



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 671**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/54 (2006.01)

G01N 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04764107 .1**

96 Fecha de presentación : **13.08.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1776464**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.04.2007**

54

Título: **Sistema de ensayo de analitos para determinar la concentración de un analito en un fluido fisiológico o acuoso.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.03.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.03.2010

73

Titular/es: **Egomedical Technologies AG.**
Freudenbergstrasse 24
9242 Oberuzwil, CH

72

Inventor/es: **Stiene, Matthias y**
Rohm, Ingrid

74

Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

ES 2 334 671 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

Sistema de ensayo de analitos para determinar la concentración de un analito en un fluido fisiológico o acuoso.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo del análisis cuantitativo de un analito, por ejemplo glucosa, en un líquido fisiológico, por ejemplo sangre. Más en particular, esta invención proporciona un sistema de ensayo de analitos y un método de ensayo para la determinación cuantitativa de analitos en un fluido fisiológico o acuoso y un método de preparación.

Antecedentes de la invención

15 La determinación de concentraciones de analitos en muestras fisiológicas tiene un papel muy importante en el diagnóstico y la terapia de una gran variedad de enfermedades. Entre los analitos de interés se incluyen, entre otros, glucosa, colesterol, ácidos grasos libres, triglicéridos, proteínas, cetonas, fenilalanina, enzimas, anticuerpos o péptidos sanguíneos, plasma, orina o saliva.

20 Medir la concentración de glucosa en muestras de sangre completa es una tarea particularmente habitual. Debido a que la diabetes provoca complicaciones fisiológicas peligrosas que conducen a la pérdida de la visión, a disfunciones renales y otras consecuencias médicas serias, solamente una terapia muy rigurosa y un control de la enfermedad reducen al mínimo el riesgo de estas consecuencias, con ajustes en ejercicio, dieta y medicación. Con frecuencia, algunos pacientes tienen que comprobar su concentración de glucosa en sangre con tres o más mediciones al día. Estos pacientes, así como los médicos y hospitales, requieren un método preciso, fiable e idealmente poco costoso para ajustar sus regímenes de tratamiento de forma que se eviten las complicaciones a largo plazo de la diabetes mellitus.

30 La mayor conciencia sobre la enfermedad de la diabetes, la aceptación del autocontrol y el autotratamiento dependen de la disponibilidad de dispositivos adecuados y permiten el desarrollo de múltiples dispositivos y métodos de uso personal y también de pruebas para el cuidado de la salud. Se dispone de pruebas de embarazo, de ovulación, de coagulación sanguínea, cetona y colesterol, como ejemplo de una selección no exhaustiva; pero la más destacada en el área del autocontrol sigue siendo la detección de la glucosa sanguínea en vasos capilares.

35 Típicamente, se aplica un fluido de muestra fisiológico, por ejemplo sangre capilar, a una tira de ensayo para evaluar la concentración de un analito. En general, las tiras de prueba se utilizan junto con un dispositivo de medida, que mide una ligera reflectancia y/o transmitancia si la tira está diseñada para la detección fotométrica, o ciertas propiedades eléctricas, tales como la corriente eléctrica, si la tira está diseñada para la detección de un compuesto electro-activo.

40 La Publicación de la Solicitud de Patente Europea N° EP 0 215 419 A2, por ejemplo, describe un dispositivo y un método para la distribución uniforme de un volumen definido de un espécimen de prueba líquido sobre una superficie reactiva a través de un espacio capilar, para proporcionar un modelo de flujo controlado y predeterminado para el líquido del espécimen. La Patente de Estados Unidos N° 4.687.529, por otra parte, controla el líquido presente en un material de matriz del reactivo por medio de almohadillas barrera hidrofóbicas en un dispositivo de prueba del reactivo, que impide o minimiza la contaminación cruzada de los reactivos en el sustrato del dispositivo de prueba.

45 En el último par de años, los biosensores electroquímicos se han destacado en el mercado del diagnóstico y ofrecen al paciente varias ventajas sobre los sistemas de fotometría de reflectancia. Las principales diferencias son las características del llenado capilar de las tiras de prueba, que permiten una más fácil aplicación de la muestra en comparación con los sistemas de fotometría de reflectancia basados en membranas de relleno superior. Adicionalmente, la celda de medida se puede localizar en la punta de la tira, por tanto, la muestra de sangre no estará en contacto directo con el dispositivo de medida (medidor) durante el procedimiento de prueba, lo que mantiene el dispositivo limpio e higiénico, evitando la contaminación de la sangre con el medidor.

50 Hasta ahora, ha evolucionado una amplia variedad de tiras biosensoras electroquímicas. Un biosensor electroquímico ejemplar, tal como se describe en la patente de Estados Unidos 5,288,636, incluye un electrodo de trabajo y uno de referencia/contador. En la superficie del electrodo de trabajo se dispone un reactivo que incluye una enzima con la capacidad de catalizar una reacción que involucra un sustrato para la enzima, un medidor redox con capacidad de transferir los electrones transferidos entre la enzima y el electrodo de trabajo y un tampón. Cuando se agrega al reactivo un fluido de muestra que contiene el analito a medir, tiene lugar una reacción que oxida el analito y reduce el mediador redox. Después o durante esta reacción, se aplica una diferencia de potencial eléctrico entre los electrodos. Se mide la corriente producida por la electrooxidación de la forma reducida del mediador y se correlaciona con la cantidad de analito en la muestra.

65 En una realización típica, el sistema electroquímico se compone de dos electrodos en un elemento soporte encerrado por paredes de soporte formando una cavidad que es lo suficientemente pequeña como para ser rellena por la acción capilar (US 4.900.424; Birth y col., 1987) o con la ayuda de capas de banda o de aspersion (US 5.628.890; Carter y col., 1997).

Debido a las variaciones en la materia prima y procesos, en la fabricación a gran escala de las tiras de analito no se garantiza una adecuada reproducibilidad tira-a-tira de un lote al siguiente. Por tanto, todos los sistemas conocidos requieren tiras de prueba que tienen que ser calibrados durante el proceso de producción. Esta información de calibración se provee en el momento de utilizar el medidor por medios manuales o automáticos. En el primer caso, el usuario tiene que introducir la información de calibración en forma de un número adjunto con cada lote de tiras de prueba, en el segundo caso la información se codifica en la tira ya sea con una barra, un color o una característica de codificación digital. Por tanto, este tipo de información de calibración representa la característica funcional de la tira de prueba en el momento de la producción, que puede ser diferente o no en cuanto a las características de la tira de prueba en el momento de la utilización, la cual puede tener lugar incluso dos años más tarde.

Además, el procedimiento de medición podría verse impedido por otros factores variables en el fluido de muestra fisiológico. Una complicación típica en los análisis de sangre completa es la variabilidad de los niveles de eritrocitos, que conduce a resultados que pueden no reflejar la concentración real de los analitos de la muestra.

La PCT/EP 2004002284 describe una tira de prueba reactiva seca para la detección fotométrica y la determinación cuantitativa de un analito en un fluido fisiológico que está provisto de un sistema de calibración integrado utilizando el método de adición estándar.

Sin embargo, hasta ahora, no existe ningún sistema de prueba de analitos que sea adecuado para la detección electroquímica y la determinación cuantitativa de un analito en un fluido fisiológico y que esté provisto de un medio de calibración y de control de calidad integrados.

Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un sistema de prueba de analitos con un medio de calibración integrado que justifique y compense cualquier variabilidad que pueda ser generada por fluctuaciones en el proceso de producción o por la variabilidad de la muestra analizada misma, que posea medios de detección electroquímicos para medir la concentración de un analito en una muestra de fluido fisiológico.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un proceso de producción para el elemento de prueba de analito electroquímico que no implique pasos de producción numerosos y complicados y que, por tanto, no sea costoso y sea aplicable a productos que ayuden a los pacientes en el autocontrol de la glucosa en sangre o de otros parámetros fisiológicos importantes.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un elemento para determinar la concentración de un analito, tal como glucosa, colesterol, ácidos grasos libres, triglicéridos, proteínas, cetonas, fenilalanina o enzimas, en un fluido fisiológico tal como sangre, suero, plasma, saliva, orina, fluido intersticial y/o intracelular, incorporando el dispositivo un medio de calibración y de control de calidad con medios de detección electroquímicos en una tira de prueba de reactivo en seco. La producción del elemento de prueba de analitos de la invención implica sólo un pequeño número de pasos de producción nada complicados que permiten una producción no costosa de las tiras.

Debido al procedimiento de calibración integrado, el sistema de prueba de analitos de la presente invención proporciona resultados fiables sin tener en cuenta el tipo de sangre, el nivel de hematocrito, la temperatura, etc. Además, también se compensan las variaciones de producción mediante el procedimiento de calibración integrado. Además, el envejecimiento del componente activo es detectable y se puede compensar y/o reportar, lo que conducirá a una vida útil prolongada del producto bajo condiciones de almacenamiento adecuadas.

La presente invención proporciona un elemento de prueba de analitos para determinar la concentración de al menos un analito en un fluido de muestra fisiológico que tiene una primera y una segunda superficies opuestas entre sí a una distancia predeterminada, estando provistas dichas dos superficies de dos patrones sustancialmente equivalentes que forman áreas de energía superficial alta y baja, que están alineadas en su mayor parte de forma congruente, por lo que las áreas de alta energía superficial crean un sistema de distribución de muestra con al menos dos áreas de detección, caracterizadas porque las áreas de detección de la primera y la segunda superficies están provistas también de dos patrones correspondientes de electrodos de trabajo y de referencia correspondientes a los medios de detección electroquímica.

El sistema de distribución de muestra contenido en la parte interior del elemento de prueba de analitos no tiene características mecánicas y/o estructurales que se asemejen a paredes, ranuras o canales para guiar el fluido fisiológico a las áreas de detección, lo que conduce a un proceso de producción eficiente en cuanto a coste, fácil y fiable.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para preparar el elemento de prueba de analitos de la presente invención con los siguientes pasos:

- aplicación de un patrón de electrodos de trabajo en una primera capa que tiene una primera superficie,
- aplicación de un patrón correspondiente de electrodos de referencia en una segunda capa que tiene una segunda superficie,

ES 2 334 671 T3

- generación de áreas de alta y baja energía superficial en la primera capa que tiene la primera superficie,
- generación de un patrón correspondiente de áreas de alta y baja energía superficial en la segunda capa que tiene la segunda superficie, formando las áreas de alta energía superficial un sistema hidrofílico de distribución de muestras con n áreas de detección predeterminadas, donde n es un número entero superior a 2, y donde se localizan los electrodos de trabajo y de referencia por debajo de las n áreas de detección predeterminadas del sistema hidrofílico de distribución de muestras,
- recubrimiento con una formulación catalítica de las n áreas de detección de la primera superficie, favoreciendo dicha formulación catalítica la detección de una concentración de analitos contenida en una muestra de fluido fisiológico utilizando medios de detección electroquímica,
- recubrimiento con las n formulaciones de calibración de las n áreas de detección de la segunda superficie, estando compuestas dichas n formulaciones de calibración de m formulaciones preformadas y de $n-m$ formulaciones con distintos niveles de compuesto de calibración, donde m es un número entero al menos igual a 1 y $n > m$, idénticamente o sustancialmente equivalentes al analito y con la capacidad de inducir la misma reacción química en la formulación catalítica que el analito en la muestra de fluido fisiológico,
- aplicación de las capas de la primera y la segunda superficies a puntos opuestos de una capa central que tiene una discontinuidad que proporciona una cavidad para el sistema de distribución de muestras formada por las áreas de alta energía superficial en la primera y la segunda superficies de la capa base y de recubrimiento.

El elemento de prueba de analitos se describe en diversas realizaciones adecuadas para una variedad de procedimientos de calibración y adaptables a distintos analitos y métodos de determinación electroquímica; se integra fácilmente en tiras de prueba que se utilizan para una sola medida o en disposiciones más complejas, tales como discos de pruebas de analitos o cintas de tiras, para proporcionar unidades de base para varias mediciones.

Otras características y ventajas de la presente invención así como la realización preferente de la misma se evidenciarán a partir de la siguiente descripción junto con las figuras adjuntas.

30

Breve descripción de las figuras

Figura 1: vista en perspectiva de una realización del elemento de prueba de analitos de la presente invención proporcionado en forma de tira de prueba.

35

Figura 2: vista en perspectiva despiezada del elemento de acuerdo con la Figura 1 que muestra las distintas capas por separado.

40

Figura 3: recubrimiento secuencial de las distintas capas sobre las capas de base y de recubrimiento.

Figura 4: corte de un área de detección del sistema de distribución de muestras del elemento de prueba de analitos.

45

Figuras 5a a 5d: pasos de un proceso de producción en cinta continua de los elementos de prueba de analitos con forma de tira.

Figura 6: muestra distintas realizaciones del sistema de distribución de muestras con distintos patrones de trayectorias y áreas de detección adecuadas para distintos métodos de calibración.

50

Figura 7: gráfico que muestra el cálculo de la concentración de analitos en la muestra utilizando el método de adición estándar.

Figura 8: gráfico que muestra el método de validación para los resultados calculados y los datos de calibración.

55

Figura 9: ejemplo de aplicación de una tira de prueba de la invención con un medidor.

Figura 10: muestra el sistema de prueba de analitos con una tira de prueba de analitos insertada listo para recibir una muestra de sangre capilar procedente de la punta del dedo de un paciente.

60

Figura 11: muestra la construcción de un disco de prueba de analitos.

Figura 12: muestra un disco de prueba de analitos comparado con una tira de prueba de analitos.

Figura 13: muestra un sistema de prueba de analitos con un disco de prueba de analitos integrado.

65

Figura 14: muestra un sistema de prueba de analitos con una tira de prueba de analitos en el modo de manejo hacia la izquierda y hacia la derecha.

Figura 15: muestra una cinta de prueba de analitos y una cinta doblada en acordeón para construir una pila.

Las capas que se muestran en la Figura 4 no están en escala, en particular el espesor de las capas 6, 14, 18 y 19 se exageran enormemente.

5

Descripción detallada de la invención

La Figura 1 muestra el elemento de prueba de analitos de la presente invención en forma de una tira de prueba 1 comprendiendo una capa base 2, una capa central 3 que se superpone a la capa base 2 y una capa de recubrimiento 4 que se superpone a la capa central 3. La capa central 3 presenta una discontinuidad 5 (véase la Figura 2) que crea una cavidad hueca junto con la capa base 2 y la capa de recubrimiento 4. Dentro de dicha cavidad se localiza un sistema de distribución de muestras 6 que se une a un área de aplicación de muestras 9 localizada en un lado de la tira de prueba de analitos. El área de aplicación de muestras 9, como superficie de contacto con el usuario, está formada preferentemente por una extrusión convexa 10 que se extiende desde un lado principal de la tira de prueba de analitos para permitir la fácil aplicación de la muestra. Opuesta al área de aplicación de muestra 9, en el segundo lado principal de la tira de prueba de analitos se encuentra el emplazamiento de una ventilación de aire (no mostrado) que permite el desplazamiento de aire mientras se distribuye el fluido fisiológico en el sistema de distribución de muestra.

Además, la tira de prueba de analitos 1 posee unas características de registro 7 que son útiles para diferenciar entre varias clases de tiras de prueba de analitos, por ejemplo para la determinación de diferentes analitos. Por estos medios se podría dar instrucciones a un medidor multi-analitos para poner en funcionamiento un programa especial o procedimientos con parámetros seleccionables al insertar la tira exigida para la determinación de un analito en particular. Como se ilustra en la Figura 2, que representa la disposición multicapa de la Figura 1 en una vista despiezada, la capa base 2 proporciona una primera superficie 2a que provee el sustrato para los electrodos de trabajo 8, guías y contactos conductores 11 de un medio de detección electroquímica, y la capa de recubrimiento 4 provee una segunda superficie 4a que provee el sustrato para los correspondientes electrodos de referencia 8', guías y contactos conductores 11' de un medio de detección electroquímica.

