



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 279 776**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/00 (2006.01)
C12Q 1/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00989267 .0**
86 Fecha de presentación : **14.12.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1244809**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.10.2002**

54 Título: **Tiras reactivas con biosensor amperométrico.**

30 Prioridad: **22.12.1999 US 469899**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2007

73 Titular/es: **Roche Diagnostics Operations, Inc.**
9115 Hague Road, P.O. Box 50416
Indianapolis, Indiana 46250-0416, US

72 Inventor/es: **Wilsey, Christopher, D. y**
Burke, David, W.

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Tiras reactivas con biosensor amperométrico.

5 **Campo de la invención**

Esta invención está relacionada con un biosensor amperométrico utilizado para la determinación de las cantidades de ácido 3-hidroxibutírico en líquidos.

10 **Antecedentes y resumen de la invención**

El ácido 3-hidroxibutírico (desde este momento referido como "3-HBA") es producido por el metabolismo incompleto de los ácidos grasos en el hígado bajo condiciones que implican un uso defectuoso o un aporte insuficiente de carbohidratos. Siempre que se metabolizan cantidades aumentadas de grasas, como cuando la ingesta de carbohidratos está restringida, la concentración de cuerpos cetónicos como el 3-HBA, la acetona o el ácido acetoacético pueden incrementar. Cuando existe una concentración excesiva de cuerpos cetónicos en sangre esta alteración se denomina cetosis.

La diabetes mellitus es un trastorno que está asociado con la cetosis. La diabetes mellitus es un trastorno del metabolismo de la glucosa. En la diabetes por deficiencia de insulina, el metabolismo de la glucosa está lo suficientemente alterado como para que se utilicen los ácidos grasos para cumplir con las necesidades energéticas del organismo. En el caso de que se metabolicen cantidades excesivas de ácidos grasos, los cuerpos cetónicos se acumulan en la sangre, es decir, se produce cetosis, y se excretan con la orina, es decir, se produce cetonuria. Además, los cuerpos cetónicos se excretan fuera del organismo en combinación con iones básicos normales, de modo que se reduce la potencia del organismo para combinar el dióxido de carbono y se provoca una acidosis sistémica, es decir, una mayor acidez de la sangre. El término cetoacidosis designa los trastornos combinados de cetosis y acidosis asociados con la diabetes. El 3-HBA a concentraciones elevadas es diagnóstico de cetoacidosis.

La detección de cetoacidosis en un paciente con diabetes mellitus es beneficiosa porque con frecuencia indica la necesidad de un cambio en la dosis de insulina o un cambio en la manera de abordar el tratamiento. Un enfoque para determinar la presencia o la concentración de cuerpos cetónicos en una muestra ha consistido en someter la muestra a un ensayo colorimétrico. Por ejemplo, se conoce perfectamente la determinación de la presencia o la concentración de cuerpos cetónicos mediante la puesta en contacto de una muestra líquida con una composición de un reactivo indicador que sufre un cambio de color al entrar en contacto con la muestra. Véanse por ejemplo las patentes estadounidenses núms. US 4 803 158, 5 326 697, 5 510 245 y 5 190 863.

También se han empleado ensayos amperométricos para la detección de cuerpos cetónicos. Véanse, por ejemplo, la PCT/US98/21815, publicada el 16 de octubre de 1998, y Batchelor, *et al.*, *Amperometric Assay for the Ketone Body Hydroxybutyrate*, *Analytic Chimica Acta*, 289-294 (1989). Estos ensayos emplean enzimas para catalizar la oxidación del 3-HBA, la forma oxidable de un cofactor y un oxidante como, por ejemplo, una quinona. Antischia *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 345, 17-28, 1997 también describe un método amperométrico para la determinación del 3-HBA.

El biosensor y el método de la presente invención están definidos en las reivindicaciones anexas. La tira reactiva con biosensor de esta invención es compatible con los sensores amperométricos comerciales para la medición de la glucosa. La tira reactiva contiene un reactivo en forma de una película seca que reacciona con la muestra de manera efectiva para generar una señal eléctrica indicadora del nivel de ácido 3-hidroxibutírico (de ahora en adelante "3-HBA") en la muestra. El reactivo contiene una sal de hexacianoferrato (III), una cantidad catalítica de una primera enzima con capacidad para catalizar la oxidación del 3-HBA de la muestra, un mediador correspondiente a dicha primera enzima y una cantidad catalítica de una segunda enzima con capacidad para catalizar la oxidación electroquímica de una forma reducida del cofactor, siendo la primera enzima hidroxibutirato deshidrogenasa.

La tira reactiva incluye al menos dos pistas de conducción eléctrica aisladas entre sí. Cada una de las pistas está adaptada para que se encuentre en contacto por vía eléctrica con el reactivo. Una de las pistas acepta la transferencia de electrones desde el reactivo, siendo el grado de transferencia de electrones indicadora del nivel de 3-HBA en la muestra.

También se proporciona un método para la determinación de información indicadora del nivel de 3-HBA en una muestra, que es compatible con los sensores amperométricos para la medición de glucosa comerciales. El método comprende la reacción en la tira reactiva de la muestra con el reactivo antes definido. El reactivo genera una señal eléctrica indicadora del nivel de 3-HBA en la muestra. A continuación se mide la señal eléctrica y se determina el nivel de 3-HBA en la muestra utilizando información que comprende la señal eléctrica medida.

Los expertos en la materia podrán apreciar las características y ventajas adicionales de la invención al considerar tal como se perciben la descripción detallada y las realizaciones preferidas que ejemplifican el mejor modo de llevar a cabo la invención mostradas a continuación.

Descripción breve de las figuras

La Fig. 1 es una vista en perspectiva por piezas de una tira reactiva, que muestra como la tira incluye un primer sustrato aislante, pistas electroconductoras formadas para ser dispuestas sobre el primer sustrato aislante, un reactivo de ensayo alineado con las pistas, un segundo sustrato aislante, un recubrimiento hidrófilo y una cubierta.

La Fig. 2 es una vista en perspectiva de la tira reactiva de la Fig. 1.

La Fig. 3 es una vista en sección transversal realizada siguiendo las líneas 28-28 de la Fig. 2, que muestra la posición relativa de los electrodos, el reactivo y la película hidrófila entre los sustratos aislantes primero y segundo.

La Fig. 4 es una vista en sección transversal realizada siguiendo las líneas 29-29 de la Fig. 2, que muestra la cubierta, la película hidrófila, los bordes de la segunda abertura del segundo sustrato y el primer sustrato aislante que juntos definen una cámara de análisis y el reactivo situado dentro de la cámara de análisis.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra las curvas de calibración de diferentes lotes de tiras reactivas.

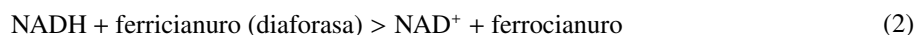
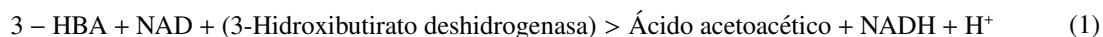
Descripción detallada de la invención

El campo de la electroquímica está basado en el fenómeno de que muchos metales, iones metálicos y moléculas conjugadas aceptan o liberan electrones fácilmente. Los compuestos tienen un potencial estándar que es el nivel energético al cual el compuesto tiene la misma probabilidad de liberar o aceptar electrones. Un compuesto se oxida o se reduce en función de si el potencial aplicado a ese compuesto es mayor o menor que su potencial estándar. La presente invención se fundamenta en una técnica electroquímica conocida como amperometría, que implica la aplicación de un potencial y la recogida de los electrones en movimiento en forma de corriente.

Se ha descubierto que las sales de hexacianoferrato (III) (ferricianuro) pueden utilizarse como mediadores y ser incorporadas a una tira reactiva o biosensor amperométrico que genera una señal eléctrica indicadora del nivel de 3-HBA en una muestra. El uso de sales de hexacianoferrato (III) como mediadores en una tira reactiva para el 3-HBA representa una ventaja porque la tira reactiva correspondiente es compatible con los medidores amperométricos de glucosa existentes, lo que permite el análisis de cetonas y de glucosa en un único medidor. El término mediador, tal como se utiliza en la especificación y las reivindicaciones, comprende oxidantes que poseen la capacidad de sufrir una reacción electroquímica reversible de oxidación-reducción. La forma oxidada del mediador debe ser capaz de recibir al menos un electrón de una reacción que implica una enzima, un analito (o cofactor producido por la reacción del analito) y la forma oxidada del mediador.

