



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización CSA Ltda

Woo
RGT

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
INVENTARIO

SOLICITUD

PCT

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

07-136140

54. TÍTULO

AMPEROMETRIA REGULADA (Nuevo título 169)

SISTEMA SENSOR, DISPOSITIVO Y MÉTODOS PARA DETERMINAR
LA CONCENTRACION DE UN ANALITICO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

BAYER HEALTHCARE LLC

DOMICILIO

NEW YORK ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

DILIA MARIA RODRIGUEZ D ALEMAN

22. BOGOTÁ, D. C.,

DIC. 26, 2007



No. 07-136140-00000-0000

Fecha: 2007-12-26 15:43:45 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 160

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 20 Feb. 2008

1) SOLICITUD DE:
☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capitulo I. ☐ Capitulo II.

2)
SOLICITANTE
(71)

Nombre: BAYER HEALTHCARE
LLC

Dirección: 555 White Plains Road,
Tarrytown, New York 10591 Estados
Unidos de América

Nacionalidad o domicilio: New York,
Estados Unidos de América

Lugar de constitución: New York,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT: ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

NÚMERO Cual _____

Teléfono: Fax:
E. Mail:

3)
REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6
Bogotá D.C.

Teléfono: 6181088 Fax: 6350824
E. Mail: info@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT: ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

NÚMERO: 41.654.882
TP: 20824 CSJ

4)
INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: 1. WU, Huan-Ping; 2. NELSON, Christine, D.; 3. BEER,
Greg, P.

Dirección: 1. 14374 Shoreline Drive, Granger, Indiana 46530
Estados Unidos; 2. 68972 Lake Street, Edwardsburg, Indiana
49112 Estados Unidos; 3. 61684 Parkshore Drive, Cassopolis,
Michigan 49031 Estados Unidos

Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores,
estadounidenses

5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/028013 Fecha: Julio 19, 2006

Publicación Internacional No. WO2007/013915 A1 Fecha: Febrero 1, 2007

6) Título (54) AMPEROMETRÍA REGULADA (Nuevo título folio 164).

7) Clasificación Internacional: G01N 27/49 G01N 33/487 C12Q 1/00 A61B 5/00

8) PRIORIDAD

33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de
Solicitud

SI ☒ NO ☐

Estados Unidos

Julio 20, 2005

60/700,787

Estados Unidos

Mayo 8, 2006

60/746,771

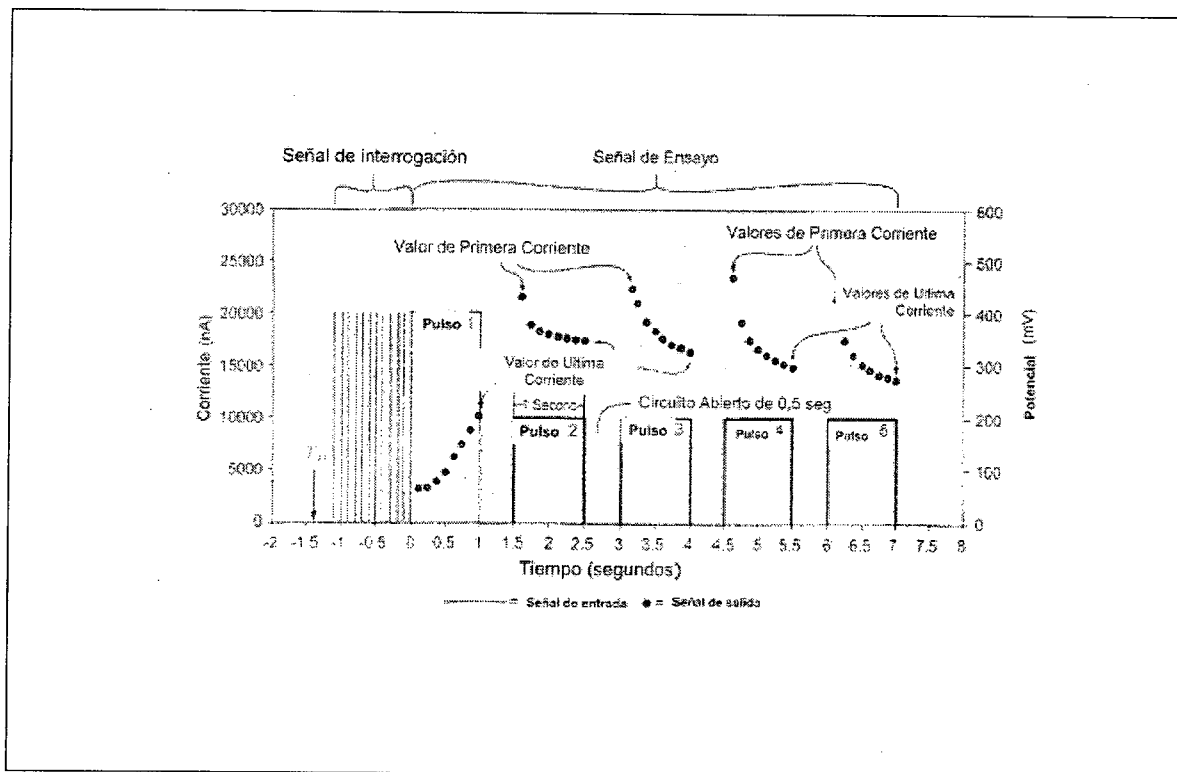
9) Comprobante de pago N°. 07-100,471 de Dic. 10, 2007

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros:
 1. Reporte internacional de búsqueda
 2. Modificación agente
 3. Opinión escrita
 4. Request

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:



12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 100,471
FECHA : DICIEMBRE 10 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-136140-00000-0000

Fecha: 2007-12-26 15:43:45 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 160

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	72394969	10/12/2007	32,420,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

EN: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

P1064

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 February 2007 (01.02.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/013915 A1

(51) International Patent Classification:

G01N 27/49 (2006.01) C12Q 1/00 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01) A61B 5/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2006/028013

(22) International Filing Date: 19 July 2006 (19.07.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/700,787 20 July 2005 (20.07.2005) US
60/746,771 8 May 2006 (08.05.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **BAYER HEALTHCARE LLC** [US/US]; 555 White Plains Road, Tarrytown, New York 10591 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **WU, Huan-Ping** [US/US]; 14374 Shoreline Drive, Granger, Indiana 46530 (US). **NELSON, Christine, D.** [US/US]; 68972 Lake Street, Edwardsburg, Indiana 49112 (US). **BEER, Greg, P.** [US/US]; 61684 Parkshore Drive, Cassopolis, Michigan 49031 (US).

(74) Agent: **GATZ, John, C.**; Jenkins & Gilchrist, a Professional Corporation, 225 W. Washington Street, Suite 2600, Chicago, Illinois 60606-3418, (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

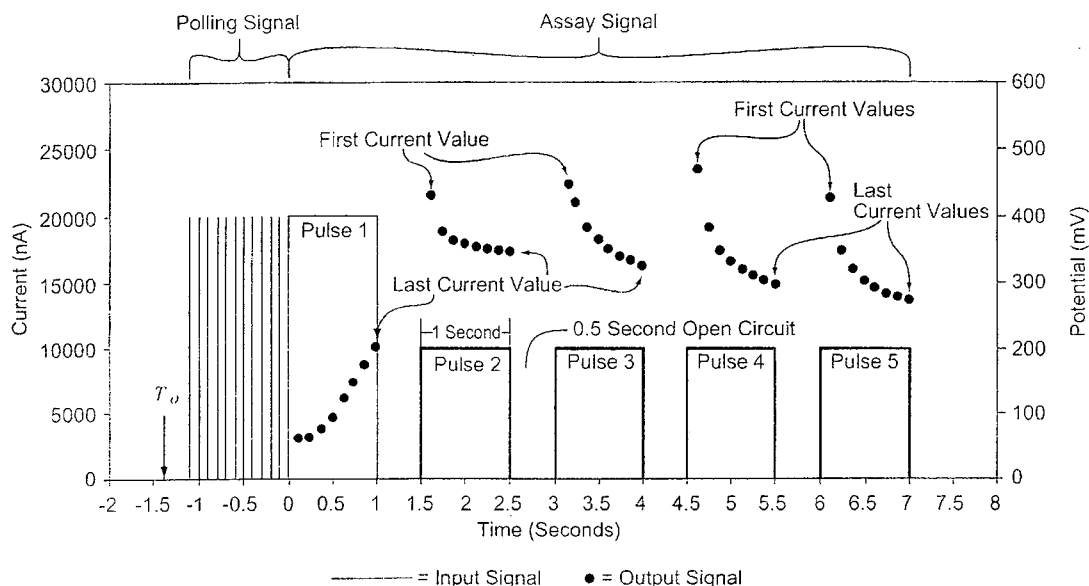
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

[Continued on next page]

(54) Title: GATED AMPEROMETRY



(57) Abstract: A sensor system, device, and methods for determining the concentration of an analyte in a sample is described. Gated amperometric pulse sequences including multiple duty cycles of sequential excitations and relaxations may provide a shorter analysis time and/or improve the accuracy and/or precision of the analysis. The disclosed gated amperometric pulse sequences may reduce analysis errors arising from the hematocrit effect, variance in cap-gap volumes, non-steady-state conditions, mediator background, under-fill, temperature changes in the sample, and a single set of calibration constants.

WO 2007/013915 A1



For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

GATED AMPEROMETRY

REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[001] This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/700,787 entitled "Gated Amperometry" as filed on July 20, 2005, and U.S. Provisional Application No. 60/746,771 entitled "Abnormal Output Detection System for a Biosensor" as filed on May 8, 2006, which are incorporated herein by reference.

BACKGROUND

[002] The quantitative determination of analytes in biological fluids is useful in the diagnosis and treatment of physiological abnormalities. For example, determining the glucose level in biological fluids, such as blood, is important to diabetic individuals who must frequently check their blood glucose level to regulate their diets and/or medication.

[003] Electrochemical systems have been used for this type of analysis. During the analysis, the analyte undergoes a redox reaction with an enzyme or similar species to generate an electric current that may be measured and correlated with the concentration of the analyte. A substantial benefit may be provided to the user by decreasing the time required for the analysis while supplying the desired accuracy and precision.

[004] One example of an electrochemical sensor system for analyzing analytes in biological fluids includes a measuring device and a sensor strip. The sensor strip includes reagents to react with and transfer electrons from the analyte during the analysis and electrodes to pass the electrons through conductors that connect the strip with the device. The measuring device includes contacts to receive the electrons from the strip and the ability to apply a voltage differential between the contacts. The device may record the current passing through the sensor and translate the current values into a measure of the analyte content of the sample. These sensor systems may analyze a single drop of whole blood (WB), such as from 1-15 microliters (μL) in volume.

[005] Examples of bench-top measuring devices include the BAS 100B Analyzer available from BAS Instruments in West Lafayette, Indiana; the CH Instrument Analyzer available from CH Instruments in Austin, Texas; the Cypress Electrochemical Workstation available from Cypress Systems in Lawrence, Kansas; and the EG&G Electrochemical Instrument available from Princeton Research Instruments in Princeton, New Jersey.

Examples of portable measuring devices include the Ascensia Breeze® and Elite® meters of Bayer Corporation.

[006] The sensor strip may include a working electrode where the analyte undergoes electrochemical reaction and a counter electrode where the opposite electrochemical reaction occurs, thus allowing current to flow between the electrodes. Thus, if oxidation occurs at the working electrode, reduction occurs at the counter electrode. See, for example, Fundamentals Of Analytical Chemistry, 4th Edition, D.A. Skoog and D.M. West; Philadelphia: Saunders College Publishing (1982), pp 304-341.

[007] The sensor strip also may include a true reference electrode to provide a non-variant reference potential to the measuring device. While multiple reference electrode materials are known, a mixture of silver (Ag) and silver chloride (AgCl) is typical due to the insolubility of the mixture in the aqueous environment of the analysis solution. A reference electrode also may be used as the counter electrode. A sensor strip using such a combination reference-counter electrode is described in U.S. Patent No. 5,820,551.

[008] The sensor strip may be formed by printing electrodes on an insulating substrate using multiple techniques, such as those described in U.S. Patent Nos. 6,531,040; 5,798,031; and 5,120,420. One or more reagent layer may be formed by coating one or more of the electrodes, such as the working and/or counter electrodes. In one aspect, more than one of the electrodes may be covered by the same reagent layer, such as when the working and counter electrodes are coated by the same composition. In another aspect, reagent layers having different compositions may be printed or micro-deposited onto the working and counter electrodes using the method described in a U.S. provisional patent application filed October 24, 2003, Application No. 60/513,817. Thus, the reagent layer on the working electrode may contain the enzyme, the mediator, and a binder while the reagent layer on the counter electrode contains a soluble redox species, which could be the same as the mediator or different, and a binder.

[009] The reagent layer may include an ionizing agent for facilitating the oxidation or reduction of the analyte, as well as any mediators or other substances that assist in transferring electrons between the analyte and the conductor. The ionizing agent may be an analyte specific enzyme, such as glucose oxidase or glucose dehydrogenase, to catalyze the oxidation of glucose in a whole blood (WB) sample. The reagent layer also may include a binder that holds the enzyme and mediator together. Table I, below, provides conventional combinations of enzymes and mediators for use with specific analytes.