Adicionalmente, la primera superficie 2a de la capa base 2 está provista de un primer patrón hidrofílico 6 que forma una primera parte del sistema de distribución de muestras. El patrón hidrofílico 6 está rodeado por una capa aislante hidrofóbica 14 que sirve de "elemento guía" hidrofóbico para el fluido de muestra en el sistema de distribución de muestras y de aislamiento eléctrico para los cables que conectan los electrodos de trabajo 8 con los medios de detección electroquímica. Igualmente, la segunda superficie 4a de la capa de recubrimiento 4 está provista de un patrón hidrofílico correspondiente 6' que forma la segunda parte de un sistema de distribución de muestras. El patrón hidrofílico 6' también está rodeado por una capa hidrofóbica 14', que sirve de elemento guía hidrofóbico para el fluido de muestra y de aislamiento eléctrico para los cables que conectan los electrodos de referencia 8'.

Los patrones hidrofílicos 6, 6' que forman las áreas de alta energía superficial del sistema de distribución de muestras comprenden un número predeterminado de áreas de detección de analitos 6a, 6'a y trayectorias de muestras 6b, 6'b (véase la Figura 3) que están alineadas y registradas en su mayor parte de forma congruente al ensamblarse la disposición multicapa. Además, los electrodos de trabajo y de referencia 8, 8' coinciden con las áreas de detección 6a, 6'a del sistema de distribución de muestras creadas por los patrones hidrofílicos 6, 6' formados en las capas base y de recubrimiento.

Las capas base y de recubrimiento están separadas por la capa central 3, que define la distancia entre la primera superficie 2a de la capa base 2 y la segunda superficie 4a de la capa de recubrimiento 4 y los sistemas de electrodos 8 y 8'. La capa central 3 puede construirse a partir de una película polimérica fina recubierta con una capa adhesiva en cualquiera de los lados, pero se puede realizar por medio de una capa impresa u otras capas respectivamente espaciadoras que proporcionan el espacio deseado entre la primera superficie 2a de la capa base 2 y la segunda superficie 4a de la capa de recubrimiento 4. Para la funcionalidad del elemento de prueba de analitos sólo es importante que la capa central proporcione una definición precisa y exacta de la distancia entre las capas base y de recubrimiento.

La capa central 3 tiene una discontinuidad 5 que forma una cavidad hueca junto con la primera superficie 2a de la capa base 2 y la segunda superficie 4a de la capa de recubrimiento 4. El sistema de distribución de muestras que se forma por medio de los patrones hidrofílicos 6, 6' y los patrones circundantes de las capas del aislamiento hidrofóbico 14, 14' en la primera superficie 2a, respectivamente con la segunda superficie 4a se localiza dentro de la cavidad creada por la discontinuidad 5 de la capa central 3 y la primera superficie 2a de la capa base 2 y la segunda superficie 4a de la capa de recubrimiento 4. Preferentemente, la cavidad hueca es sustancialmente mayor por diseño que el sistema de distribución de muestras. Dentro de un elemento funcional de pruebas de analitos, el fluido de muestra aplicado entra en la cámara de medida por la trayectoria hidrofílica (área de alta energía superficial) del sistema de distribución de muestras formado por los patrones hidrofílicos 6 y 6', y queda encerrada entre las capas de aislamiento hidrofóbico 14 y 14' (áreas de baja energía superficial) dentro de las vías de flujo predeterminadas 6b, 6'b y las áreas de detección 6a, 6'a (véase la Figura 3) del sistema de distribución de muestras entre la primera superficie 2a de la capa base 2 y la segunda superficie 4a de la capa de recubrimiento 4. Por consiguiente, la muestra no llena toda la cavidad del elemento de prueba de analitos y, por tanto, permite volúmenes de muestra muy pequeños, inferiores a 0,5 μ l, aún con múltiples electrodos de trabajo.

ES 2 334 671 T3

Debido a que el propósito de la discontinuidad 5 de la capa central es sólo en crear una cavidad para el sistema de distribución de muestras formado por los patrones hidrofílicos 6, 6', la discontinuidad 5 de la capa central 3 puede tener distintas formas, tales como forma de sombrilla, rectangular o circular. La discontinuidad 5 de la capa central 3 no tiene ninguna influencia sobre el tamaño del sistema de distribución de muestras formado en los patrones hidrofílicos 6, 6' y, por tanto, no tiene influencia ni tampoco cambia el volumen de la muestra requerida. En comparación con los patrones del sistema de distribución de muestras 6, 6', las formas de la cavidad son más bien sencillas, permitiendo así la aplicación de simples herramientas de perforación y rápido procesamiento con menos exigencia en la precisión de registro.

Adicionalmente, la capa central 3 está provista de un primer hueco 12 para exponer los contactos 11 de los electrodos de trabajo 8a de la capa base y un segundo hueco 13 para exponer los contactos 11' de los electrodos de referencia 8'a de la capa de recubrimiento.

La Figura 3 muestra los pasos de construcción de una realización preferente del elemento de prueba de analitos de la presente invención. El paso principal que se muestra en la fila a) es la preparación de la capa base 2 proporcionando una primera superficie 2a y la capa de recubrimiento 4 proporcionando una segunda superficie 4a. La capa base y la capa de recubrimiento típicamente están formadas a partir de una película polimérica sólida. En ciertas realizaciones, es ventajoso seleccionar películas poliméricas transparentes como sustrato, de forma que el paciente pueda controlar el llenado del elemento de prueba de analitos de la tira de prueba de analitos, sin embargo no se requiere para el funcionamiento apropiado del sistema de prueba de analitos.

Este paso de procesamiento es seguido por la aplicación de los electrodos y las guías conductoras (fila b). En la realización de la presente invención de acuerdo con la Figura 3, los electrodos de trabajo 8 de los medios de detección electroquímica se aplican sobre la primera superficie 2a de la capa base 2 y los electrodos de referencia correspondientes 8' de los medios de detección electroquímica se aplican sobre la segunda superficie 4a de la capa de recubrimiento, pero, obviamente, los electrodos de trabajo 8 de los medios de detección electroquímica se pueden aplicar sobre la segunda superficie 4a de la capa de recubrimiento 4 y los electrodos de referencia 8' correspondientes de los medios de detección electroquímica se pueden aplicar sobre la primera superficie 2a de la capa base. Más aún, es posible conectar eléctricamente todos o algunos electrodos de referencia entre sí.

En la técnica se conocen varias tecnologías que se utilizan en la industria para producir patrones conductores de guías y electrodos que se pueden adoptar para este paso. Son adecuados la impresión serigráfica con tintas de carbono o de metales nobles, deposición química o física de vapor de metales nobles o carbono con láser posteriormente o con formación de patrones fotolitográficos de la estructura requerida del circuito o deposición química de metales nobles en superficies compatibles. Las estructuras limpias de metales nobles, tales como oro, paladio y platino, producidas en un proceso de deposición de vapor son las más adecuadas para una medición electroquímica fiable y reproducible. En una realización preferente, el elemento se forma a partir de un sustrato de poliéster tal como MYLAR® o MELINEX® recubierto de oro o, en especial, de paladio. La estructura del circuito requerido se produce preferentemente por ablación de la capa metálica con un láser YAG. La larga longitud de onda del láser (1.064 nm) evapora esencialmente el metal y deja la película polimérica intacta, así, el proceso de estructuración es muy eficiente y evita la contaminación de la capa metálica con partículas de plástico quemado.

Cuando se concluye la estructura de circuitos, la primera superficie 2a de la capa base 2 y la segunda superficie 4a de la capa de recubrimiento 4 se suministran con patrones hidrofílicos equivalentes 6, 6' que representan las áreas de alta energía superficial, que son humidificables por el fluido de muestra (ver fila c). Los patrones hidrofílicos 6, 6' se aplican de tal manera que los electrodos 8, 8' coinciden con las áreas de detección 6a, 6'a del sistema de distribución de muestras. La preparación de las capas base y de recubrimiento concluye por la impresión de una capa de aislamiento hidrofóbico 14, 14' (fila d), que tiene el doble propósito de aislar las piezas del circuito conductor, exponiendo solamente los electrodos y las almohadillas de contacto, y limitar el fluido de muestra a la parte hidrofílica del sistema de distribución de muestras. Adicionalmente, se pueden emplear tintas hidrofóbicas para decorar el sistema de pruebas de analitos con el color deseado, un texto informativo o el logotipo del producto. Especialmente, estos pasos de impresión se llevan a cabo mediante flexografía. Sin embargo, otros procesos de impresión o recubrimiento, tales como grabado, litografía, offset, inyección de tinta o tecnología de impresión de tinta sólida, también son adecuados para la aplicación de las capas hidrofílicas e hidrofóbicas. Al mismo tiempo, la tecnología de impresión de tinta sólida es perfectamente adecuada para la aplicación de patrones hidrofóbicos debido al carácter ceroso de las tintas sólidas en sí.

La flexografía permite una impresión de alta resolución en una prensa rotativa y soporta una producción a alta velocidad. Se trata de una tecnología establecida para la impresión sobre sustratos en forma de película polimérica y es muy utilizada en la industria del envasado. Son preferentes tintas de baja viscosidad para lograr un recubrimiento fino y uniforme de aproximadamente 2-4 micras. La operación de una máquina de impresión por flexografía a cuatro colores es una práctica conocida y no da problemas operativos. Aunque sean aplicables tintas basadas en disolvente o endurecibles por UV para fabricar las tiras de prueba de analitos, son preferentes las tintas de endurecimiento por haz de electrones (EB). Estas tintas proporcionan mayor resistencia a los factores mecánicos y químicos y contienen un 100% de polímeros, opcionalmente con pigmentos, pero no contienen disolventes orgánicos volátiles ni fotoiniciadores, que han demostrado afectar a la estabilidad de los sensores químicos. Estas ventajas en las características de rendimiento derivan de la capacidad de los electrones para formar películas poliméricas reticuladas y para penetrar en la superficie.

ES 2 334 671 T3

Las tintas que se utilizan en el endurecimiento EB hacen uso de la capacidad de polimerización de monómeros y oligómeros acrílicos. La química acrílica tiene un significado especial en las tintas de hoy en día (J.T. Kunjappu, "The Emergence of Polyacrylates in Ink Chemistry", Ink World, febrero 1999, p. 40). La estructura del compuesto acrílico más sencillo, el ácido acrílico, se muestra en la siguiente ecuación:



El doble enlace de la parte acrílica se abre durante la interacción con los electrones (iniciación) y se forma un radical libre que actúa en otros monómeros, formando una cadena (propagación), que conduce a polímeros de alto peso molecular. Como se mencionó anteriormente, la polimerización inducida por radiación no requiere un iniciador externo, ya que la radiación en sí genera radicales libres de forma que, como consecuencia, no quedarán en el recubrimiento especies iniciadoras.

Se dispone de una gran variedad de monómeros acrílicos para el endurecimiento EB, variando desde simples acrilatos, tales como acrilato de 2-fenoxietilo y acrilato de isooctilo, a prepolímeros tales como bisfenol A epoxi acrilato y acrilatos de poliéster/poliéter (R. Golden. J. Coatings Technol., 69 (1997), p. 83). Esta tecnología de endurecimiento permite diseñar "tintas funcionales" con un enfoque en las propiedades químicas y físicas deseadas, sin necesidad de disolventes ni sistemas de endurecimiento que requieran otras tintas, lo que puede complicar el proceso de diseño.

Las tintas con funciones hidrofílicas se pueden obtener a partir de una amplia selección de polímeros hidrosolubles reticulables, por ejemplo polialcoholes, glicoles, derivados de acrilato de óxidos de polietileno, vinilpirrolidona y otros. Son particularmente interesantes los acrilatos de silicona organo-modificada, que son especies reticulables de polisiloxanos organo-modificados. Una tinta hidrofóbica típica contendrá monómeros, oligómeros y prepolímeros con funciones hidrofóbicas, tales como acrilatos de isooctilo, acrilatos de dodecilo, derivados de estireno o sistemas de cadenas carbonadas parcialmente fluoradas.

Al terminar las capas base y de recubrimiento con todos los recubrimientos conductores, hidrofílicos e hidrofóbicos requeridos, las formulaciones catalíticas y las formulaciones de calibración del elemento de prueba de analitos se dosifican en las áreas de detección predeterminadas (6a y 6'a). En la realización del elemento de prueba de acuerdo con la Figura 3, las áreas de detección 6a₁, 6a₂ y 6a₃ de la primera superficie se recubren con las formulaciones catalíticas que contienen una enzima y un mediador, mientras un área de detección (6c) se mantiene sin recubrimiento. Las áreas de detección correspondientes 6'a₁, 6'a₂ y 6'a₃, se recubren con las formulaciones de calibración. Dos de las áreas de detección (por ejemplo 6'a₂ y 6'a₃) se recubren con formulaciones de calibración que contienen distintas concentraciones del compuesto de calibración, mientras la formulación recubierta en la tercera área de detección (por ejemplo 6'a₁) no contiene ningún compuesto de calibración. Una vez más, el área de detección (6c) se mantiene sin recubrimiento para la evaluación de fondo.

La Figura 4 es una sección de un área de detección del sistema de distribución de muestras que muestra un electrodo de trabajo 8 y una capa hidrofílica 6a de la primera parte del sistema de distribución de muestras aplicado en la capa base 2 y recubierto con la capa con una enzima y mediador 18, y un electrodo de referencia correspondiente 8', así como una capa hidrofílica 6'a que forma la segunda parte del sistema de distribución de muestras aplicado en la capa de recubrimiento 4 y recubierto con una formulación de calibración 19. El fluido de muestra 20 humedece las áreas de alta energía superficial formadas por las capas hidrofílicas 6a y 6'a y está limitado en el sistema de distribución de muestras por las capas aislantes hidrofóbicas 14 y 14'.

La precisión de la deposición de las formulaciones catalíticas y de calibración es muy crítica y define el rendimiento del sistema de prueba de analitos. Preferentemente, ambas formulaciones se aplican con la ayuda de sistemas de chorro de tinta de alta precisión o con cabezas de impresión piezoeléctricas. La tinta en su mayor parte está compuesta de agua y del compuesto catalítico o de calibración y se secará a temperaturas ligeramente elevadas. El aspecto principal de estas formulaciones de tinta es la rápida reconstitución de los componentes químicos después de la aplicación de la muestra, sin comprometer las áreas hidrofóbicas del sistema de prueba de analitos.

Las formulaciones catalíticas adecuadas para la presente invención se basan en una base no reactiva, en componentes de transferencia de electrones (mediadores) y en una enzima o combinaciones de enzimas como promotores. La base no reactiva provee un vehículo que debe ser adecuado para la impresión de chorro de tinta, estabilización enzimática y fijación en las superficies de las áreas de detección. A continuación se da un ejemplo de composición para 100 ml de formulación.