Estos mediadores pueden utilizarse para la fabricación de una tira reactiva como sensor amperométrico para un analito como el 3-HBA, que genera una señal eléctrica indicadora del nivel de 3-HBA en la muestra aplicada. La tira reactiva se fabrica para que se le puedan aplicar muestras biológicas como sangre total, suero, plasma y similares. La tira reactiva incluye un reactivo en forma de película seca que contiene un mediador, una cantidad catalítica de una primera enzima con capacidad para catalizar la oxidación del 3-HBA de una muestra, un cofactor correspondiente a dicha primera enzima y una cantidad catalítica de una segunda enzima con capacidad para catalizar la oxidación electroquímica de una forma reducida del cofactor, siendo la primera enzima hidroxibutirato deshidrogenasa.

La composición de reactivos se incorpora en un sistema de tiras reactivas biosensoras que determina el nivel de ácido 3-hidroxibutírico (de ahora en adelante "3-HBA") en la muestra. Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que la composición de reactivos reacciona con el 3-HBA en un esquema de reacción binaria. La primera reacción implica la oxidación de prácticamente todo el 3-HBA de la muestra, y la segunda reacción implica la oxidación electroquímica de uno o más productos de reacción resultantes de la primera reacción. La oxidación electroquímica genera una corriente cuya fuerza es indicadora de la cantidad de 3-HBA en la muestra de sangre. La composición de reactivos incluye el mediador ferricianuro, las enzimas 3-hidroxibutirato deshidrogenasa y diaforasa (cada una cataliza una de las reacciones) y el cofactor NAD⁺. En consecuencia, la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa y la diaforasa reaccionan en secuencia, como se muestra en el siguiente esquema de reacción, en un ensayo para determinar la presencia o la concentración de 3-HBA en una muestra.



Si ponemos en práctica el principio, cuando una muestra que contiene el analito 3-HBA se añade al reactivo, el analito es oxidado y la forma oxidada del cofactor es reducida. Este cofactor interacciona entonces con una segunda enzima y el mediador oxidado es reducido. Se permite que la reacción alcance el punto en el que no se necesita un tiempo adicional para determinar de forma precisa la concentración del analito.

Una vez completadas las reacciones, una fuente de energía (p. ej. una pila) aplica una diferencia de potencial entre un electrodo de trabajo y un contraelectrodo. Cuando se aplica la diferencia de potencial, la cantidad del mediador en

forma oxidada en el contraelectrodo y la diferencia de potencial deben ser suficientes para causar la electrooxidación limitada por difusión de la forma reducida del mediador en la superficie del electrodo de trabajo. Un amperímetro mide la corriente limitada por difusión generada por la oxidación de la forma reducida del mediador en la superficie del electrodo de trabajo para correlacionar la corriente medida con la concentración de 3-HBA en la muestra.

Por lo tanto, la tira reactiva y el método que utiliza el reactivo de la presente invención proporcionan al usuario un método fácil y práctico para determinar los niveles de 3-HBA en sangre. La tira reactiva y el método fundamentalmente eliminan la desventaja que le supone al usuario tener que comprar o utilizar instrumentación diferente para el análisis de glucosa y 3-HBA en sangre. El sistema de tiras reactivas se construye de forma similar a la tira reactiva descrita en la patente estadounidense US 5 997 817 por Crismore *et al.* Sin embargo, se aprecia que la tira reactiva puede ser similar a los biosensores descritos en las patentes estadounidenses núms. US 5 288 636 de Pollmann *et al.* y 5 762 770 de Pritchard *et al.*, así como cualquiera de la serie de construcciones comerciales existentes para sensores de medición de glucosa, sin llegar a sobrepasar el alcance de la presente descripción.

En referencia específica a las Figs. 1-2, la tira reactiva biosensora de la presente invención incluyen un primer sustrato aislante (1), un segundo sustrato aislante (7), pistas electroconductoras (5 y 6) situadas entre los sustratos 1 y 7, un reactivo de análisis (12), una película generalmente hidrófila (25) alineada en su totalidad con el reactivo de análisis (12) y una cubierta (13) situada sobre la película 25. El reactivo 12, como se comentará más adelante, comprende la composición de reactivos de la presente invención. Además, la tira reactiva se produce a partir de rollos de material. Por esta razón, la selección de los materiales para la construcción de la tira reactiva necesita el empleo de materiales lo suficientemente flexibles como para soportar un proceso de laminado, pero que sean lo suficientemente rígidos para conferir una consistencia adecuada a la tira reactiva final.

El primer sustrato (1) incluye una primera superficie (22) sobre la que discurren las pistas conductoras (5 y 6) y una segunda superficie opuesta (23). Véase la Fig. 1. El primer sustrato (22) incluye además una indentación (2), una muesca (3) y un orificio de escape (4) situados a lo largo de las superficies primera y segunda (22 y 23). El sustrato 1 puede construirse a partir de una gran variedad de materiales aislantes. Algunos ejemplos no limitantes de materiales aislantes que proporcionan las propiedades eléctricas y estructurales deseadas son: polímeros de vinilo, poliimidas, poliésteres y polímeros de estireno. El primer sustrato aislante (1) es plástico MELINEX® 329 de 0,177 mm de grosor, un poliéster comercializado por DuPont (3411 Silverside Road, PO Box 15391, Wilmington, Delaware 19850).

Como se muestra en la Fig. 1, las pistas electroconductoras 5 y 6 están dispuestas sobre la primera superficie (22) del primer sustrato aislante (1). La pista 5 puede ser un electrodo de trabajo y la pista 6 un contraelectrodo. Las pistas 5 y 6 están hechas de materiales electroconductores. De forma específica, la pista 5 puede estar fabricada con paladio, platino, oro, carbono o titanio. La pista 6 puede estar fabricada con paladio, platino, oro, plata, aleaciones de plata, aleaciones de níquel-cromo, carbono, titanio o cobre.

Las pistas electroconductoras 5 y 6 se depositan sobre un soporte aislante, como poliamida o poliéster, para reducir la posibilidad de ruptura del material de los electrodos durante el manejo y la fabricación de la tira reactiva. Un ejemplo de este tipo de pistas conductoras consiste en un recubrimiento de paladio con una resistencia de superficie menor a 5 ohm por cuadrado sobre la poliimida UPILEX de UBE INDUSTRIES, LTD., Japón, que está disponible con un recubrimiento previo de oro, paladio o platino de TECHNI-MET en Connecticut, EE. UU.

Las pistas electroconductoras 5 y 6 representan los electrodos de la tira reactiva biosensora. Estos electrodos deben estar suficientemente separados entre sí para que los procesos electroquímicos que tengan lugar en un electrodo no interfieran con los que sucedan en el otro. La distancia entre los electrodos 5 y 6 es de aproximadamente 1,2 milímetros (mm).

En la tira reactiva mostrada en la Fig. 1, la pista electroconductora 5 sería el electrodo de trabajo y la pista electroconductora 6 sería un contraelectrodo o electrodo de referencia. La pista 6 sería un electrodo de referencia si estuviera fabricado con materiales de electrodos de referencia convencionales como los de plata/cloruro de plata. La pista 5 es un electrodo de trabajo hecho de paladio y la pista 6 es un contraelectrodo que también está hecho de paladio y tiene considerablemente el mismo tamaño que el electrodo de trabajo.

También puede haber disposiciones de tres electrodos en las que la tira incluye una pista electroconductora adicional situada entre la pista conductora 6 y el orificio de escape (4). En una disposición de tres electrodos, la pista conductora 5 sería un electrodo de trabajo, la pista 6 sería un contraelectrodo y el tercer electrodo entre la pista 6 y el orificio de escape (4) sería un electrodo de referencia.

