºs 7.338.639; 7.390.667; 7.407.811; 7.417.811; 7.452.457; 7.488.601; 7.494.816; 7.597.793; 7.638.033; 7.751.864; 7.977.112; 7.981.363; 8.148.164; 8.298.828; 8.377.707 y 8.420.404.

Con respecto a un bloqueo de CC ejemplar para la secuencia de prueba de múltiples analitos, puede incluir una pluralidad de pulsos tales como, por ejemplo, de aproximadamente 2 pulsos a aproximadamente 10 pulsos, de aproximadamente 3 pulsos a aproximadamente 9 pulsos, de aproximadamente 4 pulsos a aproximadamente 8 pulsos, de aproximadamente 5 pulsos a aproximadamente 7 pulsos, o aproximadamente 6 pulsos. En otros casos, el bloqueo de CC puede incluir aproximadamente 2 pulsos, aproximadamente 3 pulsos, aproximadamente 4 pulsos, aproximadamente 5 pulsos, aproximadamente 6 pulsos, aproximadamente 7 pulsos, aproximadamente 8 pulsos, aproximadamente 9 pulsos o aproximadamente 10 pulsos. En otros casos, el bloqueo de CC puede tener más de 10 pulsos, es decir, aproximadamente 15 pulsos, aproximadamente 20 pulsos o aproximadamente 25 pulsos. Como se usa en el presente documento, "pulso" quiere decir al menos un período de excitación y uno de recuperación.

El bloqueo de CC típicamente incluye una diferencia de potencial aplicada constantemente que alterna una diferencia de potencial de entre aproximadamente 0 mV y aproximadamente +450 mV, u otra diferencia de potencial que varía lentamente en el tiempo que se puede analizar por procedimientos electroquímicos de CC tradicionales. Sin embargo, un experto en la técnica entiende que el intervalo para la diferencia de potencial aplicada puede variar y variará dependiendo de las características químicas de analito y reactivo usados. Como tal, el potencial de pulso de excitación puede ser mayor que, menor que o igual a aproximadamente +450 mV. Los ejemplos de potenciales de excitación incluyen, pero no se limitan a, 50 mV, 75 mV, 100 mV, 125 mV, 150 mV, 175 mV, 200 mV, 225 mV, 250 mV, 275 mV, 300 mV, 325 mV, 350 mV, 375 mV, 400 mV, 425 mV, 450 mV, 475 mV, 500 mV, 525 mV, 550 mV, 575 mV, 600 mV, 625 mV, 650 mV, 675 mV, 700 mV, 725 mV, 750 mV, 775 mV, 800 mV, 825 mV, 850 mV, 875 mV, 900 mV, 925 mV, 950 mV, 975 mV o 1000 mV.

Independientemente del número, cada pulso de CC se puede aplicar durante de aproximadamente 50 ms a aproximadamente 500 ms, de aproximadamente 60 ms a aproximadamente 450 ms, de aproximadamente 70 ms a aproximadamente 400 ms, de aproximadamente 80 ms a aproximadamente 350 ms, de aproximadamente 90 ms a aproximadamente 300 ms, de aproximadamente 100 ms a aproximadamente 250 ms, de aproximadamente 150 ms a aproximadamente 200 ms o aproximadamente 175 ms. De forma alternativa, cada pulso se puede aplicar durante aproximadamente 50 ms, aproximadamente 60 ms, aproximadamente 70 ms, aproximadamente 80 ms, aproximadamente 90 ms, aproximadamente 100 ms, aproximadamente 125 ms, aproximadamente 150 ms, aproximadamente 175 ms, aproximadamente 200 ms, aproximadamente 225 ms, aproximadamente 250 ms, aproximadamente 275 ms, aproximadamente 300 ms, aproximadamente 325 ms, aproximadamente 350 ms, aproximadamente 375 ms, aproximadamente 400 ms, aproximadamente 425 ms, aproximadamente 450 ms, aproximadamente 475 ms o aproximadamente 500 ms. En particular, cada pulso de CC a +450 mV se puede aplicar durante aproximadamente 250 ms, y cada pulso de CC a 0 mV se puede aplicar durante aproximadamente 500 ms. De forma alternativa, cada pulso se puede aplicar durante menos de aproximadamente 50 ms o más de aproximadamente 500 ms.

En general, la tasa de rampa de cada pulso de CC se selecciona para proporcionar una reducción de aproximadamente un 50 % o más en la corriente pico en relación con la corriente pico proporcionada por una transición de potencial casi ideal. En algunos casos, cada pulso puede tener la misma tasa de rampa. En otros casos, algunos pulsos pueden tener la misma frecuencia de rampa y otros pulsos pueden tener una tasa de rampa diferente. Todavía en otros casos, cada pulso tiene su propia tasa de rampa. Por ejemplo, las tasas de rampa eficaces pueden ser de aproximadamente 5 mV/ms a aproximadamente 75 mV/ms o de aproximadamente 10 mV/ms a aproximadamente 50 mV/ms, de 15 mV/ms a aproximadamente 25 mV/ms, o aproximadamente 20 mV/ms. De forma alternativa, la tasa de rampa puede ser de aproximadamente 5 mV/ms, aproximadamente 10 mV/ms, aproximadamente 15 mV/ms, aproximadamente 20 mV/ms, aproximadamente 25 mV/ms, aproximadamente 30 mV/ms, aproximadamente 35 mV/ms, aproximadamente 40 mV/ms, aproximadamente 45 mV/ms, aproximadamente 50 mV/ms, aproximadamente 55 mV/ms, aproximadamente 60 mV/ms, aproximadamente 65 mV/ms, aproximadamente 70 mV/ms o aproximadamente 75 mV/ms. En particular, la tasa de rampa puede ser de aproximadamente 40 mV/ms a aproximadamente 50 mV/ms.

En el bloqueo de CC, el potencial de CC aplicado se puede fijar a aproximadamente 0 mV entre pulsos para proporcionar un pulso de recuperación, convirtiéndolo por tanto en una forma de onda de excitación en general continua. Esto contrasta con las secuencias de prueba en general conocidas en la técnica que prescriben el uso de un circuito abierto entre pulsos de CC positivos, excluyendo de este modo la posibilidad de recopilar y analizar

la corriente entre pulsos positivos. Como se usa en el presente documento, "pulso de recuperación" quiere decir un pulso de potencial cero (por ejemplo, de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +10 mV) aplicado durante un período de recuperación adecuadamente largo en el que la reacción electroquímica con el analito de interés (por ejemplo, glucosa) se apaga, permitiendo de este modo que el sistema regrese a un punto de inicio fijo antes de la interrogación subsiguiente con otro pulso de CC positivo.

Por lo tanto, un bloqueo de CC ejemplar puede alternar (es decir, pulso) entre aproximadamente 0 mV y aproximadamente +450 mV (en modo biamperométrico).

La información de respuesta a dicho bloqueo de CC se puede usar para evaluar la concentración o presencia de un primer analito, tal como una concentración o presencia de glucosa. Adicionalmente, se puede usar información tal como una respuesta de corriente de recuperación, conformación y/o magnitud de los potenciales de bloqueo de CC para corregir no solo Hct y/o temperatura, sino también la humectación del reactivo y la difusión de muestra, así como variaciones en el espesor de reactivo de detección.

Al igual que en el bloqueo de CA, un experto en la técnica entiende que el número, potencial, duración y orden de los pulsos de CC se pueden variar.

Con respecto a otro bloqueo de CC ejemplar para la secuencia de prueba de múltiples analitos, puede incluir una forma de onda que tiene una pluralidad de intervalos tales como, por ejemplo, de aproximadamente 2 intervalos a aproximadamente 10 intervalos, de aproximadamente 3 intervalos a aproximadamente 9 intervalos, de aproximadamente 4 intervalos a aproximadamente 8 intervalos, de aproximadamente 5 intervalos a aproximadamente 7 intervalos, o aproximadamente 6 intervalos. En otros casos, la forma de onda puede incluir aproximadamente 1 intervalo, aproximadamente 2 intervalos, aproximadamente 3 intervalos, aproximadamente 4 intervalos, aproximadamente 5 intervalos, aproximadamente 6 intervalos, aproximadamente 7 intervalos, aproximadamente 8 intervalos, aproximadamente 9 intervalos o aproximadamente 10 intervalos. En otros casos, la forma de onda puede tener más de 10 intervalos, es decir, aproximadamente 15 intervalos, aproximadamente 20 intervalos o aproximadamente 25 intervalos. Sin embargo, el número de intervalos de forma de onda típicamente se limita por el tiempo disponible para la secuencia de prueba.

Los intervalos de forma de onda pueden estar en un potencial que alterna o cicla entre un potencial positivo y un potencial negativo (o viceversa). Por ejemplo, el potencial puede alternar de aproximadamente -450 mV a aproximadamente +450 mV, de aproximadamente -425 mV a aproximadamente +425 mV, de aproximadamente -400 mV a aproximadamente +400 mV, de aproximadamente -375 mV a aproximadamente +375 mV, de aproximadamente -350 mV a aproximadamente +350 mV, de aproximadamente -325 mV a aproximadamente +325 mV, de aproximadamente -300 mV a aproximadamente +300 mV, de aproximadamente -275 mV a aproximadamente +275 mV, de aproximadamente -250 mV a aproximadamente +250 mV, de aproximadamente -225 mV a aproximadamente +225 mV, de aproximadamente -200 mV a aproximadamente +200 mV, de aproximadamente -175 mV a aproximadamente +175 mV, de aproximadamente -150 mV a aproximadamente +150 mV, de aproximadamente -125 mV a aproximadamente +125 mV, de aproximadamente -100 mV a aproximadamente +100 mV, de aproximadamente -75 mV a aproximadamente +75 mV, o de aproximadamente -50 mV a aproximadamente +50 mV. En algunos casos, uno o más de los ciclos sucesivos pueden tener el mismo potencial, mientras que en otros casos los ciclos sucesivos tienen un potencial distinto del de los otros segmentos.

Independientemente del número, cada intervalo de forma de onda se puede aplicar durante de aproximadamente 100 ms a aproximadamente 5 s, de aproximadamente 200 ms a aproximadamente 4 s, de aproximadamente 300 ms a aproximadamente 3 s, de aproximadamente 400 ms a aproximadamente 2 s, de aproximadamente 500 ms a aproximadamente 1 s, de aproximadamente 600 ms a aproximadamente 900 ms, o de aproximadamente 700 ms a aproximadamente 800 ms. De forma alternativa, cada intervalo de forma de onda se puede aplicar durante aproximadamente 100 ms, aproximadamente 150 ms, aproximadamente 200 ms, aproximadamente 250 ms, aproximadamente 300 ms, aproximadamente 350 ms, aproximadamente 400 ms, aproximadamente 450 ms, aproximadamente 500 ms, aproximadamente 550 ms, aproximadamente 600 ms, aproximadamente 650 ms, aproximadamente 700 ms, aproximadamente 750 ms, aproximadamente 800 ms, aproximadamente 850 ms, aproximadamente 900 ms, aproximadamente 950 ms, aproximadamente 1 s, aproximadamente 1,5 s, aproximadamente 2 s, aproximadamente 2,5 s, aproximadamente 3 s, aproximadamente 3,5 s, aproximadamente 4 s, aproximadamente 4,5 s o aproximadamente 5 s. En particular, cada intervalo de forma de onda a aproximadamente -450 mV se puede aplicar durante de aproximadamente 100 ms a aproximadamente 200 ms, y cada intervalo de forma de onda de aproximadamente +450 mV se puede aplicar durante de aproximadamente 100 ms a aproximadamente 200 ms. Todavía de forma alternativa, cada intervalo de forma de onda se puede aplicar durante menos de aproximadamente 100 ms o más de aproximadamente 5 s.

En algunos casos, los intervalos de forma de onda pueden tener las mismas tasas de rampa. En otros casos, algunos intervalos de forma de onda pueden tener la misma tasa de rampa y otros intervalos de forma de onda pueden tener una tasa de rampa diferente. Todavía en otros casos, cada intervalo de forma de onda tiene su propia tasa de rampa. Por ejemplo, la tasa de rampa puede ser de aproximadamente 0,5 mV/ms a  $\leq 45$  mV/ms. De forma alternativa, la tasa de rampa de cada intervalo puede ser de aproximadamente 1 mV/ms a aproximadamente

40 mV/ms, de aproximadamente 2 mV/ms a aproximadamente 30 mV/ms, de aproximadamente 3 mV/ms a aproximadamente 20 mV/ms, de aproximadamente 4 mV/ms a aproximadamente 19 mV/ms, de aproximadamente 5 mV/ms a aproximadamente 18 mV/ms, de aproximadamente 6 mV/ms a aproximadamente 17 mV/ms, de aproximadamente 7 mV/ms a aproximadamente 16 mV/ms, de aproximadamente 8 mV/ms a aproximadamente 15 mV/ms, de aproximadamente 9 mV/ms a aproximadamente 14 mV/ms, o de aproximadamente 10 mV/ms a aproximadamente 13 mV/ms, o de aproximadamente 11 mV/ms a aproximadamente 12 mV/ms. De forma alternativa, la tasa de rampa de cada intervalo puede ser de aproximadamente 0,5 mV/ms, 1 mV/ms, aproximadamente 2 mV/ms, aproximadamente 3 mV/ms, aproximadamente 4 mV/ms, aproximadamente 5 mV/ms, aproximadamente 6 mV/ms, aproximadamente 7 mV/ms, aproximadamente 8 mV/ms, aproximadamente 9 mV/ms, aproximadamente 10 mV/ms, aproximadamente 11 mV/ms, aproximadamente 12 mV/ms, aproximadamente 13 mV/ms, aproximadamente 14 mV/ms, aproximadamente 15 mV/ms, aproximadamente 16 mV/ms, aproximadamente 17 mV/ms, aproximadamente 18 mV/ms, aproximadamente 19 mV/ms, aproximadamente 20 mV/ms, aproximadamente 25 mV/ms, aproximadamente 30 mV/ms, aproximadamente 35 mV/ms, aproximadamente 40 mV/ms, o aproximadamente 45 mV/ms. En particular, la tasa de rampa está entre aproximadamente 3 mV/ms y aproximadamente 9 mV/ms, tal como aproximadamente 5,1 mV/ms o aproximadamente 7,15 mV/ms.

En algunos casos, la forma de onda puede ser una forma de onda triangular, forma de onda trapezoidal, forma de onda sinusoidal o combinaciones de las mismas.

Dicho bloqueo de CC se puede usar para evaluar la concentración o presencia de un segundo analito, tal como una concentración o presencia de cetona. Adicionalmente, se puede usar información tal como una respuesta de corriente de recuperación, conformación y/o magnitud de los potenciales de bloqueo de CC para evaluar la salud del reactivo de detección y/o presencia de determinados interferentes tales como antioxidantes (por ejemplo, ascorbato, ácido cítrico, deferoxamina (DFO), glutatión, N-acetilcisteína (NAC), ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC), mesilato de trilizad (TLM) y ácido úrico).

Como anteriormente, un experto en la técnica entiende que el número, potencial, duración y orden de los pulsos de CC se pueden variar.

Con respecto a otro bloqueo de CC ejemplar para la secuencia de prueba de múltiples analitos, puede incluir una forma de onda que tiene una pluralidad de intervalos tales como, por ejemplo, de aproximadamente 2 intervalos a aproximadamente 10 intervalos, de aproximadamente 3 intervalos a aproximadamente 9 intervalos, de aproximadamente 4 intervalos a aproximadamente 8 intervalos, de aproximadamente 5 intervalos a aproximadamente 7 intervalos, o aproximadamente 6 intervalos. En otros casos, la forma de onda puede incluir aproximadamente 1 intervalo, aproximadamente 2 intervalos, aproximadamente 3 intervalos, aproximadamente 4 intervalos, aproximadamente 5 intervalos, aproximadamente 6 intervalos, aproximadamente 7 intervalos, aproximadamente 8 intervalos, aproximadamente 9 intervalos o aproximadamente 10 intervalos. En otros casos, la forma de onda puede tener más de 10 intervalos, es decir, aproximadamente 15 intervalos, aproximadamente 20 intervalos o aproximadamente 25 intervalos. Sin embargo, el número de intervalos de forma de onda típicamente se limita por el tiempo disponible para la secuencia de prueba.

Los intervalos de forma de onda pueden estar en un potencial que alterna o cicla entre un potencial positivo y un potencial negativo (o viceversa). Por ejemplo, el potencial puede alternar de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +250 mV, de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +225 mV, de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +200 mV, de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +175 mV, de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +150 mV, de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +125 mV, de aproximadamente -0 mV a aproximadamente +100 mV. En otros casos, el potencial se puede mantener a aproximadamente 250 mV, a aproximadamente 225 mV, a aproximadamente 200 mV, a aproximadamente 175 mV, a aproximadamente 150 mV, a aproximadamente 125 mV o a aproximadamente 100 mV. En algunos casos, uno o más de los ciclos sucesivos pueden tener el mismo potencial, mientras que en otros casos los ciclos sucesivos tienen un potencial distinto del de los otros segmentos.

Independientemente del número, cada intervalo de forma de onda se puede aplicar durante de aproximadamente 100 ms a aproximadamente 5 s, de aproximadamente 200 ms a aproximadamente 4 s, de aproximadamente 300 ms a aproximadamente 3 s, de aproximadamente 400 ms a aproximadamente 2 s, de aproximadamente 500 ms a aproximadamente 1 s, de aproximadamente 600 ms a aproximadamente 900 ms, o de aproximadamente 700 ms a aproximadamente 800 ms. De forma alternativa, cada intervalo de forma de onda se puede aplicar durante aproximadamente 100 ms, aproximadamente 150 ms, aproximadamente 200 ms, aproximadamente 250 ms, aproximadamente 300 ms, aproximadamente 350 ms, aproximadamente 400 ms, aproximadamente 450 ms, aproximadamente 500 ms, aproximadamente 550 ms, aproximadamente 600 ms, aproximadamente 650 ms, aproximadamente 700 ms, aproximadamente 750 ms, aproximadamente 800 ms, aproximadamente 850 ms, aproximadamente 900 ms, aproximadamente 950 ms, aproximadamente 1 s, aproximadamente 1,5 s, aproximadamente 2 s, aproximadamente 2,5 s, aproximadamente 3 s, aproximadamente 3,5 s, aproximadamente 4 s, aproximadamente 4,5 s o aproximadamente 5 s. En particular, cada intervalo de forma de onda de aproximadamente -450 mV se puede aplicar durante de aproximadamente 100 ms a aproximadamente 200 ms, y

cada intervalo de forma de onda de aproximadamente +450 mV se puede aplicar durante de aproximadamente 100 ms a aproximadamente 200 ms. Todavía de forma alternativa, cada intervalo de forma de onda se puede aplicar durante menos de aproximadamente 100 ms o más de aproximadamente 5 s.