ES 2 334 671 T3

Base no reactiva		
Agua destilada	65 ml	Disolvente
Ácido cítrico	2,4 g	Sistema tampón
Citrato de sodio 3 2H ₂ O	3,2 g	Sistema tampón
Polietilenglicol	1,0 g	Inhibidor de costras
BSA	3,0 g	Estabilización enzimática
Gafquat 440 (ISP)	1,0 ml	Agente peliculígeno
Advantage S (ISP)	1,0 g	Agente peliculígeno
PVA (bajo peso molecular)	1,5 g	Estabilización enzimática
Ajustar pH a 6,5 y rellenar hasta 100 ml		
Formulación catalítica		
(todos los componentes se agregan a una base no reactiva de 100 ml)		
GOD (<i>Aspegillus niger</i>)	2,0 g (250 U/ml)	
Hexacianoferrato (III) de potasio	2,2 g	

La formulación catalítica depende del analito que se vaya a detectar. En caso de determinación de glucosa, la formulación se puede componer de glucosa oxidasa (GOD) y hexacianoferrato (III) de potasio como ejemplo de mediador. El mediador seleccionado se puede cambiar para otras aplicaciones o si el ensayo se adapta a distintas enzimas y analitos. Ejemplos de sistemas mediadores frecuentemente empleados son: hexacianoferrato (III) de potasio, tetraciano-p-quinona-dimetano (TCNQ), metilviologen (MV2+), tetratrafalvaleno (TTF), N-metilfenzino (NMP+), 1,1'-dimetilferroceno, rutenio (III) hexamina, biperidina de osmio, ferroceno y sus derivados.

Diferentes enzimas y mediadores pudieran requerir también el ajuste del pH de una base no reactiva. Alternativamente, el hexacianoferrato (III) de potasio se puede utilizar con glucosa deshidrogenasa pirrol-quinolina-quinona (GDH-PQQ) en lugar de GOD. Sensores con la enzima GDH (glucosa deshidrogenasa) muestran un rendimiento similar, como sensores, con la enzima GOD, con menor sensibilidad para el oxígeno pero con una reactividad cruzada más alta a la galactosa y la maltosa.

Las tintas adecuadas para la formulación de calibración pueden estar compuestas de la base no reactiva con la concentración requerida del compuesto de calibración. Preferentemente, el compuesto de calibración contenido en la formulación de calibración 19 recubierto en las áreas de detección predeterminadas 6a de la segunda superficie 4a es idéntico o sustancialmente equivalente al analito y es capaz de inducir la misma reacción química en la formulación catalítica que el analito en la muestra de fluido fisiológico. En caso que el analito de interés en la muestra fisiológica sea glucosa, el compuesto de calibración también es preferentemente glucosa.

Cuando concluyen todos los pasos de impresión y recubrimiento, el artículo se puede ensamblar de dos maneras. La primera alinea tres capas separadas: la capa central va sobre la capa base y la aplicación de la capa de recubrimiento termina el proceso de laminación. El registro preciso xy de las capas base y de recubrimiento se vuelve una tarea crítica para la función del elemento de prueba de analitos y, si no se logra este registro, el sistema de distribución de muestras no funcionará adecuadamente. Las tolerancias de registro deben situarse entre $\pm 5\%$ de la anchura de las trayectorias hidrofílicas para lograr un buen rendimiento. La aplicación de la capa central, cinta adhesiva de dos lados con un espesor preferente de 50 a 80 micras, es menos exigente debido a su discontinuidad relativamente grande en el material en comparación con el tamaño de las trayectorias hidrofílicas.

Alternativamente, se podría utilizar un proceso de impresión especial para aplicar de 50 a 80 micras de pasta de tinta para realizar la capa central. Son especialmente preferentes las tintas de endurecimiento por haz de electrones para esta construcción de capa central alternativa, debido al mínimo encogimiento de las tintas durante el proceso de endurecimiento. Comparado con la variación de espesor de la cinta adhesiva de alta calidad, este proceso de impresión alternativo puede resultar en una variabilidad más elevada del espesor de la capa central.

El registro es especialmente exigente en las líneas de producción continua, donde el sustrato avanza de varios metros hasta decenas de metros por minuto. La expansión del sustrato y la tensión de la banda dificultan más el registro en la dirección-x (dirección de la banda) que en la dirección-y perpendicular al movimiento de la banda.

La Figura 5 ilustra una solución para este problema; aquí se imprimen la capa base y de recubrimiento en un solo sustrato. Por tanto, la posición de las áreas de detección predeterminadas y de las trayectorias de flujo del sistema de distribución de muestras se fija en relación una con otra y se mantiene sin cambios por la expansión del material y la tensión de la banda.

5

En un primer paso de producción del proceso de producción de la banda continua de acuerdo con la Figura 5a, los patrones de los electrodos de trabajo y de referencia 8, 8' del medio de detección electroquímica y los patrones hidrofílicos 6, 6' del sistema de distribución de muestras se imprimen en un sustrato de banda 44 que forma las capas base y de recubrimiento. Como se ilustra en la Figura 5a, los patrones impresos de los sistemas de distribución de muestras 6, 6' se disponen en los sustratos de banda 44 opuestos entre sí y entrecruzados en las áreas que forman más tarde las áreas de aplicación de la muestra. Por tanto, las posiciones de los electrodos de trabajo y de referencia 8, 8' así como las áreas de detección predeterminadas 6a, 6'a se fijan en relación una con otra y se mantienen sin cambios por la expansión del material y la tensión de la banda.

15

En una realización alternativa, solamente una de entre la primera y la segunda superficies se proporciona con un patrón hidrofílico/hidrofóbico (6, 14) para crear el sistema de distribución de muestras. En una realización preferente, la primera o la segunda superficie se proporciona con el patrón hidrofílico/hidrofóbico (6, 14), mientras que la superficie correspondiente provee un patrón homogéneo de píxeles hidrofílicos rodeados por un área hidrofóbica, creando así una superficie con un carácter semi-hidrofílico y semi-hidrofóbico (carácter anfifílico) y eliminando la necesidad de alinear el patrón hidrofílico e hidrofóbico (6, 14) de la primera superficie con un patrón hidrofílico e hidrofóbico equivalente (6', 14') de la segunda superficie. Las propiedades de dicha superficie anfifílica se pueden diseñar fácilmente por medio del patrón geométrico de los píxeles hidrofílicos y la relación global entre el área hidrofílica e hidrofóbica. En la invención descrita, el carácter anfifílico, respectivamente la relación entre píxeles hidrofílicos y áreas hidrofóbicas, se diseña de modo tal que el fluido de muestra avance del píxel hidrofílico al píxel hidrofóbico solamente si la superficie opuesta proporciona un carácter hidrofílico. Si la superficie opuesta proporciona el carácter hidrofóbico, el movimiento del fluido dentro del espacio capilar del elemento de prueba de analitos se detendrá. Este mecanismo permite que el método anteriormente descrito forme un elemento de prueba de analitos funcional sin el requisito tan estricto de registro preciso del patrón correspondiente del sistema de distribución de muestras previsto en la primera y la segunda superficies. Sin embargo, de forma especial, ambas superficies primera y segunda están provistas de patrones equivalentes de alta y baja energía superficial para asegurar una distribución rápida y precisa del fluido de muestra dentro de las trayectorias hidrofílicas del sistema de distribución de muestras.

30

Las líneas discontinuas 46 indican las futuras líneas de corte para separar las tiras de prueba de analitos, mientras que las líneas discontinuas 45 indican la futura línea de doblado del sustrato de banda.

35

Después de imprimir los patrones de los electrodos de trabajo y de referencia, los patrones hidrofílicos del sistema de distribución de muestras y la capa aislante hidrofóbica, las áreas de detección 6a, 6'a del sistema de distribución de muestras se recubren con las formulaciones catalíticas y de calibración. Por ejemplo, las áreas de detección "a" de la fila inferior del sustrato de banda 44, que representarán la primera superficie del elemento de prueba de analitos, se recubren con la formulación catalítica que contiene la enzima y un mediador, mientras que las áreas de detección 6'a de la fila superior del sustrato de banda 44 representarán la segunda superficie del elemento de prueba de analitos y se recubren con las formulaciones de calibración que contienen diferentes niveles del compuesto de calibración. Una de las formulaciones de calibración (por ejemplo, posicionada en 6'a₁) no contiene el compuesto de calibración y proporciona la lectura del fluido fisiológico en el paso de detección.

45

La tarea para registrar la capa central que proporciona el espacio entre las capas de base y de recubrimiento se vuelve menos crítica debido a una larga discontinuidad 5 proporcionada en la capa central, lo cual da suficiente tolerancia en el proceso de producción para un esquema de fabricación en continuo tal como se muestra en la Figura 5b. En caso de que la capa central 47 esté impresa, se podría aplicar como último paso durante la impresión flexográfica del elemento de prueba de analitos. Se dispone de varios métodos de unión para unir las capas base y de recubrimiento fabricadas con una capa central impresa 47. Los más adecuados son el sellado térmico, unión por láser, o soldadura por ultrasonido. Alternativamente, una capa adicional 47, que se puede componer de una cinta adhesiva de dos lados, se lamina sobre una de las superficies, por ejemplo la superficie 2a de la capa base 2.

50

55

La capa central 47, que define la distancia entre la primera y la segunda superficies de las capas base y de recubrimiento, está provista de perforaciones 5, 12, 13 que exponen el sistema de distribución de muestra 6 y los contactos de los electrodos 11, 11', y crea una cavidad para los sistemas de distribución de muestras en el elemento de prueba de analitos después del paso final de ensamblaje.

60

El ensamblaje final del elemento de prueba de analitos se muestra en la Figuras 5c y 5d. El elemento de prueba de analitos se ensambla doblando la mitad superior del sustrato de banda 44 a lo largo de la línea de pliegue 45 en la parte inferior del sustrato de banda, por ejemplo con ayuda de una plancha de plegado tal como se ilustra en la Figura 5c, creando una banda de tipo intercalado como se muestra en la Figura 5d. Posteriormente, un rodillo de prensa puede asegurar una conexión estrecha entre la capa central y las capas de base y de recubrimiento.

65

Finalmente, la banda laminada se corta o perfora según la forma de producto deseada, mientras que la línea 46 proyecta un ejemplo de forma de la tira final de prueba de analitos sobre la banda antes del proceso de separación. Con el método de preparación ilustrado en la Figura 5, la parte superior del sustrato se puede doblar en la parte inferior sin

ES 2 334 671 T3

el riesgo de perder el registro en la dirección-x de la banda y proporciona un método más fácil para obtener el registro correcto de la primera y la segunda superficies que forman el sistema de distribución de muestras en comparación con el proceso de una sola lámina.

5 Los requisitos de volumen para el sistema de distribución de muestras contenido en el elemento de prueba de analitos de la realización preferente son aproximadamente de $0,5 \mu\text{l}$ - $1,0 \mu\text{l}$ y requieren aproximadamente 100 nl - 150 nl por área de detección. Sin embargo será obvio para los expertos en la técnica que el volumen del sistema de distribución de muestras variará con los diferentes diseños y con el número de áreas de detección predeterminadas empleadas, así como con el espesor de la capa central 3.

10 La Figura 6 muestra varios patrones de los distintos sistemas de distribución de muestras. La celda AI en la Figura 6 ilustra los casos para un sistema de distribución de muestra sencillo adecuado para realizar una calibración lineal. La columna A de la Figura 6 muestra el diseño principal de los sistemas de distribución de muestras sin corrección de fondo, mientras la columna B proporciona diseños para los sistemas de distribución de muestras con correcciones de fondo. La columna C indica el orden más alto de la ecuación de calibración polinomial que se puede lograr con los diseños adyacentes y la columna n indica el número mínimo de áreas de detección predeterminadas en cada superficie, respectivamente el número de mediciones requeridas. Los literales en cada diseño indican la posición de la corrección de fondo (c), muestra (1) y todas las áreas de calibración asociadas (2, 3, 4, 5, 6) con cantidades crecientes del compuesto de calibración. La calibración más sencilla está representada por una ecuación lineal donde la relación entre la medida y la concentración de analitos es estrictamente proporcional. En general, la calibración del elemento de prueba de analitos se lleva a cabo utilizando el método de adición estándar, mediante la adición de una cantidad conocida del compuesto de calibración al fluido de muestra proporcionado en las diferentes áreas de calibración y el cálculo posterior de una ecuación de calibración lineal o no lineal monótona.

25 La Figura 7 da una explicación más detallada sobre el caso I. El modelo de calibración u orden (columna C) necesita ser el apropiado para el analito seleccionado y para la química de detección empleada, como consecuencia, no es posible aplicar un modelo de calibración lineal a una reacción química que obedece a un modelo de cuarto orden y viceversa. Sin embargo, sigue siendo posible utilizar el elemento de prueba de analitos diseñado para cinco adiciones estándar para una calibración lineal, una cantidad más elevada de estándares permitirá una medición aún más precisa y una validación estadística con mayor significación en términos de coeficiente de correlación, de desviación estándar y de error estándar de la prueba en comparación con una calibración lineal basada en dos estándares.

30 Además, también es posible la repetición de medidas de muestra y estándar, por tanto, es posible realizar dos calibraciones lineales independientes para una muestra particular de fluido fisiológico con las realizaciones que se muestran en la fila IV. De igual forma, es posible utilizar el mismo elemento de prueba de analitos para la determinación de dos analitos.

35 Alternativamente, se puede realizar un sistema multi-analito dentro del mismo conjunto de áreas de detección predeterminadas si las químicas de detección seleccionadas no generan problemas de interferencia y si los ductos y productos de reacción de una reacción no participan en la otra reacción. Además, es necesario que los productos de reacción redox-activos se puedan determinar independientemente en dos potenciales de electrodo diferentes. Dentro de este esquema de detección, el producto que reacciona a un potencial bajo se determinará en primer lugar, antes de que el dispositivo de medición se cambie a un potencial mayor para controlar el segundo producto. Por tanto, el análisis se debe llevar a cabo de manera secuencial, lo que requerirá más tiempo comparado con el caso descrito anteriormente.

40 Cuando el elemento de prueba de analitos se diseña para realizar n determinaciones, siendo n un número entero mayor que 2, todas las n áreas de detección 6a en la primera superficie 2a son recubiertas con la formulación catalítica (capa con mediador-enzima 18), favoreciendo la detección del analito en el fluido de muestra fisiológica, mientras n áreas de detección predeterminadas 6'a en la segunda superficie 4a del compuesto de calibración o analito y m formulaciones preformadas, siendo m un número entero de al menos 1 y $n > m$. En otras palabras, al menos una de las n áreas de detección del sistema de distribución de muestras no contiene el compuesto de calibración.

45 Después de aplicar el fluido fisiológico al área de aplicación de la muestra y distribuirlo en las áreas de detección predeterminadas por medio de una acción capilar, se disuelven las formulaciones catalíticas en las n áreas de detección predeterminadas 6a de la primera superficie 2a, así como las n formulaciones de calibración en las n áreas de detección predeterminadas 6'a de la segunda superficie 4a, formando una mezcla de analito, compuesto de calibración (que puede ser idéntico al analito), enzima y mediador. Dentro de estas n mezclas, la concentración de las especies electroquímicamente detectables va cambiando proporcionalmente a los distintos niveles del compuesto de calibración más el nivel desconocido del analito, permitiendo así la determinación de n resultados por un medio de detección electroquímico, así como el cálculo de la concentración de analitos. Preferentemente, la formulación catalítica y las formulaciones de calibración aplicadas a las áreas de detección predeterminadas son fácilmente solubles en un fluido fisiológico o en otras soluciones acuosas. Ambas formulaciones proporcionadas en las áreas de detección opuestas entre sí se posicionan muy próximas para facilitar una mezcla difusiva rápida de los componentes, permitiendo una rápida reacción de todos los compuestos químicos contenidos en las áreas de detección y acelerando la rápida determinación electroquímica de la concentración de analitos.