Las pistas 5 y 6 representan los electrodos de la tira reactiva. Las pistas 5 y 6 se desenrollan de carretes (no se muestra) y se realiza un primer corte de 1,5 mm de ancho aproximadamente. A continuación, las pistas 5 y 6 se adhieren a la primera superficie (22) del sustrato 1. Las pistas 5 y 6 están sobre un soporte Upilex (disponible en Courtalds-Andus Performance Filmsare) dispuesto sobre la superficie (22) del sustrato 1 de forma que el soporte UPILEX esté adyacente a la superficie 22. Durante la excitación de potencial directo, en el electrodo de trabajo principalmente se oxidará un mediador reducido mientras que el contraelectrodo funciona básicamente para completar el circuito.

El segundo sustrato (7) se superpone a las pistas 5 y 6. El segundo sustrato (7) presenta una primera superficie (8) y una segunda superficie (9) que entra en contacto con las pistas conductoras 5 y 6. Como se muestra en la Fig. 1, el segundo sustrato (7) está creado de forma que incluye las aberturas primera y segunda (10 y 11). La primera abertura (10) expone partes de las pistas 5 y 6 para permitir la conexión eléctrica de un medidor (no mostrado), que mide alguna propiedad eléctrica de una muestra una vez que la muestra se mezcla con el reactivo (12) de la tira reactiva. La segunda abertura (11) incluye un borde que define un perímetro de una cámara de análisis por capilaridad. Además, existe una indentación (19) situada para que coincida con la indentación (2) del primer sustrato (1) que va desde la segunda abertura (11) hasta uno de los bordes del segundo sustrato (7). El segundo sustrato (7) está unido al primer sustrato (1) y a las pistas 5 y 6 por un adhesivo como una cola termoplástica. Un ejemplo no limitante de este tipo de cola es la cola DYNAPOL® S-1358, comercializada por Hüls America, Inc., Somerset, NJ, EE. UU.

Como se muestra en las Figs. 3 y 4, la cubierta (13) cubre una porción de la primera superficie (8) y de la segunda abertura (11). La cubierta (13) incluye una primera superficie (16) y una segunda superficie (17) que está unida a la primera superficie (8) del segundo sustrato (7). Además, la cubierta (13) incluye una ventana (18) situada de forma que coincida con la segunda abertura (11) del segundo sustrato (7). La ventana (18) tiene el tamaño y está dispuesta para que cubra la totalidad del ancho de la pista 5 y al menos un 10% del ancho de la pista 6. Asimismo, se aplica una tinta considerablemente opaca sobre la primera superficie (16) siguiendo un diseño (27) de tal manera que la ventana (18) se mantenga transparente. De nuevo en referencia a la Fig. 1, la cubierta (13) incluye una indentación (14) y una muesca (15) formada en la ventana (18) cuya forma y posición coincide con la indentación (2) y la muesca (3) del primer sustrato (1). Las muescas 2 y 15 pueden definirse como un corte generalmente triangular de los bordes afectados con una longitud aproximada de entre 0,6 y 1,3 mm y un ángulo en el vértice opuesto de entre unos 70 y 110 grados. Cabe apreciar que las dimensiones y la configuración de las muescas pueden variar dentro del ámbito de la presente descripción.

La cubierta (13) puede estar fabricada con un material plástico, como puede ser una lámina de poliéster transparente o traslúcida cuyo grosor se encuentre entre los 0,05 y 0,15 mm. La cubierta (13) está fabricada con MELINEX® 351 (poliéster que contiene dióxido de titanio para conferirle opacidad) que ha sido recubierto con un material adhesivo sensible a la presión. Un ejemplo no limitante de un adhesivo adecuado es el acrílico 3 M 9458, comercializado por 3M, Identification and Converter Systems Division, St. Paul, MN, EE. UU.

Además, la cubierta (13) o bien es intrínsecamente hidrófila o bien ha estado modificada de modo que posea una superficie hidrófila, que estará orientada hacia el segundo sustrato (7). La superficie 17 está modificada por película hidrófila (25) situada sobre el material adhesivo de la superficie 17. La película hidrófila (25) adquiere la propiedad de hidrófila mediante, por ejemplo, el recubrimiento de la misma con un material que contenga detergente o con una matriz de polímero hidrófilo formada mediante fotoentrecruzamiento. La película también puede modificarse mediante un tratamiento con plasma o una modificación covalente inducida por plasma de la superficie con grupos sulfonilo o nitroso. La película hidrófila (25) está recubierta con una mezcla de tensioactivos VITEL (The Goodyear Tire & Rubber Co., Akron, OH, EE. UU.) y RHODAPEX® (Rhodia, Cranbury, NJ, EE. UU.) con un grosor aproximado de unos 0,1 mm.

La cámara de análisis por capilaridad está definida por la segunda superficie (17) de la cubierta (13) que presenta una película hidrófila (25) adherida a ella, por los bordes de la segunda abertura (11) del segundo sustrato (7) y por la primera superficie (22) del sustrato 1. La cámara de análisis se encuentra situada de forma que queda expuesta una porción de las pistas 5 y 6 para la aplicación del reactivo (12) sobre aquellas superficies de las pistas 5 y 6 que están expuestas. La longitud y el ancho de esta cámara de análisis por capilaridad están definidas por la longitud y el ancho de la abertura 11 y la altura de la cámara de análisis está definida por el grosor del segundo sustrato (7). La cámara de análisis tiene forma de rectángulo con unos 3,2 mm en un lado y unos 6,7 mm en el otro. El grado de exposición de las pistas 5 y 6 determina el área de superficie de cada electrodo. El electrodo de trabajo y el contraelectrodo (5 y 6) presentan un área de superficie considerablemente equivalente de unos 5 mm². No obstante, se puede apreciar que el grado de exposición de las pistas 5 y 6 puede variar, siempre y cuando la segunda abertura 11 exponga al menos un 10% del ancho de cada una de las pistas (5, 6).

El reactivo (12) para el 3-HBA se sitúa dentro de la cámara de análisis de modo que cubra al electrodo de trabajo (5). El reactivo (12) se dispone en forma de una película de grosor generalmente uniforme a lo largo de la totalidad de la superficie del fondo de la cámara de análisis. De este modo, el reactivo (12) presentará una superficie hidrófila dirigida hacia el interior de la cámara de análisis. El reactivo (12) se forma de modo que incluya un orificio situado de forma que coincida con el orificio de escape (4) del primer sustrato (1). Véase la Fig. 3. Los orificios tienen una dimensión de entre 1,8 y 0,5 mm que permite la salida de aire desde la cámara de análisis.

La tira reactiva que incorpora el reactivo (12) de la presente invención se fabrica siguiendo el proceso descrito en la patente estadounidense núm. US 5 997 817. Se contempla la posibilidad de realizar variaciones y modificaciones en el método de fabricación siempre que no sobrepasen el alcance de la presente descripción.

El reactivo (12) se formula para la medición de 3-HBA en una muestra de sangre humana. El reactivo (12) reacciona con la muestra de forma que genera una señal eléctrica indicadora del nivel de 3-HBA en la muestra. El reactivo (12) comprende un mediador, enzimas y un cofactor. El reactivo (12) también comprende agentes filmógenos puesto que se requiere que confiera durabilidad y proporcione hidrofiliidad. Se puede apreciar que, a menos que se indique lo

contrario, todas las concentraciones de los componentes nombrados más adelante se refieren a la concentración de una sustancia dada en un reactivo húmedo de forma previa a la deposición y secado de ese reactivo en la tira reactiva.

Como se ha comentado previamente, un mediador adecuado para utilizar en el reactivo (12) ha de ser capaz de experimentar una reacción electroquímica reversible de oxidación-reducción. La forma oxidada del mediador debe ser capaz de recibir al menos un electrón de una reacción que implica una enzima, un analito (o cofactor producido por la reacción del analito) y la forma oxidada del mediador. El mediador es una sal de hexacianoferrato (III) como, por ejemplo, el hexacianoferrato (III) de potasio que de ahora en adelante denominaremos "ferrocianuro". Dado que el ferrocianuro también está incorporado en las tiras reactivas de los sensores medidores de glucosa, la tira reactiva para 3-HBA de la presente invención podrá utilizarse con la misma instrumentación que una tira reactiva para glucosa correspondiente, lo cual supone una gran ventaja. Un ejemplo de tira reactiva para glucosa correspondiente se describe en la patente estadounidense US 5 997 817, cuya descripción aparece incorporada aquí a modo de referencia.