Analyte	Enzyme	Mediator
Glucose	Glucose Oxidase	Ferricyanide
Glucose	Glucose Dehydrogenase	Ferricyanide
Cholesterol	Cholesterol Oxidase	Ferricyanide
Lactate	Lactate Oxidase	Ferricyanide
Uric Acid	Uricase	Ferricyanide
Alcohol	Alcohol Oxidase	Phenylenediamine

Table I

[0010] The binder may include various types and molecular weights of polymers, such as CMC (carboxyl methyl cellulose) and/or PEO (polyethylene oxide). In addition to binding the reagents together, the binder may assist in filtering red blood cells, preventing them from coating the electrode surface.

[0011] Examples of conventional electrochemical sensor systems for analyzing analytes in biological fluids include the Precision® biosensors available from Abbott in Abbott Park, Illinois; Accucheck® biosensors available from Roche in Indianapolis, Indiana; and OneTouch Ultra® biosensors available from Lifescan in Milpitas, California.

[0012] One electrochemical method, which has been used to quantify analytes in biological fluids, is coulometry. For example, Heller et al. described the coulometric method for whole blood glucose measurements in U.S. Patent No. 6,120,676. In coulometry, the analyte concentration is quantified by exhaustively oxidizing the analyte within a small volume and integrating the current over the time of oxidation to produce the electrical charge representing the analyte concentration. In other words, coulometry captures the total amount of glucose within the sensor strip.

[0013] An important aspect of coulometry is that towards the end of the integration curve of charge vs. time, the rate at which the current changes with time becomes substantially constant to yield a steady-state condition. This steady-state portion of the coulometric curve forms a relatively flat plateau region, thus allowing determination of the corresponding current. However, the coulometric method requires the complete conversion of the entire volume of analyte to reach the steady-state condition. As a result, this method is time consuming and does not provide the fast results which users of electrochemical devices, such as glucose-monitoring products, demand. Another problem with coulometry is that the small volume of the sensor cell must be controlled in order to provide accurate results, which can be difficult with a mass produced device.

[0014] Another electrochemical method which has been used to quantify analytes in biological fluids is amperometry. In amperometry, current is measured during a read pulse as a constant potential (voltage) is applied across the working and counter electrodes of the sensor strip. The measured current is used to quantify the analyte in the sample. Amperometry measures the rate at which the electrochemically active species, and thus the analyte, is being oxidized or reduced near the working electrode. Many variations of the amperometric method for biosensors have been described, for example in U.S. Patent Nos. 5,620,579; 5,653,863; 6,153,069; and 6,413,411.

[0015] A disadvantage of conventional amperometric methods is the non-steady-state nature of the current after a potential is applied. The rate of current change with respect to time is very fast initially and becomes slower as the analysis proceeds due to the changing nature of the underlying diffusion process. Until the consumption rate of the reduced mediator at the electrode surface equals the diffusion rate, a steady-state current cannot be obtained. Thus, for amperometry methods, measuring the current during the transient period before a steady-state condition is reached may be associated with more inaccuracy than a measurement taken during a steady-state time period.

[0016] The "hematocrit effect" provides an impediment to accurately analyzing the concentration of glucose in WB samples. WB samples contain red blood (RB) cells and plasma. The plasma is mostly water, but contains some proteins and glucose. Hematocrit is the volume of the RB cell constituent in relation to the total volume of the WB sample and is often expressed as a percentage. Whole blood samples generally have hematocrit percentages ranging from 20% to 60%, with ~40% being the average.

[0017] In conventional sensor strips for determining glucose concentrations, glucose may be oxidized by an enzyme, which then transfers the electron to a mediator. This reduced mediator then travels to the working electrode where it is electrochemically oxidized. The amount of mediator being oxidized may be correlated to the current flowing between the working and counter electrodes of the sensor strip. Quantitatively, the current measured at the working electrode is directly proportional to the diffusion coefficient of the mediator. The hematocrit effect interferes with this process because the RB cells block the diffusion of the mediator to the working electrode. Subsequently, the hematocrit effect influences the amount of current measured at the working electrode without any connection to the amount of glucose in the sample.

[0018] WB samples having varying concentrations of RB cells may cause inaccuracies in the measurement because the sensor may not distinguish between a lower mediator concentration and a higher mediator concentration where the RB cells block diffusion to the working electrode. For example, when WB samples containing identical glucose levels, but having hematocrits of 20, 40, and 60%, are analyzed, three different glucose readings will be reported by a conventional sensor system based on one set of calibration constants (slope and intercept, for instance). Even though the glucose concentrations are the same, the system will report that the 20% hematocrit sample contains more glucose than the 60% hematocrit sample due to the RB cells interfering with diffusion of the mediator to the working electrode.

[0019] The normal hematocrit range (RBC concentration) for humans is from 20% to 60% and is centered around 40%. Hematocrit bias refers to the difference between the reference glucose concentration obtained with a reference instrument, such as the YSI 2300 STAT PLUS™ available from YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, and an experimental glucose reading obtained from a portable sensor system for samples containing differing hematocrit levels. The difference between the reference and experimental readings results from the varying hematocrit levels between specific whole blood samples.

[0020] In addition to the hematocrit effect, measurement inaccuracies also may arise when the measurable species concentration does not correlate with the analyte concentration. For example, when a sensor system determines the concentration of a reduced mediator generated in response to the oxidation of an analyte, any reduced mediator not generated by oxidation of the analyte will lead to the sensor system indicating that more analyte is present in the sample than is correct due to mediator background.

[0021] In addition to the hematocrit and mediator background effects, other factors also may lead to inaccuracies in the ability of a conventional electrochemical sensor system to determine the concentration of an analyte in a sample. In one aspect, these inaccuracies may be introduced because the portion of the sensor strip that contains the sample may vary in volume from strip to strip. Inaccuracies also may be introduced when sufficient sample is not provided to completely fill the volume of the cap-gap, a condition referred to as under-fill. In other aspects, inaccuracies may be introduced into the measurement by random "noise" and when the sensor system lacks the ability to accurately determine temperature changes in the sample.

[0022] In an attempt to overcome one or more of these disadvantages, conventional sensor systems have attempted multiple techniques, not only with regard to the mechanical design of the sensor strip and reagent selection, but also regarding the manner in which the measuring device applies the electric potential to the strip. For example, conventional methods of reducing the hematocrit effect for amperometric sensors include the use of filters, as disclosed in U.S. Patent Nos. 5,708,247 and 5,951,836; reversing the polarity of the applied current, as disclosed in WO 01/57510; and by methods that maximize the inherent resistance of the sample, as disclosed in U.S. Patent No. 5,628,890.

[0023] Multiple methods of applying the electric potential to the strip, commonly referred to as pulse methods, sequences, or cycles, have been used to address inaccuracies in the determined analyte concentration. For example, in U.S. Patent No. 4,897,162 the pulse method includes a continuous application of rising and falling voltage potentials that are commingled to give a triangular-shaped wave. Furthermore, WO 2004/053476 and U.S. Publication Nos. 2003/0178322 and 2003/0113933 describe pulse methods that include the continuous application of rising and falling voltage potentials that also change polarity.

[0024] Other conventional methods combine a specific electrode configuration with a pulse sequence adapted to that configuration. For example, U.S. Patent No. 5,942,102 combines the specific electrode configuration provided by a thin layer cell with a continuous pulse so that the reaction products from the counter electrode arrive at the working electrode. This combination is used to drive the reaction until the current change verses time becomes constant, thus reaching a true steady state condition for the mediator moving between the working and counter electrodes during the potential step. While each of these methods balances various advantages and disadvantages, none are ideal.

[0025] As may be seen from the above description, there is an ongoing need for improved electrochemical sensor systems, especially those that may provide increasingly accurate determination of the analyte concentration in less time. The systems, devices, and methods of the present invention overcome at least one of the disadvantages associated with conventional systems.

SUMMARY

[0026] A method of determining the concentration of an analyte in a sample is provided that includes applying a pulse sequence to the sample, the pulse sequence including at least 3 duty cycles within 180 seconds. The duty cycles may each include an excitation at

a fixed potential, during which a current may be recorded, and a relaxation. The pulse sequence may include a terminal read pulse and may be applied to a sensor strip including a diffusion barrier layer (DBL) on a working electrode. The determined analyte concentration may include less bias attributable to mediator background than the same or another method lacking the pulse sequence including at least 3 duty cycles within 180 seconds. Through the use of transient current data, the concentration of the analyte may be determined when a steady-state condition is not reached during the excitation portions of the duty cycles of the pulse sequence. A data treatment may be applied to the measured currents to determine the concentration of the analyte in the sample.

[0027] A handheld analyte measuring device is provided for determining the concentration of an analyte in a sample. The device includes a gated amperometric measuring device adapted to receive a sensor strip. The gated amperometric measuring device includes at least two device contacts in electrical communication with a display through electrical circuitry. The sensor strip includes at least first and second sensor strip contacts. The first sensor strip contact is in electrical communication with a working electrode and the second sensor strip contact is in electrical communication with a counter electrode through conductors. A first reagent layer is on at least one of the electrodes and includes an oxidoreductase and at least one species of a redox pair.

[0028] A handheld measuring device adapted to receive a sensor strip is provided for determining the concentration of an analyte in a sample. The device includes contacts, at least one display, and electronic circuitry establishing electrical communication between the contacts and the display. The circuitry includes an electric charger and a processor, where the processor is in electrical communication with a computer readable storage medium. The medium includes computer readable software code, which when executed by the processor, causes the charger to implement a pulse sequence comprising at least 3 duty cycles within 180 seconds between the contacts.

[0029] A method of reducing the bias attributable to mediator background in a determined concentration of an analyte in a sample is provided that includes applying a pulse sequence including at least 3 duty cycles within 180 seconds to the sample.

[0030] A method of determining the duration of a pulse sequence including at least 3 duty cycles within 180 seconds, for determining the concentration of an analyte in a sample is provided that includes determining a plurality of sets of calibration constants determined

from currents recorded during the at least 3 duty cycles and determining the duration of the pulse sequence in response to the determined concentration of the analyte in the sample.

[0031] A method of signaling a user to add additional sample to a sensor strip is provided that includes determining if the sensor strip is under-filled by determining a decay constant from currents recorded during a gated amperometric pulse sequence and signaling the user to add additional sample to the sensor strip if the strip is under-filled.

[0032] A method of determining the temperature of a sample contained by a sensor strip is provided that includes determining a decay constant from currents recorded during a gated amperometric pulse sequence and correlating the decay constant with a temperature value.

[0033] A method of determining the duration of a pulse sequence for determining the concentration of an analyte in a sample is provided that includes determining the temperature of a sample contained by a sensor strip from decay constants determined from currents recorded during a gated amperometric pulse sequence.

[0034] The following definitions are included to provide a clear and consistent understanding of the specification and claims.

[0035] The term “analyte” is defined as one or more substances present in a sample. The analysis determines the presence and/or concentration of the analyte present in the sample.

[0036] The term “sample” is defined as a composition that may contain an unknown amount of the analyte. Typically, a sample for electrochemical analysis is in liquid form, and preferably the sample is an aqueous mixture. A sample may be a biological sample, such as blood, urine, or saliva. A sample also may be a derivative of a biological sample, such as an extract, a dilution, a filtrate, or a reconstituted precipitate.

[0037] The term “measurable species” is defined as any electrochemically active species that may be oxidized or reduced under an appropriate potential at the working electrode of an electrochemical sensor strip. Examples of measurable species include analytes, oxidoreductases, and mediators.

[0038] The term “amperometry” is defined as an analysis method where the concentration of an analyte in a sample is determined by electrochemically measuring the oxidation or reduction rate of the analyte at a potential.

[0039] The term “system” or “sensor system” is defined as a sensor strip in electrical communication through its conductors with a measuring device, which allows for the quantification of an analyte in a sample.

[0040] The term “sensor strip” is defined as a device that contains the sample during the analysis and provides electrical communication between the sample and the measuring device. The portion of the sensor strip that contains the sample is often referred to as the “cap-gap.”

[0041] The term “conductor” is defined as an electrically conductive substance that remains stationary during an electrochemical analysis.

[0042] The term “measuring device” is defined as one or more electronic devices that may apply an electric potential to the conductors of a sensor strip and measure the resulting current. The measuring device also may include the processing capability to determine the presence and/or concentration of one or more analytes in response to the recorded current values.

[0043] The term “accuracy” is defined as how close the amount of analyte measured by a sensor strip corresponds to the true amount of analyte in the sample. In one aspect, accuracy may be expressed in terms of bias.

[0044] The term “precision” is defined as how close multiple analyte measurements are for the same sample. In one aspect, precision may be expressed in terms of the spread or variance among multiple measurements.

[0045] The term “redox reaction” is defined as a chemical reaction between two species involving the transfer of at least one electron from a first species to a second species. Thus, a redox reaction includes an oxidation and a reduction. The oxidation half-cell of the reaction involves the loss of at least one electron by the first species, while the reduction half-cell involves the addition of at least one electron to the second species. The ionic charge of a species that is oxidized is made more positive by an amount equal to the number of electrons removed. Likewise, the ionic charge of a species that is reduced is made less positive by an amount equal to the number of electrons gained.