5 En algunos casos, los intervalos de forma de onda pueden tener las mismas tasas de rampa. En otros casos, algunos intervalos de forma de onda pueden tener la misma tasa de rampa y otros intervalos de forma de onda pueden tener una tasa de rampa diferente. Todavía en otros casos, cada intervalo de forma de onda tiene su propia tasa de rampa. Por ejemplo, la tasa de rampa puede ser de aproximadamente 0,5 mV/ms a  $\leq 45$  mV/ms. De forma alternativa, la tasa de rampa de cada intervalo puede ser de aproximadamente 1 mV/ms a aproximadamente 40 mV/ms, de aproximadamente 2 mV/ms a aproximadamente 30 mV/ms, de aproximadamente 3 mV/ms a aproximadamente 20 mV/ms, de aproximadamente 4 mV/ms a aproximadamente 19 mV/ms, de aproximadamente 5 mV/ms a aproximadamente 18 mV/ms, de aproximadamente 6 mV/ms a aproximadamente 17 mV/ms, de aproximadamente 7 mV/ms a aproximadamente 16 mV/ms, de aproximadamente 8 mV/ms a aproximadamente 15 mV/ms, de aproximadamente 9 mV/ms a aproximadamente 14 mV/ms, o de aproximadamente 10 mV/ms a aproximadamente 13 mV/ms, o de aproximadamente 11 mV/ms a aproximadamente 12 mV/ms. De forma alternativa, la tasa de rampa de cada intervalo puede ser de aproximadamente 0,5 mV/ms, 1 mV/ms, aproximadamente 2 mV/ms, aproximadamente 3 mV/ms, aproximadamente 4 mV/ms, aproximadamente 5 mV/ms, aproximadamente 6 mV/ms, aproximadamente 7 mV/ms, aproximadamente 8 mV/ms, aproximadamente 9 mV/ms, aproximadamente 10 mV/ms, aproximadamente 11 mV/ms, aproximadamente 12 mV/ms, aproximadamente 13 mV/ms, aproximadamente 14 mV/ms, aproximadamente 15 mV/ms, aproximadamente 16 mV/ms, aproximadamente 17 mV/ms, aproximadamente 18 mV/ms, aproximadamente 19 mV/ms, aproximadamente 20 mV/ms, aproximadamente 25 mV/ms, aproximadamente 30 mV/ms, aproximadamente 35 mV/ms, aproximadamente 40 mV/ms, o aproximadamente 45 mV/ms. En particular, la tasa de rampa está entre aproximadamente 3 mV/ms y aproximadamente 9 mV/ms, tal como aproximadamente 5,1 mV/ms o aproximadamente 7,15 mV/ms.

En algunos casos, la forma de onda puede ser una forma de onda triangular, forma de onda trapezoidal, forma de onda sinusoidal o combinaciones de las mismas.

30 La información de respuesta a dicho bloqueo de CC se puede usar para evaluar la concentración o presencia de un segundo analito, tal como una concentración o presencia de cetona.

Como anteriormente, un experto en la técnica entiende que el número, potencial, duración y orden de los pulsos de CC se pueden variar.

35 Una secuencia de prueba de múltiples analitos ejemplar se muestra en la FIG. 4A (panel izquierdo), que incluye (1) una primera diferencia de potencial de CC fija entre un primer par de electrodos dedicado a medir un primer analito, seguido de (2) una segunda diferencia de potencial de CC fija entre un segundo par de electrodos dedicado a medir un segundo analito. De forma ventajosa, al medir los analitos secuencialmente solo se requiere un potencióstato. El orden de secuencia se puede determinar por el analito que se beneficia de un tiempo de reacción más largo. Como tal, el primer analito se mide cinéticamente, mientras que el WE del segundo analito permanece en circuito abierto. Posteriormente, el WE del primer analito está en circuito abierto, mientras que el WE del segundo analito se conecta al potencióstato. El potencial aplicado en (1) y (2) puede ser diferente dependiendo del mediador. Una ganancia de potencióstato seleccionable puede ser ventajosa si los niveles fisiológicos son significativamente diferentes. La FIG. 4A (panel derecho) muestra una respuesta ejemplar a la secuencia de prueba mostrada en la FIG. 4A (panel izquierdo).

50 Una secuencia de prueba de múltiples analitos ejemplar alternativa se muestra en la FIG. 4B (panel izquierdo), que incluye (1) un retraso después de que se introduce una muestra en el elemento de prueba para permitir que las reacciones avancen, durante el que se mantiene un circuito abierto o diferencia de potencial cercana a 0 V entre ambos pares de electrodos, (2) una primera diferencia de potencial de CC fija suficiente para generar una corriente faradaica entre un primer par de electrodos, dedicada a medir un primer analito, seguido de (3) una segunda diferencia de potencial de CC fija suficiente para generar una corriente faradaica entre un segundo par de electrodos dedicada a medir un segundo analito. La FIG. 4B (panel derecho) muestra una respuesta ejemplar a la secuencia de prueba mostrada en la FIG. 4B (panel izquierdo).

60 Una secuencia de prueba de múltiples analitos ejemplar alternativa se muestra en la FIG. 4C (panel izquierdo), que incluye (1) un retraso después de que se introduce una muestra en el elemento de prueba para permitir que las reacciones avancen, durante el que se mantiene un circuito abierto o diferencia de potencial cercana a 0 V entre ambos pares de electrodos, (2) una primera diferencia de potencial de CC fija suficiente para generar una corriente faradaica entre un primer par de electrodos, dedicada a medir un primer analito, seguido de (3) una diferencia de potencial de CC cercana a 0 V entre el primer par de electrodos para permitir que la corriente regrese a 0, a continuación (4) una segunda diferencia de potencial de CC fija suficiente para generar una corriente faradaica entre un segundo par de electrodos dedicada a medir un segundo analito. La FIG. 4C (panel derecho) muestra una respuesta ejemplar a la secuencia de prueba mostrada en la FIG. 4C (panel izquierdo).

65

Una secuencia de prueba de múltiples analitos ejemplar alternativa se muestra en la FIG. 4D (panel izquierdo), que incluye (1) un retraso después de que se introduce una muestra en el elemento de prueba para permitir que las reacciones avancen, durante el que se mantiene un circuito abierto o diferencia de potencial cercana a 0 V entre ambos pares de electrodos, (2) un primer bloqueo de CC de pulsos de corta duración (por ejemplo, aproximadamente 50-500 ms) de aproximadamente +450 mV separados por intervalos de recuperación de corta duración de forma similar (por ejemplo, aproximadamente 50-500 ms) durante los que se aplica una diferencia de potencial de aproximadamente 0 mV, seguido de (3) un segundo bloqueo de CC que aplica una diferencia de potencial fija de aproximadamente +175 mV después de un circuito abierto entre un segundo par de electrodos dedicado a medir un segundo analito. La FIG. 4D (panel derecho) muestra una respuesta ejemplar a la secuencia de prueba mostrada en la FIG. 4D (panel izquierdo).

Una secuencia de prueba de múltiples analitos ejemplar alternativa se muestra en la FIG. 4E (panel izquierdo), que incluye no solo los componentes de CC como se analiza anteriormente sino que también incluye uno o más componentes de CA. Por ejemplo, la secuencia de prueba incluye (1) un retraso después de que se introduce una muestra en el elemento de prueba para permitir que las reacciones avancen, durante el que se mantiene un circuito abierto o diferencia de potencial cercana a 0 V entre ambos pares de electrodos, (2) un bloqueo de CA de una pluralidad de señales de CA de baja amplitud, (3) un primer bloqueo de CC de pulsos de corta duración (por ejemplo, aproximadamente 50-500 ms) que aumentan hasta o de aproximadamente 0 V a aproximadamente +450 mV durante un intervalo de 10 ms, separados por pulsos de recuperación de corta duración de forma similar (por ejemplo, aproximadamente 50-500 ms) durante los que se aplica un potencial de recuperación de aproximadamente 0 mV de circuito cerrado, (4) un segundo bloqueo de CC que tiene pulsos que alternan o realizan ciclos entre aproximadamente -450 mV a aproximadamente +450 mV en un circuito cerrado, y (5) un tercer bloqueo de CC que aplica una diferencia de potencial fija de aproximadamente +175 mV después de un circuito abierto entre un segundo par de electrodos dedicado a medir un segundo analito. La FIG. 4E (panel derecho) muestra una respuesta ejemplar a la secuencia de prueba mostrada en la FIG. 4E (panel izquierdo).

En las secuencias de pruebas de múltiples analitos, el componente de CA puede ser una serie de excitaciones de pequeña amplitud en múltiples frecuencias discretas. Asimismo, el primer componente de CC (pulsado) puede ser una serie de diferencias de potencial controladas por velocidad de respuesta aplicadas a través de un par de electrodos primarios entre CC 0 V y una amplitud (es decir, +450 mV es este ejemplo) suficiente para producir una respuesta de corriente faradaica proporcional a la concentración del analito primario. La amplitud del potencial depende del mediador del analito primario. Las duraciones positivas de los pulsos son lo suficientemente largas para minimizar las influencias de las corrientes de carga y  $<150$  ms para limitar la distancia de difusión por encima del WE de analito primario que se interroga a  $10\text{-}15\ \mu\text{m}$  ( $d = \sqrt{(D_M \times t)}$ ), de forma ideal significativamente menor que el espesor del reactivo de detección hidratado. Es beneficioso medir las respuestas de corriente del analito primario cerca del final de uno o más pulsos positivos para minimizar los efectos de los transitorios de carga y otros ruidos. Los pulsos positivos de 130 ms se intercalan con intervalos de diferencia de potencial aplicada de 0 V de duración suficiente para permitir que la celda electroquímica vuelva a estar cerca de su estado inicial ( $I \rightarrow 0$ ).

Además, el segundo componente de CC emula una técnica de voltamperometría cíclica. Aquí, la diferencia de potencial aplicada al par de electrodos primarios se extiende entre +450 mV y -450 mV a una tasa de 3,5 V/s. Por lo tanto, el segundo componente de CC se puede usar para detectar interferencias electroactivas. Esto va seguido de un tercer componente de CC para medir una concentración de analito secundaria.

De manera similar al primer componente de CC, el tercer componente de CC aplica una o más diferencias de potencial controladas por velocidad de respuesta a través de un par de electrodos secundarios a una amplitud (es decir, +175 mV es este ejemplo) suficiente para producir una respuesta de corriente faradaica proporcional a la concentración del analito secundario y dependiente del mediador del analito secundario. La corriente del analito secundario se mide en un momento después de aplicar el potencial secundario, típicamente, aproximadamente 500 ms.

Una secuencia de prueba de múltiples analitos ejemplar alternativa se muestra en la FIG. 4F, que incluye no solo los componentes de CA y CC como se analiza anteriormente sino también un intervalo de depósito. Por ejemplo, la secuencia de prueba incluye (1) un intervalo de depósito durante el que se aplica brevemente una primera diferencia de potencial positiva entre uno o ambos pares de electrodos para reducir la cantidad de mediador reducido presente en el/los reactivo(s) antes de una contribución significativa de la reacción de analito de interés, (2) un bloqueo de CA de una pluralidad de señales de CA de baja amplitud; (3) un primer componente de CC de pulsos de corta duración (por ejemplo, aproximadamente 50-500 ms) que aumentan en un intervalo de 10 ms de aproximadamente 0 V a una segunda diferencia de potencial positiva suficiente para generar una corriente faradaica medible relacionada con la concentración del primer analito, a continuación cambia de nuevo a aproximadamente 0 V, separados por pulsos de recuperación de corta duración de forma similar (por ejemplo, aproximadamente 50-500 ms) durante los que se aplica un potencial de recuperación de aproximadamente 0 mV de circuito cerrado, (4) un segundo componente de CC que tiene pulsos que alternan o realizan ciclos entre aproximadamente -450 mV a aproximadamente +450 mV en un circuito cerrado, y (5) un tercer componente de CC de pulsos de corta duración (por ejemplo, aproximadamente 50-500 ms) aumentados en un intervalo de 10 ms de aproximadamente 0 V a una tercera diferencia de potencial positiva suficiente para generar una corriente

5 faradaica medible relacionada con la concentración del segundo analito, a continuación cambia de nuevo a aproximadamente 0 V, separados por pulsos de recuperación de corta duración de forma similar (por ejemplo, aproximadamente 50-500 ms) durante los que se aplica un potencial de recuperación de aproximadamente 0 mV de circuito cerrado. La FIG. 4F (panel derecho) muestra una respuesta ejemplar a la secuencia de prueba mostrada en la FIG. 4F (panel izquierdo).

10 En vista de esto, una de las señales de prueba descritas en el presente documento se puede aplicar a uno o más de los WE para proporcionar una diferencia de potencial entre el WE y CE. De forma alternativa, se puede proporcionar un potencial de prueba distinto del potencial de referencia o de tierra virtual como CE para proporcionar una diferencia de potencial entre el WE y CE. Se apreciará que se pueden utilizar lo anterior y una variedad de otras configuraciones de celdas de prueba, electrodos y/o circuitos adicionales y alternativos operables para aplicar una señal de prueba a un sistema de electrodos en contacto con una muestra combinada y un reactivo de detección y medir una respuesta a esto.

15 La información de respuesta de corriente CA y/o CC se recopila de la secuencia de prueba aplicada e incluye respuestas de corriente a los bloqueos de CA y CC. La información importante incluye, pero no se limita a, duración, conformación y/o magnitud de la respuesta de corriente a un pulso de excitación y/o un pulso de recuperación en la secuencia de prueba. En algunos casos, la información de respuesta de corriente se puede recopilar a una tasa de muestreo A/D para mediciones de CC y CA para simplificar el diseño de sistema, incluyendo una única vía de señal compartida para mediciones de CA y CC. El intervalo de tasas de muestreo de audio digital común incluye, pero no se limita a, de aproximadamente 44,1 kHz a aproximadamente 192 kHz. Los convertidores A/D en este intervalo están fácilmente disponibles en una variedad de proveedores de semiconductores comerciales.

20 La información de respuesta de corriente al bloqueo de CA se puede usar para determinar valores de impedancia, admitancia y fase u otros parámetros complejos como se describe con más detalle a continuación. Asimismo, se puede usar información de corriente para los bloqueos de CC para determinar concentraciones de analito u otros parámetros complejos como se describe con más detalle a continuación (por ejemplo, compensación y/o correcciones basadas en Hct, temperatura y/o interferencias, así como compensaciones y/o correcciones para humectación de reactivos, espesor de película de reactivos y cinética de reacción).

25 En los procedimientos se puede obtener información de corriente de respuesta de CA y/o CC (es decir, medida o registrada) a de aproximadamente 2.000/s a aproximadamente 200.000/s, de aproximadamente 3.000/s a aproximadamente 190.000/s, de aproximadamente 4.000/s a aproximadamente 180.000/s, de aproximadamente 5.000/s a aproximadamente 170.000, de aproximadamente 6.000/s a aproximadamente 160.000/s, de aproximadamente 7.000/s a aproximadamente 150.000/s, de aproximadamente 8.000/s a aproximadamente 140.000/s, de aproximadamente 9.000/s a aproximadamente 130.000/s, de aproximadamente 10.000/s a aproximadamente 120.000/s, de aproximadamente 15.000/s a aproximadamente 110.000/s, de aproximadamente De 20.000/s a aproximadamente 100.000/s, de aproximadamente 30.000/s a aproximadamente 90.000/s, de aproximadamente 40.000/s a aproximadamente 80.000/s, de aproximadamente 50.000/s a aproximadamente 70.000/s, o a aproximadamente 60.000/s. En algunos casos, se puede obtener la información de corriente de respuesta de CA y/o CC a de aproximadamente 100/s a aproximadamente 200/s, de aproximadamente 200/s a aproximadamente 300/s, de aproximadamente 300/s a aproximadamente 400/s, de aproximadamente 400/s a aproximadamente 500/s, de aproximadamente 500/s a aproximadamente 600/s, de aproximadamente 600/s a aproximadamente 700/s, de aproximadamente 700/s a aproximadamente 800/s, de aproximadamente 800/s a aproximadamente 900/s, de aproximadamente 1000/s a aproximadamente 1500/s, de aproximadamente 1500/s a aproximadamente 2000/s, de aproximadamente 2000/s a aproximadamente 2500/s, de aproximadamente 2500/s a aproximadamente 3000/s, de aproximadamente 3.000/s a aproximadamente 3.500/s, de aproximadamente 3.500/s a aproximadamente 4.000/s, de aproximadamente 4.000/s a aproximadamente 4.500/s, de aproximadamente 4.500/s a aproximadamente 5.000/s, de aproximadamente 5.000/s a aproximadamente 5.500/s, de aproximadamente 5.500/s a aproximadamente 6.000/s, de aproximadamente 6.000/s a aproximadamente 6.500/s, de aproximadamente 6.500 a aproximadamente 7.000/s, de aproximadamente 7.000/s a aproximadamente 7.500/s, de aproximadamente 7.500/s a aproximadamente 8.000/s, de aproximadamente 8.000/s a aproximadamente 8.500/s, de aproximadamente 8.500 a aproximadamente 9.000/s, de aproximadamente 9.000/s a aproximadamente 9.500/s, de aproximadamente 9.500/s a aproximadamente 10.000/s, de aproximadamente 10.000/s a aproximadamente 20.000/s, de aproximadamente 20.000/s a aproximadamente 30.000/s, de aproximadamente 30.000/s a aproximadamente 40.000/s, de aproximadamente 40.000/s a aproximadamente 50.000/s, de aproximadamente 50.000/s a aproximadamente 60.000/s, de aproximadamente 60.000/s a aproximadamente 70.000/s, de aproximadamente 70.000/s a aproximadamente 80.000/s, de aproximadamente 80.000/s a aproximadamente 90.000/s, de aproximadamente 90.000/s a aproximadamente 100.000/s, de aproximadamente 100.000/s a aproximadamente 110.000/s, de aproximadamente 110.000/s a aproximadamente 120.000/s, de aproximadamente 120.000/s a aproximadamente 130.000/s, de aproximadamente 130.000/s a aproximadamente 140.000/s, de aproximadamente 140.000/s a aproximadamente 150.000/s, de aproximadamente 150.000/s a aproximadamente 160.000/s, de aproximadamente 160.000/s a aproximadamente 170.000/s, de aproximadamente 170.000/s a aproximadamente 180.000/s, de aproximadamente 180.000/s a aproximadamente 190.000/s, o a aproximadamente 200.000/s. En otros casos, se puede obtener la información de corriente de respuesta de CA y/o CC hasta aproximadamente

100/s, aproximadamente 200/s, aproximadamente 300/s, aproximadamente 400/s, aproximadamente 500/s, 600/s, aproximadamente 700/s, aproximadamente 800/s, aproximadamente 900/s, aproximadamente 1000/s, aproximadamente 1250/s, aproximadamente 1500/s, aproximadamente 1750/s, aproximadamente 2000/s, aproximadamente 2225/s, aproximadamente 2500/s, aproximadamente 2750/s, aproximadamente 3000/s, aproximadamente 3250/s, aproximadamente 3500/s, aproximadamente 3750/s, aproximadamente 4000/s, aproximadamente 4250/s, aproximadamente 4500/s, aproximadamente 4.750/s, aproximadamente 5.000/s, aproximadamente 5.250/s, aproximadamente 5.500/s, aproximadamente 5.750/s, aproximadamente 6.000/s, aproximadamente 6.250/s, aproximadamente 6.500, aproximadamente 7.000/s, aproximadamente 7.250/s, aproximadamente 7.500/s, aproximadamente 7.750/s, aproximadamente 8.000/s, aproximadamente 8.250/s, aproximadamente 8.500/s, aproximadamente 8.750, aproximadamente 9.000/s, aproximadamente 9.250/s, aproximadamente 9.500/s, aproximadamente 9.750/s, aproximadamente 10.000/s, aproximadamente 15.000/s, aproximadamente 20.000/s, aproximadamente 25.000/s, aproximadamente 30.000/s, aproximadamente 35.000/s, aproximadamente 40.000/s, aproximadamente 45.000/s, aproximadamente 50.000/s, aproximadamente 55.000/s, aproximadamente 60.000/s, aproximadamente 65.000/s, aproximadamente 70.000/s, aproximadamente 75.000/s, aproximadamente 80.000/s, aproximadamente 85.000/s, aproximadamente 90.000/s, aproximadamente 95.000/s, aproximadamente 100.000/s, aproximadamente 105.000/s, aproximadamente 110.000/s, aproximadamente 115.000/s, aproximadamente 120.000/s, aproximadamente 125.000/s, aproximadamente 130.000/s, aproximadamente 135.000/s, aproximadamente 140.000/s, aproximadamente 145.000/s, aproximadamente 150.000/s, aproximadamente 155.000/s, aproximadamente 160.000/s, aproximadamente 165.000/s, aproximadamente 170.000/s, aproximadamente 175.000/s, aproximadamente 180.000/s, aproximadamente 185.000/s, aproximadamente 190.000/s, aproximadamente 195.000 o aproximadamente 200.000/s. Aún en otros casos, la información de respuesta de corriente CA y/o CC se puede obtener a más de 200.000/s.