El intervalo de concentraciones de analito que se pretende medir y las propiedades de difusión del mediador a través del reactivo y de la muestra serán quienes indiquen la cantidad necesaria de mediador que debe haber en el reactivo. Más en concreto, la cantidad de forma reducida de mediador debe ser suficiente para garantizar que la corriente producida durante la electrorreducción esté limitada por la reducción de la forma oxidada del mediador en la superficie del electrodo de trabajo. La solubilidad del mediador y el impacto de una cantidad excesiva de mediador sobre la estabilidad del producto generalmente indican el límite superior de la concentración del mediador. El reactivo para el análisis del 3-HBA incluye sal de hexacianoferrato (III) a una concentración de 112,8 a 56,4 mM aproximadamente, basada en 329,26 mg/mmol, para medir el nivel de 3-HBA en una muestra humana de sangre total con un volumen de 3,5 a 7 microlitros (μ l). Se aprecia que cabe la posibilidad de depositar más de 7 μ l de muestra sobre la tira reactiva, pero que la concentración de sal de hexacianoferrato (III) en el reactivo disuelto solamente depende de la cantidad de muestra que entra dentro de la cámara de análisis. Sin embargo, también se aprecia que la concentración de hexacianoferrato variará a la vez que el volumen de sangre total humana que entre en la cámara de análisis.

El reactivo para el análisis del 3-HBA de la presente invención también incluye enzimas del tipo adecuado y en cantidad suficiente para catalizar la reacción en la que intervienen enzima, analito y forma oxidada de mediador. Una enzima adecuada para emplearla en el reactivo realiza la función de catalizar la oxidación del 3-HBA en la muestra, y una segunda enzima la de catalizar la oxidación electroquímica de una forma reducida del cofactor. La primera enzima es una deshidrogenasa y una segunda enzima es diaforasa. Más concretamente, la primera enzima es la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa, comercializada por Toyobo Co., Ltd. Biochemical Operations Department, Osaka, Japón y por Roche Diagnostics Corporation, Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN, EE. UU. La diaforasa es comercializada por Roche Diagnostics Corporation, Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN, EE. UU.

En el caso de la tira reactiva diseñada para el análisis del 3-HBA, se incluyen aproximadamente entre 0,20 y 20 millones de unidades de 3-hidroxibutirato deshidrogenasa y entre 0,1 y 10 millones de unidades de diaforasa por litro de reactivo cuando se deja que la reacción transcurra durante unos 15 segundos como mínimo antes de la aplicación del potencial eléctrico. De forma más preferible, se permite que la reacción transcurra durante unos 50 segundos como mínimo antes de la aplicación del potencial eléctrico. No obstante, se aprecia que la cantidad de enzimas incluidas en el reactivo puede variar dependiendo de la estabilidad que se desee, de la geometría de los electrodos y de las propiedades físicas de la película de reactivo sin que se llegue a sobrepasar el alcance de la presente descripción.

Además, el reactivo de análisis contiene un cofactor que coopera con las enzimas y el mediador. Algunos ejemplos no limitantes de cofactores adecuados son: NAD⁺, NADP⁺, NADH₂, NADPH₂ y metosulfato de fenazina. Preferentemente, el cofactor es NAD⁺. El NAD⁺ es comercializado por Roche Diagnostics Corporation, Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN, EE. UU. El reactivo para el análisis del 3-HBA incluye NAD⁺ a una concentración de 21,1 a 43 μ M aproximadamente, basada en 663,44 g/mmol, para medir el nivel de 3-HBA en una muestra humana de sangre total con un volumen de 3,5 a 7 microlitros (μ l). Se aprecia que cabe la posibilidad de depositar más de 7 μ l de muestra sobre la tira reactiva, pero que la concentración de NAD⁺ en el reactivo disuelto solamente depende de la cantidad de muestra que entra dentro de la cámara de análisis. Sin embargo, también se aprecia que la concentración de NAD⁺ variará a la vez que el volumen de sangre total humana que entre en la cámara de análisis.

Para mejorar la solubilización del mediador se pueden incluir diversas sustancias "de carga" en el reactivo. Una sustancia de carga se define aquí como una sustancia de partículas insolubles de tamaño microscópico que se dispersan de forma uniforme a través de la matriz de reactivo durante la composición del reactivo. La sustancia de carga preferida es un óxido metálico que no acepta ni da electrones al potencial aplicado o con relación al potencial del mediador o mediadores. El reactivo 12 incluye una sustancia de carga, como el dióxido de titanio, que está presente en una cantidad del 0,2 al 2,0% (peso fresco:peso fresco) y preferiblemente del 0,22% (peso fresco:peso fresco).

Cuando se emplean sustancias de carga, generalmente se incluyen en el reactivo (12) sustancias como polímeros para aumentar su viscosidad. El reactivo (12) incluye el polímero NATROSOL 250K (Hidroxietilcelulosa, comercializada por Aqualon Oil Field Chemicals, Houston, TX, EE. UU). La cantidad de NATROSOL 250K puede variar entre el 0,05 y el 0,5% (peso fresco:peso fresco) y la concentración preferida es aproximadamente del 0,19% (peso fresco:peso fresco). Cabe apreciar que es posible emplear una diversidad de viscosantes comerciales que se encuentren dentro del ámbito de la presente descripción.

ES 2 279 776 T3

Los polímeros hidrófilos pueden proporcionar tanto durabilidad como hidrofiliidad al reactivo. Algunos ejemplos no limitantes de polímeros aceptables son: polietilenglicol/óxido de polietileno, polivinil-alcohol, polivinil-pirrolidina, sulfonato de poliestireno, polivinil-acetato y microemulsiones de vinil-acetato. El óxido de polietileno (Union Carbide Corporation, Danbury, CT, EE. UU.) de peso molecular medio aproximado de 100 a 900 kilodaltons se utiliza a concentraciones del 0,2 al 2% aproximadamente (peso fresco:peso fresco). El reactivo (12) incluye óxido de polietileno de peso molecular medio aproximado de 300 kilodaltons a cerca del 0,59% (peso fresco:peso fresco).

El tensioactivo generalmente se incluye en el reactivo para controlar (disminuir) la tensión superficial. Algunos ejemplos no limitantes de detergentes aceptables son DON'S (dioctilsulfosuccinato sódico), nonil fenoxipoli (etileno-oxi) etanol ramificado (comercializado por Rhone-Poulenc, Collegeville, PA como Igepal CO-630 o por Roche Diagnostics, Biochemicals, Indianápolis, IN como TRITON X-100®). La cantidad y el tipo de detergente en el reactivo ha de ser suficiente para reducir la tensión superficial hasta entre 20 y 70 dina/cm aproximadamente. Cuando la muestra es de sangre, debe evitarse una lisis celular no deseada mediante la restricción de la concentración total del detergente a niveles inferiores de aproximadamente el 0,3% (depende del tipo de detergente). En el caso de la tira reactiva diseñada para analizar el 3-HBA empleando glucosa deshidrogenasa, encontramos TRITON X-100® a concentraciones no superiores a aproximadamente el 0,05% (peso fresco:peso fresco), siendo preferida una cercana al 0,035% (peso fresco:peso fresco).