[0046] The term “mediator” is defined as a substance that may be oxidized or reduced and that may transfer one or more electrons. A mediator is a reagent in an electrochemical analysis and is not the analyte of interest, but provides for the indirect measurement of the analyte. In a simplistic system, the mediator undergoes a redox reaction in response to the oxidation or reduction of the analyte. The oxidized or reduced mediator then undergoes the

opposite reaction at the working electrode of the sensor strip and is regenerated to its original oxidation number.

[0047] The term “binder” is defined as a material that provides physical support and containment to the reagents while having chemical compatibility with the reagents.

[0048] The term “mediator background” is defined as the bias introduced into the measured analyte concentration attributable to measurable species not responsive to the underlying analyte concentration.

[0049] The term “under-fill” is defined as when insufficient sample was introduced into the sensor strip to obtain an accurate analysis.

[0050] The term “redox pair” is defined as two conjugate species of a chemical substance having different oxidation numbers. Reduction of the species having the higher oxidation number produces the species having the lower oxidation number. Alternatively, oxidation of the species having the lower oxidation number produces the species having the higher oxidation number.

[0051] The term “oxidation number” is defined as the formal ionic charge of a chemical species, such as an atom. A higher oxidation number, such as (III), is more positive, and a lower oxidation number, such as (II), is less positive.

[0052] The term “soluble redox species” is defined as a substance that is capable of undergoing oxidation or reduction and that is soluble in water (pH 7, 25° C) at a level of at least 1.0 grams per Liter. Soluble redox species include electro-active organic molecules, organotransition metal complexes, and transition metal coordination complexes. The term “soluble redox species” excludes elemental metals and lone metal ions, especially those that are insoluble or sparingly soluble in water.

[0053] The term “oxidoreductase” is defined as any enzyme that facilitates the oxidation or reduction of an analyte. An oxidoreductase is a reagent. The term oxidoreductase includes “oxidases,” which facilitate oxidation reactions where molecular oxygen is the electron acceptor; “reductases,” which facilitate reduction reactions where the analyte is reduced and molecular oxygen is not the analyte; and “dehydrogenases,” which facilitate oxidation reactions where molecular oxygen is not the electron acceptor. *See, for example, Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revised Edition, A.D. Smith, Ed., New York: Oxford University Press (1997) pp. 161, 476, 477, and 560.*

[0054] The term "electro-active organic molecule" is defined as an organic molecule lacking a metal that is capable of undergoing an oxidation or reduction reaction. Electro-active organic molecules may serve as mediators.

[0055] The term "organotransition metal complex," also referred to as "OTM complex," is defined as a complex where a transition metal is bonded to at least one carbon atom through a sigma bond (formal charge of -1 on the carbon atom sigma bonded to the transition metal) or a pi bond (formal charge of 0 on the carbon atoms pi bonded to the transition metal). For example, ferrocene is an OTM complex with two cyclopentadienyl (Cp) rings, each bonded through its five carbon atoms to an iron center by two pi bonds and one sigma bond. Another example of an OTM complex is ferricyanide (III) and its reduced ferrocyanide (II) counterpart, where six cyano ligands (formal charge of -1 on each of the 6 ligands) are sigma bonded to an iron center through the carbon atoms.

[0056] The term "coordination complex" is defined as a complex having well-defined coordination geometry, such as octahedral or square planar. Unlike OTM complexes, which are defined by their bonding, coordination complexes are defined by their geometry. Thus, coordination complexes may be OTM complexes (such as the previously mentioned ferricyanide), or complexes where non-metal atoms other than carbon, such as heteroatoms including nitrogen, sulfur, oxygen, and phosphorous, are datively bonded to the transition metal center. For example, ruthenium hexaamine is a coordination complex having a well-defined octahedral geometry where six NH_3 ligands (formal charge of 0 on each of the 6 ligands) are datively bonded to the ruthenium center. A more complete discussion of organotransition metal complexes, coordination complexes, and transition metal bonding may be found in Collman et al., Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry (1987) and Miessler & Tarr, Inorganic Chemistry (1991).

[0057] The term "steady-state" is defined as when the change in electrochemical signal (current) with respect to its independent input variable (voltage or time) is substantially constant, such as within ± 10 or $\pm 5\%$.

[0058] The term "transient point" is defined as the current value obtained as a function of time when an increasing rate of diffusion of a measurable species to a conductor surface transitions into a relatively constant rate of diffusion. Before the transient point, the current is rapidly changing with time. Similarly, after the transient point, the rate of current decay becomes relatively constant, thus reflecting the relatively constant rate of diffusion of a measurable species to a conductor surface.

[0059] The term “relatively constant” is defined as when the change in a current value or a diffusion rate is within ± 20 , ± 10 , or $\pm 5\%$.

[0060] The term “average initial thickness” refers to the average height of a layer prior to the introduction of a liquid sample. The term average is used because the top surface of the layer is uneven, having peaks and valleys.

[0061] The term “redox intensity” (RI) is defined as the total excitation time divided by the sum of the total excitation time and the total relaxation time delays for a pulse sequence.

[0062] The term “handheld device” is defined as a device that may be held in a human hand and is portable. An example of a handheld device is the measuring device accompanying Ascensia® Elite Blood Glucose Monitoring System, available from Bayer HealthCare, LLC, Tarrytown, New York.

[0063] The term “on” is defined as “above” and is relative to the orientation being described. For example, if a first element is deposited over at least a portion of a second element, the first element is said to be “deposited on” the second. In another example, if a first element is present above at least a portion of a second element, the first element is said to be “on” the second. The use of the term “on” does not exclude the presence of substances between the upper and lower elements being described. For example, a first element may have a coating over its top surface, yet a second element over at least a portion of the first element and its top coating may be described as “on” the first element. Thus, the use of the term “on” may or may not mean that the two elements being related are in physical contact.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0064] The invention may be better understood with reference to the following drawings and description. The components in the figures are not necessarily to scale, emphasis instead being placed upon illustrating the principles of the invention. Moreover, in the figures, like referenced numerals designate corresponding parts throughout the different views.

[0065] FIG. 1A is a perspective representation of an assembled sensor strip.

[0066] FIG. 1B is a top-view diagram of a sensor strip, with the lid removed.

[0067] FIG. 2 depicts an end-view diagram of the sensor strip of FIG. 1B.

[0068] FIG. 3 represents an electrochemical analytic method of determining the presence and concentration of an analyte in a sample.

- [0069] FIGs. 4A and 4B depict a working electrode having a surface conductor and a DBL during the application of long and short read pulses.
- [0070] FIGs. 5A-5E represent five examples of pulse sequences where multiple duty cycles were applied to the sensor strip after introduction of the sample.
- [0071] FIG. 6A shows the transient output currents of the pulse sequence represented in FIG. 5B for 40% hematocrit WB samples containing 50, 100, 200, 400, and 600 mg/dL glucose.
- [0072] FIG. 6B shows current contour profiles prepared by plotting and connecting the final current value from each of the transient current profiles shown in FIG. 6A.
- [0073] FIG. 6C shows current contour profiles prepared from transient current profiles generated by the pulse sequence depicted in FIG. 5E.
- [0074] FIG. 6D is a graph illustrating output signals in relation to input signals for an electrochemical system using gated amperometric pulse sequences.
- [0075] FIGs. 7A and 7B are graphs illustrating the improvement in measurement accuracy when a DBL is combined with a short read pulse.
- [0076] FIGs. 7C and 7D are graphs illustrating the reduction in hematocrit bias that may be obtained when a gated amperometric pulse sequence is combined with a DBL.
- [0077] FIG. 8 plots the endpoint currents recorded at multiple duty cycles when the pulse sequence of FIG. 5B was applied to WB samples containing various glucose concentrations.
- [0078] FIG. 9A depicts the transient current profiles obtained from the pulse sequence represented in FIG. 5B when a 2.0 μ L sample was introduced to 10 different sensor strips.
- [0079] FIG. 9B depicts the profiles of the decay rate of each pulse sequence converted from FIG. 9A as a function of time.
- [0080] FIG. 10 plots K constants determined from a pulse sequence for glucose concentrations of 50, 100, and 400 mg/dL as a function of temperature.
- [0081] FIG. 11 is a schematic representation of a measuring device.

DETAILED DESCRIPTION

- [0082] The present invention makes use of the discovery that gated amperometric pulse sequences including multiple duty cycles may provide improved accuracy and precision to an analysis, while reducing the completion time of the analysis. Each duty cycle includes an excitation that may be provided at a relatively constant voltage. Each duty cycle also

includes a relaxation that may be provided by an open circuit. The pulse sequences of the present invention may reduce the time required for analysis by eliminating the need for additional delays and pulses, such as "incubation" delays to provide reagent rehydration, "burn-off" pulses to renew the electrodes, and mediator regeneration pulses to renew the oxidation state of the mediator, thus reducing analysis time.

[0083] Even with shorter analysis times, the gated amperometric pulse sequences of the present invention may improve accuracy and/or precision in relation to conventional methods. In one aspect, accuracy errors introduced by the hematocrit effect and precision errors introduced by varying cap-gap volume may be reduced through the combination of a diffusion barrier layer with the pulse sequences of the present invention. In another aspect, errors otherwise resulting from a non-steady-state sensor condition and/or mediator background may be reduced. The gated pulse sequences of the present invention also may allow the determination of transient current and contour profiles that simulate a steady-state condition. The transient current profiles may be used to provide a plurality of sets of calibration constants, under-fill detection, and the ability to determine the temperature of the sample, instead of relying on the temperature from the measuring device.

[0084] FIGs. 1A and 1B depict a sensor strip 100, which may be used in the present invention. FIG. 1A is a perspective representation of an assembled sensor strip 100 including a sensor base 110, at least partially covered by a lid 120 that includes a vent 130, a concave area 140, and an input end opening 150. A partially-enclosed volume 160 (the cap-gap) is formed between the base 110 and the lid 120. Other sensor strip designs compatible with the present invention also may be used, such as those described in U.S. Patent Nos. 5,120,420 and 5,798,031.

[0085] A liquid sample for analysis may be transferred into the cap-gap 160 by introducing the liquid to the opening 150. The liquid fills the cap-gap 160 while expelling the previously contained air through the vent 130. The cap-gap 160 may contain a composition (not shown) that assists in retaining the liquid sample in the cap-gap. Examples of such compositions include water-swellaable polymers, such as carboxymethyl cellulose and polyethylene glycol; and porous polymer matrices, such as dextran and polyacrylamide.

[0086] FIG. 1B depicts a top-view of the sensor strip 100, with the lid 120 removed. Conductors 170 and 180 may run under a dielectric layer 190 from the opening 150 to a working electrode 175 and a counter electrode 185, respectively. In one aspect, the working and counter electrodes 175, 185 may be in substantially the same plane, as depicted in the

figure. In a related aspect, the working and counter electrodes 175, 185 may be separated by greater than 200 or 250 μm and may be separated from an upper portion of the lid 120 by at least 100 μm . The dielectric layer 190 may partially cover the electrodes 175, 185 and may be made from any suitable dielectric material, such as an insulating polymer.

[0087] The counter electrode 185 balances the potential at the working electrode 175 of the sensor strip 100. In one aspect, this potential may be a reference potential achieved by forming the counter electrode 185 from a redox pair, such as Ag/AgCl , to provide a combined reference-counter electrode. In another aspect, the potential may be provided to the sensor system by forming the counter electrode 185 from an inert material, such as carbon, and including a soluble redox species, such as ferricyanide, within the cap-gap 160. Alternatively, the sensor strip 100 may be provided with a third conductor and electrode (not shown) to provide a reference potential to the sensor system.

[0088] FIG. 2 depicts an end-view diagram of the sensor strip depicted in FIG. 1B showing the layer structure of the working electrode 175 and the counter electrode 185. The conductors 170 and 180 may lie directly on the base 110. Surface conductor layers 270 and 280 optionally may be deposited on the conductors 170 and 180, respectively. The surface conductor layers 270, 280 may be made from the same or from different materials.

[0089] The material or materials used to form the conductors 170, 180 and the surface conductor layers 270, 280 may include any electrical conductor. Preferable electrical conductors are non-ionizing, such that the material does not undergo a net oxidation or a net reduction during analysis of the sample. The conductors 170, 180 preferably include a thin layer of a metal paste or metal, such as gold, silver, platinum, palladium, copper, or tungsten. The surface conductor layers 270, 280 preferably include carbon, gold, platinum, palladium, or combinations thereof. If a surface conductor layer is not present on a conductor, the conductor is preferably made from a non-ionizing material.

[0090] The surface conductor material may be deposited on the conductors 170, 180 by any conventional means compatible with the operation of the sensor strip, including foil deposition, chemical vapor deposition, slurry deposition, and the like. In the case of slurry deposition, the mixture may be applied as an ink to the conductors 170, 180, as described in U.S. Patent No. 5,798,031.

[0091] The reagent layers 275 and 285 may be deposited on the conductors 170 and 180, respectively, and include reagents and optionally a binder. The binder material is preferably a polymeric material that is at least partially water-soluble. Suitable partially

water-soluble polymeric materials for use as the binder may include poly(ethylene oxide) (PEO), carboxy methyl cellulose (CMC), polyvinyl alcohol (PVA), hydroxyethylene cellulose (HEC), hydroxypropyl cellulose (HPC), methyl cellulose, ethyl cellulose, ethyl hydroxyethyl cellulose, carboxymethyl ethyl cellulose, polyvinyl pyrrolidone (PVP), polyamino acids such as polylysine, polystyrene sulfonate, gelatin, acrylic acid, methacrylic acid, starch, maleic anhydride salts thereof, derivatives thereof, and combinations thereof. Among the above binder materials, PEO, PVA, CMC, and PVA are preferred, with CMC and PEO being more preferred at present.