Los detalles adicionales con respecto a procedimientos de medición electroquímica ejemplares se divulgan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.ºs 4.008.448; 4.225.410; 4.233.029; 4.323.536; 4.891.319; 4.919.770; 4.963.814; 4.999.582; 4.999.632; 5.053.199; 5.108.564; 5.120.420; 5.122.244; 5.128.015; 5.243.516; 5.288.636; 5.352.351; 5.366.609; 5.385.846; 5.405.511; 5.413.690; 5.437.999; 5.438.271; 5.508.171; 5.526.111; 5.627.075; 5.628.890; 5.682.884; 5.727.548; 5.762.770; 5.858.691; 5.997.817; 6.004.441; 6.054.039; 6.254.736; 6.270.637; 6.645.368; 6.662.439; 7.073.246; 7.018.843; 7.018.848; 7.045.054; 7.115.362; 7.276.146; 7.276.147; 7.335.286; 7.338.639; 7.386.937; 7.390.667; 7.407.811; 7.429.865; 7.452.457; 7.488.601; 7.494.816; 7.545.148; 7.556.723; 7.569.126; 7.597.793; 7.638.033; 7.731.835; 7.751.864; 7.977.112; 7.981.363; 8.148.164; 8.298.828; 8.329.026; 8.377.707; y 8.420.404, así como los documentos RE36268, RE42560, RE42924 y RE42953. Otros procedimientos de medición electroquímica ejemplares que se pueden usar en el presente documento se divulgan en las publicaciones de solicitud de patente internacional n.ºs WO 2014/140718; WO 2014/140164; WO 2014/140170; WO 2014/140172; WO 2014/140173; y WO 2014/140177.

Las concentraciones de analito se pueden determinar por algoritmos y/o correlaciones para la cantidad de equivalentes redox (por ejemplo, electrones) liberados o consumidos en los reactivos de detección y medidos por medio del sistema de electrodos, donde dichos algoritmos y/o correlaciones son conocidos en la técnica.

Después de la información de respuesta se procesa y se correlaciona para determinar las concentraciones de analito, los procedimientos pueden incluir presentar en el medidor una o más concentraciones de analito o tendencias a un usuario. Son conocidas en la técnica una variedad de medios gráficos y/o numéricos para presentar los datos y otra información relacionada al usuario. Véanse, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2009/0210249 y la patente de EE. UU. n.º 9.218.453.

Además de las etapas descritas anteriormente, los procedimientos también pueden incluir etapas adicionales. Con respecto a medir glucosa y cetona, los procedimientos pueden incluir determinar ambos analitos durante cada prueba, pero solo proporcionar al usuario la concentración de glucosa a menos que se cumpla un umbral o condición predeterminado para un analito (por ejemplo, glucosa), el otro analito (por ejemplo, cetona) o ambos analitos. Por ejemplo, las concentraciones de hidroxibutirato por debajo de 0,6 mM en sangre se consideran normales, mientras que las concentraciones de hidroxibutirato que están entre 0,6 mM y 1,5 mM indican que se puede desarrollar un problema y las que son mayores de 1,5 mM indican un riesgo de desarrollar CAD. Las concentraciones de hidroxibutirato por encima de 3 mM en sangre son indicativas de CAD y requieren tratamiento médico de urgencia. Por tanto, y en algunos casos, la concentración de glucosa se presenta al usuario y la concentración de cetona se presenta solo si se cumple(n) el/los umbral(es) o condición/condiciones predeterminado(s), y donde el/los umbral(es) o condición/condiciones predeterminado(s) puede(n) ser una concentración de glucosa de aproximadamente 240 mg/dl o una concentración de cetona de aproximadamente 0,6 mM a aproximadamente 3,0 mM o incluso de aproximadamente 0,6 mM a aproximadamente 1,5 mM. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional n.º 2014/068024.

En otros casos, los procedimientos también pueden incluir proporcionar la indicación en respuesta a determinar que la primera concentración de analito es superior a un valor predeterminado incluye al menos uno de presentar la primera concentración de analito, proporcionar una advertencia, proporcionar una lista de acciones a tomar en respuesta a que la primera concentración de analito sea superior al valor predeterminado y transmitir un mensaje a al menos uno de un usuario del elemento de prueba, profesional sanitario, cuidador y padre o tutor.

Específicamente, proporcionar la indicación en respuesta a determinar que la concentración del primer analito es superior al nivel predeterminado puede incluir transmitir un mensaje a un dispositivo móvil u ordenador. En algunos casos, proporcionar la indicación en respuesta a determinar que la primera concentración de analito es superior al nivel predeterminado incluye además presentar un mensaje relacionado con la primera concentración de analito en un medidor de prueba. En otros casos, proporcionar la indicación en respuesta a determinar que la concentración del primer analito es superior al nivel predeterminado incluye presentar un mensaje relacionado con la concentración del primer analito. Todavía en otros casos, proporcionar la indicación en respuesta a determinar que la concentración del primer analito es superior al nivel predeterminado incluye cambiar un color o un sombreado de al menos una parte de una pantalla de visualización o visualización textual. Todavía en otra forma, proporcionar la indicación en respuesta a determinar que la concentración del primer analito es superior al nivel predeterminado incluye presentar un icono de información en una pantalla de presentación. Todavía en otra forma, proporcionar la indicación en respuesta a determinar que la concentración del primer analito es superior al nivel predeterminado incluye presentar un icono de información en una pantalla de presentación con un tono de audio o vibración para animar al paciente a prestar atención. En un aspecto de esta forma, el procedimiento incluye además proporcionar un mensaje en respuesta a una selección del icono de información. En otro aspecto, el mensaje incluye al menos una de una descripción de la concentración del primer analito, una lista de acciones a adoptar en respuesta a que la concentración del primer analito esté por encima del nivel predeterminado e información de contacto de un profesional sanitario.

En consecuencia, el medidor puede configurar una vigilancia de cetona siempre que se registre un valor de glucosa medido mayor que o igual a un valor predeterminado, tal como 240 mg/dl. De forma alternativa, la vigilancia de cetona se puede configurar por el medidor siempre que un valor de cetona medido sea mayor que o igual a un valor predeterminado, tal como por ejemplo de 0,6 mM a 3,0 mM. La vigilancia de cetona recomendaría someter a prueba la glucosa y la cetona cada 4-6 horas mientras se mantenga el valor predeterminado. En una forma no limitante, por ejemplo, tras el inicio de y durante la vigilancia de cetonas, el medidor puede presentar automáticamente los niveles de glucosa y cetona medidos independientemente de su relación con cualquier valor preespecificado. Una vigilancia de cetona también puede iniciar un nuevo conjunto de datos de tendencias para determinar si las cetonas están comenzando a aumentar incluso si todavía están por debajo del umbral de un nivel alto de cetona. También se puede iniciar una vigilancia de cetonas si el usuario ha indicado que tiene una enfermedad tal como un resfriado o la gripe.

### Ejemplos

El concepto según la invención se comprenderá mejor tras la consideración de los siguientes ejemplos no limitantes, que se ofrecen para propósitos de ilustración, no de limitación.

#### Ejemplo 1: reactivos de detección de cetona y glucosa para análisis de analito doble.

Procedimientos: los reactivos de detección de cetona y glucosa se prepararon como se describe a continuación. La tabla 3 muestra los componentes básicos para el reactivo de detección de cetona.

Tabla 3: reactivo de detección de cetona.

Componente reactivo	Húmedo (%)	Seco (%)	Húmedo (mM)
MOPS	1,51	14,49	72,22
Keltrol	0,08	0,78	
Natrosol 250 HBR	0,56	5,34	
Kollidon VA 64	1,63	15,64	
Tergitol 15-S-19	0,03	0,28	
Propiofan 70D	1,18	11,29	
PG355	0,33	3,14	10,12
cNAD	2,00	19,20	30,37
HBDH	2,56	24,54	
KOH	0,55	5,29	
% sólidos	10,43	100,00	

La tabla 4 muestra los componentes básicos del reactivo de detección de glucosa.

Tabla 4: reactivo de detección de glucosa.

Componente reactivo	Húmedo (%)	Seco (%)	Húmedo (mM)
Ácido PIPES	2,19	22,58	72,5
Goma xantana			
Goma/Keltrol F	0,09	0,96	
Natrosol 250 HBR	0,51	5,28	
Geropon T77	0,03	0,29	
Kollidon VA 64	1,73	17,81	
NA1144	0,64	6,64	23,3
succinato de sodio			
hexahidrato	0,23	2,33	14,0
KOH 30 % (p/v)	0,91	9,34	
FAD-GDH	2,07	21,34	
Propiofan 70D	1,30	13,43	
% Contenido sólido	9,71	100	

Se preparó 3-HB en tampón fosfato 150 mM, pH 7.

5 Se aplicó una secuencia de prueba a diferentes niveles de 3-HB en tampón (es decir, 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0 y 8,0 mM). Se usó una secuencia de prueba como se divulga en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2014/140178, que a continuación se siguió de un solo pulso largo de 175 mV (frente al contraelectrodo de glucosa). La corriente se leyó a los 0,5 segundos después de aplicar la diferencia de potencial de 175 mV entre el electrodo de trabajo de cetona y el contraelectrodo de glucosa para mediciones de cetona.

10 El reactivo de cetona tuvo un alto contenido de mediador (10 mM) en comparación con otros estudios en el presente documento. El contenido de polímero en la película seca fue mayor que en otros estudios.

Resultados: la FIG. 5 muestra una respuesta lineal durante el estudio de respuesta a la dosis, donde se midieron corrientes crecientes a medida que se incrementa la concentración de 3-HB.

#### 15 **Ejemplo 2: estudio de interferencia acuosa.**

Procedimientos: los reactivos de detección de cetona y glucosa se prepararon como se indicó anteriormente en el ejemplo 1. Los reactivos de detección se incorporaron a los elementos de prueba y a continuación se usaron en experimentos de interferencia. El reactivo de detección de glucosa se aplicó a los electrodos de trabajo y contraelectrodos de glucosa, y el reactivo de detección de cetona se aplicó al electrodo de trabajo de cetona.

La matriz acuosa para glucosa y 3-HB fue tampón fosfato 150 mM, pH 7.

25 En los experimentos de interferencia, se dosificaron los elementos de prueba con muestras acuosas que contenían 3-HB y glucosa con concentraciones variables (0, 1,0, 3,0 y 8,0 mM para 3-HB; y 0 o 300 mg/dl para glucosa). La corriente se leyó a aproximadamente 130 ms (véase, por ejemplo, punto "DC1" en la FIG. 4E, panel derecho) después de iniciar el primer pulso aumentado de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +450 mV entre el electrodo de trabajo de glucosa y el contraelectrodo de glucosa para mediciones de glucosa y aproximadamente 30 0,5 segundos después de aplicar la diferencia de potencial de 175 mV entre el electrodo de trabajo de cetona y el contraelectrodo de glucosa para mediciones de cetona.

Resultados: la FIG. 6A muestra la corriente de glucosa en presencia de 3-HB, sin impacto sobre la corriente de glucosa por la presencia de diferentes niveles de 3-HB (0 mM, 1 mM, 3 mM y 8 mM). Se sometieron a prueba dos niveles de glucosa, cada uno con diferentes niveles de 3-HB.

Asimismo, la FIG. 6B muestra la corriente de 3-HB en presencia de glucosa, sin impacto sobre la corriente de 3-HB por la presencia de diferentes niveles de glucosa (0 mg/dl y 300 mg/dl). Se sometieron a prueba cuatro niveles diferentes de 3-HB (0 mM, 1 mM, 3 mM y 8 mM), conteniendo cada nivel 0 mg/dl o 300 mg/dl de glucosa.

#### 40 **Ejemplo 3: efecto de diferentes coenzimas sobre el reactivo de detección de cetona.**

Procedimientos: las características químicas de reactivo se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 1. Aquí, sin embargo, se preparó un reactivo de detección de cetona con NAD en lugar de cNAD para la coenzima/cofactor. Las tablas 5 y 6 muestran los componentes básicos para los reactivos de detección de cetona alternativos. En los estudios de respuesta a la dosis, el reactivo de glucosa es el mismo que en los ejemplos anteriores.

Tabla 5: reactivo de detección de cetona alternativo (con NAD).

Componente reactivo	Húmedo (%)	Seco (%)	Húmedo (mM)
MOPS	2,12	14,67	101,5
Keltrol	0,075	0,52	
Natrosol 250 HBR	0,27	1,89	
Kollidon VA 64	1,39	9,58	
Tergitol 15-S-19	0,03	0,21	
Propiofan 70D	1,20	8,28	
succinato de sodio	0,41	2,82	15,1
PG355	0,242	1,67	7,5
NAD	4,11	28,4	62,0
HBDH	3,794	26,20	
KOH	0,837	5,78	
% sólidos	14,483	100,00	

Tabla 6: reactivo de detección de cetona alternativo (con cNAD).

Componente reactivo	Húmedo (%)	Seco (%)	Húmedo (mM)
MOPS	2,12	14,67	101,5
Keltrol	0,075	0,52	
Natrosol 250 HBR	0,27	1,89	
Kollidon VA 64	1,39	9,58	
Tergitol 15-S-19	0,03	0,21	
Propiofan 70D	1,20	8,28	
succinato de sodio	0,41	2,82	15,1
PG355	0,242	1,67	7,5
cNAD	4,09	28,21	62,0
HBDH	3,79	26,20	
KOH	0,837	5,78	
% sólidos	14,46	100,00	

5

La secuencia de prueba fue la misma que en los ejemplos anteriores y se aplicó a diferentes niveles de 3-HB en tampón (es decir, 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 y 4,0 mM) y a diferentes niveles de glucosa en tampón (es decir, 0, 57, 123, 520 y 1000 mg/dl). Como anteriormente en el ejemplo 2, la corriente se leyó a aproximadamente 130 ms (véase, por ejemplo, punto "DC1") después de iniciar el primer pulso aumentado de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +450 mV entre el electrodo de trabajo de glucosa y el contraelectrodo de glucosa para mediciones de glucosa y aproximadamente 0,5 segundos después de aplicar la diferencia de potencial de 175 mV entre el electrodo de trabajo de cetona y el contraelectrodo de glucosa para mediciones de cetona.

10

El reactivo de cetona tiene un bajo contenido de mediador (7,5 mM) en comparación con los estudios anteriores. Asimismo, el contenido de polímero en la película seca es menor que los estudios anteriores.

15

Resultados: la FIG. 7A muestra que el NAD (rombos) es ligeramente más eficaz como cofactor que el cNAD (cuadrados); sin embargo, la respuesta con cNAD sigue siendo aceptable, especialmente porque posee una estabilidad potenciada sobre el cofactor natural NAD.

20

La FIG. 7B muestra que existe poca diferencia en la medición de glucosa cuando se usan NAD o cNAD en el reactivo de detección de cetona. Por tanto, la FIG. 7B muestra que la respuesta de la glucosa no se ve alterada por el procedimiento de depósito de reactivo de detección (por ejemplo, PicoJet®).

#### 25 **Ejemplo 4: efecto de diferentes mediadores sobre el reactivo de detección de cetona.**

Procedimientos: las características químicas de reactivo se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 1. Aquí, sin embargo, se preparó el reactivo de detección de cetona con cPES en lugar de PG355. La tabla 7 muestra los componentes básicos para el reactivo de detección de cetona alternativo. En los estudios de respuesta a la dosis, el reactivo de glucosa es el mismo que en los ejemplos anteriores.

30

Tabla 7: reactivo de detección de cetona alternativo (con cPES).

Componente reactivo	Húmedo (%)	Seco (%)	Húmedo (mM)
MOPS	2,13	14,85	102,0
Keltrol	0,08	0,53	
Natrosol 250 HBR	0,27	1,91	
Kollidon VA 64	1,39	9,69	
Tergitol 15-S-19	0,03	0,21	

Componente reactivo	Húmedo (%)	Seco (%)	Húmedo (mM)
Propiofan 70D	1,20	8,36	
succinato de sodio	0,41	2,86	15,2
cPES	0,23	1,63	7,5
cNAD	4,10	28,55	62,2
HBDH	3,89	26,51	
KOH	0,70	4,90	
% sólidos	14,37	100,00	

La secuencia de prueba fue la misma que en los ejemplos anteriores y se aplicó a diferentes niveles de 3-HB en tampón (es decir, 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 y 4,0 mM). Como anteriormente, la corriente se leyó a los 0,5 segundos después de aplicar la diferencia de potencial de 175 mV entre el electrodo de trabajo de cetona y el contraelectrodo de glucosa para mediciones de cetona.

El reactivo de cetona tiene un bajo contenido de mediador (7,5 mM) en comparación con los estudios anteriores. Asimismo, el contenido de polímero en la película seca es menor que los estudios anteriores.

**Resultados:** la FIG. 8 muestra que cPES es un mediador eficaz con resultados comparables al uso de PG355.

#### Ejemplo 5: efecto de diferentes enzimas sobre el reactivo de detección de cetona.

**Procedimientos:** las características químicas de reactivo se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 2. Aquí, sin embargo, se preparó el reactivo de detección de cetona con HBDH natural, un mutante HBDH AFDH3 y un HBDH AFDH4 (véase la solicitud de patente EP n.º 16165421.5 para detalles adicionales sobre los mutantes). La tabla 8 muestra los componentes básicos para los reactivos de detección de cetonas alternativos. En los estudios de respuesta a la dosis, el reactivo de detección de glucosa fue el mismo que en los ejemplos 1 y 2 anteriores.