El reactivo (12) puede incluir un tampón. El tampón debe estar en una cantidad suficiente y ser del tipo adecuado para proporcionar y mantener un pH en el que la estabilidad y la actividad enzimáticas sean co-óptimas. La actividad de la enzima hace referencia a la capacidad de la enzima para catalizar la reacción entre analito y mediador o analito y derivado de analito para reactivos de múltiples enzimas. La estabilidad de la(s) enzima(s) hace referencia a la conservación de esa actividad a lo largo del tiempo y en los casos en que el reactivo está expuesto a diversas formas de estrés, como calor o humedad. Además, el tampón no debe tener un potencial de oxidación menor que el del mediador reducido. Ejemplos no limitantes de tampones adecuados incluyen sales de pirofosfato en las que el pH se encuentra entre 7,8 y 9,0 aproximadamente, y lo más preferible es que sea de 8,7 aproximadamente. Algunos ejemplos no limitantes de sales de pirofosfato adecuadas son el pirofosfato disódico y el pirofosfato tetrasódico. Si el pH óptimo para la actividad enzimática es significativamente diferente al de la muestra, entonces el tampón debe estar en una concentración suficiente para llevar el pH final del reactivo rehidratado junto con la muestra hasta el nivel deseado. La concentración de tampón que se emplea generalmente es de entre 50 y 200 mM en el reactivo. La concentración preferida es de cerca de 53,6 mM.

El reactivo también puede contener sustancias que estabilicen los diversos componentes. Los siguientes compuestos son estabilizantes aceptables para las enzimas en combinación con un cofactor en el reactivo de la presente invención: flavina mononucleótido, adenosina difosfato, iones magnesio, lactosa, trealosa y rafinosa. El reactivo 12 incluye un estabilizante como la rafinosa en una concentración de cerca del 0,5 al 5% (peso fresco:peso fresco), preferiblemente de cerca del 0,68% (peso fresco:peso fresco).

El grosor de la película de reactivo deshidratado debe ser el adecuado para que, en combinación con las propiedades inherentes a la química, la sensibilidad del sistema frente a la interferencia de variaciones en el hematocrito esté mitigada. El grosor de la película (medido por la proporción de volumen de dispensación de reactivo fresco respecto al área de superficie sobre la que se dispensa) ha de ser el adecuado para que unos 10 μ l de reactivo se dispensen dentro de un área de unos 22,5 mm². El reactivo descrito más adelante, a través del uso del polímero principal (el óxido de polietileno) y en combinación con el grosor de la película, dará lugar a que la tira reactiva posea una sensibilidad reducida a las variaciones en el hematocrito.

Cuando una muestra que contiene el analito 3-HBA se añade al reactivo, el analito se oxida y la forma oxidada del cofactor se reduce. Este cofactor interacciona entonces con una segunda enzima y el mediador oxidado se reduce. Se permite que la reacción alcance un punto en el tiempo en el que el uso de analito y de mediador oxidado ha alcanzado un punto donde no es necesario un tiempo adicional para determinar de forma precisa la concentración del analito. Durante este tiempo de incubación, es posible que sea necesario situar entre los electrodos un potencial alterno de pequeña magnitud para determinar la magnitud de las interferencias debidas a los cambios de impedancia. Véase, por ejemplo, la Solicitud internacional núm. PCT/US98/27203; publicada el 1 de julio de 1999 como Publicación internacional núm. WO 99/32881.

Se permite que la oxidación del analito y la reducción de la forma oxidada del cofactor se lleven a cabo por completo. El término "por completo", tal como se utiliza a lo largo de la especificación y las reivindicaciones, se define como una reacción suficiente que implica que el analito, cofactor y la enzima formen uno o varios productos de reacción reducidos y una reacción suficiente que implica que los productos de reacción reducidos, la enzima y el mediador estén correlacionados con la concentración de analito a una corriente limitada por difusión generada por la oxidación del mediador en la superficie del electrodo de trabajo.

Una vez se han completado las reacciones, se aplica una diferencia de potencial entre un electrodo de trabajo y un contraelectrodo para provocar la electrooxidación limitada por difusión de la forma reducida del mediador en la superficie del electrodo de trabajo. Un amperímetro mide la corriente limitada por difusión generada por la oxidación de la forma reducida del mediador en la superficie del electrodo de trabajo. La corriente medida puede correlacionarse de forma precisa con la concentración de 3-HBA en la muestra cuando se cumplen los siguientes requisitos:

ES 2 279 776 T3

1. La tasa de oxidación de la forma reducida de mediador está controlada por la tasa de difusión de la forma reducida del mediador hacia la superficie del electrodo de trabajo.

2. La corriente producida está limitada por la oxidación de la forma reducida del mediador en la superficie del electrodo de trabajo.

La tira reactiva de la presente invención cumple estos requisitos al emplear el reactivo (12) que incluye un mediador fácilmente reversible y al suministrar reactivo con la forma oxidada del mediador en una cantidad suficiente para garantizar que la corriente producida durante la electrooxidación limitada por difusión esté limitada por la oxidación de la forma reducida del mediador en la superficie del electrodo de trabajo. Para que la corriente producida durante la electrooxidación esté limitada por la oxidación de la forma reducida del mediador en la superficie del electrodo de trabajo, es necesario que la cantidad de forma oxidada del mediador en la superficie del contraelectrodo siempre supere a la cantidad de forma reducida en la superficie del electrodo de trabajo.

Por lo tanto, la tira reactiva y el método que utiliza el reactivo de la presente invención proporcionan al usuario un método fácil y práctico para determinar los niveles de 3-HBA en sangre. La tira reactiva y el método fundamentalmente eliminan la desventaja que le supone al usuario tener que comprar o utilizar instrumentación diferente para el análisis de glucosa y 3-HBA en sangre.

A continuación se muestra un protocolo para la preparación de 1 litro de un reactivo para la determinación de 3-HBA que emplea las enzimas hidroxibutirato deshidrogenasa y diaforasa, así como el mediador ferricianuro.

Paso 1

Se prepara una solución de NATROSOL (250K) en agua desionizada mediante la adición de 1,90 g de NATROSOL K en la superficie de 430 g de agua desionizada, bajo la acción de un agitador giratorio y una turbina a una velocidad de unas 400 revoluciones por minuto (rpm) como mínimo durante un periodo de unos 30 minutos como mínimo.

Paso 2

En la solución del paso 1 se dispersan 6,1 g de óxido de polietileno (peso molecular medio de 300 kDa) (Union Carbide 750NF) mediante la adición gradual del polvo sobre la superficie de la solución a la vez que se mezcla a una velocidad de unas 400 rpm como mínimo durante un periodo de unos 60 minutos como mínimo.

Paso 3

En la solución del paso 2 se dispersan 6,8 g de rafinosa mediante la adición gradual del polvo sobre la superficie de la solución a la vez que se mezcla a una velocidad de 400 rpm como mínimo durante un periodo de 10 minutos como mínimo.

Paso 4

Se tampona la solución del paso 3 por la adición de 58,8 g de pirofosfato disódico (anhidro) y 73,1 g de pirofosfato tetrasódico (anhidro) a la vez que se mezcla a una velocidad de 400 rpm durante un periodo de 20 minutos como mínimo. Se comprueba que el pH final sea de 8,7. La mezcla creada de ahora en adelante se denominará la "Matriz polimérica".

Paso 5

Se prepara una suspensión de dióxido de titanio mediante la dispersión de 2,3 g de dióxido de titanio sobre 377,8 g de agua desionizada, bajo la acción de un agitador giratorio y una turbina a una velocidad de 600 rpm como mínimo, durante un periodo de 20 minutos como mínimo. La mezcla creada de ahora en adelante se denominará la "Suspensión de carga".

Paso 6

La suspensión de carga del paso 5 se combina con la matriz polimérica del paso 4. Esta combinación se realiza filtrando la suspensión de carga a través de una malla gruesa (200 micras) para eliminar cualquier partícula grande no dispersa de dióxido de titanio de forma previa al paso de combinación o durante el mismo.

ES 2 279 776 T3

Paso 7

Seguidamente se añaden 13,3 g de ferricianuro potásico al reactivo del paso 6. Se deja que el reactivo se mezcle a 500 rpm como mínimo, durante un mínimo de 20 minutos o hasta que esté listo para el último paso de acoplamiento de reactivos (paso 13). Esta matriz de ahora en adelante se denominará la “Base de reactivos”.

Paso 8

Se prepara una solución diferente mediante la dispersión de 200.000 unidades de enzima 3-hidroxi-butarato deshidrogenasa en 100 g de agua desionizada a la vez que se mezcla a una velocidad de 200 rpm como mínimo, empleando una placa de agitación y un agitador mecánico.