[0092] In addition to the binder, the reagent layers 275 and 285 may include the same or different reagents. In one aspect, the reagents present in the first layer 275 may be selected for use with the working electrode 175, while the reagents present in the second layer 285 may be selected for use with the counter electrode 185. For example, the reagents in the layer 285 may facilitate the free flow of electrons between the sample and the conductor 180. Similarly, the reagents in the layer 275 may facilitate the reaction of the analyte.

[0093] The reagent layer 275 may include an oxidoreductase specific to the analyte that may facilitate the reaction of the analyte while enhancing the specificity of the sensor system to the analyte, especially in complex biological samples. Examples of some specific oxidoreductases and corresponding analytes are given below in Table II.

Oxidoreductase (reagent layer)	Analyte
Glucose dehydrogenase	β -glucose
Glucose oxidase	β -glucose
Cholesterol esterase; cholesterol oxidase	Cholesterol
Lipoprotein lipase; glycerol kinase; glycerol-3-phosphate oxidase	Triglycerides
Lactate oxidase; lactate dehydrogenase; diaphorase	Lactate
Pyruvate oxidase	Pyruvate
Alcohol oxidase	Alcohol
Bilirubin oxidase	Bilirubin
Uricase	Uric acid
Glutathione reductase	NAD(P)H
Carbon monoxide oxidoreductase	Carbon monoxide

Table II

At present, especially preferred oxidoreductases for glucose analysis include glucose oxidase, glucose dehydrogenase, derivatives thereof, or combinations thereof.

[0094] The reagent layer 275 also may include a mediator to more effectively communicate the results of the analyte reaction to the surface conductor 270 and/or the conductor 170. Examples of mediators include OTM complexes, coordination complexes, and electro-active organic molecules. Specific examples include ferrocene compounds, ferrocyanide, ferricyanide, coenzymes of substituted or unsubstituted pyrroloquinoline quinones (PQQ), substituted or unsubstituted 3-phenylimino-3H-phenothiazines (PIPT), 3-phenylimino-3H-phenoxazine (PIPO), substituted or unsubstituted benzoquinones, substituted or unsubstituted naphthoquinones, N oxides, nitroso compounds, hydroxylamines, oxines, flavins, phenazines, phenazine derivatives, phenothiazines, indophenols, and indamines. These, and other mediators that may be included in the reagent layer may be found in U.S. Patent Nos. 5,653,863; 5,520,786; 4,746,607; 3,791,988; and in EP Patent Nos. 0354441 and 0330517.

[0095] At present, especially preferred mediators for glucose analysis include ferricyanide, ruthenium hexaamine, PIPT, PIPO, or combinations thereof. A review of useful electrochemical mediators for biological redox systems may be found in *Analytica Clinica Acta*. 140 (1982), pages 1-18.

[0096] The reagent layers 275, 285 may be deposited by any convenient means, such as printing, liquid deposition, or ink-jet deposition. In one aspect, the layers are deposited by printing. With other factors being equal, the angle of the printing blade may inversely affect the thickness of the reagent layers. For example, when the blade is moved at an approximately 82° angle to the base 110, the layer may have a thickness of approximately 10 μm. Similarly, when a blade angle of approximately 62° to the base 110 is used, a thicker 30 μm layer may be produced. Thus, lower blade angles may provide thicker reagent layers. In addition to blade angle, other factors, such as the viscosity of the material being applied as well as the screen-size and emulsion combination, may affect the resulting thickness of the reagent layers 275, 285.

[0097] The working electrode 175 also may include a diffusion barrier layer (DBL) that is integral to a reagent layer 275 or that is a distinct layer 290, such as depicted in FIG. 2. Thus, the DBL may be formed as a combination reagent/DBL on the conductor, as a distinct layer on the conductor, or as a distinct layer on the reagent layer. When the working electrode 175 includes the distinct DBL 290, the reagent layer 275 may or may not reside on

the DBL 290. Instead of residing on the DBL 290, the reagent layer 275 may reside on any portion of the sensor strip 100 that allows the reagent to solubilize in the sample. For example, the reagent layer 175 may reside on the base 110 or on the lid 120.

[0098] The DBL provides a porous space having an internal volume where a measurable species may reside. The pores of the DBL may be selected so that the measurable species may diffuse into the DBL, while physically larger sample constituents, such as RB cells, are substantially excluded. Although conventional sensor strips have used various materials to filter RB cells from the surface of the working electrode, a DBL provides an internal porous space to contain and isolate a portion of the measurable species from the sample.

[0099] When the reagent layer 275 includes a water-soluble binder, any portion of the binder that does not solubilize into the sample prior to the application of an excitation may function as an integral DBL. The average initial thickness of a combination DBL/reagent layer is preferably less than 30 or 23 micrometers (μm) and more preferably less than 16 μm . At present, an especially preferred average initial thicknesses of a combination DBL/reagent layer is from 1 to 30 μm or from 3 to 12 μm . The desired average initial thickness of a combination DBL/reagent layer may be selected for a specific excitation length on the basis of when the diffusion rate of the measurable species from the DBL to a conductor surface, such as the surface of the conductor 170 or the surface of the surface conductor 270 from FIG. 2, becomes relatively constant.

[00100] Furthermore, using too thick of a DBL with a short excitation length may delay when the diffusion rate of the measurable species from the DBL to the conductor surface becomes relatively constant. For example, when duty cycles including sequential 1 second excitations separated by 0.5 second relaxations are applied to a working electrode using a combination DBL/reagent layer having an average initial thickness of 30 μm , a preferred diffusion rate may not be reached until at least 6 duty cycles have been applied ($>\sim 10$ seconds). Conversely, when the same duty cycles are applied to a working electrode using a combination DBL/reagent layer having an average initial thickness of 11 μm , a relatively constant diffusion rate may be reached after the second excitation (~ 2.5 seconds). Thus, there is an upper limit for the preferred average initial thickness of the DBL for a given duty cycle. A more in-depth treatment of the correlation between DBL thickness, excitation length, and time to reach a relatively constant diffusion rate may be found in U.S. Provisional

App. No. 60/655,180, filed February 22, 2005, entitled "Concentration Determination in a Diffusion Barrier Layer".

[00101] The distinct DBL 290 may include any material that provides the desired pore space, while being partially or slowly soluble in the sample. In one aspect, the distinct DBL 290 may include a reagent binder material lacking reagents. The distinct DBL 290 may have an average initial thickness of at least 5 μm , preferably, from 8 to 25 μm , and more preferably from 8 to 15 μm .

[00102] FIG. 3 represents an electrochemical analysis 300 for determining the presence and optionally the concentration of an analyte 322 in a sample 312. In 310, the sample 312 is introduced to a sensor strip 314, such as the sensor strip depicted in FIGs. 1A-1B and 2. The reagent layers, such as 275 and/or 285 from FIG. 2, begin to solubilize into the sample 312, thus allowing reaction. At this point in the analysis, it may be beneficial to provide an initial time delay, or "incubation period," for the reagents to react with the sample 312. Preferably, the initial time delay may be from 1 to 10 seconds. A more in-depth treatment of initial time delays may be found in U.S. Pat. Nos. 5,620,579 and 5,653,863.

[00103] During the reaction, a portion of the analyte 322 present in the sample 312 is chemically or biochemically oxidized or reduced in 320, such as by an oxidoreductase. Upon oxidation or reduction, electrons optionally may be transferred between the analyte 322 and a mediator 332 in 330.

[00104] In 340, a measurable species 342, which may be the charged analyte 322 from 320 or the charged mediator 332 from 330, is electrochemically excited (oxidized or reduced). For example, when the sample 312 is whole blood containing glucose that was oxidized by glucose oxidase in 320, which then transfers an electron to reduce a ferricyanide (III) mediator to ferrocyanide (II) in 330, the excitation of 340 oxidizes ferrocyanide (II) to ferricyanide (III) at the working electrode. In this manner, an electron is selectively transferred from the glucose analyte to the working electrode of the sensor strip where it may be detected by a measuring device.

[00105] The current resulting from the excitation 340 may be recorded during the excitation 340 as a function of time in 350. In 360, the sample undergoes relaxation. Preferably, the current is not recorded during the relaxation 360.

[00106] In 370, the excitation 340, the recordation 350, and the relaxation 360 are repeated at least twice for a total of at least three duty cycles within a 180 second or less

timeframe. The recorded current and time values may be analyzed to determine the presence and/or concentration of the analyte 322 in the sample 312 in 380.

[00107] Amperometric sensor systems apply a potential (voltage) to the sensor strip to excite the measurable species while the current (amperage) is monitored. Conventional amperometric sensor systems may maintain the potential while measuring the current for a continuous read pulse length of from 5 to 10 seconds, for example. In contrast to conventional methods, the duty cycles used in the electrochemical analysis 300 replace continuous, long-duration read pulses with multiple excitations and relaxations of short duration.

[00108] The analysis 300 may increase the accuracy and/or precision of the analyte determination when the measurable species excited at the working electrode in 540 is substantially drawn from the interior of a DBL, as opposed to the measurable species present in the cap-gap of the strip. FIGs. 4A and 4B depict a working electrode 400 having a surface conductor 430 and a distinct DBL 405 during the application of a long read pulse and a short excitation. When a WB sample is applied to the working electrode 400, RB cells 420 cover the DBL 405. Analyte present in the sample forms external measurable species 410 external to the DBL 405. A portion of the external measurable species 410 diffuses into the distinct DBL 405 to give internal measurable species 415.

[00109] As shown in FIG. 4A, when a continuous 10 second read pulse is applied to the working electrode 400, both the external and internal measurable species 410 and 415 are excited at the surface conductor 430 by a change in oxidation state. During the long read pulse, the external measurable species 410 diffuses through the sample region where the RB cells 420 reside and through the DBL 405 to the surface conductor 430. Diffusion of the external measurable species 410 through the RB cells 420 during the read pulse introduces the hematocrit effect to the analysis. Because a substantial portion of the measurable species excited at the surface conductor 430 originates from outside the DBL 420, a long read pulse applied to a sensor strip having a DBL may perform similarly with regards to the hematocrit effect to a short read pulse applied to a strip lacking a DBL.

[00110] Conversely, FIG. 4B represents the situation where a short excitation is applied to the DBL equipped sensor strip 400 to excite the internal measurable species 415, while substantially excluding from excitation the measurable species 410 external to the DBL 405. During the short excitation, the measurable species 410 either remains external to the DBL 405 or does not substantially diffuse through the DBL to reach the surface conductor

430. In this manner, the short excitation may provide a substantial reduction in the influence of the hematocrit effect on the analysis.

[00111] By controlling the length of excitation at the working electrode, the measurable species internal to the DBL may be analyzed, while the measurable species external to the DBL may be substantially excluded from analysis. In relation to the surface conductor 430 of the working electrode, the thickness and internal volume of the DBL 405 is believed to alter the diffusion rate of the internal measurable species 415 in relation to the diffusion rate of the external measurable species 410.

[00112] Because the measurable species internal to the DBL may diffuse at a different rate to the conductor of the working electrode than the measurable species external to the DBL, the length of the excitation at the working electrode may select which measurable species is preferentially analyzed. While identical from a molecular standpoint, the different diffusion rates of the measurable species internal and external to the DBL may allow differentiation.

[00113] While not wishing to be bound by any particular theory, it is presently believed that the rate of diffusion of the measurable species from outside the DBL into the DBL is varying, while the diffusion rate of the measurable species from the internal volume of the DBL to the conductor is relatively constant. The varying rate of diffusion of the measurable species outside the DBL may be caused by the RB cells and other constituents present in the sample and may give rise to the hematocrit effect. Thus, analysis errors (bias) introduced by the sample constituents, including RB cells, may be reduced by substantially limiting analysis to the measurable species having a relatively constant diffusion rate to the conductor.

[00114] Another advantage of selectively analyzing the measurable species internal to the DBL is a reduction of measurement imprecision from sensor strips having varying cap-gap volumes. If a read pulse continues past the time when substantially all of the measurable species present in the cap-gap has been analyzed, the analysis no longer represents the concentration of measurable species in the sample, but has instead determined the amount of measurable species in the cap-gap; a very different measurement. As the excitation length becomes long relative to the volume of the cap-gap, the current measurement will depend on the volume of the cap-gap, not the underlying analyte concentration. Thus, long read pulses may result in measurements that are highly inaccurate with regard to analyte concentration when the pulse length "overshoots" the measurable species present in the cap-gap.

[00115] As described in U.S. Provisional App. No. 60/617,889, filed October 12, 2004, entitled "Concentration Determination in a Diffusion Barrier Layer," a single short read pulse or excitation may be selected to substantially limit measurable species excitation to a DBL. When a single excitation is used, the length of the excitation and the thickness of the DBL may be preferably selected so that a relatively constant diffusion rate of the measurable species from the DBL to the conductor surface is reached during the excitation. If a relatively constant diffusion rate is not reached during the excitation, the concentration of the measurable species within the DBL may not accurately represent the concentration of the measurable species in the sample, thus adversely affecting the analysis. Furthermore, the single excitation may not effectively reduce the background signal from the mediator.