65 Debido a que existen más de dos áreas de detección dispuestas dentro del sistema de distribución de muestras, gracias a lo cual al menos dos de las áreas de detección contienen niveles conocidos pero diferentes del compuesto de

ES 2 334 671 T3

calibración, es posible que el medio de procesamiento calcule la concentración desconocida del analito a partir de las n mediciones realizadas con el fluido fisiológico en el elemento de prueba del analito.

La Figura 7 muestra un ejemplo de cálculo de una concentración de analito en una muestra por el método de adición estándar lineal, técnica de calibración conocida que se utiliza en varios campos de la química analítica y ahora integrado y utilizado en una tira de prueba de reactivo en seco para la detección electroquímica por primera vez. En este ejemplo, el sistema de distribución de muestras incluye tres áreas de detección de analitos, dos están recubiertas con diferentes niveles predeterminados de un compuesto de calibración. Después de aplicar el fluido fisiológico al sistema de distribución de muestras, la reacción catalítica se lleva a cabo en las áreas de detección de analitos y el medio de detección electroquímico mide una primera señal electroquímica 21a, tal como la corriente eléctrica generada por la muestra localizada en el área de detección, con el primer nivel de compuesto de calibración. La lectura de esta área de detección representa una señal proporcional a la concentración combinada del primer compuesto de calibración y la concentración del analito. En paralelo, se produce una segunda señal electroquímica 21b mediante la muestra localizada en el área de detección con el segundo nivel del compuesto de calibración que representa una señal proporcional a la concentración combinada del segundo compuesto de calibración y la concentración del analito. Además, se mide una tercera señal electroquímica 21c en el área de detección que contiene solamente la muestra con una concentración de analito desconocida.

Debido a que existe una correlación lineal entre la señal electroquímica y la concentración del analito, el medio de procesamiento del sistema de prueba del analito puede calcular, mediante análisis de regresión lineal de las mediciones, los coeficientes para la ecuación de calibración $y = c_0 + c_1x$ en el ejemplo anterior. La concentración del analito en la muestra de fluido fisiológico se determina por el punto cero ($y = 0$) 22 de la ecuación de calibración previamente calculada.

Una representación general de las ecuaciones de calibración aplicables se da en forma de:

$$y = \sum_1^{n-1} \{c_{(n-1)}x^{(n-1)}\}$$

donde $y = f$ (resulta de la medición electroquímica); $x = f$ (concentración de los compuestos de calibración); n número de mediciones excluyendo repeticiones o mediciones de fondo.

Este formato de ecuación polinomial proporciona, junto con los n valores presentados en la Figura 6, la entidad de la mayoría de los modelos de calibración útiles para los diversos diseños de los sistemas de distribución de muestras en la figura anteriormente mencionada. Los valores para "y" y "x" pueden representar los datos calculados por una función para permitir el pre-procesamiento de los datos sin procesar generados por el medio de detección. Por tanto, es posible utilizar una función logarítmica para la linearización de los datos sin procesar.

Debe resultar obvio a partir de esta exposición que la invención no se limita a los diseños de sistemas de distribución de muestras de la Figura 6; y un experto en la técnica tendrá la capacidad de diseñar sistemas con n superior a 6 junto con la información suministrada.

En Frank y col. (Anal. Chem., vol. 50, No. 9, agosto 1978) y Saxberg y col. (Anal. Chem. Vol. 51, No. 7, junio 1979) se da una introducción detallada en una metodología de adición estándar lineal y no lineal.

Una realización preferente del elemento de prueba de analitos de la presente invención de acuerdo con la Figura 3, está diseñada para comprender un área de detección que incluye los compuestos catalíticos pero ningún compuesto de calibración ($6a_1$ y $6'a_1$, resp.), un área de detección que incluye los compuestos catalíticos y una primera concentración del compuesto de calibración ($6a_2$ y $6'a_2$, resp.), un área de detección que incluye los compuestos catalíticos y una segunda concentración del compuesto de calibración ($6a_3$ y $6'a_3$, resp.) y un área de detección para la absorción de fondo ($6c$ y $6'c$, resp.). Por medio de esta última área de detección, que no incluye ni compuesto de calibración ni compuestos catalíticos, es posible determinar la absorción de fondo de la muestra y considerarla durante el proceso de calibración.

La Figura 8 ilustra un método de validación preprogramada para los resultados calculados y los datos de calibración por medio del cual se verifica la validez de los resultados medidos definiendo una "ventana de validación" 23b para medidas válidas y correctas. Por este medio, el sistema de prueba de analitos puede limitar todos los datos a un rango de concentración validado y útil, por ejemplo de 30 a 600 mg/dl de glucosa, y un rango válido para la señal electroquímica, típicamente entre 0 y 5 μA , dependiendo del material del electrodo, del mediador, del potencial y del área del electrodo. De igual forma, el medio de procesamiento puede limitar la pendiente y la intercepción de los coeficientes generales c_0 a $c_{(a-1)}$, a un rango válido que sea particularmente útil para las ecuaciones polinomiales no lineales. Una población de medidas válidas con una línea correspondiente de calibración 23a localizada dentro de los límites de la ventana de validación 23b se ilustra en la Figura 8; véase los literales 24a a 24c.

ES 2 334 671 T3

Todavía más poderosa es la validación de resultados por medio de evaluación estadística y análisis de regresión lineal. Se puede estimar la calidad de la calibración por medio de un coeficiente de correlación r_2 y un intervalo de confianza; por tanto, el sistema de prueba de analitos puede rechazar la visualización de un resultado de medida si el coeficiente de correlación cae por debajo de un umbral preprogramado. Alternativamente, el medio de procesamiento puede calcular una tolerancia o rango de concentración del resultado basado en el intervalo de confianza calculado. Estos métodos permiten un alto control sobre la calidad de los resultados suministrados al paciente, que se utilizan y se conocen hoy en día solamente a partir de métodos y equipos de laboratorio costosos y sofisticados. Es todavía más importante para el paciente/usuario, especialmente en escenarios hospitalarios, el derecho a seguridad en la calidad en el momento de la medición.

La Figura 9 muestra la inserción de la tira de prueba de analitos dentro de un sistema de prueba de analitos. En una realización preferente, la tira de prueba de analitos está diseñada para tener una extensión lateral y cóncava localizada en el lado mayor de la tira de prueba, donde se encuentra el área de aplicación de muestras 9. Esta característica permite la fácil aplicación de muestras de sangre capilar sustraídas del brazo o el dedo del paciente, tal como se muestra en la Figura 10.

En otra realización de la presente invención, como se muestra en la Figura 11, una pluralidad de elementos de prueba de analitos se disponen simétricamente alrededor de un punto central para formar un disco de prueba de analitos 29 con áreas de aplicación de muestras orientadas hacia fuera 9. El ejemplo de disco de prueba de analitos 29 de acuerdo con la Figura 11a incluye nueve elementos de prueba de analitos 1 de la presente invención. Como se muestra en la vista despiezada de la Figura 11b, el disco de prueba de analitos 29 está recubierto de una envoltura o manguito de disco compuesto por una capa superior 30 y una capa inferior 31. El lado interior de las capas superior e inferior 30, 31 del manguito puede estar provisto también de una capa absorbente de la humedad 32 para captar el exceso de sangre después de haber utilizado y transportado el elemento de prueba de analitos dentro del sistema de cartucho. La capa superior 30 y la capa inferior 31 de la envoltura de disco tienen perforaciones que se disponen de manera congruente entre sí, formando una ventana óptica 25 para exponer el elemento de prueba de analitos activo y para ayudar al usuario a insertar el disco en el medidor según una orientación correcta. Adyacente a la ventana óptica 25, en las áreas periféricas exteriores de la capa superior de la envoltura de disco 30 y de la capa inferior de la envoltura de disco 31, se encuentran dos huecos 26 para exponer el área de aplicación de muestras 9 de los elementos de prueba de analitos del disco. Los contactos 28a con el sistema de electrodos de trabajo del elemento de prueba de analitos y los contactos 28'a (no mostrados) con el sistema de electrodos de referencia, que se proporcionan en el sitio opuesto de los contactos 28a, están alineados con el borde interior del disco 29 para exponerlos al medidor. Preferentemente, el disco de prueba 29 está provisto adicionalmente de una muesca de registro 33, que también se puede localizar en el borde interior del disco 29. Durante un procedimiento de medida, solamente el elemento de prueba de analitos que se utiliza actualmente para la determinación de analitos está expuesto por medio del hueco 26, como se muestra en la Figura 11c. El disco de prueba de analitos 29 tiene la capacidad de girar alrededor de su punto central para llevar un nuevo elemento de prueba de analitos a su posición según se requiera.

Por medio de un disco de prueba de analitos es posible disponer de una pluralidad de elementos de prueba de analitos en un área relativamente pequeña. El mismo número de elementos de prueba de analitos incluidos en las tiras de prueba de analitos requeriría un área mucho más grande y, por tanto, mucho más material, como se ilustra mediante la comparación de tamaños del disco de prueba de analitos y las tiras de prueba de analitos ilustradas en la Figura 12. Aunque el área unitaria 34 del disco de prueba de analitos 29 incluya nueve elementos de prueba de analitos 1, el área idéntica 35 alojaría solamente tres elementos de prueba de analitos incorporados en tres tiras de prueba de analitos 1. Sin embargo, no es aconsejable una reducción en los tamaños de la tira de prueba debido a la complicación del manejo de tiras más pequeñas, que es más difícil y más incómodo para el paciente.

Las Figuras 13a y 13b muestran el disco de prueba de analitos incluido en un medidor, donde el área de aplicación de muestras 9 sobresale una vez más del alojamiento del medidor 36.

Es posible adaptar, no sólo para las tiras de prueba de analitos sino también para el disco de prueba de analitos, el dispositivo de medición (sistema de prueba de analitos) al modo de manejo hacia la izquierda y hacia la derecha, como se ilustra en la Figura 14. Cuando se desea un modo de manejo hacia la izquierda de acuerdo con la Figura 14a, la tira de prueba de analitos 7 se inserta dentro del medidor desde el lado inferior, área de aplicación de muestras 9 para recibir el fluido fisiológico que sobresale del alojamiento del medidor. Al finalizar la medición, se presenta la concentración de analitos en la pantalla del sistema de prueba de analitos 37. De igual forma, se puede realizar un modo de manejo hacia la derecha de acuerdo con la Figura 14b adaptando la pantalla 37 del sistema de prueba de analitos a un modo de operación contrario girando 180° el contenido visualizado en la pantalla, lo que permite la inserción de la tira de prueba de analitos 7 dentro del medidor desde el lado superior.

La Figura 15 ilustra otra posibilidad de disponer los elementos de prueba de analitos de manera que se pueda ahorrar espacio. En esta realización, los elementos de prueba de analitos se disponen acolados para formar una banda de prueba de analitos 43 con una extensión lateral para formar las áreas de aplicación de muestras 9. En la banda, el área entre dos elementos de prueba de analitos está provista de una perforación o línea de plegado 42 para separar un elemento individual de prueba de analitos 40 de la banda de prueba de analitos 43. Por medio de un pliegue en zigzag a lo largo de la perforación o líneas de plegado 42 es posible construir una pila de bandas del dispositivo de prueba de analitos 41 que se puede alojar fácilmente en un pequeño envase para permitir una mejor dispensación de los elementos individuales de prueba de analitos de la banda de prueba de analitos 43.

ES 2 334 671 T3

El elemento de prueba de analitos de la presente invención, producido en forma de disco o tira, se puede preparar fácilmente por medio de procesos conocidos por los expertos en técnicas de impresión, perforación por troquelado, y laminación. El diseño del elemento de prueba de analitos permite un proceso de producción sencillo y eficiente en cuanto a coste, procedimiento que preferentemente es, pero no necesariamente, de naturaleza continua.

5

Debido al procedimiento de calibración integrado y al método de validación, el sistema de prueba de analitos de la presente invención proporciona resultados fiables mediante la compensación de las interferencias endógenas, tales como distintos tipos de sangre y niveles de hematocrito, así como interferencias hexógenas, tales como suplementos nutricionales como vitamina C o productos farmacéuticos, que de otro modo influirían y modificarían los resultados de la medida. Como la calibración del sistema de prueba de analitos se lleva a cabo en paralelo con las mediciones, diferentes parámetros ambientales, tales como la temperatura en el momento de la medida, no tienen consecuencias en la precisión de los resultados determinados. Además, las variaciones de producción, por ejemplo, variaciones en el espesor de la capa central, se compensan por el procedimiento de calibración integrada, así como la degradación de los compuestos químicos o bioquímicos tales como enzimas o mediadores. La pérdida de actividad enzimática es detectable debido a la calibración interna y se puede compensar hasta cierto punto, lo que conduce a una vida útil prolongada del producto. Representa especialmente una ventaja en los sistemas de diagnóstico que requieren más biocatalizadores sensibles que la glucosa oxidasa.

La presente invención proporciona un sistema de prueba de analitos que incorpora un medio de calibración y de control de calidad con medios de detección electroquímicos en un elemento de prueba de reactivo en seco que no ejerce una presión excesiva sobre el proceso de producción, sino que elimina la necesidad de intervenciones del usuario en procedimientos de calibración y control de calidad, en combinación con un control estricto del rendimiento de la tira en el momento del análisis de la muestra.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Elemento de prueba de analitos para determinar la concentración de al menos un analito en un fluido de muestra acuoso o fisiológico que tiene una primera superficie (2a) y una segunda superficie (4a) opuestas entre sí a una distancia predeterminada, ambas superficies provistas de dos patrones sustancialmente equivalentes que forman áreas de alta y baja energía superficial, que están alineadas en su mayor parte de forma congruente, con lo cual las áreas de alta energía superficial (6, 6') crean un sistema de distribución de muestras con al menos dos áreas de detección (6a, 6'a), **caracterizado** porque las áreas de detección (6a) de la primera superficie (2a) están provistas de electrodos de trabajo (8a) y las áreas de detección (6'a) de la segunda superficie (4a) están provistas de electrodos de referencia (8'a) correspondientes de los medios de detección electroquímicos.

15 2. Elemento de prueba de analitos según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la distancia entre la primera y la segunda superficies es determinada por una capa central (3) que se dispone entre una capa base (2) y una capa de recubrimiento (4) que contiene las superficies primera y segunda (2a, 4a).

20 3. Elemento de prueba de analitos según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la capa central (3) tiene una discontinuidad (5) para formar una cavidad hueca con las superficies primera y segunda (2a, 4a) de la capa base y de recubrimiento (2, 4), siendo dicha cavidad hueca más grande que el sistema de distribución de muestras formado por las áreas de alta energía superficial (6, 6') en la primera y la segunda superficies (2a, 4a).

25 4. Elemento de prueba de analitos según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque dichas áreas de alta energía superficial (6, 6') son creadas por una composición hidrofílica insoluble en agua aplicada sobre las superficies primera y segunda (2a, 4a).

30 5. Elemento de prueba de analitos según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque dichas áreas de alta energía superficial (6, 6') en la primera y la segunda superficies (2a, 4a) están limitadas por capas de aislamiento hidrofóbicas (14, 14') que proporcionan áreas de baja energía superficial.

35 6. Elemento de prueba de analitos según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque

n áreas de detección predeterminadas (6a) que recubren los electrodos de trabajo (8a) de dicha primera superficie (2a) están recubiertas con una formulación catalítica que favorece la detección electroquímica de un analito en un fluido fisiológico y

40 *n* áreas de detección predeterminadas (6'a) que recubren los electrodos de referencia (8'a) de dicha segunda superficie (4a) están recubiertas con *n* formulaciones de calibración compuestas de *m* formulaciones preformadas y *n-m* formulaciones con distintos niveles de compuesto de calibración, siendo *n* un número entero superior a 2, *m* un número entero igual o superior a 1, y *n* > *m*.