Paso 9

Se añaden 200.000 unidades de enzima diaforasa a la solución del paso 8 y se dejan mezclar durante 10 minutos. Esta solución de ahora en adelante se denominará “Solución enzimática”. La solución resultante se refrigera a una temperatura aproximada de entre 4 y 10°C hasta que está lista para incorporarla al reactivo final (paso 13).

Paso 10

Se prepara otra solución diferente disolviendo 96 mg de cloruro de magnesio hexahidrato en 50 g de agua desionizada.

Paso 11

Se disuelven 200 mg de cofactor NAD⁺ a la solución del paso 10 mientras se agita a 200 rpm durante 5 minutos.

Paso 12

Se disuelven 145 mg de flavina mononucleótido a la solución del paso 11 mientras se agita a 200 rpm durante 5 minutos. Esta solución de ahora en adelante se denominará “Solución de cofactor”. La solución de cofactor se refrigera a una temperatura aproximada de entre 4 y 10°C hasta que está lista para la incorporación final al reactivo (paso 13).

Paso 13

El reactivo final se construye mediante la adición de la solución enzimática del paso 9 y la solución de cofactor del paso 12 a la base de reactivos del paso 7. El reactivo final se agitó a una velocidad reducida de 400 rpm durante un mínimo de 15 minutos.

Paso 14

El reactivo final se completa con la adición de 0,35 g de Triton X-100 y agitación a 400 rpm durante un mínimo de 15 minutos de forma previa a la dispensación.

Una tira reactiva de la presente invención se fabrica siguiendo el proceso descrito en la patente estadounidense núm. US 5 997 817. A la tira reactiva para la determinación de 3-HBA se le añaden 10 μ l de reactivo fabricado según el protocolo que se acaba de describir en la superficie que lleva los electrodos de la cámara de análisis. La cantidad de reactivo puede variar entre 3 y 10 μ l, siendo la dispensación preferida de unos 10 μ l. Esta cantidad de reactivo cubrirá considerablemente las áreas de superficie de los electrodos. La película de reactivo resultante contendrá suficiente ferricianuro y enzimas (β -hidroxi-butarato deshidrogenas y diaforasa) para catalizar la oxidación del 3-HBA (de una muestra humana de sangre total) y la reducción de ferricianuro para permitir la determinación exacta y precisa de la concentración de 3-HBA tras una incubación inicial (previa a la aplicación del potencial) en un plazo de unos 60 segundos.

Para garantizar la obtención de una capa de reactivo homogénea y de distribución uniforme tras el proceso de deshidratación, a la superficie de la cámara de análisis que lleva los electrodos se le aplica un tratamiento corona con un arco eléctrico de 150 vatios, dispuesto a una distancia de 0,63 μ m, inmediatamente antes de la aplicación del reactivo. Esta aplicación se realiza mientras el material está pasando a través de una línea de procesamiento de unos 6,5 metros por minuto. Este tratamiento aumenta la energía de superficie del área diana para facilitar el esparcimiento del reactivo fresco antes de la deshidratación. El arco eléctrico en corona se aplica durante unos 5 minutos como máximo, y más preferiblemente durante menos de unos 45 segundos, de forma previa a la dispensación del reactivo sobre el

ES 2 279 776 T3

material. Posteriormente a la aplicación del arco, y antes de la aplicación del reactivo, el tratamiento en corona se reduce sobre la superficie de la capa espaciadora en la que no debe haber reactivo.

Esta disipación de la corona se consigue aplicando una película de agua desionizada de modo que el agua entre en contacto con la superficie de la capa espaciadora, pero no lo haga con la superficie de la capa base que lleva los electrodos. La película de agua que se dispone sobre la superficie de la capa espaciadora debe ser lo suficientemente delgada para que se pueda secar mediante infrarrojos o convección mecánica antes de que el material alcance el área de aplicación del reactivo.

A continuación, el reactivo se seca mediante incubación a unos 70°C. El secado elimina al menos un 98% del contenido en agua del reactivo. El agua restante se reduce a cantidades traza durante la posterior desecación en un dispositivo de empaquetado final. La película de reactivo deshidratado resultante contendrá entre 1.000 y 5.000 unidades de actividad por enzima por gramo.

Un ejemplo no limitante de los componentes que se utilizan para formar 100 g del reactivo de la presente invención consiste en la siguiente tabla 1.

TABLA 1

peso fresco (g)	%	peso seco (g)	peso/g en peso seco (mg)	%	peso seco/ sensor (mg)	componente
95,78						Agua desionizada
0,61	0,60	0,61	120,8	12,1	0,06010	PEO 750N
0,19	0,19	0,19	37,6	3,8	0,01872	Natrosol 250K
0,23	0,23	0,23	45,6	4,6	0,02266	Dóxido de titanio
0,58	0,57	0,58	114,9	11,5	0,05715	Pirofosfato disódico
0,73	0,72	0,73	144,8	14,5	0,07202	Pirofosfato tetrasódico
1,33	1,31	1,33	264,1	26,4	0,03137	Ferricianuro potásico

ES 2 279 776 T3

						sico
0,68	0,67	0,68	134,7	13,5	0,06700	Rafinosa
0,0200	0,0197	0,0200	4,0	0,4	0,00197	NAD+
0,0145	0,0143	0,0145	2,9	0,3	0,00173	Flavina mononu- cleótido
0,0096	0,0095	0,0096	1,9	0,2	0,00095	Cloruro magnésico
0,05	0,05	0,05	909	1,0	0,00493	Triton X-100
0,3	0,92	0,47	92,4	9,2	0,09196	β-Hidroxibu- tirato deshidro- genasa (dados 2 U/mg)
0,33	0,33	0,13	26,4	2,6	0,03284	Enzima diaforasa (<i>B.stearot hermicus</i>) (dados 32 U/mg)
101,50		5,05		1000 ,0		TOTAL

ES 2 279 776 T3

Las tiras reactivas diferenciadas se emplean junto con lo siguiente:

5 1. una fuente energética conectada con el electrodo de trabajo y el contraelectrodo que sea capaz de suministrar una diferencia de potencial eléctrico entre estos electrodos suficiente para causar la electrooxidación limitada por difusión de la forma reducida del mediador en la superficie del electrodo de trabajo; y

10 2. un medidor conectado eléctricamente con el electrodo de trabajo y el contraelectrodo que sea capaz de medir la corriente limitada por difusión producida por la oxidación de la forma reducida del mediador cuando se aplica la diferencia de potencial eléctrico antes mencionada.

15 El medidor normalmente estará adaptado para aplicar un algoritmo, como se comenta más adelante, a la medición de corriente, de modo que se proporciona una concentración del analito y se muestra en una pantalla. Esta fuente energética, este medidor y el sistema biosensor son asunto de las patentes estadounidenses núms. US 4 963 814, 4 999 632, 4 999 582 y 5 243 516 y de la WO 99/32881.

20 La tira reactiva que incorpora el reactivo de la presente invención puede utilizarse para determinar la concentración de un analito en una muestra líquida llevando a cabo los pasos que se explicitan a continuación:

a. Poner en contacto la muestra líquida con el reactivo que cubre considerablemente áreas de superficie sustancialmente iguales del electrodo de trabajo y del contraelectrodo.

25 b. Permitir que finalice por completo la reacción entre el analito y la forma oxidada del mediador y medir la impedancia de fondo empleando un potencial alterno bajo (57 mV de amplitud) de frecuencia media o alta (100 Hz+) para la calibración interna durante el periodo de incubación.

c. Aplicar seguidamente una diferencia de potencial directa entre los electrodos que sea suficiente para provocar la electrooxidación limitada por difusión de la forma reducida del mediador en la superficie del electrodo de trabajo.

30 d. Medir entonces la corriente limitada por difusión resultante.

e. Correlacionar la medición de corriente con la concentración de analito en el líquido.

35 Es posible analizar muchos líquidos que contengan 3-HBA. Por ejemplo, se puede medir el 3-HBA en los líquidos del organismo humano como la sangre total, el suero sanguíneo, la orina o el líquido cefalorraquídeo. Además, también es posible medir el 3-HBA en productos alimentarios, productos fermentados y en sustancias del entorno que pueden contener contaminantes ambientales.