Tabla 8: reactivo de detección de cetona alternativo (con HBDH natural).

Componente reactivo	Húmedo (%)	Seco (%)	Húmedo (mM)
MOPS	2,12	14,54	101,5
Keltrol	0,08	0,52	
Natrosol 250 HBR	0,27	1,87	
Kollidon VA 64	1,39	9,50	
Tergitol 15-S-19	0,03	0,21	
Propiofan 70D	1,20	8,21	
succinato de sodio	0,41	2,80	15,1
PG355	0,24	1,66	7,5
cNAD	4,08	27,97	61,9
HBDH, AFDH3	3,80	26,00	
HBDH, o AFDH4			
HBDH			
KOH	0,98	6,71	
% sólidos	14,6	100,00	

La secuencia de prueba fue la misma que en los ejemplos anteriores y se aplicó a muestras que tenían diferentes niveles de 3-HB en tampón (es decir, 0,5, 1,5 y 3,0 mM) y a diferentes niveles de glucosa en tampón (es decir, 40, 150 y 400 mm/dl). Adicionalmente, las muestras se prepararon como sangre venosa glucosilada que tiene un hematocrito de aproximadamente un 41 %. Como anteriormente en los ejemplos 2-3, la corriente se leyó a aproximadamente 130 ms (véase, por ejemplo, punto "DC1") después de iniciar el primer pulso aumentado de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +450 mV entre el electrodo de trabajo de glucosa y el contraelectrodo de glucosa para mediciones de glucosa y aproximadamente 0,5 segundos después de aplicar la diferencia de potencial de 175 mV entre el electrodo de trabajo de cetona y el contraelectrodo de glucosa para mediciones de cetona.

**Resultados:** en general, no se observó impacto significativo sobre la señal 3-HB (es decir, corriente) en presencia de glucosa entre las diferentes enzimas HBDH (véanse las FIGS. 9A-C). Asimismo, no se observó impacto significativo sobre la señal de glucosa en presencia de 3-HB (véanse las FIGS. 9D-F). Por tanto, no hay pruebas de interferencias entre reactivos.

#### Ejemplo 6: reactivos de detección de cetona y glucosa alternativos para análisis de analito doble.

**Procedimientos:** las características químicas de reactivo se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 2. Aquí, sin embargo, se preparó el reactivo de detección de glucosa con FAD-GDH y NA1144 y se preparó

el reactivo de detección de cetona con HBDH y diaforasa/NA1144. La concentración de NA1144 para el reactivo de detección de glucosa fue de 25 mM y fue de 7,5 mM para el reactivo de detección de cetona.

Los reactivos de detección de cetona y glucosa se depositaron usando distribución discreta PicoJet®.

La secuencia de prueba fue la misma que en los ejemplos anteriores y se aplicó a muestras que tenían diferentes niveles de 3-HB en tampón (es decir, 0 mM, 1 mM, 3 mM y 8 mM) y que tienen un único nivel de glucosa (es decir, 300 mm/dl).

**Resultados:** como se muestra en la FIG. 10A, no se observó impacto significativo sobre la corriente de glucosa (concentración de glucosa = 300 mg/dl) cuando las soluciones de prueba contenían diferentes niveles de 3-HB (0, 0,5, 1,5, 4 y 8 mM) y las tiras se dosificaron desde la parte frontal o el lado. Asimismo, y como se muestra en la FIG. 10B, no hubo impacto significativo sobre la señal 3-HB (es decir, corriente) cuando las tiras reactivas se dosificaron desde la parte frontal o el lado de la tira. Cuando las tiras se dosificaron desde el lateral, la solución de prueba fluyó primero sobre el reactivo de glucosa. Si el reactivo de glucosa no estuvo fijado firmemente en su lugar, lo que da como resultado una interferencia entre los reactivos, se esperaría ver algún impacto sobre la corriente 3HB medida en el electrodo de trabajo de cetona.

**Ejemplo 7: reactivos de detección de glucosa doble por recubrimiento por ranura sobre elementos de prueba.**

**Procedimientos:** las características químicas de reactivo se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 1. Asimismo, la secuencia de prueba es la misma como se describe anteriormente en el ejemplo 1.

Los reactivos de detección de cetona y glucosa se depositaron usando un recubrimiento por ranura de reactivo doble en lugar de la distribución discreta PicoJet®.

Para los experimentos de interferencia, los elementos de prueba se dosificaron con muestras que tenían diferentes niveles de 3-HB en tampón (es decir, 0,5, 1,5 y 3,0 mM) y a diferentes niveles de glucosa en tampón (es decir, 1, 150 y 300 mm/dl). De nuevo, y como anteriormente en el ejemplo 2, la corriente se leyó a aproximadamente 130 ms (véase, por ejemplo, punto "DC1") después de iniciar el primer pulso aumentado de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +450 mV entre el electrodo de trabajo de glucosa y el contraelectrodo de glucosa para mediciones de glucosa y aproximadamente 0,5 segundos después de aplicar la diferencia de potencial de 175 mV entre el electrodo de trabajo de cetona y el contraelectrodo de glucosa para mediciones de cetona.

**Resultados:** en general, no se observó impacto significativo sobre la señal 3-HB en presencia de diferentes niveles de glucosa (véase la FIG. 11A). Asimismo, no se observó impacto significativo sobre la señal de glucosa en presencia de 3-HB (véase la FIG.11B). Por tanto, no hubo pruebas de interferencia entre reactivos por medio del recubrimiento por ranura.

**Ejemplo 8: reactivos de detección doble por impresión por inyección de tinta con recubrimiento de polímero sobre elementos de prueba.**

**Procedimientos:** las características químicas de reactivo se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 1. Aquí, se prepararon dos reactivos de detección de glucosa, donde un reactivo de detección de glucosa incluyó FAD-GDH y el otro reactivo de detección de glucosa incluyó una PQQ-GDH mutante con baja sensibilidad a la maltosa (disponible de Roche Diagnostics, Inc.; Indianápolis, IN, EE. UU.). Las formulaciones de inyección de tinta para cada reactivo de detección de glucosa fueron las mismas con excepción de la enzima y la coenzima.

Tabla 9: formaciones de inyección de tinta.

Componente reactivo	Húmedo (%)	Seco (%)
PIPES	3,7	21,9
Kollidon VA 64	7,9	47,6
succinato de sodio	0,3	1,7
KOH	0,7	4,1
Tegowet 265	0,05	0,3
NA1144	1,4	8,4
enzima (incl. coenzima)	3,0	16,0

Tabla 10: formulación de recubrimiento de polímero.

Componente	Húmedo (%)	Seco (%)
PIPES	3,4	15,6
Kollidon VA 64	11,9	54,0
Natrosol 250 HBR	1,2	5,6

Componente	Húmedo (%)	Seco (%)
Propiofan 70D	2,7	12,4
Aerosil	2,7	12,4

Ambos reactivos de detección de glucosa se depositaron usando impresión por inyección de tinta en lugar de recubrimiento por ranura de reactivo doble o distribución discreta PicoJet®.

5 La secuencia de prueba es la misma como se describe anteriormente en el ejemplo 1. Se observó una interferencia mínima entre los electrodos para los principales interferentes glucídicos para cada electrodo. Las respuestas de corriente se normalizaron a la respuesta de glucosa para cada electrodo, ya que las áreas de WE fueron diferentes para cada reactivo. No se recopilaron datos de respuesta a la dosis; en su lugar, el experimento fue aplicar 450 mV a través de cada WE y CE y realizar un experimento "cinético", donde se realizó el seguimiento de la corriente desde el momento en que se aplicó la muestra.

10 Resultados: la FIG. 12A muestra la respuesta de 350 mg/dl de glucosa, 350 mg/dl de maltosa o 350 mg/dl de xilosa en el electrodo que tiene la PQQ-GDH mutante con baja sensibilidad a la maltosa. No se observó respuesta de xilosa significativa en el electrodo con PQQ-GDH mutante. Si hubiera habido interferencia provocada por el reactivo FAD-GDH, se habría esperado ver una respuesta de xilosa significativa.

15 La FIG. 12B muestra la respuesta de 350 mg/dl de glucosa, 350 mg/dl de maltosa y 350 mg/dl de xilosa en el electrodo FAD-GDH. Se observó una respuesta de maltosa mínima en el electrodo FAD-GDH. Se observó alguna señal debida a la xilosa, lo que se esperaba debido a la interferencia de xilosa con FAD-GDH.

20

#### Lista de números de referencia

- 10 elemento de prueba de diagnóstico
- 25 12 sustrato de soporte
- 14 espaciador
- 16 cubierta
- 30 18 primera superficie
- 20 segunda superficie
- 35 22 primer extremo
- 24 segundo extremo
- 26 borde lateral
- 40 28 borde lateral
- 30 canal capilar
- 45 32 borde de extremo
- 34 superficie interior
- 36 superficie inferior
- 50 38 medidor
- 40 puerto de elemento de prueba
- 55 42 pantalla
- 44 medio de entrada

REIVINDICACIONES

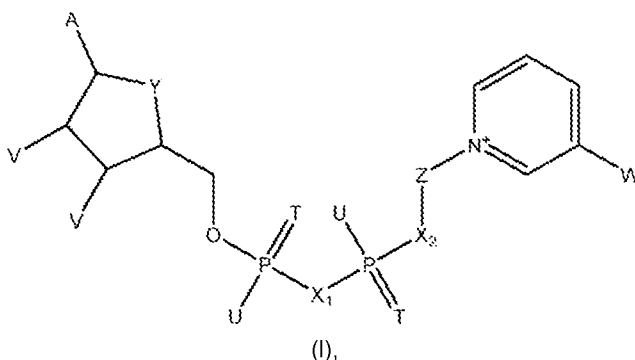
1. Un elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo (10) que comprende:
- 5 una cubierta (16);
- un espaciador (14); y
- 10 un sustrato de base no conductor (12) que tiene sobre el mismo un primer sistema de electrodos en comunicación con un primer reactivo de detección seco y un segundo sistema de electrodos en comunicación con un segundo reactivo de detección seco, en el que el primer sistema de electrodos comprende un primer electrodo de trabajo y un contraelectrodo y el segundo sistema de electrodos comprende un segundo electrodo de trabajo, en el que el
- 15 contraelectrodo del primer sistema de electrodos proporciona la función de contraelectrodo para el segundo sistema de electrodos; en el que:
- el primer reactivo de detección seco es para la detección de un primer analito en una muestra de líquido corporal y se aplica al primer sistema de electrodos; en el que el primer reactivo de detección seco comprende una primera enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la primera enzima, una primera coenzima y un primer
- 20 mediador; y
- el segundo reactivo de detección seco es para la detección de un segundo analito en la muestra de líquido corporal y se aplica al segundo sistema de electrodos; en el que el segundo reactivo de detección seco comprende una segunda enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la segunda enzima, una segunda coenzima y un
- 25 segundo mediador, que es distinto del primer mediador;
- y configurado de modo que, en uso, el contraelectrodo se usa como contraelectrodo para la medición del primer analito en el primer electrodo de trabajo y como contraelectrodo para la medición del segundo analito en el segundo electrodo de trabajo;
- 30 en el que:
- el sustrato de base no conductor tiene una primera superficie (18) orientada hacia el espaciador y una segunda superficie (20) que está opuesta a la primera superficie;
- 35 el espaciador se dispone sobre la primera superficie del sustrato de base no conductor;
- la cubierta se sitúa sobre el espaciador;
- 40 la cubierta, espaciador y sustrato de base no conductor forman juntos una cámara de muestra (30);
- la cámara de muestra funciona como un capilar y se define como el espacio entre la cubierta y el sustrato y se une por un lado por el espaciador;
- 45 el espaciador tiene un borde de extremo (32) sustancialmente paralelo a un primer extremo (22) del sustrato de base no conductor, definiendo de este modo el delimitador de la cámara de muestra extendiéndose a través de todo el ancho del sustrato de base no conductor; y
- 50 configurado de modo que aplicar una muestra al primer extremo del sustrato de base no conductor permitirá que una muestra llene la cámara de muestra desde el primer extremo del sustrato de base no conductor o desde los lados (26, 28);
- en el que:
- 55 (i) la cámara de muestra incluye un par de electrodos de suficiencia de muestra situados a lo largo de un respectivo borde lateral del sustrato de base no conductor, en el que el primer electrodo de trabajo y el contraelectrodo se sitúan contiguos a un electrodo de suficiencia de muestra, y el segundo electrodo de trabajo se sitúa contiguo al otro electrodo de suficiencia de muestra, y el segundo electrodo de trabajo tiene un área de trabajo mayor que el primer electrodo de trabajo; o
- 60 (ii) la cámara de muestra incluye un par de electrodos de suficiencia de muestra situados a lo largo de un respectivo borde lateral del sustrato de base no conductor, en el que el contraelectrodo se extiende a través de la cámara de muestra y está más cerca del borde lateral que el primer electrodo de trabajo y el segundo electrodo de trabajo, en el que el primer electrodo de trabajo y el segundo electrodo de trabajo tienen áreas de trabajo equivalentes.
- 65

2. El elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo de la reivindicación 1, en el que la primera enzima dependiente de coenzima y la segunda enzima dependiente de coenzima se seleccionan del grupo que consiste en una alcohol deshidrogenasa, una glucosa deshidrogenasa, una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, una glucosa oxidasa, una glicerol deshidrogenasa, una hidroxibutirato deshidrogenasa, una malato deshidrogenasa, una sorbitol deshidrogenasa, una aminoácido deshidrogenasa que comprende L-aminoácido deshidrogenasa y una oxidasa o deshidrogenasa dependiente de dinucleótido de flavina y adenina (FAD), dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) o pirroloquinolina-quinona (PQQ);

en el que preferentemente:

- la primera enzima dependiente de coenzima es glucosa deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o glucosa oxidasa;
- la segunda enzima dependiente de coenzima es hidroxibutirato deshidrogenasa;
- la primera enzima dependiente de coenzima es glucosa deshidrogenasa y la segunda enzima dependiente de coenzima es hidroxibutirato deshidrogenasa; o
- tanto la primera enzima dependiente de coenzima como la segunda enzima dependiente de coenzima son glucosa deshidrogenasa, glucosa oxidasa o hidroxibutirato deshidrogenasa.

3. El elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo de la reivindicación 1, en el que la primera coenzima y la segunda coenzima se seleccionan del grupo que consiste en un dinucleótido de flavina y adenina (FAD), un dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), una pirroloquinolina-quinona (PQQ), un tio-NAD, un tio-NADP, una PQQ o una coenzima artificial tal como un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal o una forma reducida del mismo, y en el que el compuesto de acuerdo con la fórmula (I) es como sigue:



en la que:

A = adenina o un análogo de la misma,

T = en cada caso indica independientemente O o S,

U = en cada caso indica independientemente OH, SH, BH<sub>3</sub><sup>-</sup> o BCNH<sub>2</sub><sup>-</sup>,

V = en cada caso indica independientemente OH o un grupo fosfato,

W = COOR, CON(R)<sub>2</sub>, COR o CSN(R)<sub>2</sub> en el que R en cada caso indica independientemente H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>,

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> = en cada caso indican independientemente O, CH<sub>2</sub>, CHCH<sub>3</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH o NCH<sub>3</sub>,

Y = NH, S, O o CH<sub>2</sub>,

Z = un residuo que comprende un grupo cíclico con 5 átomos de C que opcionalmente contiene un heteroátomo seleccionado de O, S y N y opcionalmente uno o más sustituyentes, y un residuo CR<sub>4</sub> en el que CR<sub>4</sub> está unido al grupo cíclico y a X<sub>2</sub>, y

donde R<sub>4</sub> = en cada caso indica independientemente H, F, Cl o CH<sub>3</sub>, siempre que Z y el residuo piridina no estén enlazados por un enlace glucosídico,

o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo;

en el que preferentemente:

- 5 - la primera coenzima es FAD, NAD, NADP o el compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo;
- la primera coenzima es FAD;
- 10 - la segunda coenzima es carba-NAD, carba-NADP, tio-NAD o tio-NADP;
- la primera coenzima es FAD y la segunda coenzima es carba-NAD; o
- tanto la primera coenzima como la segunda son carba-NAD o PQQ.

15 4. El elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo de la reivindicación 1, en el que el primer mediador y el segundo mediador se seleccionan del grupo que consiste en un compuesto azo o un precursor azo, benzoquinona, azul de meldola, una nitrosoanilina o un precursor basado en nitrosoanilina, una fenacina o un precursor basado en fenacina, una quinona o un derivado de quinona, una tiacina o un derivado de tiacina, un complejo de metal de transición tal como ferricianuro de potasio y derivados de osmio, y una combinación de una fenacina/precursor basado en fenacina y cloruro de hexamina-rutenio, así como derivados de los mismos;

en el que preferentemente:

- 25 - el primer mediador es un derivado de nitrosoanilina o precursor basado en nitrosoanilina, ferricianuro, hexamina de rutenio o fenacina; en el que más preferentemente el primer mediador es clorhidrato de N,N-bis(hidroxietyl)-3-metoxi-4-nitrosoanilina;
- 30 - el segundo mediador es azul de meldola, una fenacina o precursor basado en fenacina, o una quinona o un derivado de quinona; en el que más preferentemente el segundo mediador es 1-(3-carboxi-propionilamino)-5-etil-fenacin-5-io;
- el primer mediador es clorhidrato de N,N-bis(hidroxietyl)-3-metoxi-4-nitrosoanilina y el segundo mediador es 1-(3-carboxi-propionilamino)-5-etil-fenacin-5-io; o
- 35 - tanto el primer mediador como el segundo mediador son clorhidrato de N,N-bis(hidroxietyl)-3-metoxi-4-nitrosoanilina.

40 5. El elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo de la reivindicación 1, en el que:

i) la primera enzima dependiente de coenzima es glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD, la primera coenzima es FAD, y el primer mediador es clorhidrato de N,N-bis(hidroxietyl)-3-metoxi-4-nitrosoanilina, y en el que la segunda enzima dependiente de coenzima es hidroxibutirato deshidrogenasa, la segunda coenzima es carba-NAD, carba-NADP, tio-NAD o tio-NADP, y el segundo mediador es 1-(3-carboxi-propionilamino)-5-etil-fenacin-5-io;

o

50 ii) la primera enzima dependiente de coenzima es glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD, la primera coenzima es FAD, y el primer mediador es clorhidrato de N,N-bis(hidroxietyl)-3-metoxi-4-nitrosoanilina (NA1144), y en el que la segunda enzima dependiente de coenzima es glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD o una glucosa oxidasa, la segunda coenzima es FAD o PQQ, y el segundo mediador es un ferricianuro o una nitrosoanilina distinta de NA1144 como mediador.