[00116] Referring to FIG. 3, the excitation 340, the recordation 350, and the relaxation 360 constitute a single duty cycle, which may be applied to a sensor strip at least three times during a 180 second or less time period. More preferably, at least 4, 6, 8, 10, 14, 18, or 22 duty cycles are applied during an independently selected 120, 90, 60, 30, 15, 10, or 5 second time period. In one aspect, the duty cycles are applied during a 5 to 60 second time period. In another aspect, from 3 to 18 or from 3 to 10 duty cycles may be applied within 30 seconds or less. In another aspect, from 4 to 8 duty cycles may be applied within 3 to 16 seconds.

[00117] The potential applied during the excitation 340 portion of the duty cycle is preferably applied at a substantially constant voltage and polarity throughout its duration. This directly contrasts to conventional read pulses where the voltage is changed or "swept" through multiple voltage potentials and/or polarities during data recordation. In one aspect, the duration of the excitation 340 is at most 4 or 5 seconds, and preferably less than 3, 2, 1.5, or 1 second. In another aspect, the duration of the excitation 340 is from 0.01 to 3 seconds, from 0.01 to 2 seconds, or from 0.01 to 1.5 seconds. More preferably, the duration of the excitation 340 is from 0.1 to 1.2 seconds.

[00118] After the excitation 340, in 360 the measuring device may open the circuit through the sensor strip 314, thus allowing the system to relax. During the relaxation 360, the current present during the excitation 340 is substantially reduced by at least one-half, preferably by an order of magnitude, and more preferably to zero. Preferably, a zero current state is provided by an open circuit or other method known to those of ordinary skill in the art to provide a substantially zero current flow. At least 3 relaxations may be provided during the duty cycles of the pulse sequence.

[00119] In one aspect, the relaxation 360 is at least 10, 5, 3, 2, 1.5, 1, or 0.5 seconds in duration. In another aspect, the relaxation 360 is from 0.1 to 3 seconds, from 0.1 to 2 seconds, or from 0.1 to 1.5 seconds in duration. More preferably, the relaxation 360 is from 0.2 to 1.5 seconds in duration and provided by an open circuit.

[00120] During the relaxation 360, the ionizing agent may react with the analyte to generate additional measurable species without the effects of an electric potential. Thus, for a glucose sensor system including glucose oxidase and a ferricyanide mediator as reagents, additional ferrocyanide (reduced mediator) responsive to the analyte concentration of the sample may be produced without interference from an electric potential during the relaxation 360.

[00121] Many conventional analysis methods continuously apply a voltage during the duration of the read pulse. The applied voltage may have a fixed potential or may have a potential that is swept from a positive to a negative potential or from a positive or a negative potential to a zero potential relative to a potential. Even at a zero relative potential, these methods continuously draw current from the sensor strip during the read pulse, which permits the electrochemical reaction to continue throughout the read pulse. Thus, the reaction that produces measurable species responsive to the analyte concentration and the diffusion of the measurable species to the working electrode are both affected by current during the zero potential portion of a conventional read pulse.

[00122] Conventional methods that continuously apply voltage to and draw current from the sensor strip, even at a zero potential in relation to a potential, are fundamentally different from the relaxations of the present invention. The multiple duty cycles applied by the present invention also are markedly different from conventional methods that use a single long duration pulse with multiple measurements, such as those disclosed in U.S. Pat. No. 5,243,516, due to the multiple relaxations of the present invention. In contrast to these conventional methods, each duty cycle of the pulse sequences of the present invention provides an independent diffusion and analyte reaction time during the relaxation.

[00123] FIGs. 5A-5E depict five examples of gated amperometric pulse sequences where multiple duty cycles were applied to the sensor strip after introduction of the sample. In these examples, square-wave pulses were used; however, other wave types compatible with the sensor system and the test sample also may be used. FIGs. 5C-5D depict pulse sequences including multiple duty cycles having the same excitation and open circuit delay times.

[00124] FIGs. 5A-5B depict pulse sequences that include 9 duty cycles having the same excitation and open circuit delay times in addition to a terminal read pulse 510 of longer duration that increases in voltage. The increased voltage of this terminal read pulse provides the ability to detect a species having a higher oxidation potential. A more complete discussion regarding terminal read pulses may be found in U.S. Provisional App. No. 60/669,729, filed April 8, 2005, entitled "Oxidizable Species as an Internal Reference in Control Solutions for Biosensors."

[00125] FIG. 5A depicts a 9 duty cycle pulse sequence where 0.5 second excitations are separated by 1 second open circuit delays to give a redox intensity (RI) of 0.357 (5/14). Thus, in FIG. 5A, the second duty cycle has an excitation portion 520 and a relaxation portion 530. FIG. 5B depicts a 9 duty cycle pulse sequence where 1 second excitations are separated by 0.5 second open circuit delays to give a RI of 0.69 (10/14.5). FIG. 5C depicts an 7 duty cycle pulse sequence where 1 second excitations are separated by 1 second open circuit delays to give a RI of 0.53 (8/15). A terminal read pulse 540 of the same duration and voltage as those used during the 7 duty cycles was applied. FIG. 5D depicts a 6 duty cycle pulse sequence where 1.5 second excitations are separated by 1 second open circuit delays to give a RI of 0.636 (10.5/16.5). As in FIG. 5C, the terminal read pulse 540 of the same duration and voltage as the prior duty cycle pulses was applied. FIG. 5E depicts a 7 duty cycle pulse sequence where relatively short 0.25 second excitations are separated by relatively long 1.5 second relaxations. The FIG. 5E pulse sequence begins with an initial 1 second pulse 550 and ends with the 1.25 second terminal read pulse 540 to provide a RI of 0.25 (4/16).

[00126] The higher the RI for a pulse sequence, the less background will be introduced into the analysis by the mediator. The pulse sequences represented in FIGs. 5A-5E are oxidative pulses, designed to excite (i.e. oxidize) a reduced mediator, which is the measurable species. Thus, the greater the oxidative current applied to the sensor strip in a given time period, the less chance that mediator reduced by pathways other than oxidation of the analyte is contributing to the recorded current values.

[00127] Table III, below, provides the slope, intercept, and ratio of intercept-to-slope for the contour profiles of the last four duty cycles of pulse sequences (a) and (b). Pulse sequence (a) was:

9 x (0.5 sec on + 1.0 sec off) + 0.5 sec = 14 sec, RI = 5/14 = 0.357.

Pulse sequence (b) was:

9 x (1.0 sec on + 0.375 sec off) + 1.0 sec = 13.375 sec, RI = 10/13.375 = 0.748

	Pulse Sequence (a), RI = 0.357			Pulse Sequence (b), RI = 0.748		
Pulse #	Slope	Intercept	Int/Slope	Slope	Intercept	Int/Slope
7	20.5	2581.6	125.93	14.07	741.29	52.69
8	19.99	2239.4	112.03	13.47	649.93	48.25
9	19.53	1973.4	101.04	12.92	580.94	44.96
10	19.1	1762.5	92.28	12.45	525.26	42.19

Table III

[00128] The intercept-to-slope ratios provide an indication of the amount of background signal attributable to the mediator, with higher ratio values indicating a greater proportion of the recorded signal attributable to mediator background. Thus, while the pulse frequency (number of excitations / total assay time in seconds) of sequences (a) and (b) are similar at about 0.7 sec⁻¹, the increase in RI provided by pulse sequence (b) provides less than half as much background signal. In combination, the multiple excitations of the pulse sequence may eliminate the need for an initial pulse to renew the oxidation state of the mediator. While the background current may be influenced by the mediator, for ferricyanide, pulse sequences having RI values of at least 0.01, 0.3, 0.6, or 1 are preferred, with RI values of from 0.1 to 0.8, from 0.2 to 0.7, or from 0.4 to 0.6 being more preferred.

[00129] Referring back to FIG. 3, in 350 the current passing through the conductors of the sensor strip 314 for each duty cycle of the pulse sequence may be recorded as a function of time. FIG. 6A shows the output currents plotted as a function of time for the pulse sequence represented in FIG. 5B for 40% hematocrit WB samples containing 50, 100, 200, 400, and 600 mg/dL glucose. Instead of a conventional long duration read pulse resulting in extensive oxidation of the measurable species, each excitation is followed by a break in the current profile.

[00130] In FIG. 6A, when the output currents are plotted as a function of time, each excitation results in a transient current profile having an initial high current value that decays over time. Preferably, the duty cycles include short, independent excitations and relaxations that inhibit the system from reaching a steady-state or a slow current decay condition during

30

each excitation, as required during the read pulse of conventional systems. Instead of conventional steady-state or slowly decaying currents, transient (rapidly decaying) current values are obtained from the gated amperometric pulse sequences because the electrochemical reaction of the measurable species at the working electrode is faster than the rate at which the measurable species is supplied to the working electrode by diffusion.

[00131] FIG. 6B shows a contour profile plot prepared by connecting the final current value from each of the transient current profiles (i.e. the final current value from each excitation) shown in FIG. 6A. The contour profile may be used to simulate the data obtained from a conventional system at steady-state, where the current change with time is substantially constant.

[00132] The transient current profiles obtained from gated amperometric pulse sequences and the derived contour current values are fundamentally different from the current profiles obtained from a conventional analysis using a single read pulse. While currents recorded from a single read pulse derive from a single relaxation/diffusion, each time point in the contour profile of the transient currents originates from an excitation after an independent relaxation/diffusion process. Furthermore, as the length of an excitation increases, the correlation between the current and the analyte concentration may decrease, often due to the hematocrit effect. Thus, the accuracy of an analysis using multiple, short excitations may be increased in comparison to an analysis using a longer read pulse having the duration of the multiple excitations combined.

[00133] Referring back to FIG. 6A, a transient point 605 is reached in the current profile when the last in time current value obtained for an excitation represents the greatest last in time current value obtained for any excitation. Thus, for FIG. 6A the transient point is reached at approximately 5 seconds. For each of the glucose concentrations, equilibrium with regards to DBL re-hydration may be reached at the highest current value in the contour profile for each glucose concentration. Thus, when the transient currents of FIG. 6A are converted to contour currents in FIG. 6B, reading 610 (highest) and 620 (lower) establish that equilibrium was reached regarding diffusion of the measurable species into the DBL and re-hydration of the DBL at about five seconds for the 600 mg/dL glucose concentration.

[00134] Current values recorded at a relatively constant diffusion rate minimize inaccuracies that would otherwise be introduced by variations in the rehydration and diffusion rates of the reagents. Thus, once a relatively constant diffusion rate is reached, the recorded current values more accurately correspond to the concentration of the measurable

species, and thus the analyte. Furthermore, for FIG. 6B, the complete analysis may be completed in as few as seven seconds because once the highest current value 610 of the contour profile is known, its value may be directly correlated to the analyte concentration. Additional data points may be obtained to reduce background error attributable to the mediator, as previously discussed.

[00135] FIG. 6C shows current contour profiles prepared from transient current profiles generated by the pulse sequence depicted in FIG. 5E. During each 0.25 second excitation, current values were recorded at the middle (~0.125 second) and end (~0.25 second), which may be used to determine a decay constant. Using the longer initial pulse with the short excitations and relatively long relaxations, the analysis may be completed in about four seconds.

[00136] FIG. 6D is a graph illustrating output signals in relation to input signals for an electrochemical system using gated amperometric pulse sequences. The input signals are potentials applied to a sample of biological fluid. The input signals include a polling input signal and an assay input signal. The output signals are currents generated from the sample. The output signals include a polling output signal and an assay output signal. The sample generates the assay output signal from a redox reaction of glucose in whole blood in response to the assay input signal. The input and output signals may be for a biosensor having working and counter electrodes. Other biosensors may be used including those with additional electrodes and different configurations. Other analyte concentrations may be measured including those in other biological fluids. Other output signals may be generated including those that decline initially and those that decline in all pulses.

[00137] In use, a sample of the biological fluid is deposited in a biosensor. The biosensor applies a polling signal to the sample from about -1.25 seconds through about 0 seconds. The pulses have a pulse width of about 5 – 10 ms and a pulse interval of about 125 ms. The biosensor generates a polling output signal in response to the polling input signal. The biosensor measures the polling output signal. The biosensor may have a potentiostat that provides the polling output signal to the input of an analog comparator.

[00138] When the polling output signal is equal to or greater than a polling threshold, the biosensor applies the assay input signal to the electrodes from about 0 seconds through about 7 seconds. The polling threshold value may be about 250 nA. The comparator may compare the polling output signal to the polling threshold value. When the polling output

signal exceeds the polling threshold value, the output signal of the comparator may trigger the launch of the assay input signal.

[00139] During the assay input signal, the biosensor applies a duty cycle with a first pulse having a potential of about 400 mV for about 1 sec to the working and counter electrodes. The first pulse is followed by a 0.5 sec relaxation, which may be an essentially open circuit or the like. The assay output signal or current within the first pulse is measured and stored in a memory device. The biosensor may apply a second pulse to the working and counter electrodes at about 200 mV for about 1 sec. The assay output signal or current within the second pulse is measured and stored in a memory device. The biosensor continues applying pulses from the assay input signal to the working and counter electrodes until the end of the assay period or for as long as desired by the biosensor. The assay period may be about 7 seconds. The biosensor may measure and store assay output signal or current within each pulse.