40 Cuando se miden analitos que se encuentran en líquidos del organismo humano, especialmente la sangre total, la diferencia de potencial aplicada entre los electrodos no debe ser mayor de unos 500 mV. Cuando se aplica una diferencia de potencial mayor de 500 mV entre los electrodos, la oxidación de la superficie del electrodo de trabajo (para el paladio) y de algunos componentes sanguíneos puede ser excesiva, lo que evitaría establecer una correlación exacta y precisa entre la corriente y la concentración de analito. En un ensayo para el 3-HBA en una muestra de sangre total, en el que la forma oxidada del mediador es ferricianuro, se puede aplicar una diferencia de potencial de entre unos 150 y 500 mV entre los electrodos para conseguir la electrooxidación limitada por difusión de la forma reducida del ferricianuro en la superficie del electrodo de trabajo. Se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos de unos 300 mV.

50 La corriente generada a partir de la oxidación de la forma reducida de mediador puede medirse en cualquier momento de entre unos 0,5 y unos 30 segundos después de aplicar la diferencia de potencial entre los electrodos. En un tiempo menor de unos 0,5 segundos no se consigue una corriente limitada por difusión. Pasados unos 30 segundos la convección pasa a ser significativa, de modo que interviene con la medición de una corriente limitada por difusión.

55 La corriente medida durante el ensayo de un analito de una muestra líquida se puede correlacionar con la concentración del analito en la muestra mediante la aplicación de un algoritmo en el dispositivo medidor de corriente. El algoritmo puede ser uno sencillo, como ilustra el siguiente ejemplo.

$$[\text{Analito}] = Ci \cdot 7,5 + d$$

60 en el que [Analito] representa la concentración del analito 3-HBA en la muestra (véase la fig. 5), i es la corriente (en microamperios) medida a 9,0 segundos tras la aplicación de la diferencia de potencial entre los electrodos, C es la pendiente de la línea: p. ej. 0,483 para el ensayo A y 0,528 para el ensayo B, y d es el punto de intersección: p. ej. -2,82 para el ensayo A y -1,23 para el ensayo B. Por lo tanto, las concentraciones de 3-HBA para los ensayos A y B se determinaron del siguiente modo:

65 Ensayo A: [3-HBA] = Corriente x 0,483 - 2,82

Ensayo B: [3-HBA] = Corriente x 0,528 - 1,23

ES 2 279 776 T3

Al realizar mediciones con concentraciones conocidas del analito 3-HBA se pueden obtener las curvas de calibración, como se muestra en la fig. 5. Esta calibración se guardará en la memoria de solo lectura (ROM) del dispositivo medidor y se podrá aplicar a un conjunto de biosensores en particular.

5 En el método para el análisis del 3-HBA de una muestra humana de sangre total, se añaden 5 μ l de sangre total al reactivo 12 antes descrito. Se permite que la reacción prosiga hasta un punto estable de modo que se forme una concentración estable de ferrocianuro. Durante este tiempo, se aplica corriente alterna de 57 mV de amplitud y 2 kHz de frecuencia para determinar la impedancia de fondo. Pasados unos 15 segundos tras la adición de la muestra de sangre total, se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos de unos 300 mV, oxidando así el ferrocianuro a ferricianuro en la superficie del electrodo de trabajo. Las mediciones de corriente se realizan en intervalos de 0,5 segundos desde el segundo 1 hasta el segundo 9,0 tras la aplicación de la diferencia de potencial entre los electrodos. Estas mediciones de corriente se correlacionan con la concentración de 3-HBA en la muestra sanguínea.

15 En este ejemplo de medición de 3-HBA en una muestra de sangre, las mediciones de corriente se realizan en tiempos diferentes (del segundo 1 al 7,5 tras la aplicación de la diferencia de potencial), en lugar de en un tiempo único fijado (como se ha descrito previamente), y el algoritmo resultante está representado por la siguiente ecuación:

$$[3 - \text{HBA}] = C1 i_1 + C2 i_2 + C3 i_3 + \dots Cn i_n + d$$

20 en la que i_1 es la corriente medida en el primer tiempo de medición (1 segundo tras la aplicación de la diferencia de potencial de 300 mV); i_2 es la corriente medida en el segundo tiempo de medición (1,5 s tras la aplicación de la diferencia de potencial de 300 mV); i_3 es la corriente medida en el tercer tiempo de medición (2 s tras la aplicación de la diferencia de potencial de 300 mV); i_n es la corriente medida en el n -ésimo tiempo de medición (en este ejemplo, en el catorceavo tiempo de medición o a los 7,5 s tras la aplicación de la diferencia de potencial de 300 mV); $C1$, $C2$, $C3$ y Cn son coeficientes derivados de una técnica de análisis de regresión multivariante, como el análisis de componentes principales o de los mínimos cuadrados parciales; y d es el punto de intersección de la regresión (en unidades de concentración de 3-HBA).

30 De forma alternativa, la concentración de 3-HBA de la muestra que se está midiendo puede determinarse integrando la curva generada al representar la corriente, i , frente al tiempo de medición durante un intervalo de tiempo determinado (por ejemplo: de 1 a 7,5 segundos tras la aplicación de la diferencia de potencial de 300 mV), para obtener así la carga total transferida durante el periodo de medición. La carga total transferida es directamente proporcional a la concentración del 3-HBA en la muestra que se está midiendo.

35 Asimismo, la medición de la concentración de 3-HBA puede corregirse según las diferencias entre la temperatura ambiental en el tiempo real de medición y la temperatura ambiental en el tiempo de calibración. Por ejemplo, si la curva de calibración para el 3-HBA se construyera a la temperatura ambiental de 23°C, la medición de 3-HBA se debe corregir empleando la siguiente ecuación:

$$[3 - \text{HBA}] \text{ corregida} = [3 - \text{HBA}] \text{ medida} \times (1 - K (T - 23^\circ\text{C}))$$

45 donde T es la temperatura ambiental (en °C) en el tiempo de medición de la muestra y K es una constante derivada de la siguiente ecuación de regresión:

$$Y = K(T - 23),$$

50 donde $Y = [3 - \text{HBA}]$ medido a 23°C - $[3 - \text{HBA}]$ medido a T .

Con el fin de calcular el valor de K , cada una de las múltiples concentraciones de 3-HBA es medida a varias temperaturas, T y a 23°C (el caso base). Seguidamente, se realiza una regresión lineal de Y sobre $T - 23$. El valor de K es la pendiente de esta regresión.

55 La concentración de 3-HBA de una muestra puede medirse siguiendo el método de la presente invención que emplea la tira reactiva de la misma. Además, cuando se mide una muestra humana de sangre total, el error debido al efecto del hematocrito es insignificante en un margen del 30 al 55% de hematocrito.

60 La presente invención se ha ejemplificado con analitos que se oxidan y mediadores que se reducen en presencia de una cantidad catalítica de enzima. Sin embargo, la presente invención, se pueden emplear reactivos y métodos para medir la concentración de un analito en una muestra de líquido, en la que se reduce el analito y la forma reducida de un mediador se oxida en presencia de una cantidad catalítica de una enzima (p. ej. una reductasa). Una vez completada la reacción en la que intervienen el analito, la enzima y la forma reducida del mediador, se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos. La cantidad de forma reducida del mediador en el contraelectrodo (en este caso un ánodo en lugar de un cátodo) y la diferencia de potencial aplicada deben ser suficientes para causar la electrorreducción limitada por difusión de la forma oxidada del mediador en la superficie del electrodo de trabajo (en este caso un cátodo en lugar de un ánodo). La corriente limitada por difusión generada por la reducción de la forma oxidada del mediador

en la superficie del electrodo de trabajo se correlaciona con la concentración de analito en la muestra que se está analizando.