45 7. Elemento de prueba de analitos según la reivindicación 6, **caracterizado** porque se proporciona adicionalmente un área de detección (6c) que no contiene ningún compuesto catalítico ni tampoco el compuesto de calibración y que permite la medición de señales de fondo.

50 8. Elemento de prueba de analitos según la reivindicación 6, **caracterizado** porque dicho compuesto de calibración contenido en la formulación de calibración recubierto en *n-m* áreas de detección predeterminadas (6'a) de la segunda superficie (4a) es idéntico o sustancialmente equivalente al analito y tiene la capacidad de inducir la misma reacción química en la formulación catalítica que el analito de la muestra de fluido fisiológico.

55 9. Elemento de prueba de analitos según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el compuesto de calibración es glucosa.

60 10. Elemento de prueba de analitos según la reivindicación 6, **caracterizado** porque la formulación catalítica contiene como componentes reactivos un promotor que experimenta una reacción catalítica o no catalítica con el analito y/o una coenzima, y un mediador que genera una señal electroquímica en la superficie de un electrodo.

65 11. Elemento de prueba de analitos según la reivindicación 10, **caracterizado** porque el promotor es una enzima seleccionada de entre el grupo consistente en deshidrogenasas, quinasas, oxidasas, fosfatasas, reductasas y/o transferasas.

12. Elemento de prueba de analitos según la reivindicación 11, **caracterizado** porque el promotor es una enzima específica para la glucosa.

65 13. Elemento de prueba de analitos según la reivindicación 10, **caracterizado** porque el mediador para determinar la concentración de analitos se selecciona de entre el grupo consistente en hexacianoferrato (III) de potasio, tetraciano-p-quinona-dimetano (TCNQ), metilviologen (MV2+), tetratiafulvaleno (TTF), N-metilfenzino (NMP+), rutenio (III) hexamina, biperidina de osmio, ferroceno o sus derivados.

ES 2 334 671 T3

14. Elemento de prueba de analitos según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se proporciona en forma de tira donde un área de aplicación de muestras (9) se localiza en el extremo de una extensión lateral y convexa (10) en un lado de dicha tira de prueba de analitos.

5 15. Disposición de una prueba de analitos que incluye una pluralidad de elementos de prueba de analitos según una de las reivindicaciones anteriores que están dispuestos simétricamente alrededor de un punto central para formar un disco de prueba de analitos (29) con áreas de aplicación de muestras orientadas hacia fuera (9).

10 16. Disposición de una prueba de analitos que incluye una pluralidad de elementos según al menos una de las reivindicaciones anteriores que están dispuestos de manera lineal para formar una banda de prueba de analitos (43) con extensiones laterales que forman las áreas de aplicación de muestras (9).

17. Método para preparar un elemento de prueba de analitos que comprende los pasos de:

15 aplicar un patrón de electrodos de trabajo (8) en una primera capa (2) que tiene una primera superficie (2a),

aplicar un patrón correspondiente de electrodos de referencia (8') en una segunda capa (4) que tiene una segunda superficie (4a),

20 generar áreas de alta y baja energía superficial en la primera superficie (2a),

generar un patrón correspondiente de áreas de alta y baja energía superficial en la segunda superficie (4a), formando las áreas de alta energía superficial (6, 6') un sistema hidrofílico de distribución de muestras con n áreas de detección predeterminadas (6a, 6'a), donde n es un número entero superior a 2 y donde los electrodos de trabajo y de referencia (8, 8') se localizan por debajo de las n áreas de detección predeterminadas (6, 6') del sistema hidrofílico de distribución de muestras,

25 recubrir con una formulación catalítica las n áreas de detección (6a) de la primera superficie, favoreciendo dicha formulación catalítica la detección de una concentración de analitos contenida en una muestra de fluido fisiológico utilizando medios de detección electroquímica,

30 recubrir con las n formulaciones de calibración las n áreas de detección (6'a) de la segunda superficie, estando compuestas dichas n formulaciones de calibración de m formulaciones preformadas y de $n-m$ formulaciones con distintos niveles de compuesto de calibración, donde m es un número entero de al menos 1 y $n > m$, idénticas o sustancialmente equivalentes al analito y con capacidad de inducir la misma reacción química en la formulación catalítica que el analito en la muestra de fluido fisiológico,

35 aplicar las capas de la primera y la segunda superficies a los sitios opuestos de una capa central (3) que tiene una discontinuidad (5) que proporciona una cavidad para el sistema de distribución de muestras formada por las áreas de alta energía superficial (6, 6') en la primera y la segunda superficies (2a, 4a) de la primera y la segunda capas (2, 4).

45 18. Método para preparar un elemento de prueba de analitos según la reivindicación 17, **caracterizado** porque dichas áreas de alta energía superficial (6, 6') se crean mediante la aplicación de una composición hidrofílica insoluble en agua en la primera y la segunda superficies (2a, 4a).

50 19. Método para preparar un elemento de prueba de analitos según una de las reivindicaciones 17 y 18, **caracterizado** porque dichas áreas de baja energía superficial se crean mediante la aplicación de composiciones hidrofóbicas en la primera y la segunda superficies (2a, 4a), formando capas eléctricamente aislantes (14, 14') que rodean las áreas de alta energía superficial (6, 6').

55 20. Método para preparar un elemento de prueba de analitos según una de las reivindicaciones 18 y 19, **caracterizado** porque dichas composiciones hidrofílicas y/o hidrofóbicas se imprimen en la primera y la segunda superficie por medio de flexografía, litografía, grabado, método de recubrimiento de tinta sólida o impresión por chorro de tinta.

60 21. Método para preparar un elemento de prueba de analitos según una de las reivindicaciones 17 a 20, **caracterizado** porque dichas composiciones catalíticas y/o de calibración recubren las áreas de detección (6a, 6'a) de la primera y la segunda superficies por medio de impresión por chorro de tinta o micro-dispensación.

65 22. Método para preparar un elemento de prueba de analitos según una de las reivindicaciones 17 a 21, **caracterizado** porque la capa base (2) y la capa de recubrimiento (4) se forman a partir de un sustrato flexible y plegado a lo largo de una línea de plegado centrado longitudinal (45) para encerrar la capa central (3) de manera que los patrones hidrofílicos (6, 6') que forman el sistema de distribución de muestras con las áreas de detección predeterminadas (6'a, 6a) y los correspondientes electrodos de trabajo y de referencia (8, 8') de dichas primera superficie (2a) y segunda superficie (4a) están alineados y registrados para que en su mayor parte sean congruentes.

ES 2 334 671 T3

23. Sistema de prueba de analitos para determinar la concentración de un analito en un fluido de muestra acuoso o fisiológico que comprende:

5 un elemento de prueba de analitos o disposición de prueba de analitos según una de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado** porque n áreas de detección predeterminadas (6a) de una primera superficie (2a) están recubiertas con una formulación catalítica que favorece la detección de un analito en un fluido fisiológico, y

10 n áreas de detección predeterminadas (6'a) de una segunda superficie (4a) están recubiertas con n formulaciones de calibración compuestas de m formulaciones preformadas y $n-m$ formulaciones con distintos niveles del compuesto de calibración, donde n es un número entero superior a 2, m es un número entero igual o superior a 1 y $n > m$,

15 medios de detección electroquímica para detectar una señal electroquímica de la muestra fisiológica localizada en $2n$ áreas de detección predeterminadas y obtener n resultados de $2n$ áreas de detección predeterminadas, y

20 medios de procesamiento para calcular todos los coeficientes de calibración de una ecuación de calibración polinomial de los que se dispone a partir de las n mediciones que obedecen a:

$$25 \quad y = \sum_1^{n-1} \{c_{(n-1)}x^{(n-1)}\},$$

30 y un coeficiente de regresión para validar la calidad de los coeficientes de calibración calculados de la ecuación de calibración.

24. Método para determinar la concentración de al menos un analito en una muestra acuosa o fisiológica, comprendiendo dicho método:

35 la conexión de un elemento de prueba de analitos a un medio de detección y procesamiento,

40 la aplicación de una muestra fisiológica a un elemento de prueba de analitos que tiene una primera superficie (2a) y una segunda superficie (4a) opuestas entre sí a una distancia predeterminada, estando provistas dichas ambas superficies de dos patrones sustancialmente equivalentes (6, 6') que forman áreas de alta energía superficial que están alineadas en su mayor parte de forma congruente para crear un sistema de distribución de muestras con al menos dos áreas de detección (6a) cubriendo cada una de ellas un electrodo de trabajo (8) y al menos dos áreas de detección (6'a), cubriendo cada una de ellas un electrodo de referencia (8'a),

45 la detección de las señales producidas en las distintas áreas de detección, y

la relación de las señales para determinar la cantidad de analito(s) en la muestra fisiológica.

25. Elemento de prueba de analitos para determinar la concentración de al menos un analito en un fluido de muestra fisiológico o acuoso que tiene una primera superficie y una segunda superficie opuestas entre sí a una distancia predeterminada, **caracterizado** porque una de entre las superficies primera y segunda está provista de un patrón hidrofílico/hidrofóbico y porque la superficie correspondiente proporciona un patrón homogéneo de píxeles hidrofílicos rodeados por un área hidrofóbica creando así una superficie con carácter semihidrofílico y semihidrofóbico, por medio de lo cual las áreas hidrofílicas y semihidrofílicas crean un sistema de distribución de muestras con al menos dos áreas de detección, estando provistas dichas áreas de detección de la primera superficie de electrodos de trabajo y estando provistas las áreas de detección de la segunda superficie de los correspondientes electrodos de referencia (8'a) de los medios de detección electroquímica.