[00140] The polling input signal is an electrical signal, such as current or potential, that pulses or turns on and off at a set frequency or interval. The sample generates a polling output signal in response to the polling input signal. The polling output signal is an electrical signal, such as current or potential. The biosensor may show the polling output signal on a display and/or may store the assay output signal in a memory device. The biosensor may apply the polling signal to detect when a sample connects with the electrodes. The biosensor may use other methods and devices to detect when a sample is available for analysis.

[00141] The polling input signal is duty cycle in which a sequence of polling pulses is separated by polling relaxations. During a polling pulse, the electrical signal is on. During a polling relaxation, the electrical signal is off. On may include time periods when an electrical signal is present. Off may include time periods when an electrical signal is not present. Off may not include time periods when an electrical signal is present but has essentially no amplitude. The electrical signal may switch between on and off by closing and opening an electrical circuit, respectively. The electrical circuit may be opened and closed mechanically, electrically, or the like.

[00142] A polling input signal may have one or more polling pulse intervals. A polling pulse interval is the sum of a polling pulse and a polling relaxation. Each polling pulse has an amplitude and a polling pulse width. The amplitude indicates the intensity of the potential, the current, or the like of the electrical signal. The amplitude may vary or be a constant during the polling pulse. The polling pulse width is the time duration of a polling

pulse. The polling pulse widths in a polling input signal may vary or be essentially the same. Each polling relaxation has a polling relaxation width, which is the time duration of a polling relaxation. The polling relaxation widths in a polling input signal may vary or be essentially the same.

[00143] The polling input signal may have a polling pulse width of less than about 300 milliseconds (ms) and a polling pulse interval of less than about 1 sec. The polling input signal may have a polling pulse width of less than about 100 ms and a polling pulse interval of less than about 500 ms. The polling input signal may have a polling pulse width in the range of about 0.5 ms through about 75 ms and a polling pulse interval in the range of about 5 ms through about 300 ms. The polling input signal may have a polling pulse width in the range of about 1 ms through about 50 ms and a polling pulse interval in the range of about 10 ms through about 250 ms. The polling input signal may have a polling pulse width of about 5 ms and a polling pulse interval of about 125 ms. The polling input signal may have other pulse widths and pulse intervals.

[00144] The biosensor may apply the polling input signal to the sample during a polling period. The polling period may be less than about 15 minutes, 5 minutes, 2 minutes, or 1 minute. The polling period may be longer depending upon how a user uses the biosensor. The polling period may be in the range of about 0.5 second (sec) through about 15 minutes. The polling period may be in the range of about 5 sec through about 5 minutes. The polling period may be in the range of about 10 sec through about 2 minutes. The polling period may be in the range of about 20 sec through about 60 sec. The polling period may be in the range of about 30 through about 40 sec. The polling period may have less than about 200, 100, 50, or 25 pulse intervals. The polling period may have from about 2 through about 150 pulse intervals. The polling period may have from about 5 through about 50 pulse intervals. The polling period may have from about 5 through about 15 pulse intervals. The polling period may have about 10 pulse intervals. Other polling periods may be used.

[00145] The biosensor applies the assay input signal when the polling output signal is equal to or greater than a polling threshold. The polling threshold may be greater than about 5 percent (%) of the expected assay input signal at the beginning of the first pulse. The polling threshold may be greater than about 15% of the expected assay input signal at the beginning of the first pulse. The polling threshold may be in the range of about 5 percent (%) through about 50% of the expected assay input signal at the beginning of the first pulse.

Other polling thresholds may be used. The biosensor may indicate the polling output signal is equal to or greater than the polling threshold on a display.

[00146] The assay input signal is an electrical signal, such as current or potential, that pulses or turns on and off at a set frequency or interval. The sample generates an assay output signal in response to the assay input signal. The assay output signal is an electrical signal, such as current or potential.

[00147] The assay input signal is a sequence of assay pulses separated by assay relaxations. During an assay pulse, the electrical signal is on. During an assay relaxation, the electrical signal is off. On includes time periods when an electrical signal is present. Off includes time periods when an electrical signal is not present and does not include time periods when an electrical signal is present but has essentially no amplitude. The electrical signal switches between on and off by closing and opening an electrical circuit, respectively. The electrical circuit may be opened and closed mechanically, electrically, or the like.

[00148] An assay input signal may have one or more assay pulse intervals. An assay pulse interval is the sum of an assay pulse and an assay relaxation. Each assay pulse has an amplitude and an assay pulse width. The amplitude indicates the intensity of the potential, the current, or the like of the electrical signal. The amplitude may vary or be a constant during the assay pulse. The assay pulse width is the time duration of an assay pulse. The assay pulse widths in an assay input signal may vary or be essentially the same. Each assay relaxation has an assay relaxation width, which is the time duration of an assay relaxation. The assay relaxation widths in an assay input signal may vary or be essentially the same.

[00149] The assay input signal may have an assay pulse width of less than about 5 sec and an assay pulse interval of less than about 15 sec. The assay input signal may have an assay pulse width of less than about 3, 2, 1.5, or 1 sec and an assay pulse interval of less than about 13, 7, 4, 3, 2.5, or 1.5 sec. The assay input signal may have an assay pulse width in the range of about 0.1 sec through about 3 sec and an assay pulse interval in the range of about 0.2 sec through about 6 sec. The assay input signal may have an assay pulse width in the range of about 0.1 sec through about 2 sec and an assay pulse interval in the range of about 0.2 sec through about 4 sec. The assay input signal may have an assay pulse width in the range of about 0.1 sec through about 1.5 sec and an assay pulse interval in the range of about 0.2 sec through about 3.5 sec. The assay input signal may have an assay pulse width in the range of about 0.4 sec through about 1.2 sec and an assay pulse interval in the range of about 0.6 sec through about 3.7 sec. The assay input signal may have an assay pulse width in the

range of about 0.5 sec through about 1.5 sec and an assay pulse interval in the range of about 0.75 sec through about 2.0 sec. The assay input signal may have an assay pulse width of about 1 sec and an assay pulse interval of about 1.5 sec. The assay input signal may have other pulse widths and pulse intervals.

[00150] The biosensor applies the assay input signal to the sample during an assay period. The assay period may have the same or a different duration than the polling period. The assay period of the assay input signal may be less than about 180, 120, 90, 60, 30, 15, 10, or 5 sec. The assay period may be in the range of about 1 sec through about 100 sec. The assay period may be in the range of about 1 sec through about 25 sec. The assay period may be in the range of about 1 sec through about 10 sec. The assay period may be in the range of about 2 sec through about 3 sec. The assay period may be about 2.5 sec. The assay period may have less than about 50, 25, 20, 15, 10, 8, 6, or 4 assay pulse intervals. The assay period may have assay pulse intervals in the range of about 2 through about 50. The assay period may have assay pulse intervals in the range of about 2 through about 25. The assay period may have assay pulse intervals in the range of about 2 through about 15. The assay period may have about 10 assay pulse intervals. Other assay periods may be used.

[00151] FIGs. 7A and 7B are graphs illustrating the improvement in measurement accuracy when a DBL is combined with a short read pulse. Whole blood samples were combined with ferrocyanide in a 1:5 dilution ratio to represent an underlying glucose concentration and measured with a 1 second read pulse. Thus, the initial 20%, 40%, and 60% hematocrit WB samples were diluted to 16%, 32%, and 48% hematocrit (a 20% reduction of all three hematocrit values). The 20%, 40%, and 60% lines represent the current measured for the blood samples containing 16%, 32%, and 48% hematocrit, respectively.

[00152] FIG. 7A shows the inaccuracies introduced by the hematocrit and other effects from a bare conductor sensor strip lacking a DBL. The inaccuracy is represented as the difference between the 20% and 60% hematocrit lines (the total hematocrit bias span) and represents the maximum measurement inaccuracy attributable to the hematocrit effect. Smaller bias values represent a more accurate result. Similar performance was observed when a DBL was used with a longer read pulse as discussed above with regard to FIG. 4A.

[00153] Conversely, FIG. 7B shows a marked decrease in the distance between the 20% and 60% calibration lines when a DBL is combined with a 1 second read pulse. A distinct DBL of PEO polymer and 10% KCl (without reagents) was printed on a conductor as used for FIG. 7A above. The total bias hematocrit span with the DBL/short read pulse was

nearly two-thirds less than the total bias span without the DBL. Thus, pulse sequences including multiple duty cycles in combination with a DBL may significantly increase measurement accuracy and provide a desirable reduction in mediator background.

[00154] FIGs. 7C and 7D illustrate the reduction in hematocrit bias that may be obtained when a gated amperometric pulse sequence is combined with a DBL. FIG. 7C demonstrates that the measurement bias attributable to hematocrit effect is within $\pm 5\%$ when a DBL was combined with the pulse sequence of FIG. 5E and the current values were recorded at 14.875 seconds or 0.125 seconds from the last pulse. For comparison, FIG. 7D establishes that bias increases to $\pm 15\%$ when current value at 16 seconds (1.25 seconds from the last pulse) is used to determine the glucose concentration of the sample. Thus, the longer the duration of the excitation, the greater the hematocrit bias observed.

[00155] In addition to the ability of the present invention to reduce inaccuracy from the hematocrit effect and mediator background signal, the combination of the transient current profile of each excitation and the resulting contour profiles may be used to provide multiple sets of calibration constants to the sensor system, thus increasing the accuracy of the analysis. Each set of calibration constants obtained may be used to correlate a specific current reading to a specific concentration of measurable species in the sample. Thus, in one aspect, an increase in accuracy may be obtained by averaging the glucose values obtained using multiple sets of calibration constants.

[00156] Conventional electrochemical sensor systems generally use one set of calibration constants, such as slope and intercept, to convert current readings into corresponding concentration of the analyte in the sample. However, a single set of calibration constants may result in inaccuracies in the analyte concentration determined from the recorded current values because random noise is included in the measurement.

[00157] By taking the current value at a fixed time within each duty cycle of the pulse sequences of the present invention, multiple sets of calibration constants may be established. FIG. 8 plots the endpoint currents recorded at 8.5, 10, 11.5, 13, and 14.5 seconds (duty cycles 6-9 and first portion of the terminal read pulse) when the pulse sequence depicted in FIG. 5B was applied to WB samples containing various glucose concentrations. Each of these five calibration lines are independent of the other and may be used in at least two ways.

[00158] First, the multiple sets of calibration constants may be used to determine the number of duty cycles that should be applied during the pulse sequence to obtain the desired accuracy, precision, and assay time. For example, if the current values obtained from the first

three excitations indicate a high glucose concentration, such as >150 or 200 mg/dL, the sensor system may terminate the analysis at about 5.5 seconds, thus considerably shortening the time required for the analysis. Such a shortening may be possible because imprecision at high glucose concentrations is typically less than at lower glucose concentrations. Conversely, if the current values obtained from the first three excitations indicate a low glucose concentration, such as ≤ 150 or 100 mg/dL, the sensor system may extend the analysis to greater than 7, such as greater than 8 or 10 seconds, to increase the accuracy and/or precision of the analysis.

[00159] Second, the multiple sets of calibration constants may be used to increase the accuracy and/or precision of the analysis by averaging. For example, if the target glucose measurement time is 11.5 seconds, the currents at 8.5, 10, and 11.5 seconds can be utilized to calculate the glucose concentrations using the slopes and intercepts from the corresponding calibration lines; therefore, $G_{8.5} = (i_{8.5} - \text{Int}_{8.5})/\text{Slope}_{8.5}$, $G_{10} = (i_{10} - \text{Int}_{10})/\text{Slope}_{10}$, and $G_{11.5} = (i_{11.5} - \text{Int}_{11.5})/\text{Slope}_{11.5}$. Theoretically, these three glucose values should be equivalent, differing only by random variations. Thus, the glucose values $G_{8.5}$, G_{10} , and $G_{11.5}$ may be averaged and the final glucose value of $(G_{8.5} + G_{10} + G_{11.5})/3$ may be calculated. Averaging the values from the calibration lines may provide a reduction in noise at the rate of $1/\sqrt{3}$.

[00160] An unexpected benefit of gated amperometric pulse sequences including relatively short excitations and relatively long relaxations, such as that depicted in FIG. 5E, is the ability to simplify calibration. While the multiple sets of calibration constants that may be obtained from the transient and contour profiles may provide an advantage to the accuracy of the analysis, a pulse sequence such as depicted in FIG. 5E may provide similar accuracy to that obtained using multiple sets of calibration constants from a single set of calibration constants. While not intending to be bound by any particular theory, this result may be attributable to the relatively long relaxation times in comparison to the short relaxations. The long relaxation times may provide a state where the average rate of measurable species conversion during the excitation is balanced by the rate of measurable species diffusion into the DBL. In this manner, the multiple sets of calibration constants may collapse into a single set and the conversion of the recorded data into an analyte concentration may be simplified by carrying out the averaging process on the recorded current data before determining the analyte concentration.

[00161] The combination of the transient current profile of each excitation and the resulting contour profiles also may be used to determine if the sensor strip has been under-

filled with sample, thus allowing the user to add additional sample to the sensor strip. In addition to working and counter electrodes, conventional sensor systems may determine an under-fill condition through the use of a third electrode or electrode pair; however, the third electrode or electrode pair adds complexity and cost to the sensor system.