Aunque en la presente invención se han descrito con detalle ciertas realizaciones preferidas, se contempla que
5 puedan realizarse variaciones y modificaciones dentro del ámbito de la presente invención que se define en las reivin-
dicaciones que siguen.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de tiras reactivas para la detección de ácido 3-hidroxibutírico en una muestra; sistema que consta de:

un sustrato,

al menos un electrodo situado sobre el sustrato

y un reactivo en contacto con al menos un electrodo, siendo el reactivo una película de reactivo deshidratado que reacciona con la muestra generando una señal eléctrica indicadora del nivel de ácido 3-hidroxibutírico en la muestra, y conteniendo dicho reactivo una sal de hexacianoferrato (III), una cantidad catalítica de una hidroxibutirato deshidrogenasa con capacidad para catalizar la oxidación del ácido 3-hidroxibutírico de la muestra, un cofactor correspondiente a dicha hidroxibutirato deshidrogenasa y una cantidad catalítica de una segunda enzima con capacidad para catalizar la oxidación electroquímica de una forma reducida del cofactor.

2. El sistema de la reivindicación 1 en el que la segunda enzima es diaforasa.

3. El sistema de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el cofactor se selecciona del grupo formado por NAD⁺, NADP⁺, NADH₂, y NADPH₂.

4. El sistema de la reivindicación 3, en el que el cofactor es NAD⁺.

5. El sistema de la reivindicación 1, en el que la sal de hexacianoferrato (III) es hexacianoferrato (III) de potasio.

6. El sistema de la reivindicación 1, en el que el reactivo también contiene una sustancia de carga.

7. El sistema de la reivindicación 6, en el que la sustancia de carga es un óxido metálico.

8. El sistema de la reivindicación 1, en el que el reactivo también contiene un polímero seleccionado del grupo formado por: polietilenglicol/óxido de polietileno, polivinil-alcohol, polivinil-pirrolidina, sulfonato de poliestireno, polivinil-acetato y microemulsiones de vinil-acetato.

9. El sistema de la reivindicación 1, en el que el reactivo también contiene un tensioactivo.

10. El sistema de la reivindicación 9, en el que el tensioactivo se selecciona del grupo formado por dioctilsulfosuccinato sódico y nonil fenoxipoli (etileno-oxi) etanol ramificado.

11. El sistema de la reivindicación 1, en el que el reactivo también contiene un tampón inorgánico.

12. El sistema de la reivindicación 11, en el que el tampón es una sal de pirofosfato.

13. El sistema de la reivindicación 1, en el que el reactivo también contiene estabilizantes seleccionados del grupo formado por flavina mononucleótido, adenosina difosfato, iones magnesio, lactosa y rafinosa.

14. Un método para determinar información indicativa de la cantidad de ácido β -hidroxibutírico en una muestra, método que consta de los siguientes pasos:

proporcionar el sistema de tiras reactivas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13,

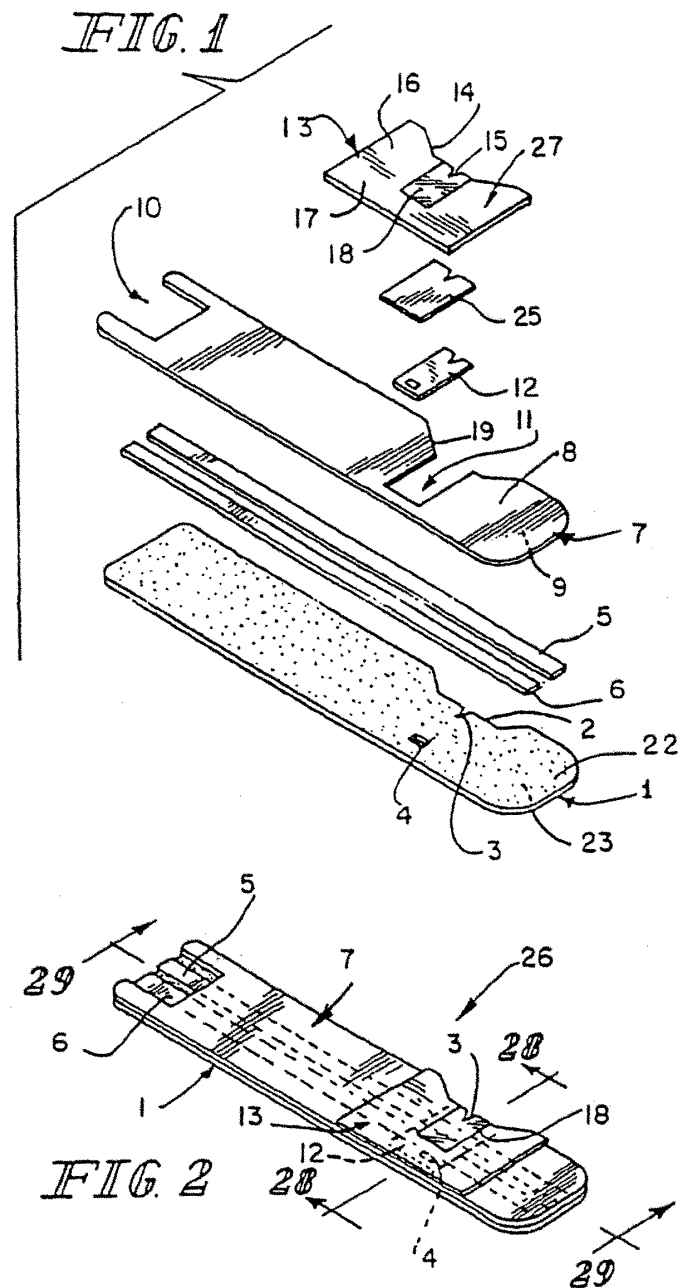
poner en contacto el reactivo del sistema de tiras reactivas con la muestra de líquido y

aplicar una diferencia de potencial directa entre los electrodos que sea suficiente para generar una señal eléctrica del reactivo que sea indicadora de la cantidad de ácido β -hidroxibutírico en la muestra de líquido.

15. El método de la reivindicación 14 en el que el paso de aplicación tiene lugar al menos unos 15 segundos después del paso de puesta en contacto.

16. El método de la reivindicación 15 en el que el paso de aplicación tiene lugar unos 50 segundos después del paso de puesta en contacto.

17. El método de la reivindicación 14, que además comprende el paso de medir la impedancia de fondo del analito y del reactivo.



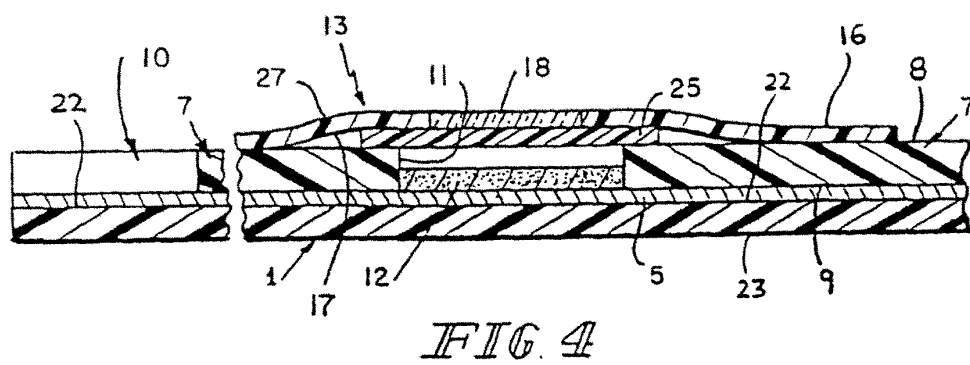
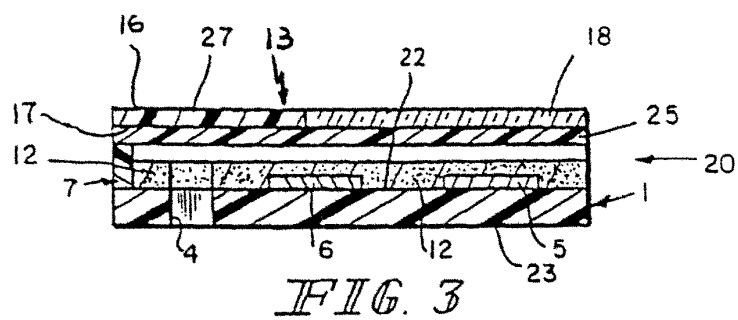


Fig. 5