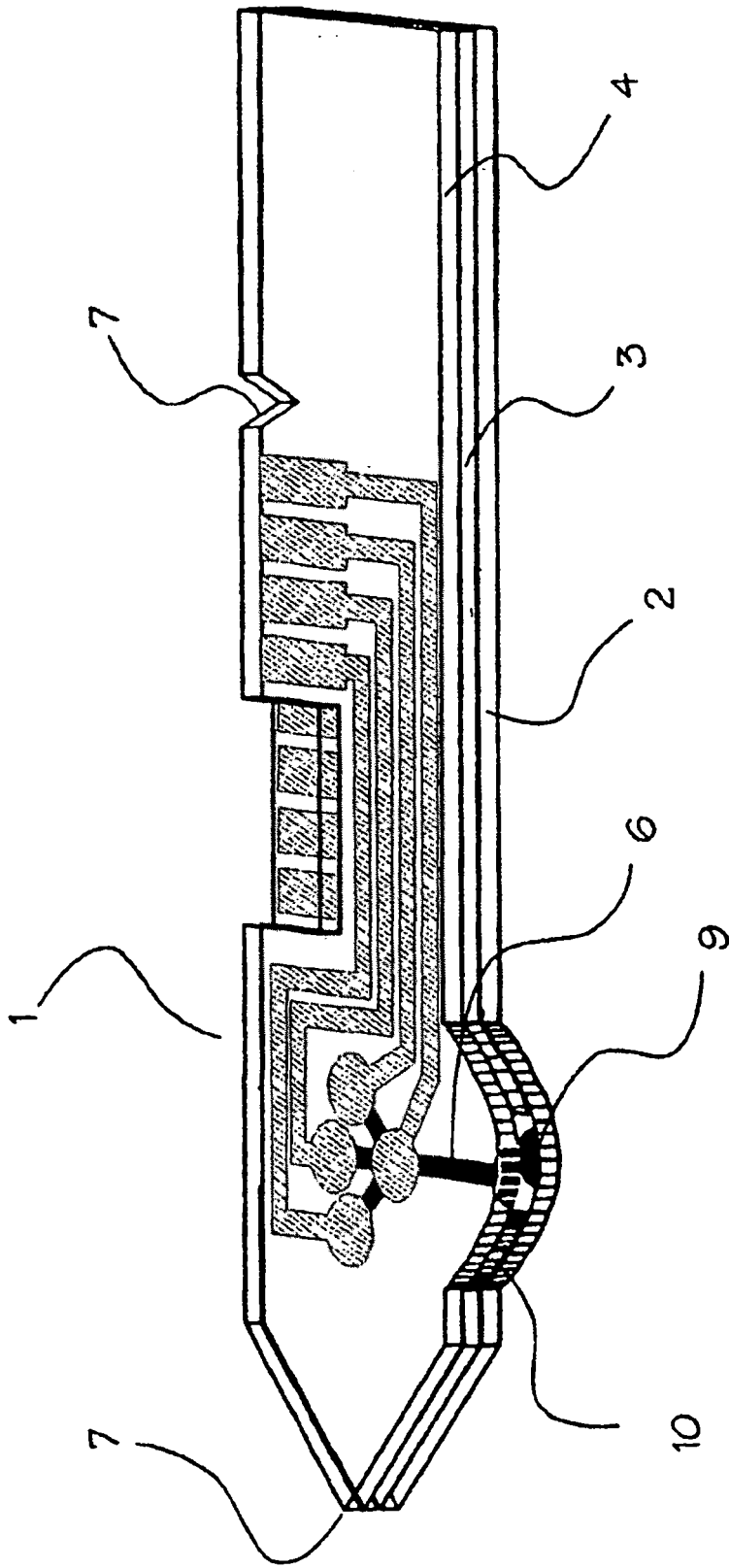


Fig. 1

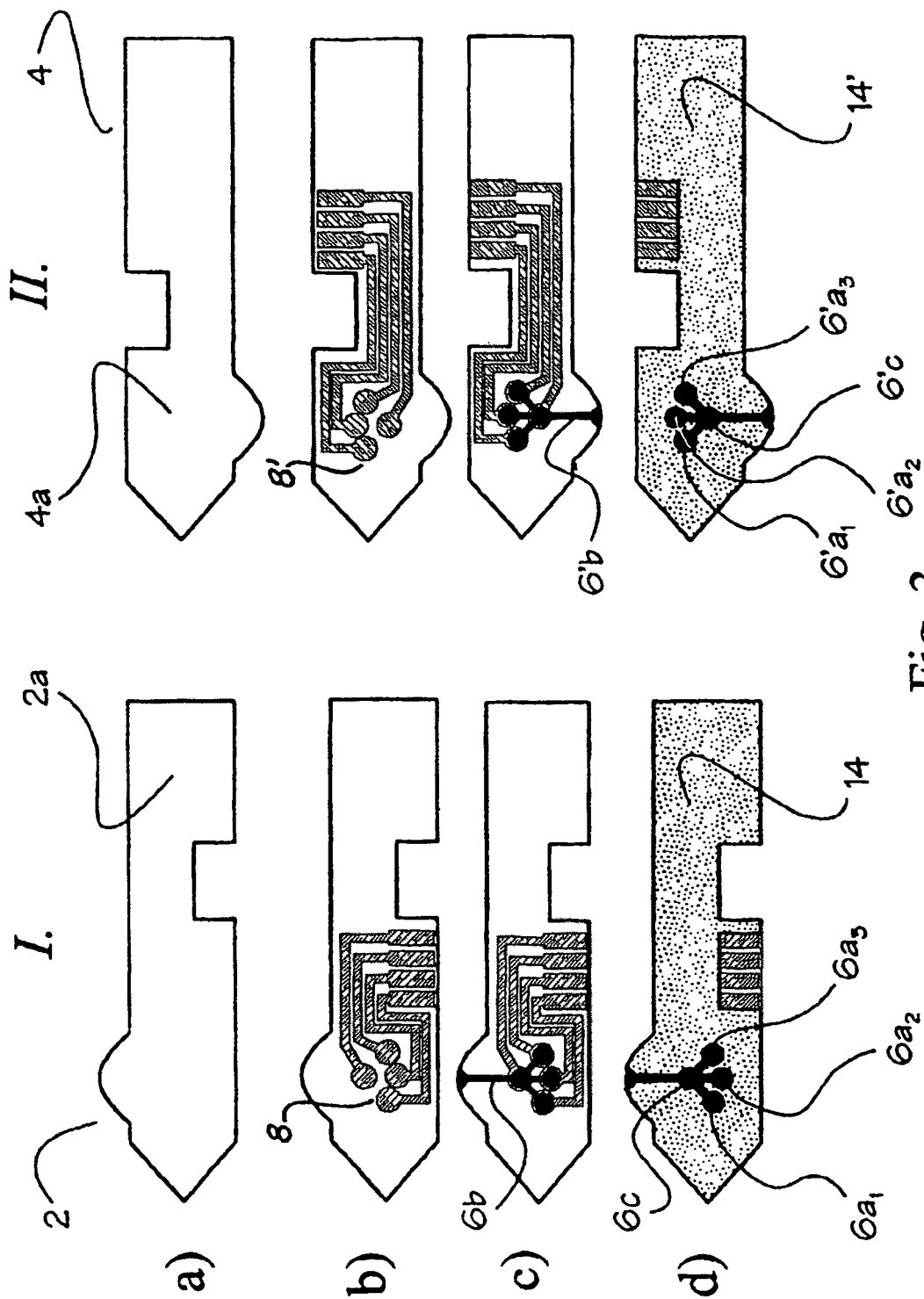


Fig. 3

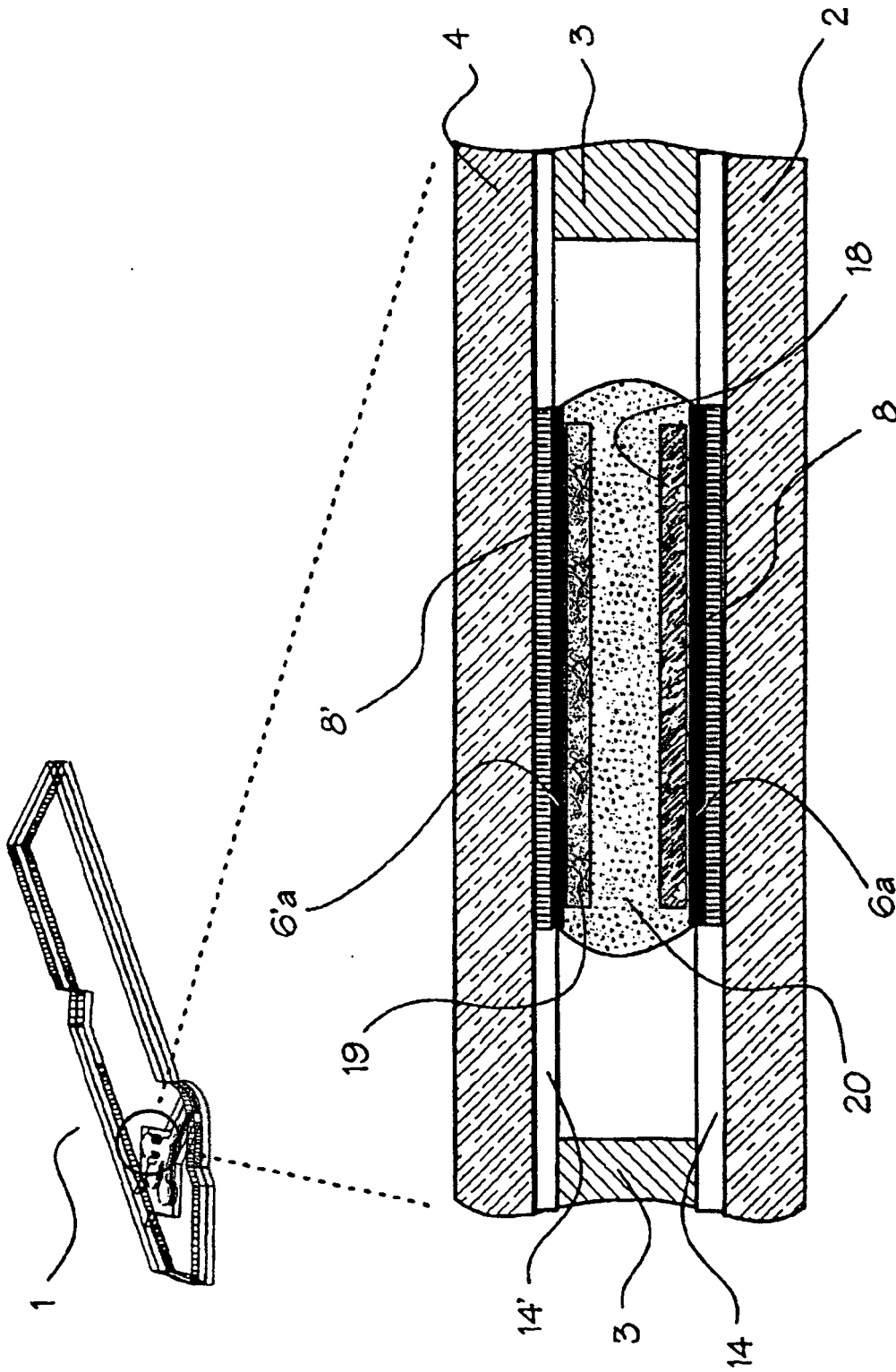


Fig. 4

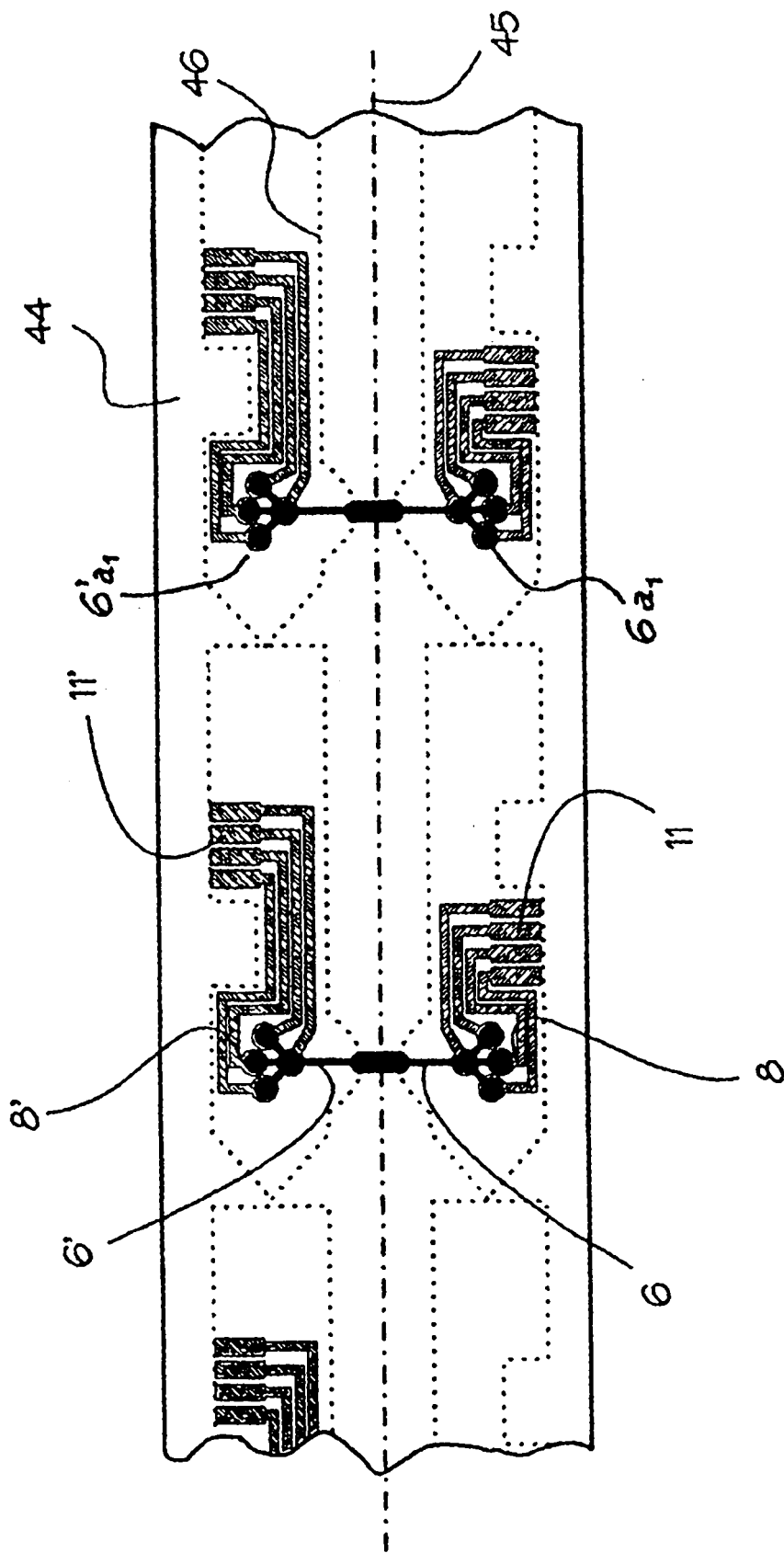


Fig. 5a

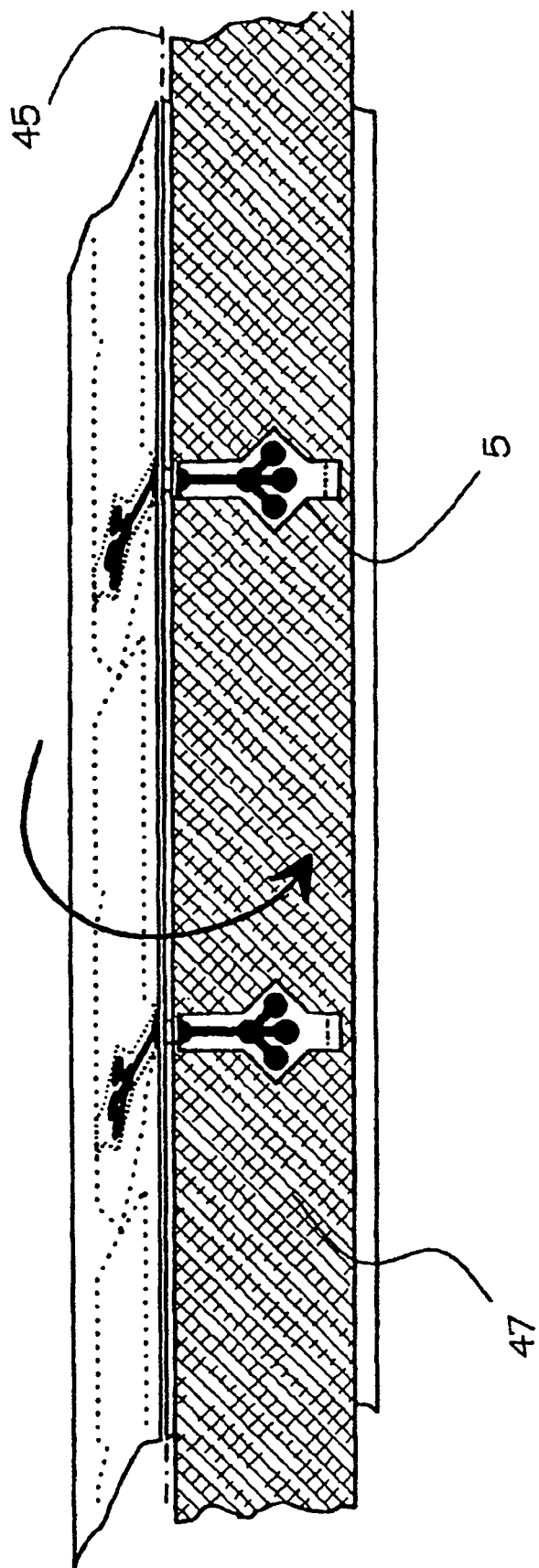


Fig. 5c

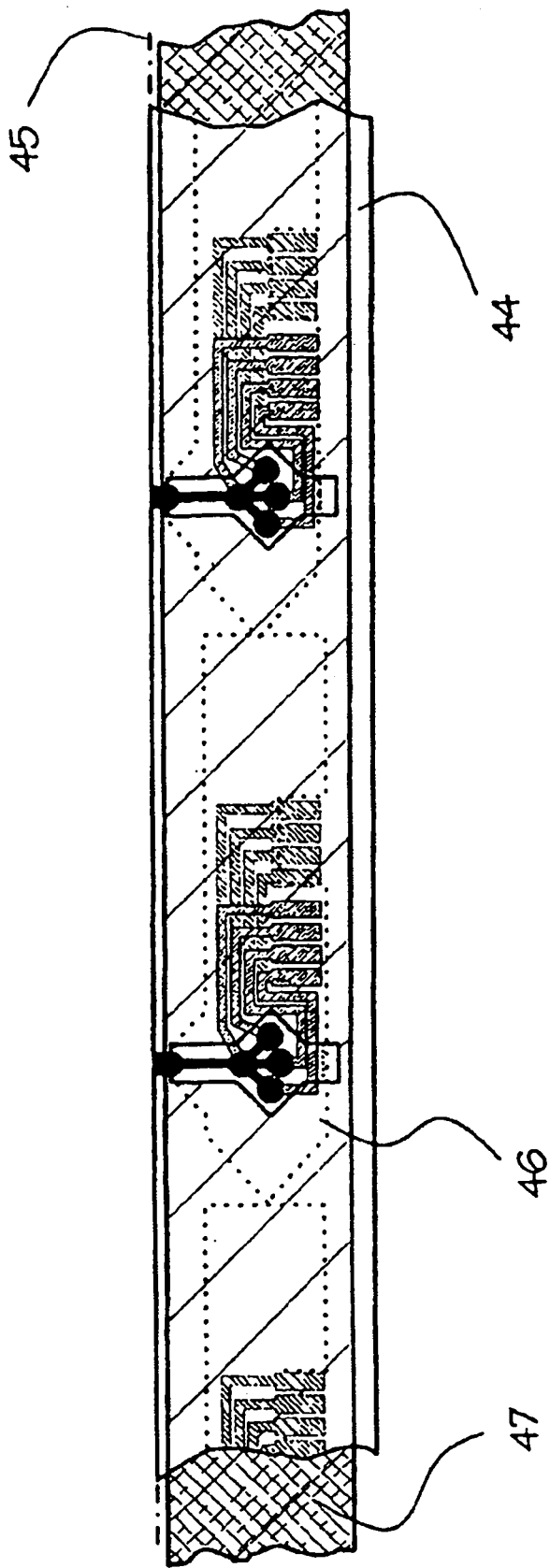
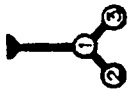