[00162] Conventional two electrode systems may be able to recognize that an analysis is "bad," but may not determine if the reason for the failed analysis was caused by under-fill or a defective sensor strip. The ability to determine if under-fill caused the failure of the analysis is beneficial because it may be corrected by adding additional sample to the same sensor strip and repeating the analysis, thus preventing a good strip from being discarded.

[00163] FIG. 9A depicts the transient current profiles obtained from the pulse sequence represented in FIG. 5B for 10 analyses, each using a different sensor strip, where 2.0 μ L of sample was introduced to the strip. Depending on the filling speed and the cap-gap volume of a specific sensor strip, 2.0 μ L of sample may or may not be enough to fill the strip.

[00164] In FIG. 9B the transient current profiles of FIG. 9A were converted to contour profiles of decay rate as a function of time. In one aspect, the decay rate may be represented as a K constant determined by either of the following equations:

$$K_1 = \frac{\ln(i_{0.125}) - \ln(i_{1.0})}{\ln(t_{0.125}) - \ln(t_{1.0})}$$

$$K_2 = \frac{\ln(i_{0.5}) - \ln(i_{1.0})}{\ln(t_{0.5}) - \ln(t_{1.0})}$$

where the 0.125, 0.5, and 1.0 values are in seconds. Thus, using the K constant of a decay process, the current profiles of FIG. 9A may be converted into the decay constant profiles of FIG. 9B.

[00165] FIG. 9B establishes that a substantial difference exists between the decay profiles of the under-filled sensors and the normal-filled sensors, especially in the time range of 3 to 7 seconds. Under-fill may be determined from the decay constant profiles by comparing the difference between the actual decay constant and a previously selected value. For example, if -0.1 is selected as the upper limit for a normal-filled sensor with regard to FIG. 9B, any K_1 constant having a value lower than -0.1 determined from excitations during the 3 to 5 second time period may be considered normal-filled. Similarly, any sensor having a K_1 value higher than -0.1 may be considered under-filled. In this manner, the under-fill may be determined in response to a decay rate obtained from a transient current profile.

[00166] Thus, in FIG. 9B the sensor strips represented by series 3 and 8 were sufficiently filled, while the eight sensor strips represented by series 1-2, 4-7, and 9-10 were under-filled. In this manner, the gated amperometric pulse sequences of the present invention allowed for under-fill detection in a two-electrode sensor strip, a function typically requiring a third electrode for conventional sensor systems. Furthermore, the under-fill determination was made in less than ten seconds, providing time for the measuring device to signal the user, such as by sending a signal to a light emitting device or a display, to add more sample to the strip.

[00167] Because under-fill may be determined from the transient current profiles, the same current values used to determine the presence and/or concentration of the analyte may be used to determine if an under-fill condition exists. Thus, under-fill may be determined during the multiple duty cycles of the pulse sequence without lengthening the duration of the electrochemical analysis beyond that required for concentration determination.

[00168] The combination of the transient current profile of each excitation and the resulting contour profile also may be used to determine if a change in the temperature of the sample may adversely affect the analysis. Conventional sensor systems include a thermistor in the measuring device or on the strip to provide the temperature of the device or strip, respectively. While this temperature is an approximation of the sample temperature, typically, the device or strip is at a different temperature than the sample. The temperature difference between the device or strip and the sample may introduce bias into the analysis.

[00169] By determining a decay rate, such as with a K constant as previously discussed, the temperature of the sample may be determined. FIG. 10 depicts K constants plotted as a function of temperature that were obtained from the fifth excitation of a pulse sequence for glucose concentrations of 50, 100, and 400 mg/dL. The plots establish that the decay rate increased in absolute value with increasing temperature. While not wishing to be bound by any particular theory, this phenomenon may be attributed to lower temperatures slowing down the diffusion rate of the various constituents present in the cap-gap. In this manner, the temperature of a sample may be determined in response to a decay rate obtained from a transient current profile.

[00170] Because sample temperature may be determined from the transient current profiles, the same current values used to determine the presence and/or concentration of the analyte may be used to determine the temperature of the sample. Thus, the temperature of the sample may be determined during the multiple duty cycles of the pulse sequence without

lengthening the duration of the electrochemical analysis beyond that required for concentration determination.

[00171] In one aspect, the temperature of the sample may be determined by solving for K by the following equation:

$$K = \frac{\ln i_{0.125} - \ln i_{0.375}}{\ln(0.125) - \ln(0.375)}$$

where $i_{0.125}$ and $i_{0.375}$ are the currents at 0.125 and 0.375 seconds from the excitation most sensitive to temperature change, such as the excitation generating the most sensitive current decay with respect to the temperature change. $\ln(0.125)$ and $\ln(0.375)$ are the natural logarithmic terms of the times at 0.125 and 0.375 seconds, respectively. From the plot of these K constants verses temperature, as depicted in FIG. 10, the temperature of the sample may be determined by the correlation function of the plot. The correlation function may be a polynomial fit of the curve. The temperature determined from this plot may be different from the temperature of the device and may more accurately reflect the temperature of the sample.

[00172] An advantage of determining the temperature of the sample, as opposed to the device, is that the length of the analysis may be adjusted to allow sufficient time for the rehydration of a DBL to reach equilibrium, thus increasing the accuracy of the analysis. For example, if the temperature of the sample determined during the pulse sequence is at least 5 or 10° C below ambient temperature, the pulse sequence may be lengthened, such as with additional duty cycles.

[00173] FIG. 11 is a schematic representation of a measuring device 1100 including contacts 1120 in electrical communication with electrical circuitry 1110 and a display 1130. In one aspect, the measuring device 1100 is portable and is adapted to be handheld and to receive a sensor strip, such as the strip 100 from FIG. 1A. In another aspect, the measuring device 1100 is a handheld measuring device adapted to receive a sensor strip and implement gated amperometric pulse sequences.

[00174] The contacts 1120 are adapted to provide electrical communication with the electrical circuitry 1110 and the contacts of a sensor strip, such as the contacts 170 and 180 of the sensor strip 100 depicted in FIG. 1B. The electrical circuitry 1110 may include an electric charger 1150, a processor 1140, and a computer readable storage medium 1145. The electrical charger 1150 may be a potentiostat, signal generator, or the like. Thus, the charger 1150 may apply a voltage to the contacts 1120 while recording the resulting current to function as a charger-recorder.

[00175] The processor 1140 may be in electrical communication with the charger 1150, the computer readable storage medium 1145, and the display 1130. If the charger is not adapted to record current, the processor 1140 may be adapted to record the current at the contacts 1120.

[00176] The computer readable storage medium 1145 may be any storage medium, such as magnetic, optical, semiconductor memory, and the like. The computer readable storage medium 1145 may be a fixed memory device or a removable memory device, such as a removable memory card. The display 1130 may be analog or digital, in one aspect a LCD display adapted to displaying a numerical reading.

[00177] When the contacts of a sensor strip containing a sample are in electrical communication with the contacts 1120, the processor 1140 may direct the charger 1150 to apply a gated amperometric pulse sequence to the sample, thus starting the analysis. The processor 1140 may start the analysis in response to the insertion of a sensor strip, the application of a sample to a previously inserted sensor strip, or in response to a user input, for example.

[00178] Instructions regarding implementation of the gated amperometric pulse sequence may be provided by computer readable software code stored in the computer readable storage medium 1145. The code may be object code or any other code describing or controlling the functionality described in this application. The data that results from the gated amperometric pulse sequence may be subjected to one or more data treatments, including the determination of decay rates, K constants, slopes, intercepts, and/or sample temperature in the processor 1140 and the results, such as a corrected analyte concentration, output to the display 1130. As with the instructions regarding the pulse sequence, the data treatment may be implemented by the processor 1140 from computer readable software code stored in the computer readable storage medium 1145.

[00179] Without limiting the scope, application, or implementation, the methods and systems previously described may be implemented using the following algorithm:

[00180]	Step 1:	Turn on biosensor power
[00181]	Step 2:	Perform biosensor self-test
[00182]	Step 3:	Setup to poll for application of sample to sensor
		Set ASIC polling potential to v_{poll}
		Set ASIC threshold level to $i_{trigger}$
		Set polling periodic timer to expire at int_{poll}

- [00183] Step 4: Setup for assaying the sensor current
 Wait for polling periodic timer to expire
 Enable ASIC charge pump
 Enable ASIC threshold detector (i_{trigger})
 Enable polling potential (v_{poll})
 Select sensor channel which applies potential to sensor
 Wait for settling time t_{poll}
- [00184] Step 5: Test if the sensor current exceeds the threshold
- [00185] Step 6: Delay and test sensor current again
- [00186] Step 7: Upon detection of Sample Application
 start counting time
 launch pulse sequence
- [00187] Step 8: Pulse 1 – Measure sensor currents $i_{1,1}$ and $i_{1,8}$
 Pulse 1 starts at time t_{p1}
 Set Pulse 1 duration to d_{p1}
 Set Pulse 1 sensor potential to v_{p1}
 Select sensor channel to apply potential to sensor
 At time $t_{1,1}$, measure sensor signal, save value as AD_{S11}
 At time $t_{1,8}$, measure sensor signal, save value as AD_{S18}
- [00188] Step 9: Delay 1 – Re-standardize electronics
 Delay 1 starts at end of AD_2 reading, disconnect sensor channel
 Delay 1 ends at beginning of Pulse 2
 Set potential to $V_{\text{standardize}}$
 At time t_{c1} , select reference resistor channel then measure signal, save value as AD_{R1}
 At time t_{c2} , select offset channel then measure signal, save value as AD_{O1}
 Note: sensor currents starting at Pulse 1 are calculated from the AD_{R1} and AD_{O1} measurements
- [00189] Step 10: Pulse 2 - Measure sensor currents $i_{2,1}$ and $i_{2,8}$
 Pulse 2 starts at time t_{p2}
 Set Pulse 2 duration to d_{p2}

- Set Pulse 2 sensor potential to v_{p2}
 Select sensor channel to apply potential to sensor
 At time $t_{2,1}$, measure sensor signal, save value as AD_{S21}
 At time $t_{2,8}$, measure sensor signal, save value as AD_{S28}
- [00190] Step 11: Delay 2 –
 Delay 2 starts at end of AD_{S3} reading, disconnect sensor channel
 Delay 2 ends at beginning of Pulse 3
 Select offset channel to disconnect sensor
- [00191] Step 12: Pulse 3 - Measure sensor currents: $i_{3,1}$ and $i_{3,8}$
 Pulse 3 starts at time t_{p3}
 Set Pulse 3 duration to d_{p3}
 Set Pulse 3 sensor potential to v_{p3}
 Select sensor channel to apply potential to sensor
 At time $t_{3,1}$, measure sensor signal, save value as AD_{S31}
 At time $t_{3,8}$, measure sensor signal, save value as AD_{S38}
- [00192] Step 13: Delay 3 – T_1 and i_{wet}
 Delay 3 starts at end of AD_{S38} reading, disconnect sensor channel
 Delay 3 ends at beginning of Pulse 4
 Set potential to $V_{standardize}$
 At time t_{c3} , select thermistor channel then measure signal, save value as AD_{T1}
 At time t_{wet} , select offset channel then measure signal, save value as AD_{wet}
- [00193] Step 14: Pulse 4 - Measure sensor currents: $i_{4,1}$, $i_{4,4}$, and $i_{4,8}$
 Pulse 4 starts at time t_{p4}
 Set Pulse 4 duration to d_{p4}
 Set Pulse 4 sensor potential to v_{p4}
 Select sensor channel to apply potential to sensor
 At time $t_{4,1}$, measure sensor signal, save value as AD_{S41}
 At time $t_{4,4}$, measure sensor signal, save value as AD_{S44}
 At time $t_{4,8}$, measure sensor signal, save value as AD_{S48}

- [00194] Step 15: Delay 4 –
 Delay 4 starts at end of AD_{S48} reading, disconnect sensor channel
 Delay 4 ends at beginning of Pulse 5
 Select offset channel to disconnect sensor
- [00195] Step 16: Pulse 5 - Measure sensor currents: $i_{5,1}$, $i_{5,4}$, and $i_{5,8}$
 Pulse 5 starts at time t_{p5}
 Set Pulse 5 duration to d_{p5}
 Set Pulse 5 sensor potential to v_{p5}
 Select sensor channel to apply potential to sensor
 At time $t_{5,1}$, measure sensor signal, save value as AD_{S51}
 At time $t_{5,4}$ measure sensor signal, save value as AD_{S54}
 At time $t_{5,8}$, measure sensor signal, save value as AD_{S58}
 Disable ASIC analog functions
- [00196] Step 17: Look up slope and intercept for lot calibration number
 S = Slope value for current lot calibration number
 Int = Intercept value for current lot calibration number
- [00197] Step 18: Adjust slope and intercept for temperature effect
- [00198] Step 19: Calculate glucose concentration at 25°C
- [00199] Step 20: Convert to target reference (plasma vs. WB reference)
- [00200] Step 21: Check underfill
- [00201] Step 22: Check for “Abnormal Behavior”
- [00202] Step 23: If low glucose, check again for “Abnormal Behavior”
- [00203] Step 25: Check for extreme glucose levels
- [00204] Step 26: Display result
- [00205] The algorithm may have other subroutines including those to check for errors such as sample temperature and underfill conditions. The constants that may be used in the algorithm are given in Table III below. Other constants may be used.
- [00206]