55 6. El elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo de la reivindicación 1, en el que la primera enzima dependiente de coenzima y la primera coenzima o la segunda enzima dependiente de coenzima y la segunda coenzima están unidas covalente o iónicamente entre sí.

60 7. El elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

el primer sistema de electrodos se proporciona sobre el sustrato de base no conductor (12), comprendiendo el primer sistema de electrodos el primer contraelectrodo, el primer electrodo de trabajo, un primer cable de contraelectrodo, un primer cable de electrodo de trabajo, una primera almohadilla de contacto de contraelectrodo y una primera almohadilla de contacto de electrodo de trabajo, en el que el primer cable de contraelectrodo conecta

eléctricamente el primer contraelectrodo a la primera almohadilla de contacto de contraelectrodo y el primer cable de electrodo de trabajo conecta eléctricamente el primer electrodo de trabajo a la primera almohadilla de contacto de electrodo de trabajo, y en el que al menos el primer contraelectrodo y el primer electrodo de trabajo se localizan en un área del canal capilar;

5

el segundo sistema de electrodos se proporciona sobre el sustrato no conductor pero en una localización distinta de una localización del primer sistema de electrodos, comprendiendo el segundo sistema de electrodos el segundo electrodo de trabajo, un segundo cable de electrodo de trabajo y una segunda almohadilla de contacto de electrodo de trabajo, en el que el segundo cable de electrodo de trabajo conecta eléctricamente el segundo electrodo de trabajo a la segunda almohadilla de contacto de electrodo de trabajo, y en el que al menos el segundo electrodo de trabajo se localiza en un área del canal capilar; y

10

el primer reactivo de detección seco se aplica al primer sistema de electrodos y el segundo reactivo de detección seco se aplica al segundo sistema de electrodos, el reactivo de detección seco localizado en un área del canal capilar.

15

8. El elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo de la reivindicación 7, en el que

20

- el borde de la cubierta se extiende a través del primer cable de contraelectrodo, el primer cable de electrodo de trabajo y el segundo cable de electrodo de trabajo de modo que el primer contraelectrodo, el primer electrodo de trabajo y el segundo contraelectrodo se localizan completamente dentro del canal capilar; o

25

- el primer electrodo de trabajo tiene un área de trabajo que es equivalente a o menor que un área de trabajo del segundo electrodo de trabajo.

9. Un procedimiento para determinar la concentración de un primer analito y un segundo analito en una muestra de líquido corporal, que comprende:

30

aplicar la muestra de líquido corporal a un elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;

aplicar una primera secuencia de prueba eléctrica al primer electrodo de trabajo y al contraelectrodo, obteniendo de este modo información de respuesta relacionada con el primer analito;

35

aplicar una segunda secuencia de prueba eléctrica al segundo electrodo de trabajo y al contraelectrodo, obteniendo de este modo información de respuesta relacionada con el segundo analito;

determinar la concentración del primer analito a partir de la información de respuesta obtenida para el primer analito;

40

determinar la concentración del segundo analito a partir de la información de respuesta obtenida para el segundo analito; y

45

presentar información a un usuario con respecto a una o ambas concentraciones de analito.

10. Un procedimiento para medir electroquímicamente la concentración de un primer analito y un segundo analito en una muestra de líquido corporal, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

50

aplicar una muestra de líquido corporal que tiene o se sospecha que tiene el uno o más analitos de interés a un elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 de modo que la muestra de líquido corporal está en contacto fluido con el reactivo de detección seco para hidratar el reactivo de detección seco;

55

aplicar una secuencia de prueba eléctrica al elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo por medio de un medidor de prueba configurado para interactuar con el elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos de dosis de extremo de ancho completo, en el que la secuencia de prueba comprende:

60

a. un primer componente de corriente continua (CC) fijo que comprende una diferencia de potencial aplicada entre el primer contraelectrodo y el primer electrodo de trabajo para medir un primer analito de interés; y

b. un segundo componente de CC fijo que comprende una diferencia de potencial aplicada entre el primer contraelectrodo y el segundo electrodo de trabajo para medir un segundo analito de interés;

65

medir la información de respuesta a cada componente de la secuencia de prueba eléctrica con el medidor de

prueba; y

determinar una o más concentraciones de analito con el medidor de prueba usando la información de respuesta;

5 y opcionalmente comprende además la etapa de transmitir un mensaje a al menos uno de un usuario del elemento de prueba, profesional sanitario, cuidador y padre o tutor para ajustar un tratamiento o modificar una dieta en base a la una o más concentraciones de analito.

10 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la secuencia de prueba eléctrica comprende además:

i) un retraso después de aplicar la muestra de líquido corporal al elemento de prueba de diagnóstico de múltiples analitos para permitir que la muestra de líquido corporal hidrate el reactivo de detección seco, y en el que el retraso comprende una diferencia de potencial abierta o cercana a 0 V mantenida entre el primer contraelectrodo y el primer electrodo de trabajo así como entre el primer contraelectrodo y el segundo electrodo de trabajo;

15 o

ii) entre el primer componente de CC fijo y el segundo componente de CC fijo, una diferencia de potencial de CC cercana a 0 V mantenida entre el primer par de electrodos para permitir que una corriente de respuesta regrese a 0.

20 12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el primer componente de CC fijo es una pluralidad de pulsos de potencial aumentados a o de aproximadamente 0 V a aproximadamente +450 mV, estando separado cada pulso por un intervalo de recuperación durante el que se aplica una diferencia de potencial de aproximadamente 0 mV entre el primer contraelectrodo y el primer electrodo de trabajo, en el que:

i) el segundo componente de CC fijo sigue un intervalo de recuperación final y es una diferencia de potencial de aproximadamente +175 mV aplicada entre el primer contraelectrodo y el segundo electrodo de trabajo, en el que los pulsos e intervalos de recuperación del primer componente de CC fijo son cada uno durante de aproximadamente 50 ms a aproximadamente 500 ms, y en el que el segundo componente de CC fijo es de al menos aproximadamente 500 ms;

30 o

ii) el segundo componente de CC fijo sigue un intervalo de recuperación final y es una pluralidad de pulsos de potencial aumentados a o de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +175 mV, estando separado cada pulso por un intervalo de recuperación durante el que se aplica una diferencia de potencial de aproximadamente 0 mV entre el primer contraelectrodo y el segundo electrodo de trabajo, en el que los pulsos e intervalos de recuperación del primer componente de CC fijo y del segundo componente de CC fijo son cada uno durante de aproximadamente 50 ms a aproximadamente 500 ms;

y en el que preferentemente los pulsos de potencial del primer componente de CC fijo se aumentan durante aproximadamente 10 ms.

45 13. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la secuencia de prueba eléctrica comprende además:

i) un tercer componente de CC fijo, comprendiendo el tercer componente de CC fijo una pluralidad de pulsos de potencial que alterna entre aproximadamente -450 mV y aproximadamente +450 mV, y en el que el tercer componente de CC fijo se aplica entre el primer componente de CC fijo y el segundo componente de CC fijo;

50 o

ii) un intervalo de depósito durante el que se aplica una diferencia de potencial positiva entre el primer contraelectrodo y el primer electrodo de trabajo y opcionalmente entre el primer contraelectrodo y el segundo electrodo de trabajo para reducir una cantidad de mediador reducido presente en el reactivo de detección seco antes de una contribución significativa del uno o más analitos de interés, en el que el intervalo de depósito se aplica durante de aproximadamente 0,5 segundos a aproximadamente 1,0 segundos; o

iii) un componente de corriente alterna (CA), comprendiendo el componente de CA una pluralidad de señales de CA de baja amplitud; en el que preferentemente

a) el componente de CA comprende frecuencias de aproximadamente 10 kHz, aproximadamente 20 kHz, aproximadamente 10 kHz, aproximadamente 2 kHz y aproximadamente 1 kHz, y en el que cada frecuencia se aplica durante de aproximadamente 0,5 segundos a aproximadamente 1,5 segundos;

b) el componente de CA comprende frecuencias de aproximadamente 20 kHz, aproximadamente 10 kHz,

aproximadamente 2 kHz y aproximadamente 1 kHz, y en el que cada frecuencia se aplica durante de aproximadamente 0,5 segundos a aproximadamente 1,5 segundos; o

5 c) el componente de CA se aplica antes del primer componente de CC fijo y del segundo componente fijo.

14. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la muestra de líquido corporal comprende sangre y/o:

i) el primer analito es glucosa y el segundo analito es hidroxibutirato; en el que preferentemente:

10 - la primera enzima dependiente de coenzima es glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD, la primera coenzima es FAD, y el primer mediador es clorhidrato de N,N-bis(hidroxi-etil)-3-metoxi-4-nitrosoanilina, y

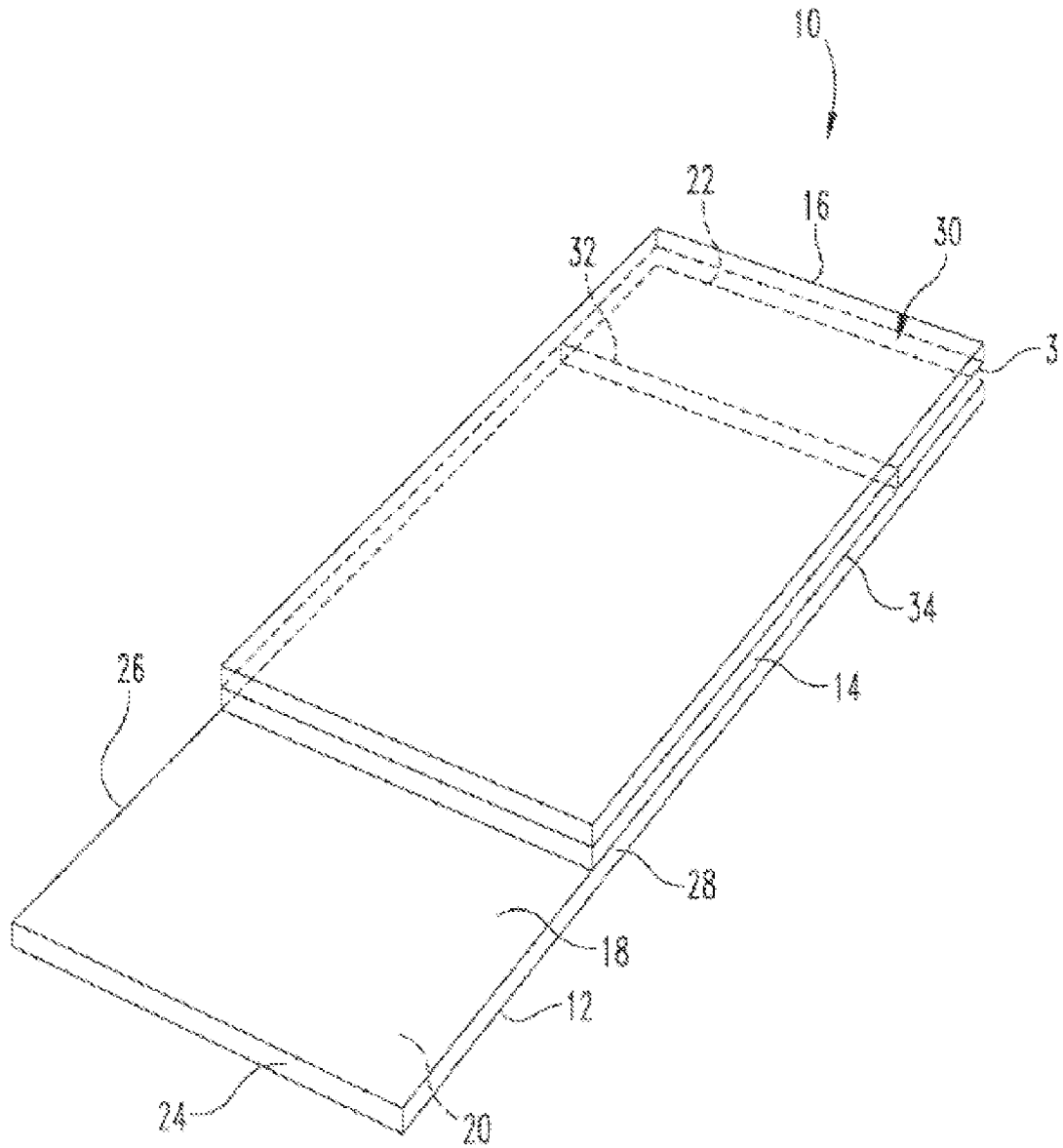
15 - la segunda enzima dependiente de coenzima es hidroxibutirato deshidrogenasa, la segunda coenzima es carba-NAD, carba-NADP, tio-NAD o tio-NADP, y el segundo mediador es 1-(3-carboxi-propionilamino)-5-etil-fenacin-5-ilo;

o

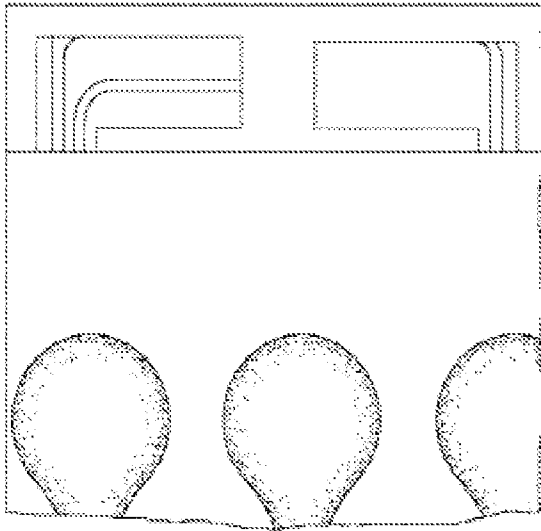
20 ii) el primer analito y el segundo analito son el mismo; en el que preferentemente el analito es glucosa; y en el que más preferentemente

- la primera enzima dependiente de coenzima es glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD, la primera coenzima es FAD y el primer mediador es clorhidrato de N,N-bis(hidroxi-etil)-3-metoxi-4-nitrosoanilina (NA1144), y

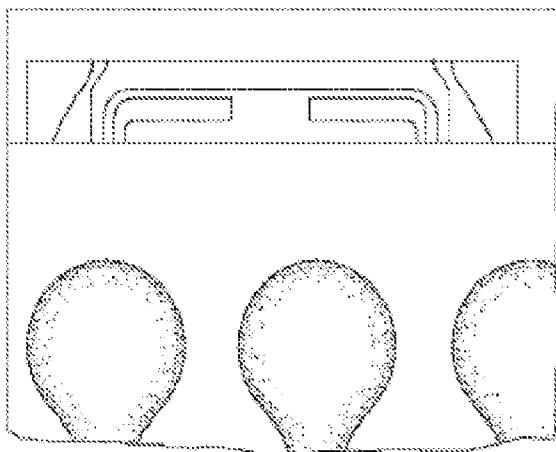
25 - la segunda enzima dependiente de coenzima es glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD o una glucosa oxidasa, la segunda coenzima es FAD o PQQ, y el segundo mediador es un ferricianuro o una nitrosoanilina distinta de NA1144 como mediador.