Fig. 5d

	A	B	C	n
I			1 ^{er} Orden (lineal)	3
II			2 ^o Orden (cuadrático)	4
III			3 ^{er} Orden (cúbico)	5
IV			4 Orden	6

n: número mínimo de mediciones necesarias para el modelo de calibración

Fig. 6

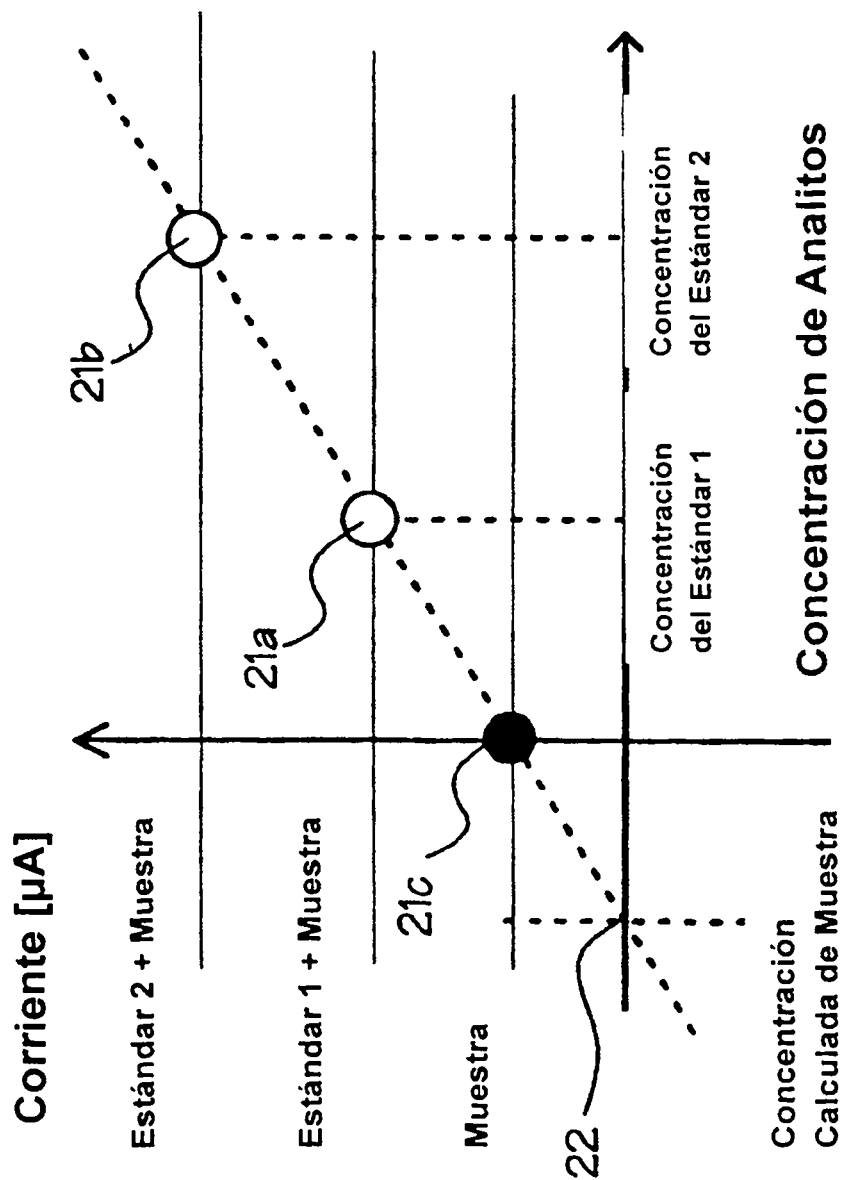


Fig. 7

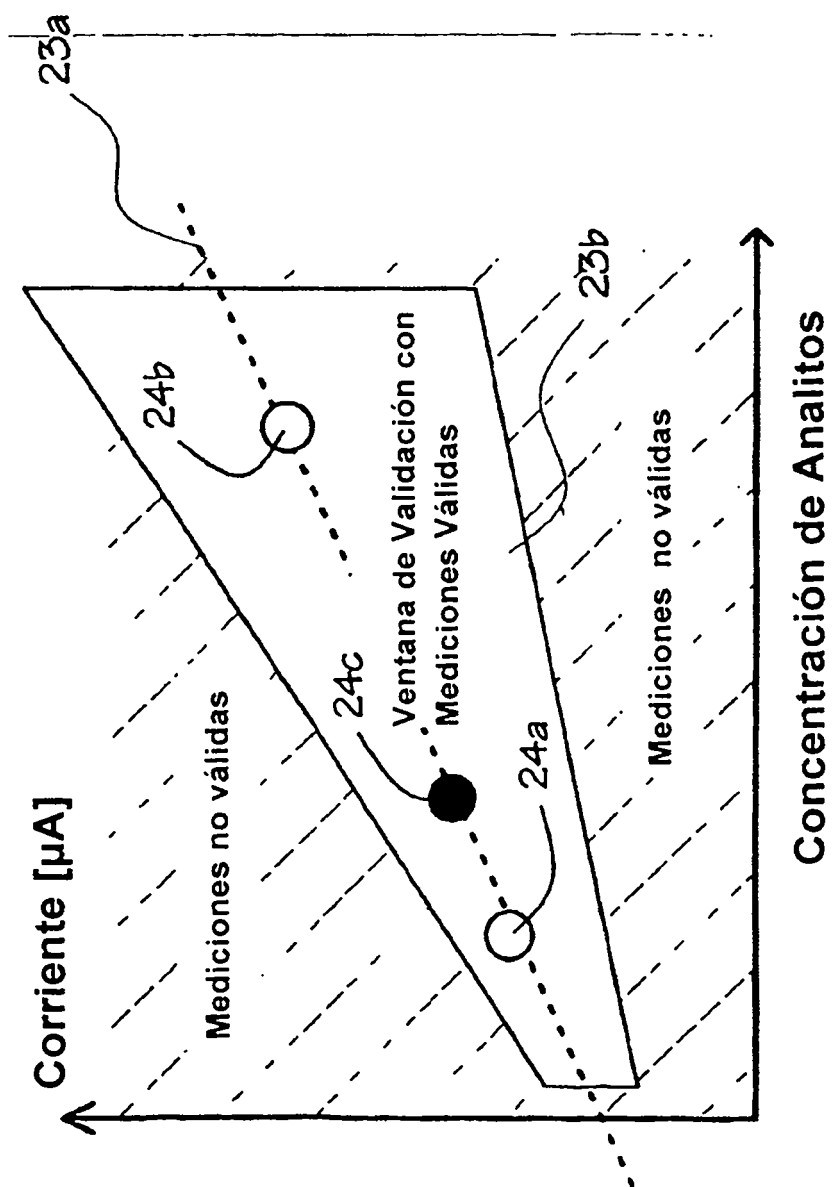


Fig. 8

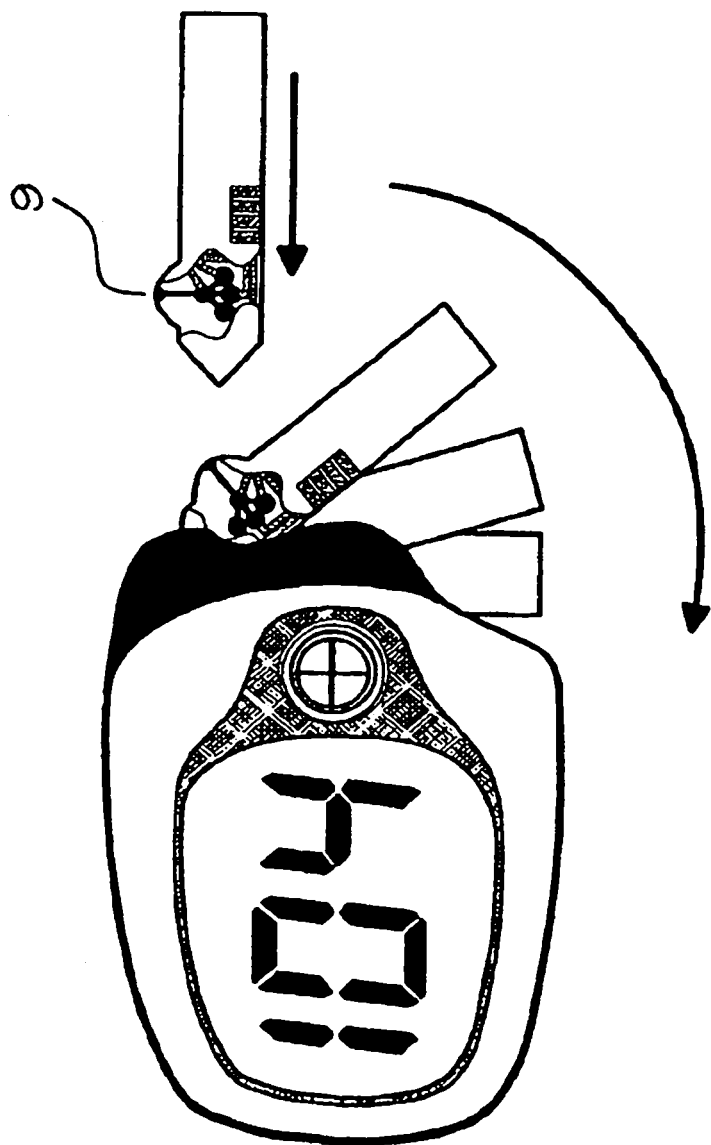