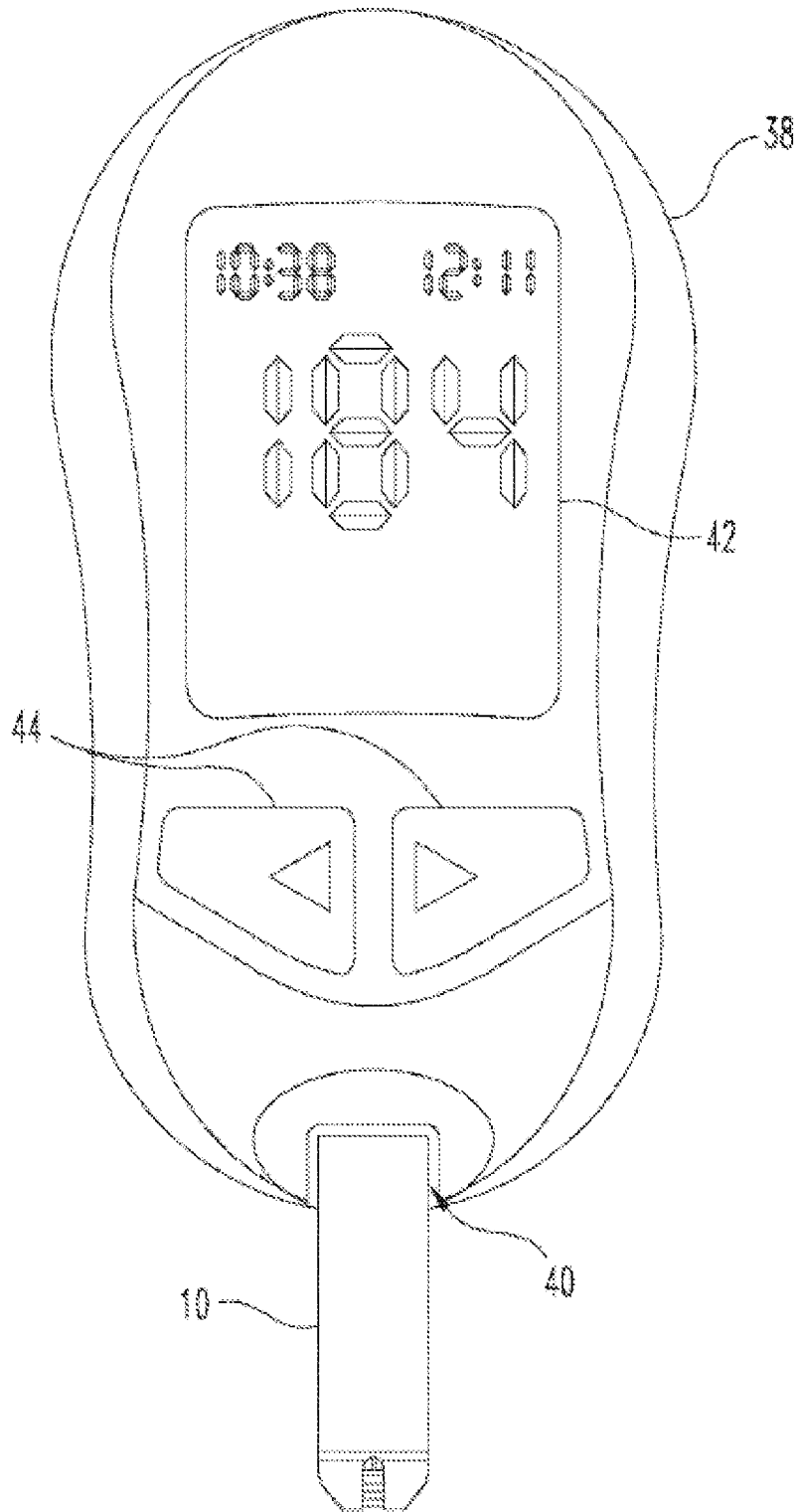
**FIG. 1**



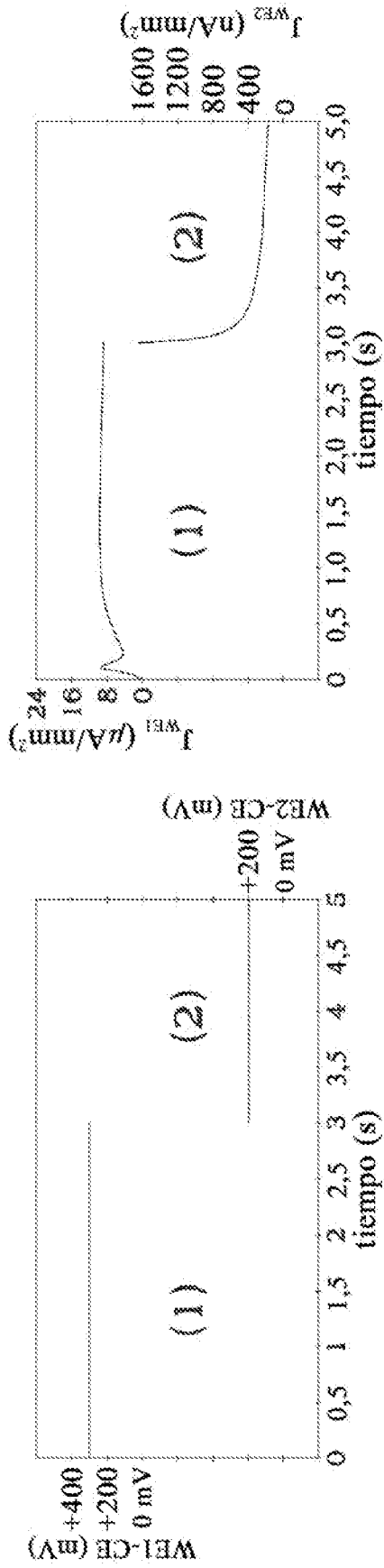
**FIG. 2A**



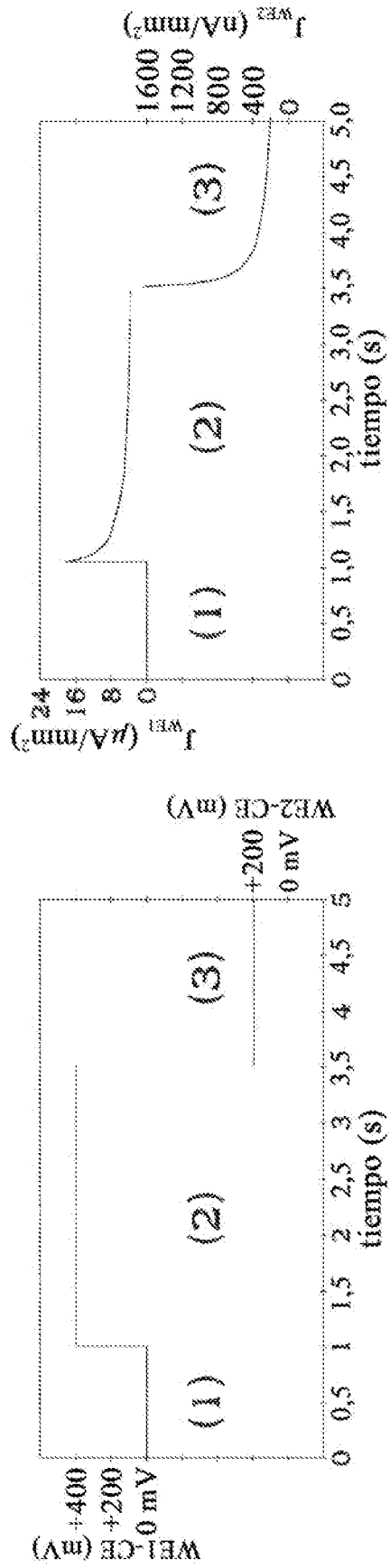
**FIG. 2B**



**FIG. 3**



**FIG. 4A**



**FIG. 4B**

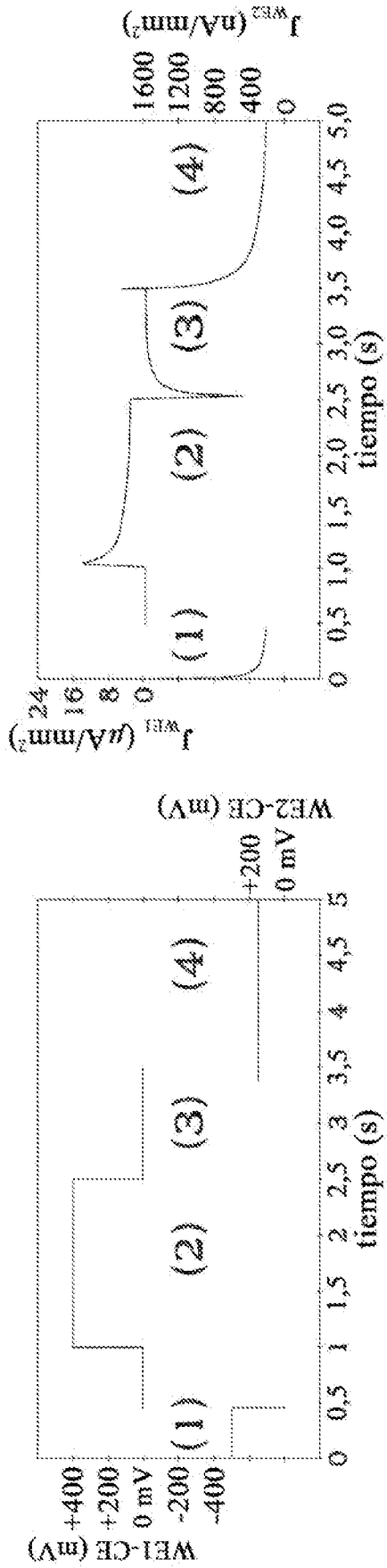


FIG. 4C

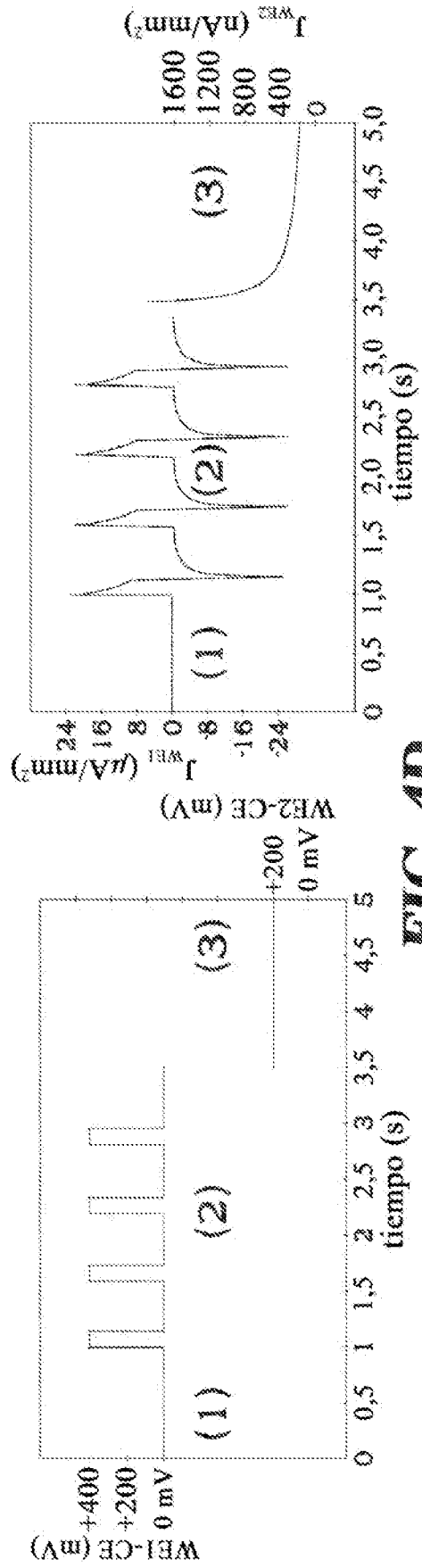


FIG. 4D

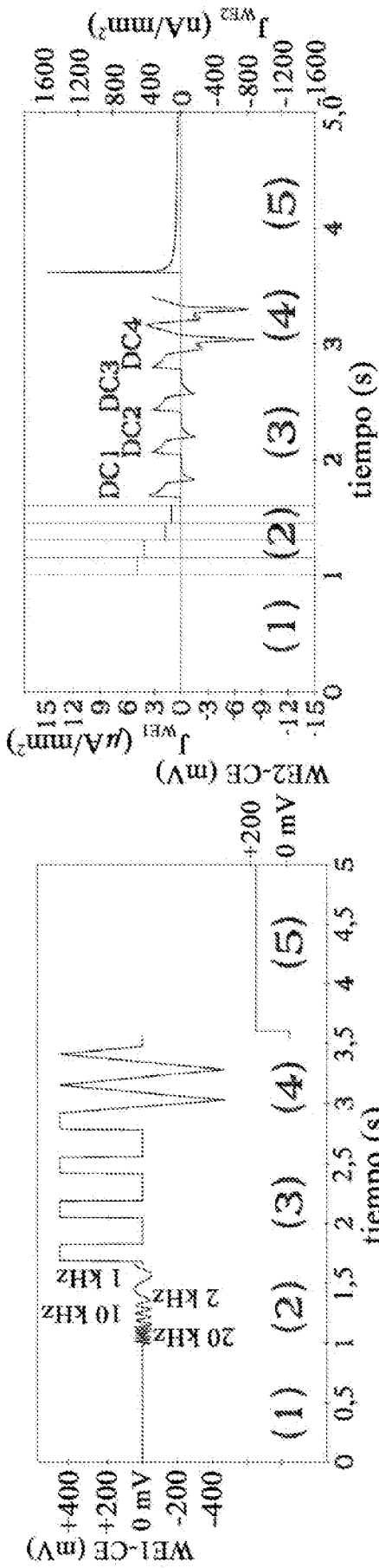


FIG. 4E

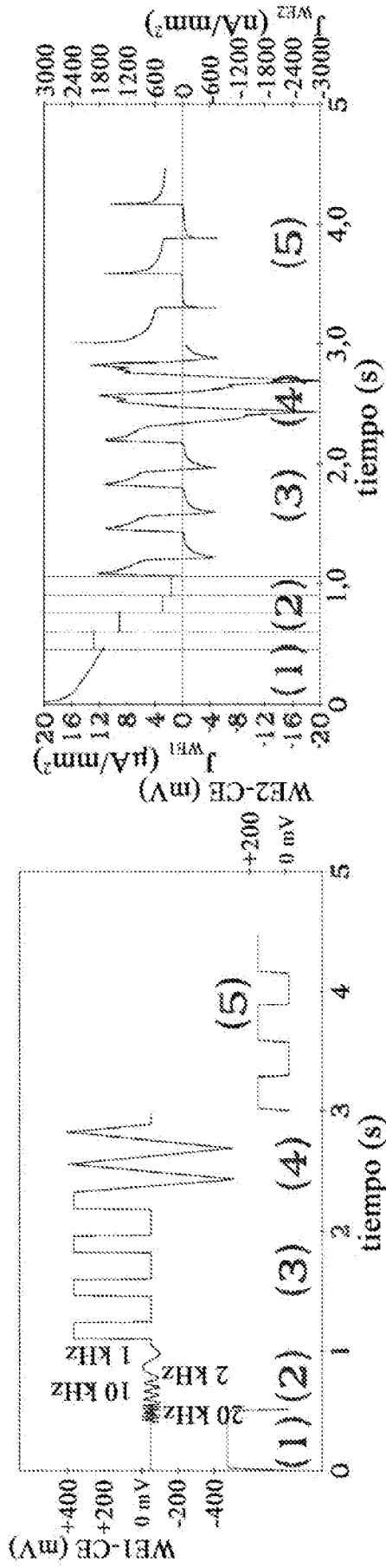
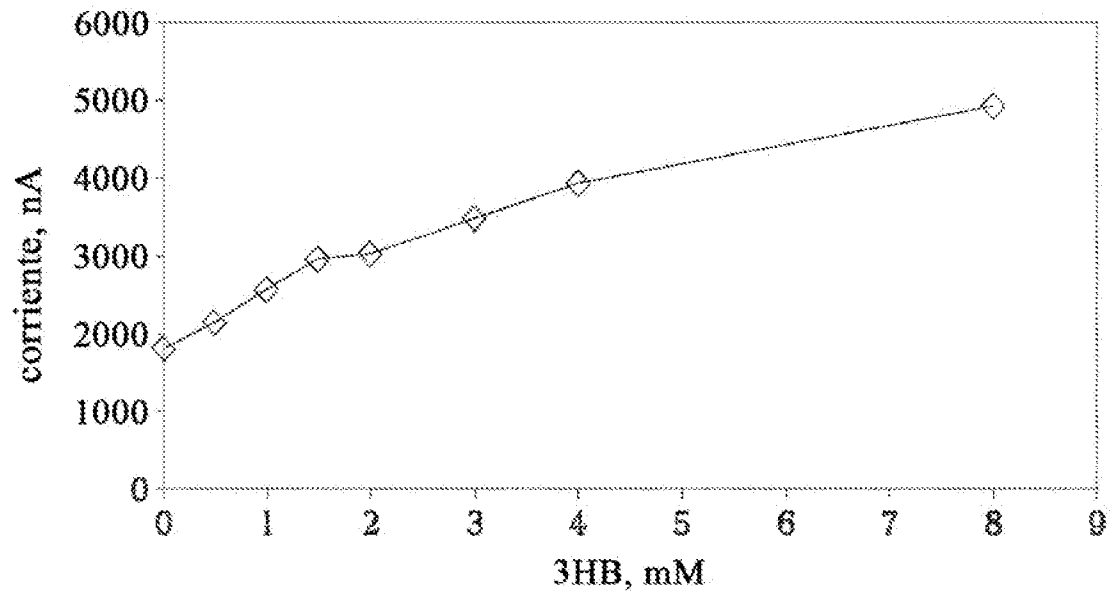
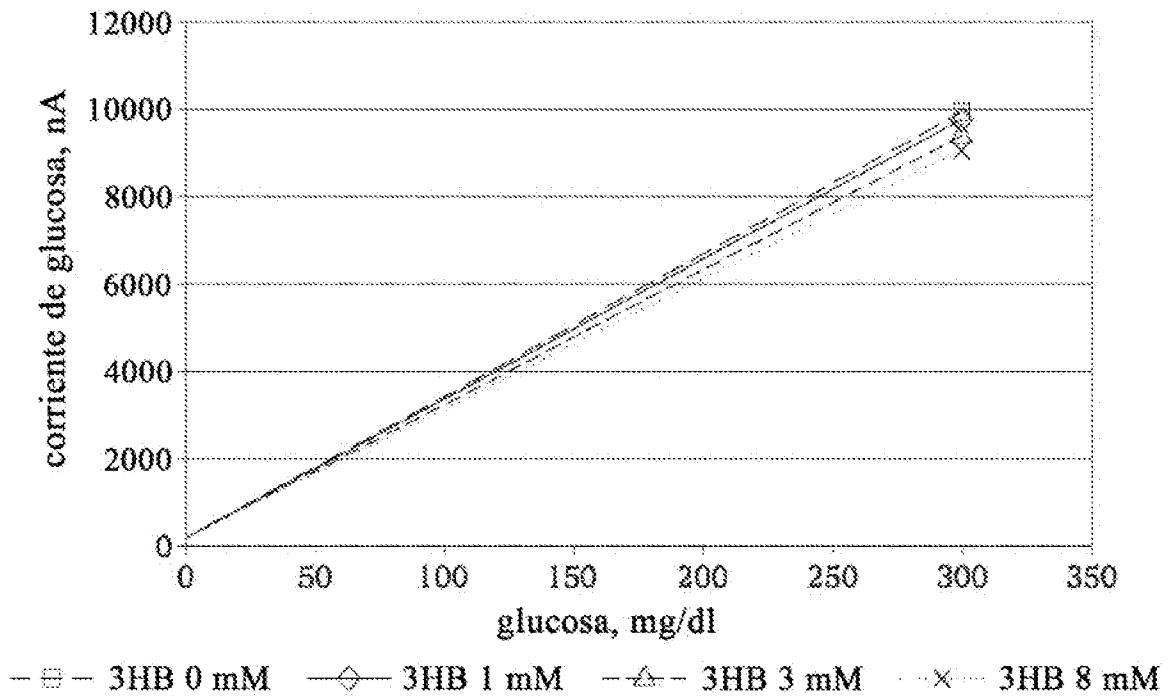


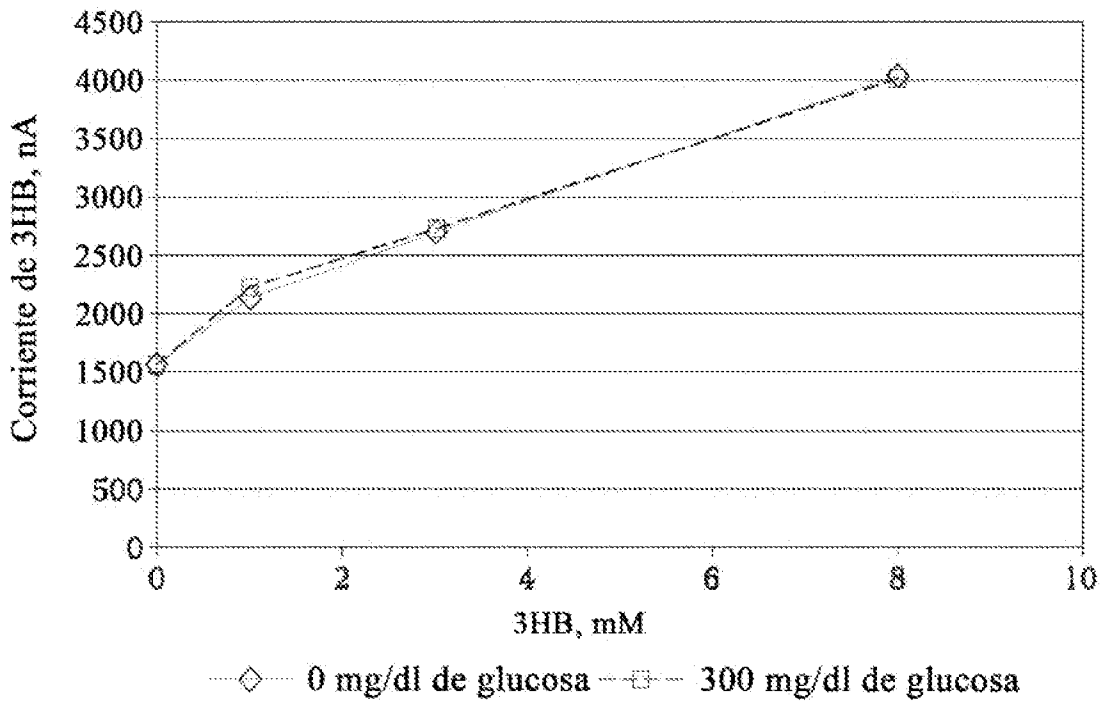
FIG. 4F



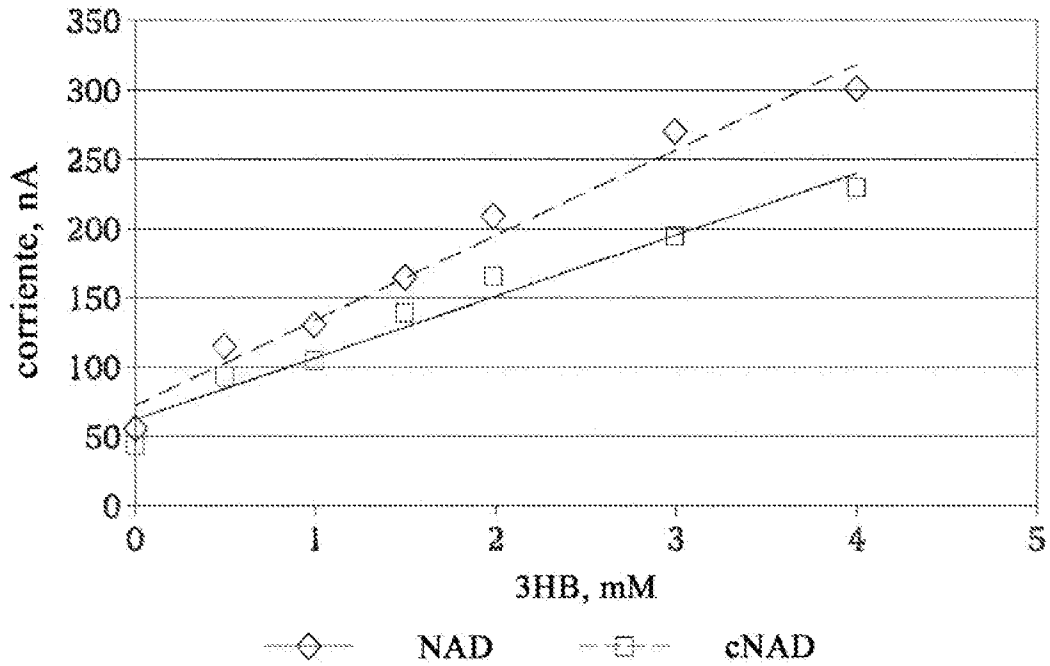
**FIG. 5**



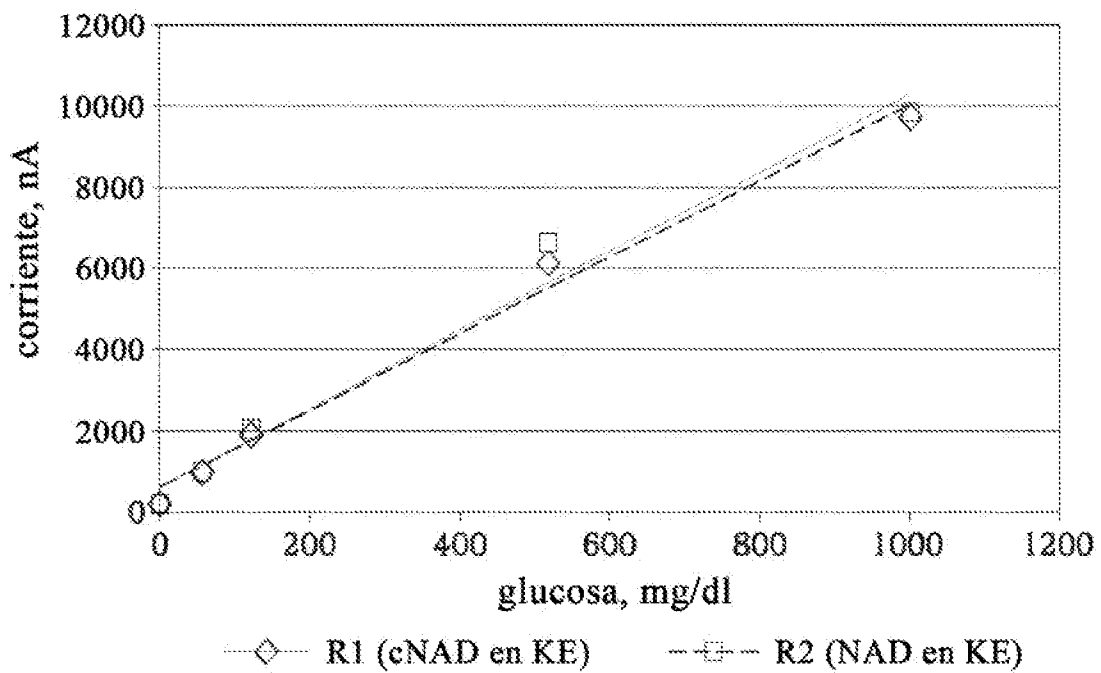
**FIG. 6A**



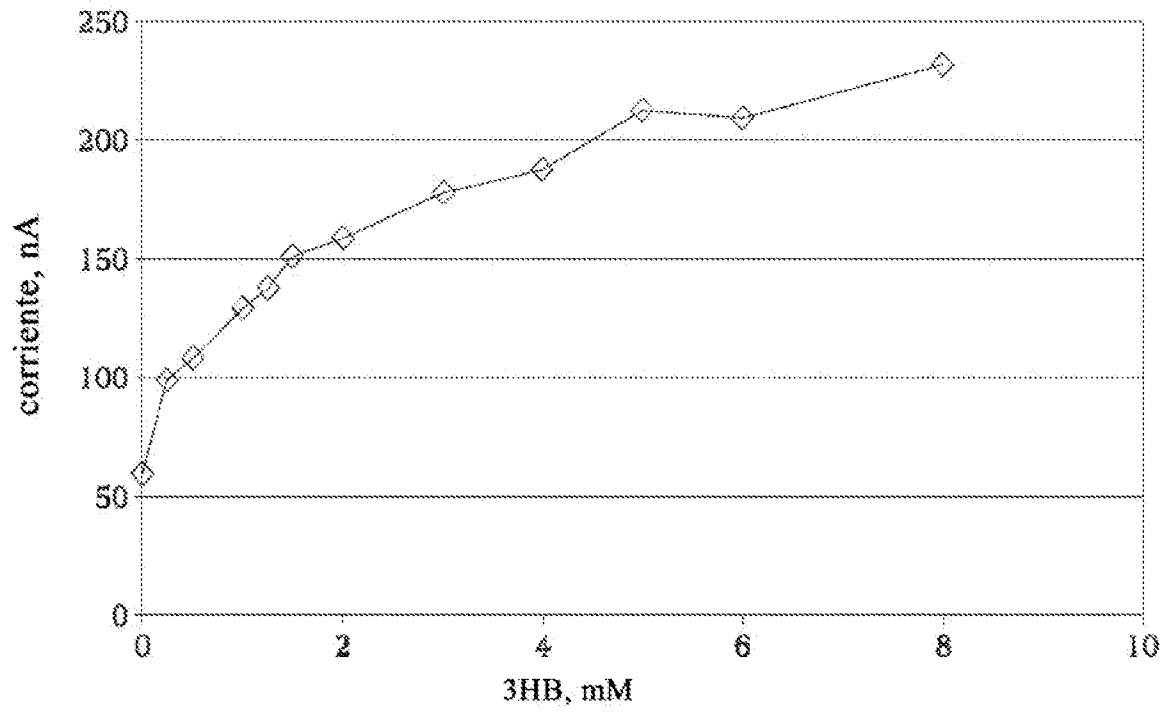
**FIG. 6B**



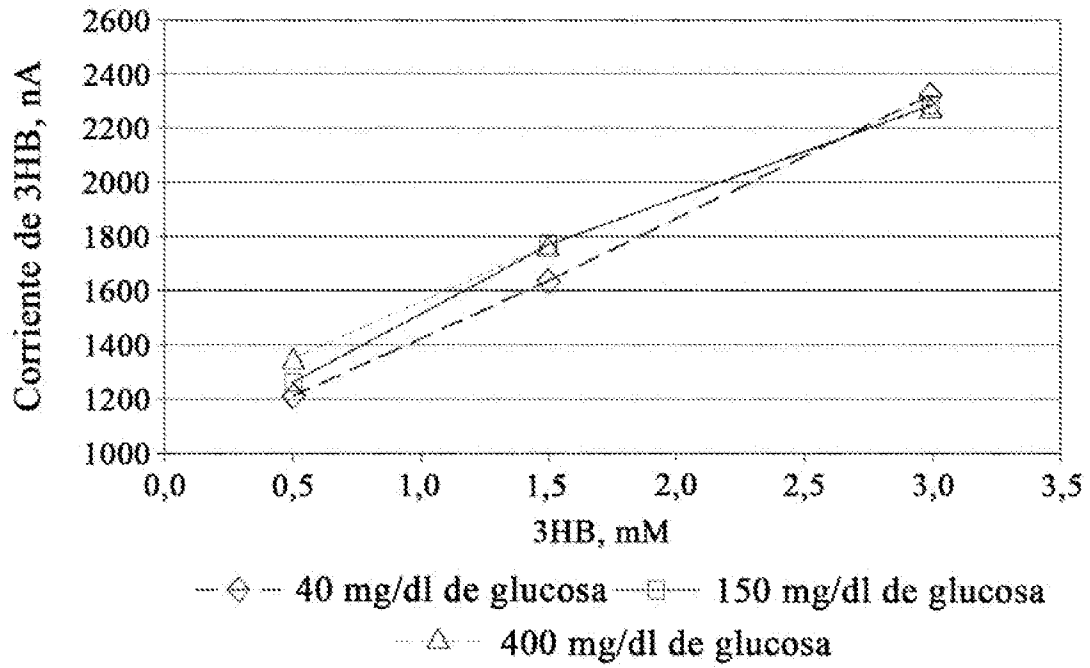
**FIG. 7A**



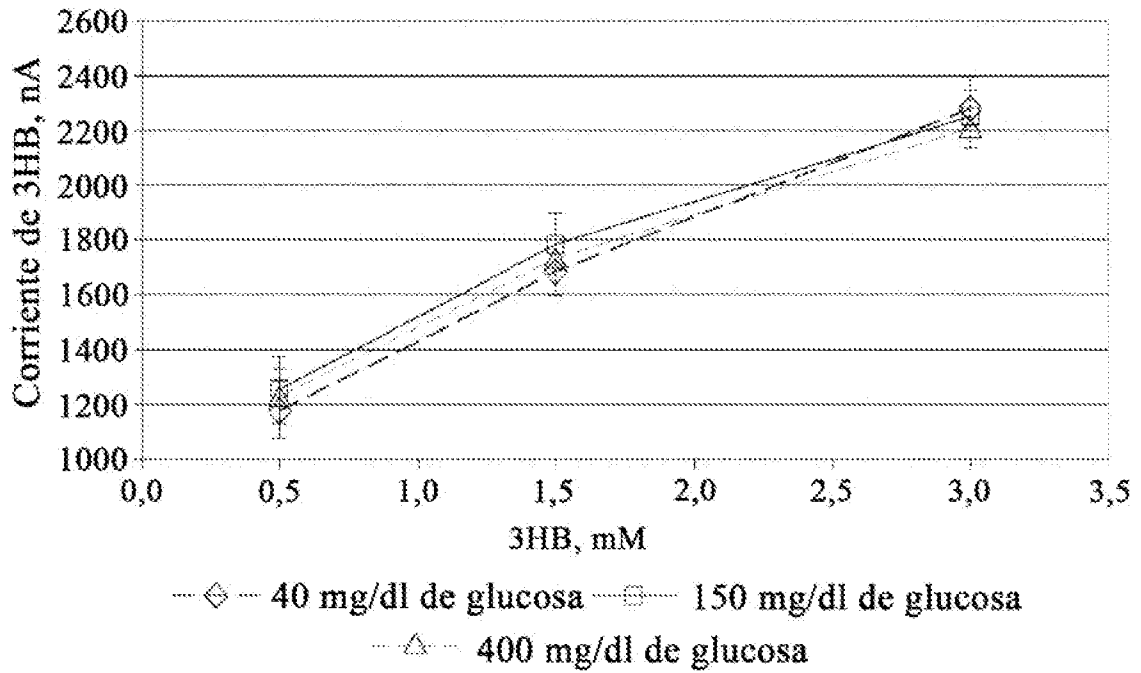
**FIG. 7B**



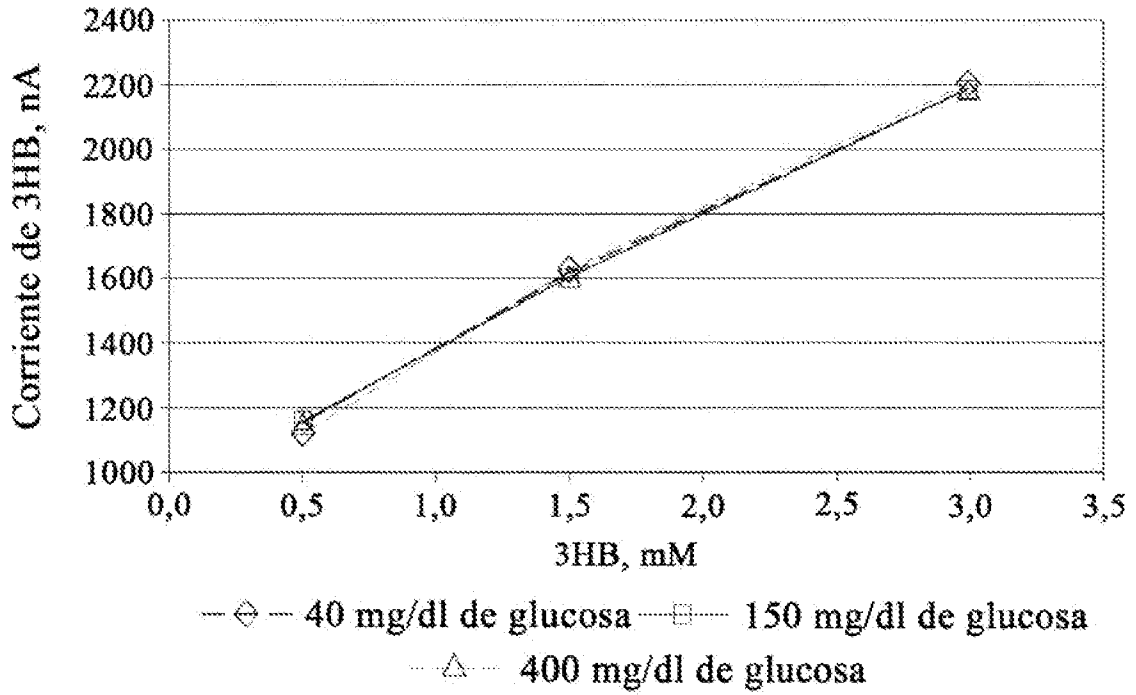
**FIG. 8**



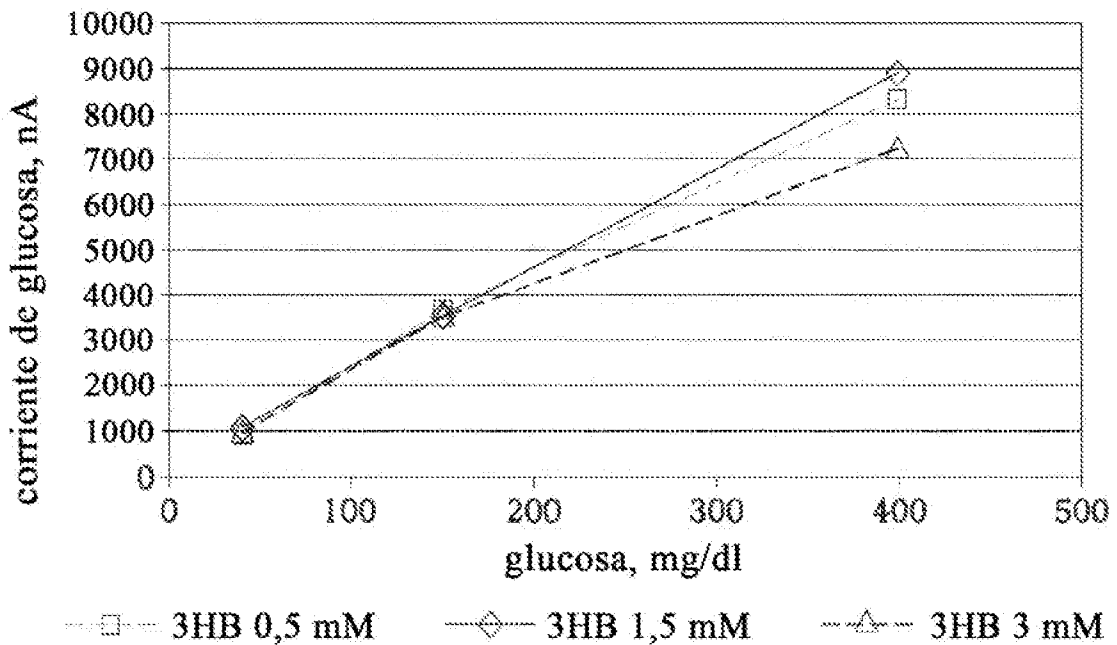
**FIG. 9A**



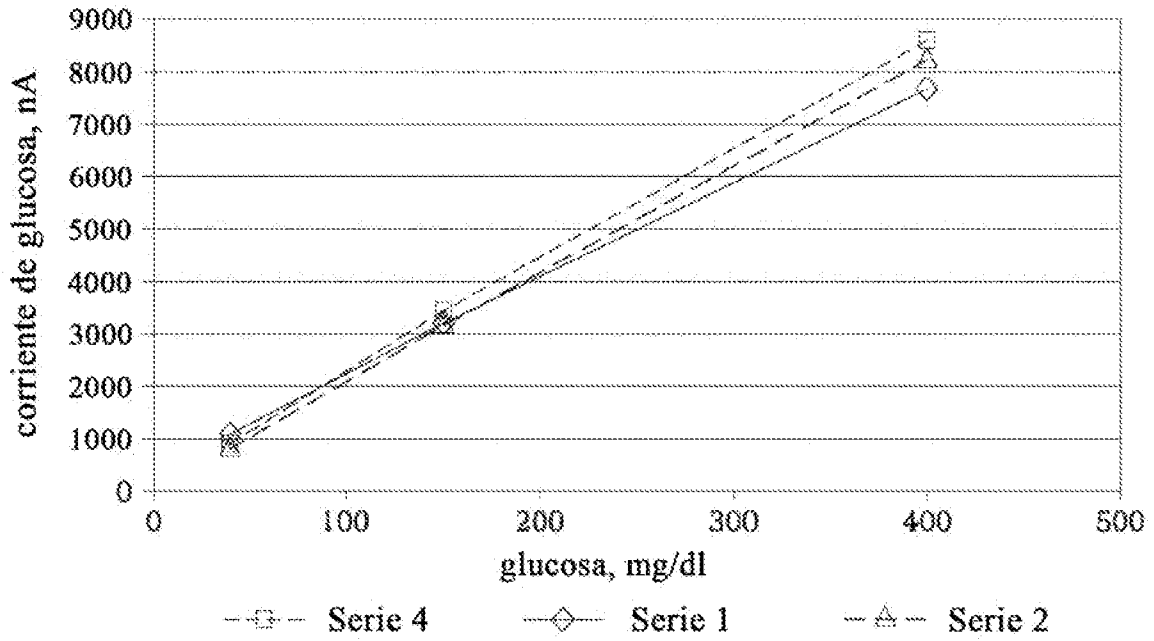