Fig. 9

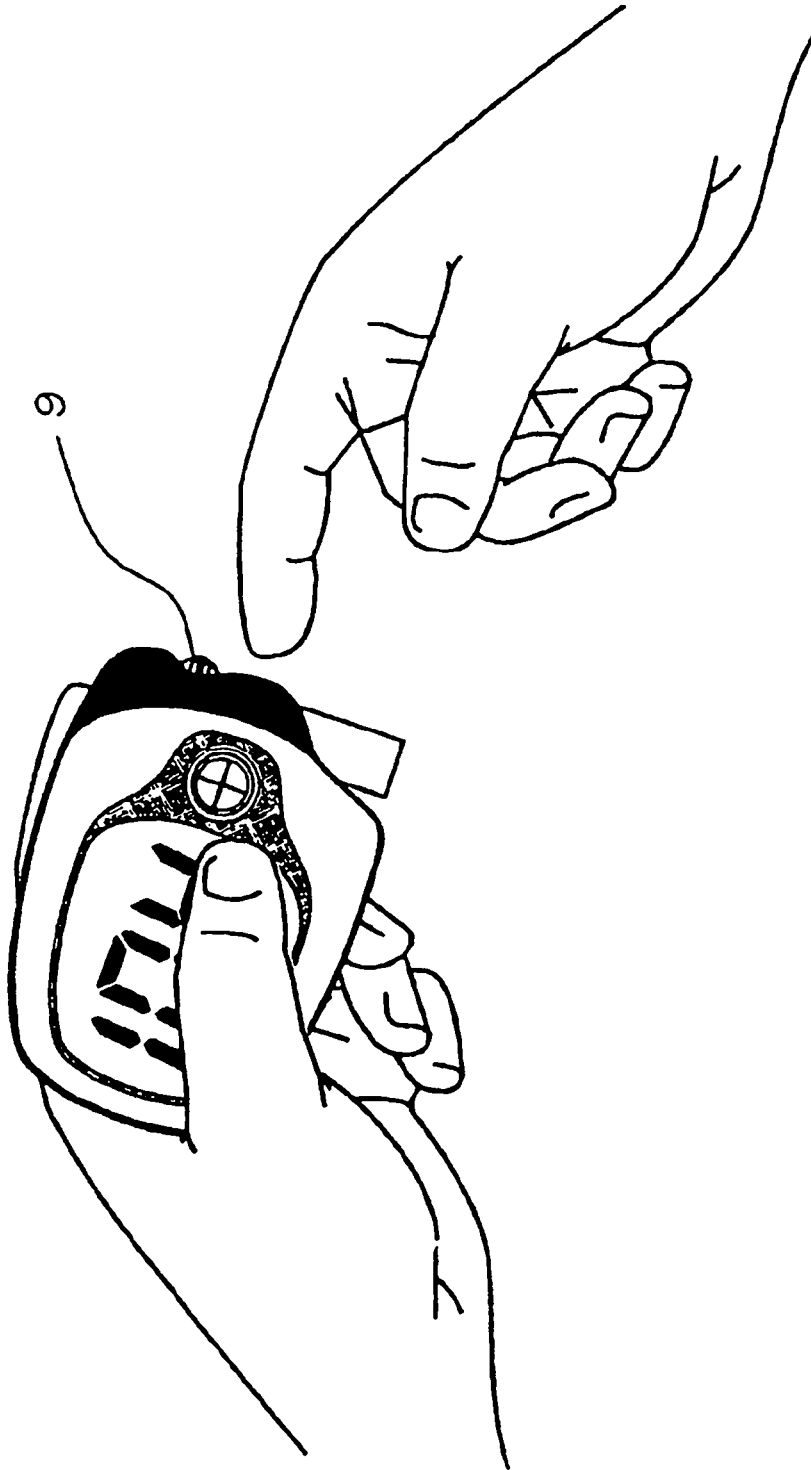


Fig. 10

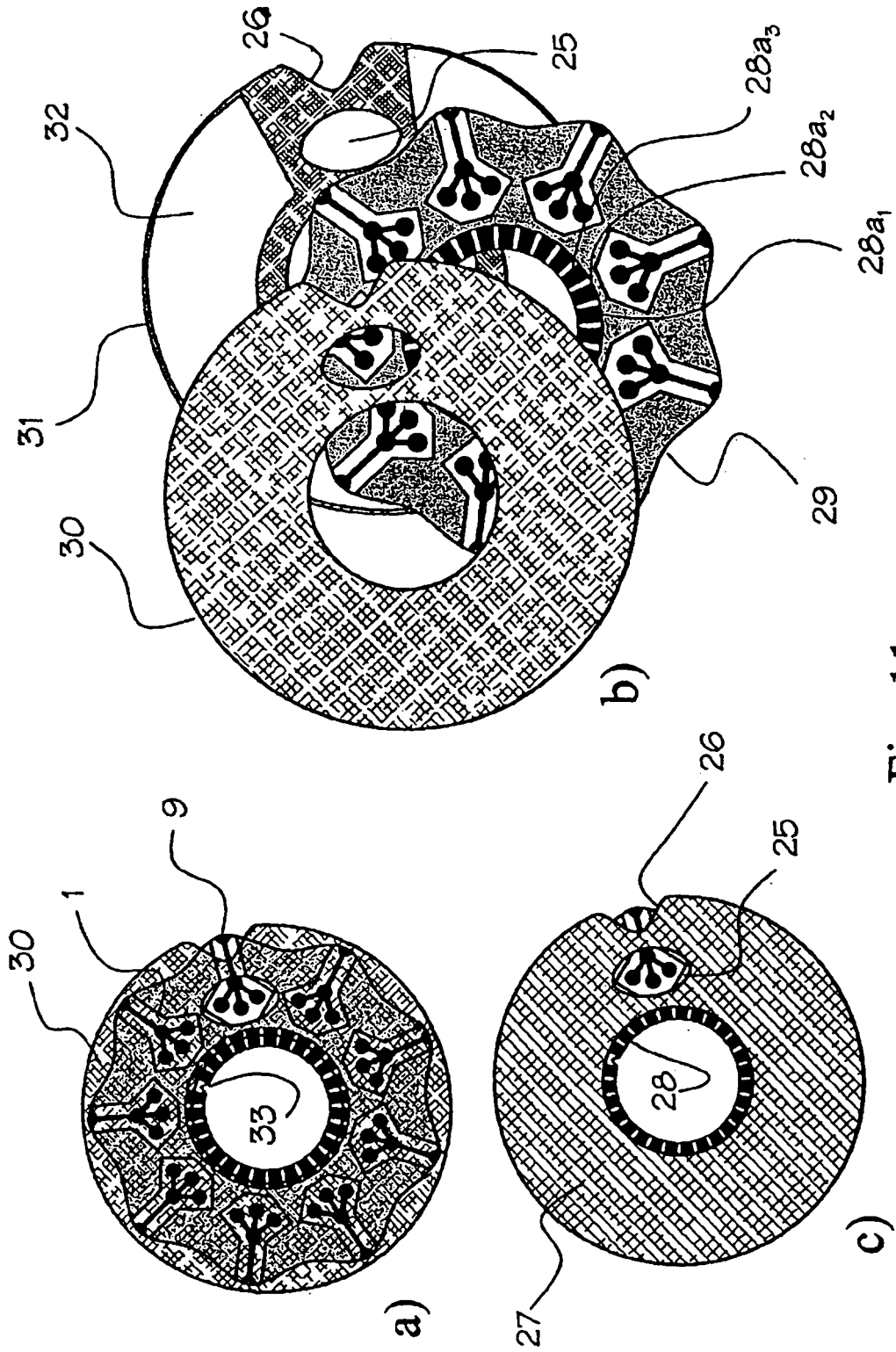


Fig. 11

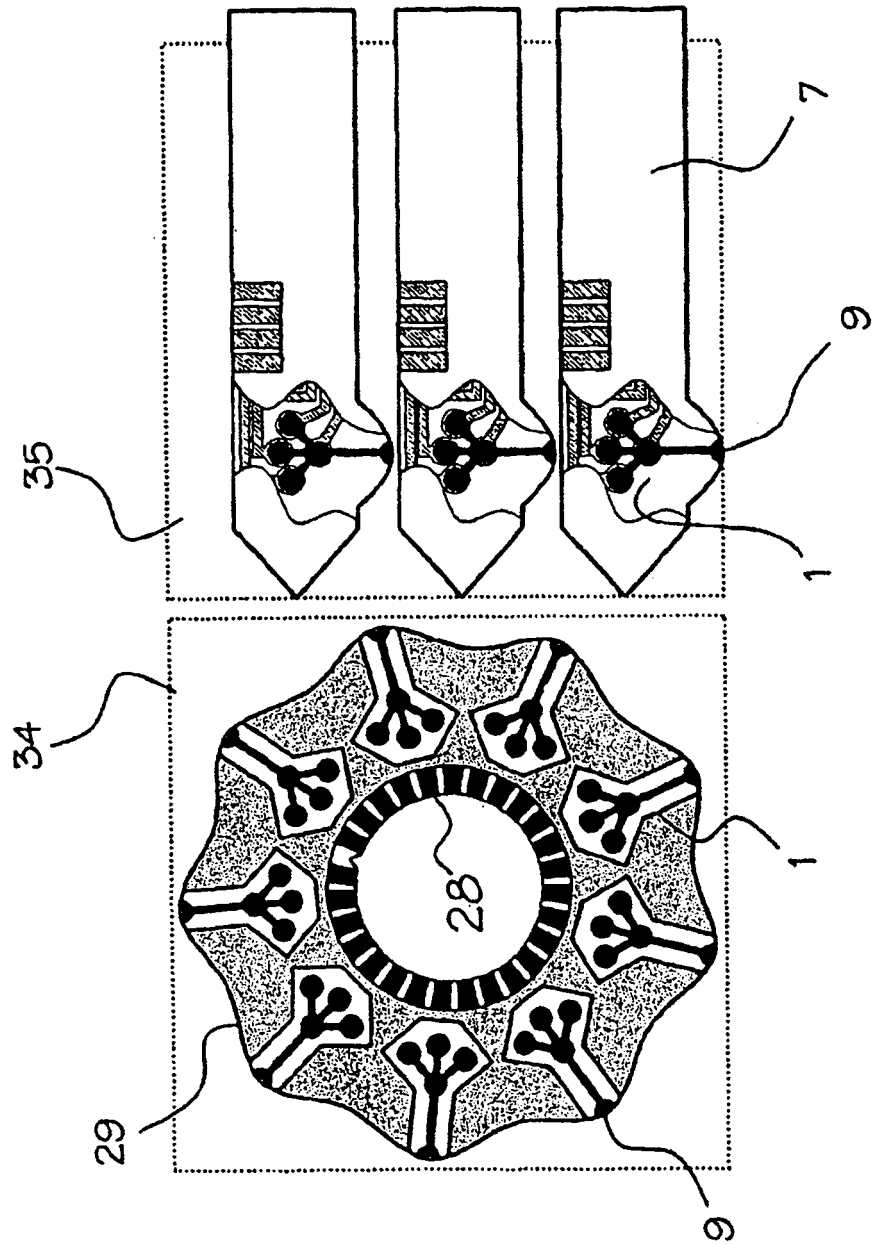


Fig. 12

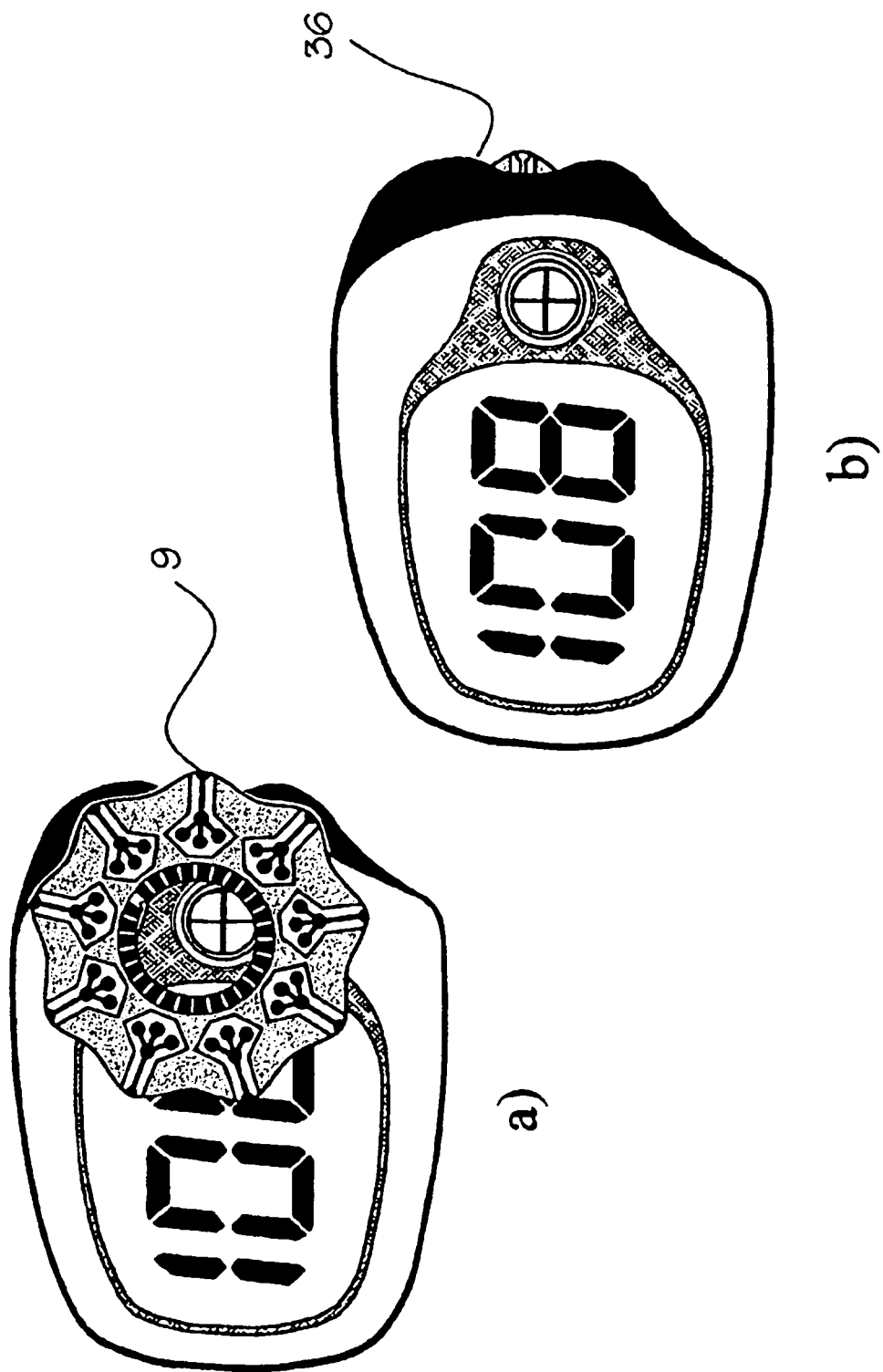


Fig. 13

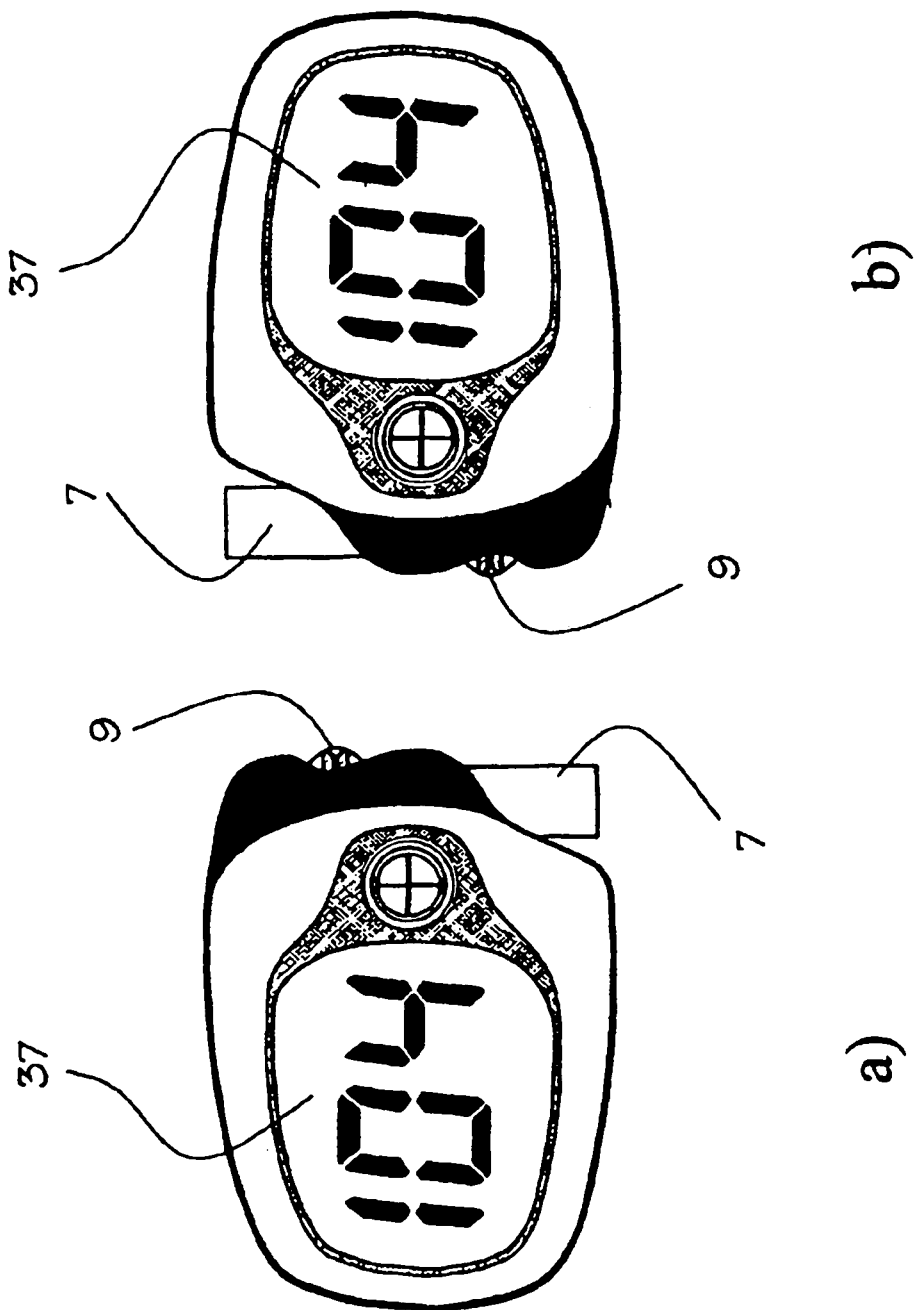


Fig. 14

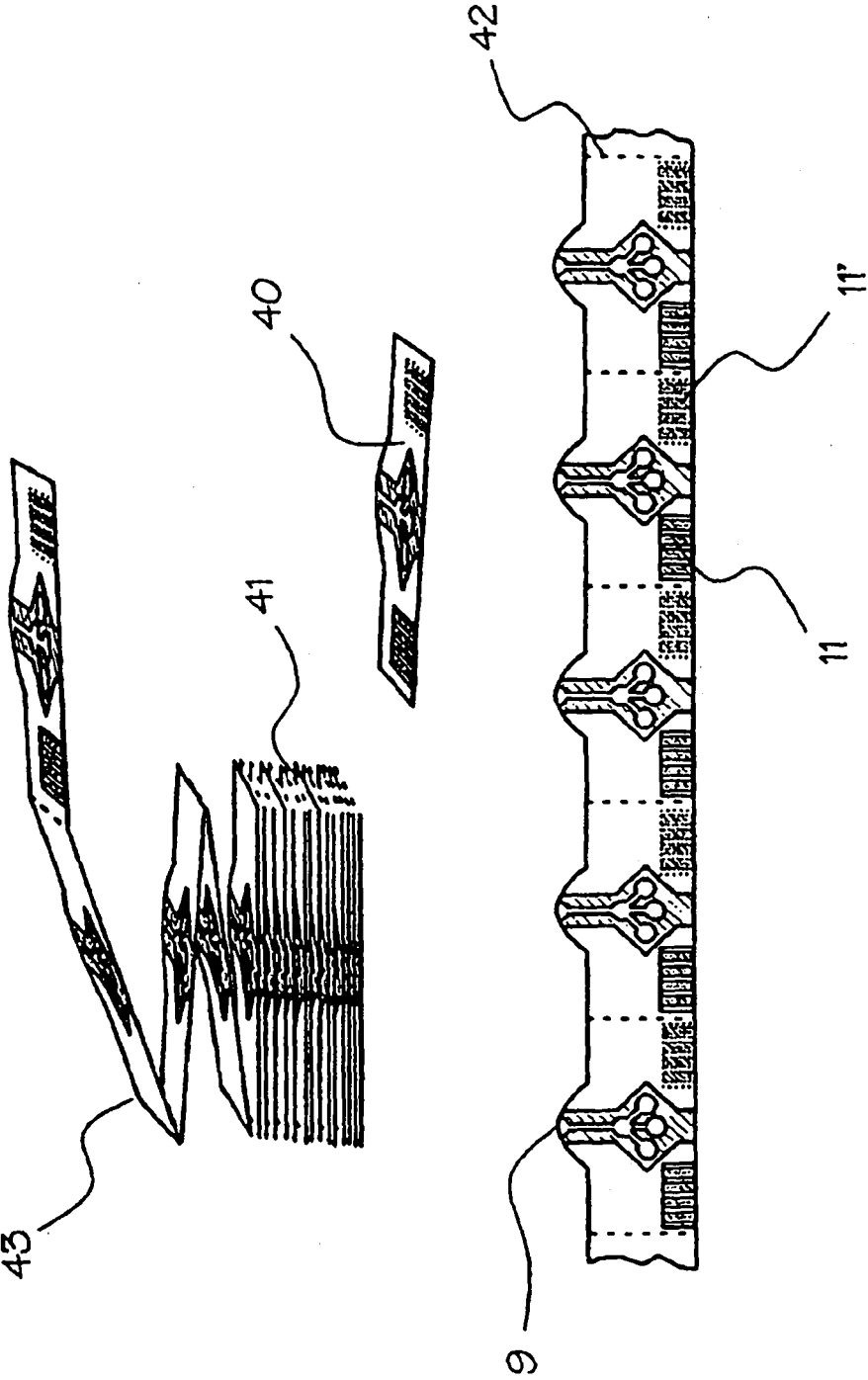


Fig. 15