**FIG. 9B**



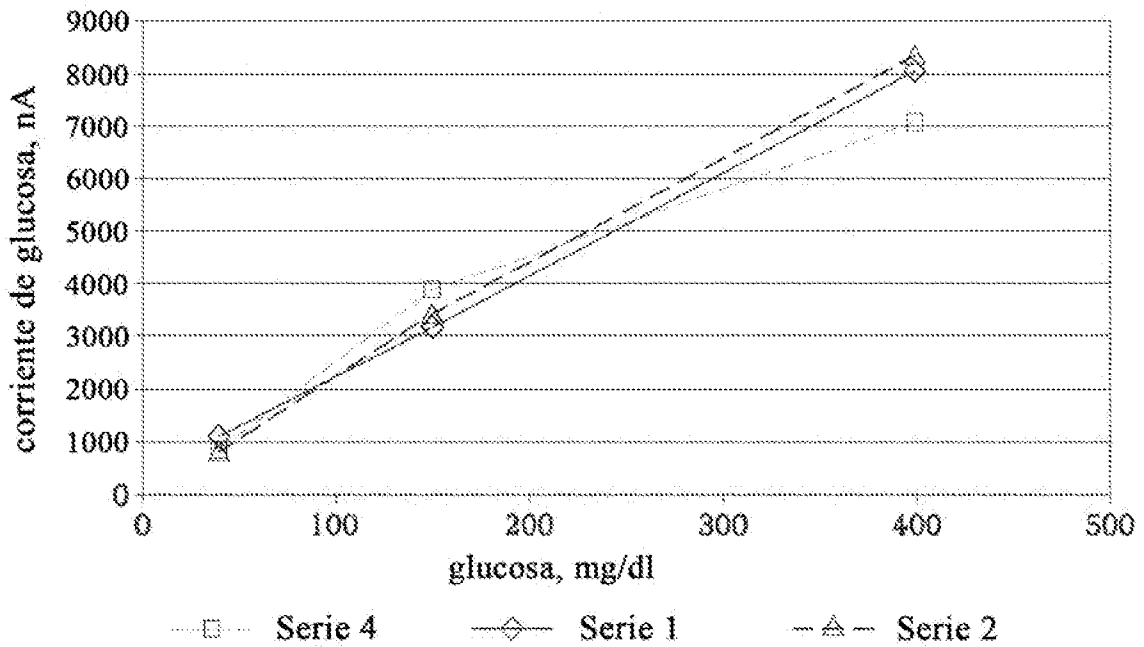
**FIG. 9C**



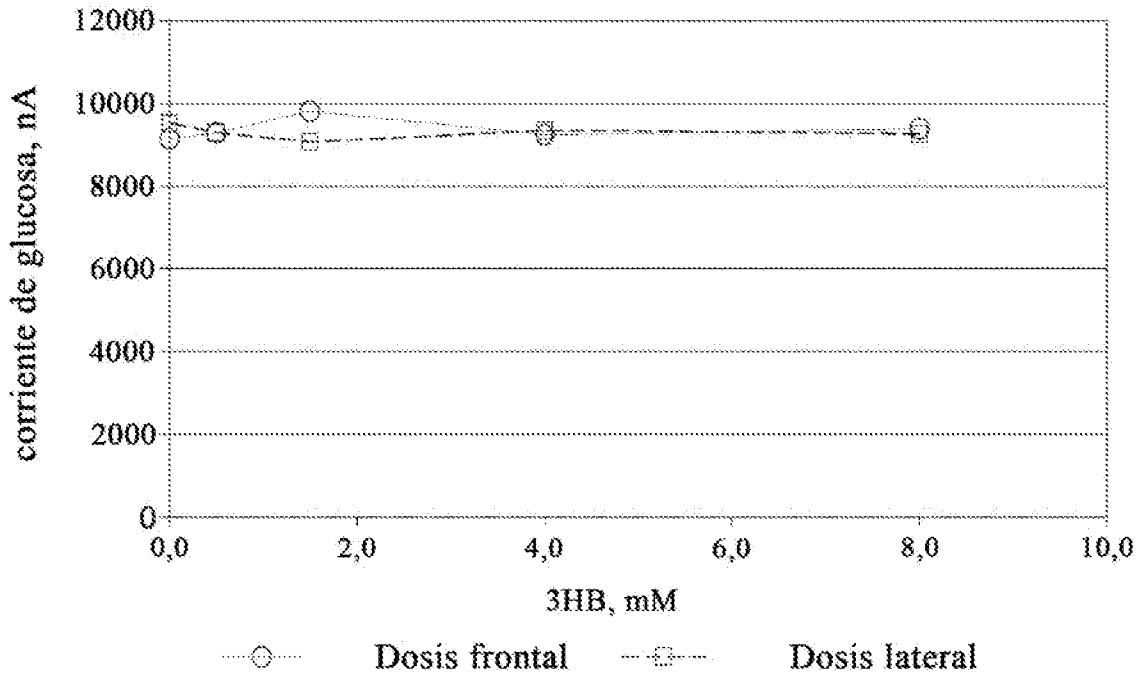
**FIG. 9D**



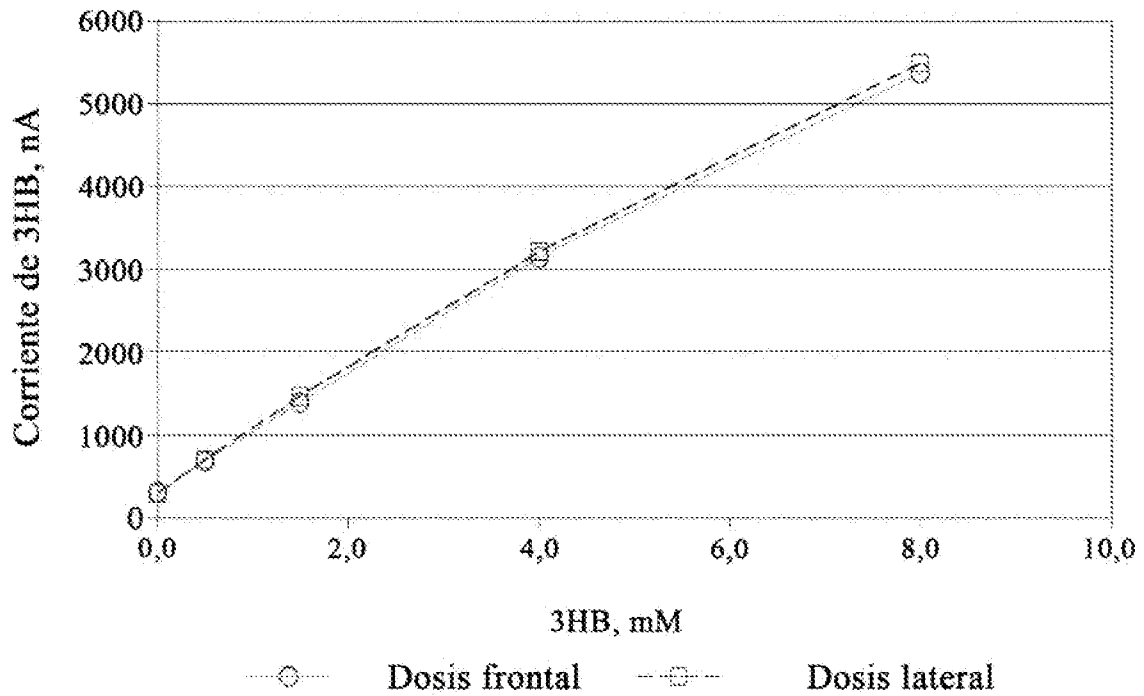
**FIG. 9E**



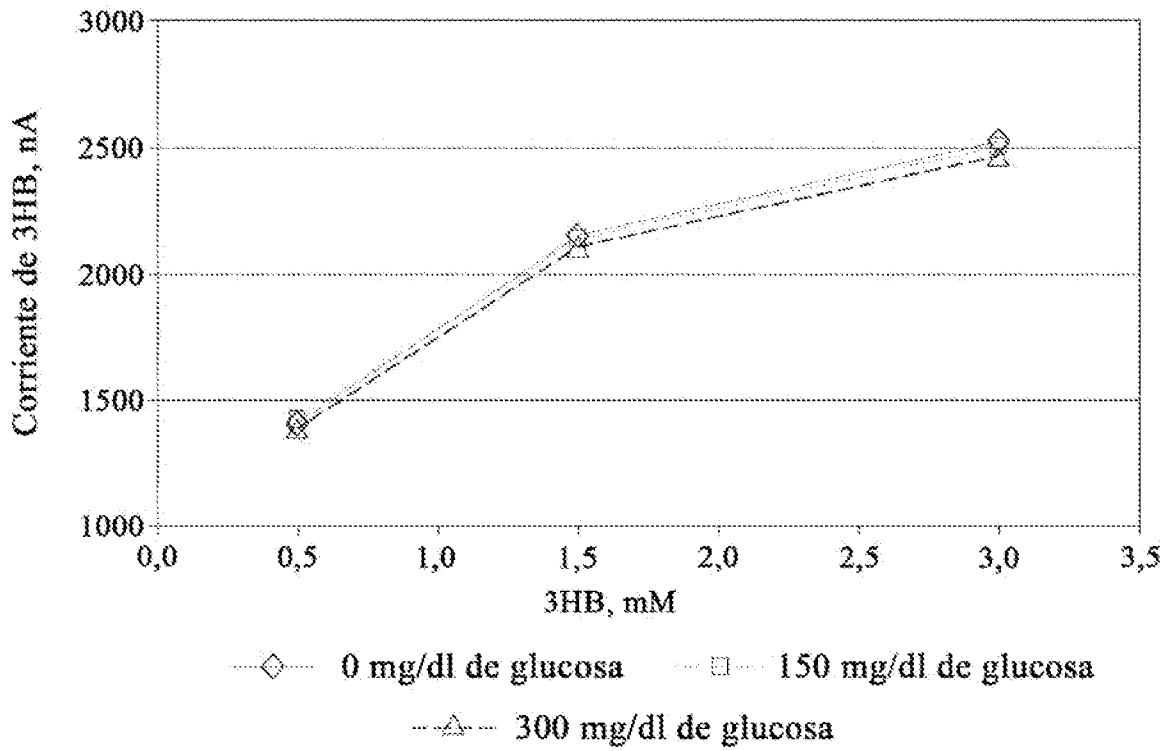
**FIG. 9F**



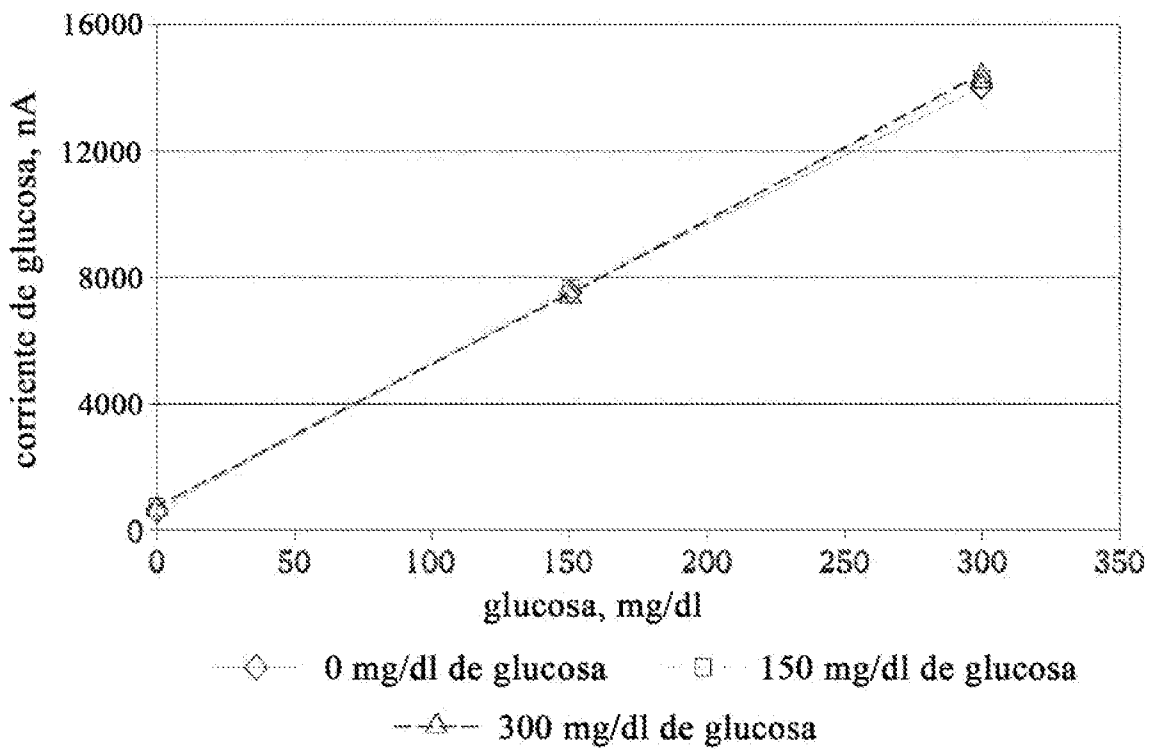
**FIG. 10A**



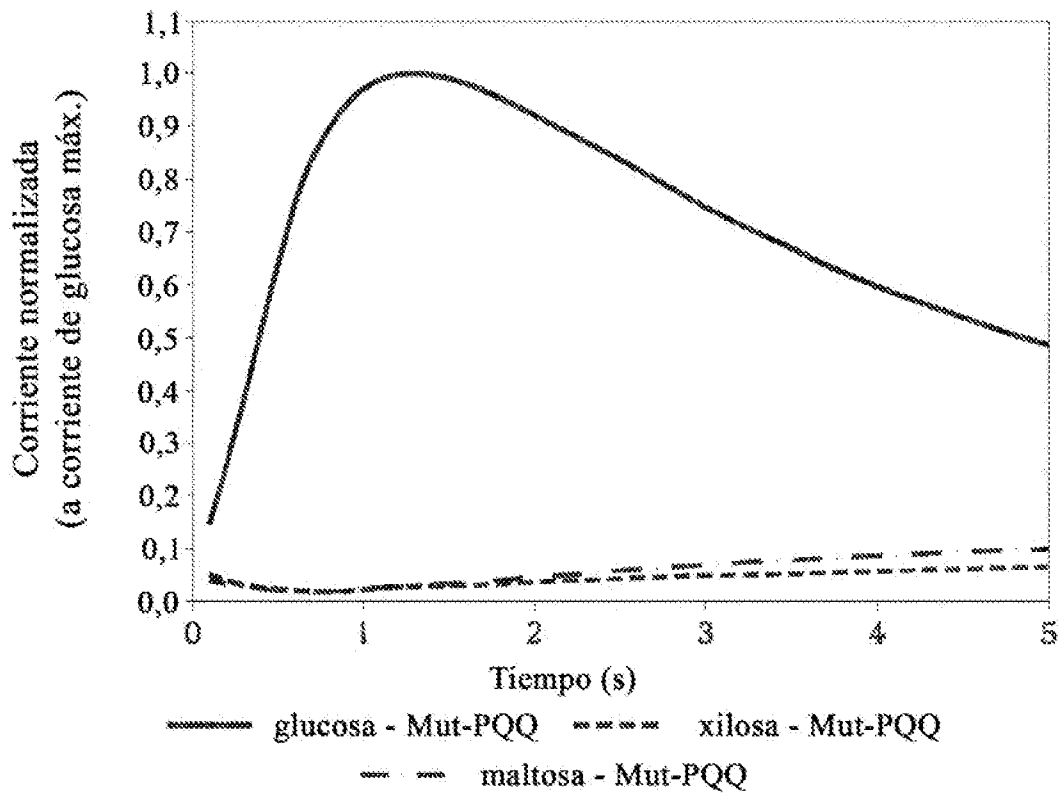
**FIG. 10B**



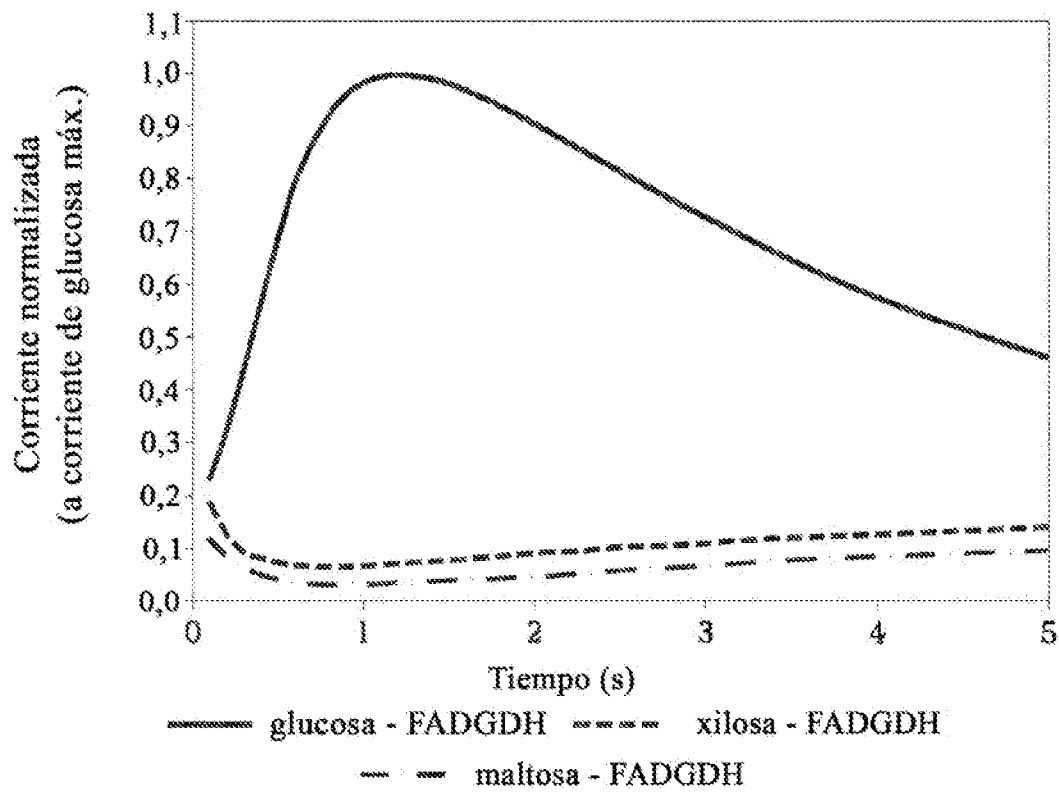
**FIG. 11A**



**FIG. 11B**



**FIG. 12A**



**FIG. 12B**