Constant	Description	Value	Units
v_{poll}	polling voltage	400	mV
int_{poll}	polling interval	125	ms

Constant	Description	Value	Units
t_{poll}	polling duration	10	minutes
$i_{trigger}$	threshold detect trigger current	250	nA
t_{p1}	pulse 1 start time	0	sec
d_{p1}	pulse 1 duration	1	second
v_{p1}	pulse 1 voltage level	400	mV
$t_{1,1}$	time of sensor current reading 1	0.125	sec
$t_{1,8}$	time of sensor current reading 2	1.00	sec
t_{c1}	Offset reading time	1.125	sec
t_{c2}	Reference reading time	1.25	sec
t_{p2}	pulse 2 start time	1.5	sec
d_{p2}	pulse 2 duration	1	second
v_{p2}	pulse 2 voltage level	200	mV
$t_{2,1}$	time of sensor current reading 3	1.625	sec
$t_{2,8}$	time of sensor current reading 4	2.50	sec
t_{p3}	pulse 3 start time	3	sec
d_{p3}	pulse 3 duration	1	second
v_{p3}	pulse 3 voltage level	200	mV
$t_{3,1}$	time of sensor current reading 5	3.125	sec
$t_{3,8}$	time of sensor current reading 6	4.00	sec
t_{c3}	Thermistor reading time	4.125	sec
t_{wet}	Time of wet sensor current reading	4.25	sec
t_{p4}	pulse 4 start time	4.5	second
d_{p4}	pulse 4 duration	1	second
v_{p4}	pulse 4 voltage level	200	mV
$t_{4,1}$	time of sensor current reading 7	4.625	sec
$t_{4,4}$	time of sensor current reading 8	5.00	sec
$t_{4,8}$	time of sensor current reading 9	5.50	sec
t_{p5}	pulse 5 start time	6	sec
d_{p5}	pulse 5 duration	1	second
v_{p5}	pulse 5 voltage level	200	mV
$t_{5,1}$	time of sensor current reading 10	6.125	sec

Constant	Description	Value	Units
$t_{5,4}$	time of sensor current reading 11	6.50	sec
$t_{5,8}$	time of sensor current reading 12	7.00	sec

TABLE III

[00207] While various embodiments of the invention have been described, it will be apparent to those of ordinary skill in the art that other embodiments and implementations are possible within the scope of the invention.

CLAIMS:

1. A method of determining the concentration of an analyte in a sample, comprising:
applying a pulse sequence to the sample, the pulse sequence comprising at least 3 duty cycles within 180 seconds; and
5 determining the concentration of the analyte in the sample.
2. The method of claim 1, wherein the concentration of the analyte determined from the method includes less bias attributable to mediator background than a concentration of the analyte determined from another method lacking the pulse sequence comprising at least 3 duty cycles within 180 seconds.
- 10 3. The method of claim 1, wherein the concentration of the analyte determined from the method includes less bias attributable to mediator background than a concentration of the analyte determined from the same method lacking the pulse sequence comprising at least 3 duty cycles within 180 seconds.
4. The method of claim 1, wherein the sample is a liquid comprising a
15 biological fluid.
5. The method of claim 1, wherein the analyte is glucose.
6. The method of claim 1, wherein each of the duty cycles comprises an excitation at a fixed potential and a relaxation.
7. The method of claim 6, wherein a current value is recorded during
20 each of the excitations.
8. The method of claim 1, wherein the pulse sequence comprises a terminal read pulse.
9. The method of claim 1, wherein the pulse sequence is applied to a sensor strip including a diffusion barrier layer on a working electrode.
- 25 10. The method of claim 1, further comprising measuring resulting currents and determining a plurality of calibration points from the currents.
11. The method of claim 10, wherein the duration of the pulse sequence is determined from the plurality of calibration points.
12. The method of claim 10, wherein the determining of the analyte
30 concentration includes a signal averaging including the plurality of calibration points.
13. The method of claim 1, further comprising determining if a sensor strip containing the sample is under-filled with the sample.

14. The method of claim 13, wherein the determining if a sensor strip containing the sample is under-filled includes determining a decay rate.

15. The method of claim 1, further comprising determining the temperature of the sample contained by a sensor strip.

5 16. The method of claim 15, wherein the determining of the temperature of the sample contained by a sensor strip includes determining a decay rate.

17. A handheld analyte measuring device, for determining the concentration of an analyte in a sample, comprising a gated amperometric measuring device adapted to receive a sensor strip, wherein

10 the gated amperometric measuring device comprises at least two device contacts in electrical communication with a display through electrical circuitry, and

the sensor strip comprises at least first and second sensor strip contacts, the first sensor strip contact in electrical communication with a working electrode and the second sensor strip contact in electrical communication with a counter electrode through conductors, where

15 wherein a first reagent layer is on at least one of the electrodes, the first reagent layer comprises an oxidoreductase and at least one species of a redox pair.

18. A method of determining the concentration of an analyte in a sample, comprising the acts:

20 applying a pulse sequence to the sample, the pulse sequence comprising at least 3 duty cycles within 180 seconds;

measuring the resulting currents;

applying a data treatment to the measured currents; and

determining the concentration of the analyte in the sample.

25 19. A handheld measuring device, for determining the concentration of an analyte in a sample, the device being adapted to receive a sensor strip, the device comprising:

contacts;

at least one display; and

30 electronic circuitry establishing electrical communication between the contacts and the display, the circuitry comprising an electric charger and a processor in electrical communication, the processor in electrical communication with a computer readable storage medium comprising computer readable software code, which when

executed by the processor, causes the charger to implement a pulse sequence comprising at least 3 duty cycles within 180 seconds between the contacts.

20. A method of reducing the bias attributable to mediator background in a determined concentration of an analyte in a sample, the method comprising the acts of:
5 of:

applying a pulse sequence to the sample, the pulse sequence comprising at least 3 duty cycles within 180 seconds.

21. A method of determining the duration of a pulse sequence including at least 3 duty cycles within 180 seconds, for determining the concentration of an
10 analyte in a sample, the method comprising the acts of:

determining a plurality of calibration points determined from currents recorded during the at least 3 duty cycles; and

determining the duration of the pulse sequence in response to the determined concentration of the analyte in the sample.

22. A method of signaling a user to add additional sample to a sensor strip,
15 the method comprising the acts of:

determining if the sensor strip is under-filled by determining a decay constant from currents recorded during at least two excitations of a pulse sequence including at least 3 duty cycles within 180 seconds; and

20 signaling the user to add additional sample to the sensor strip if the strip is under-filled.

23. A method of determining the temperature of a sample contained by a sensor strip, the method comprising the acts of:

determining a decay constant from currents recorded during at least two
25 excitations of a pulse sequence including at least 3 duty cycles within 180 seconds; and

correlating the decay constant with a temperature value.

24. A method of determining the concentration of an analyte, the method comprising the acts of:

30 applying a pulse sequence to a sample of a biological fluid during a time period equal to or less than 180 seconds, the pulse sequence having at least three duty cycles, the duty cycle having an excitation at a substantially constant voltage, the duty cycle having a relaxation;

measuring at least one current profile; and
determining the concentration of the analyte in the sample in response to the at
least one current profile.

25. The method of claim 24, wherein the excitation is less than 5 seconds.

5 26. The method of claim 24, wherein the relaxation is responsive to an
open circuit.

27. The method of claim 24, wherein the relaxation is at least 0.5 seconds.

28. The method of claim 24, wherein the current profile is a transient
current profile.

10 29. The method of claim 24, wherein the current during a relaxation is
zero.

30. The method of claim 24, wherein the pulse sequence comprises square-
wave pulses.

31. The method of claim 24, wherein the pulse sequence has a redox
15 intensity of at least 0.01.

32. The method of claim 24, further comprising determining the
concentration of the analyte in response to a current profile when a relatively constant
diffusion rate of the measurable species is reached.

33. The method of claim 24, further comprising establishing multiple sets
20 of calibration constants in response to the at least one current profile.

34. The method of claim 33, further comprising determining the number of
duty cycles in the pulse sequence in response to the multiple sets of calibration
constants.

35. The method of claim 33, further comprising:
25 determining the concentration of the analyte in the sample in response to each
set of calibration constants; and

averaging the concentrations of the analyte from the sets of the calibration
constants.

36. The method of claim 24, further comprising determining when a sensor
30 strip is under-filled in response to the current profile.

37. The method of claim 36, further determining when a sensor strip is
under-filled when a decay rate of the current profile is less than a selected value.

38. The method of claim 37, wherein the selected value is -0.1.

39. The method of claim 24, further comprising determining a temperature of the sample in response to a decay rate of the current profile.

40. A method of determining an analyte in a biological fluid, the method comprising the acts of:

5 introducing a sample of the biological fluid to a sensor strip;

transferring at least one electron from an analyte in the sample to a mediator in the sensor strip;

applying a pulse sequence to the sample during a time period equal to or less than 180 seconds, the pulse sequence having at least three duty cycles, the duty cycle
10 having an excitation at a substantially constant voltage, the duty cycle having a relaxation;

analyzing a current responsive to the excitation of the measurable species; and determining an analyte in the sample in response to the current.

41. The method of claim 40, further comprising electrochemically exciting
15 a measurable species.

42. The method of claim 41, further comprising oxidizing the analyte in the sample.

43. The method of claim 41, further comprising reducing the analyte in the sample.

20 44. The method of claim 41, wherein the measurable species is the analyte.

45. The method of claim 41, wherein the measurable species is a mediator.

46. The method of claim 40, further comprising recording the current during the excitation as a function of time.

47. The method of claim 40, further comprising determining the presence
25 of an analyte in the sample.

48. The method of claim 40, further comprising determining the concentration of the analyte in the sample.

49. The method of claim 40, further comprising:

exciting the measurable species internal to a diffusion barrier layer; and
30 substantially excluding from excitation the measurable species external to the diffusion barrier layer.

50. A sensor strip, comprising:

a sensor base having at least two conductors under a dielectric layer, the at least two conductors being connected to at least two electrodes, at least one electrode having a diffusion barrier layer; and

a lid at least partially covering the sensor base, the lid forming a vent, the lid
5 having a concave area and an input end opening, and
wherein the sensor base and the lid form a cap-gap.

51. The sensor strip of claim 50, wherein the sensor base comprises a working electrode and a counter electrode, and wherein the working electrode has the diffusion barrier layer.

10 52. The sensor strip of claim 51, wherein the working and counter electrodes are in substantially the same plane

53. The sensor strip of claim 51, wherein the working and counter electrodes are separated by greater than 200 μm .

54. The sensor strip of claim 51, wherein the working and counter
15 electrodes are separated from an upper portion of the lid by at least 100 μm .

55. The sensor strip of claim 51, wherein the counter electrode is configured to provide a reference potential.

56. The sensor strip of claim 51, wherein the dielectric layer partially covers the working and counter electrodes.

20 57. The sensor strip of claim 51, further comprising at least one reagent layer deposited on the conductors.

58. The sensor strip of claim 57, wherein the at least one reagent layer includes a reagent.

59. The sensor strip of claim 57, wherein the at least one reagent layer
25 includes at least one of a binder and a mediator.

60. The sensor strip of claim 50, wherein the diffusion barrier layer is integral to a reagent layer.

61. The sensor strip of claim 60, wherein a combined diffusion barrier and reagent layer has an average thickness less than 30 μm .

30 62. The sensor strip of claim 50, wherein the diffusion barrier layer is distinct from a reagent layer.

63. The sensor strip of claim 62, wherein the reagent layer resides on at least one of the sensor base and lid.

64. The sensor strip of claim 62, wherein the diffusion barrier layer has an average thickness of at least 5 μm .

65. A measuring device for determining an analyte in a biological fluid, comprising:

5 at least two contacts;
 a display; and

 electrical circuitry establishing electrical communication between the at least two contacts and the display, the electrical circuitry including a processor in electrical communication with an electric charger and a computer readable storage medium,

10 wherein the processor is operable to implement a pulse sequence from the electric charger to the at least two contacts during a time period equal to or less than 180 seconds, the pulse sequence having at least three duty cycles, the duty cycle having an excitation at a substantially constant voltage, the duty cycle having a relaxation,

15 wherein the processor is operable to measure at least one current profile at the least two contacts, and

 wherein the processor is operable to determine the analyte in the biological fluid in response to the at least one current profile.

1/12

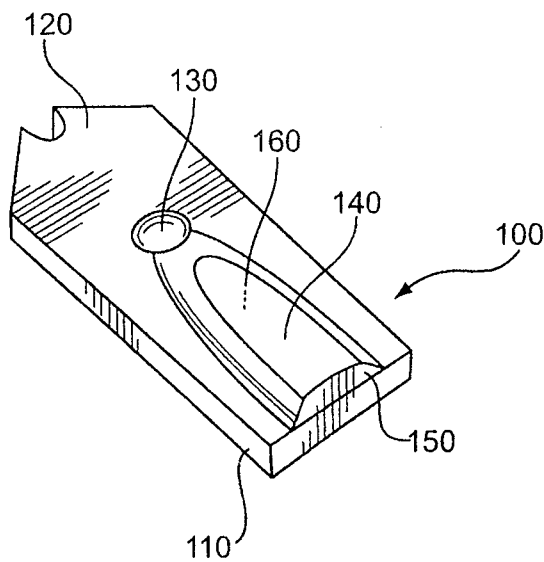


Fig. 1A

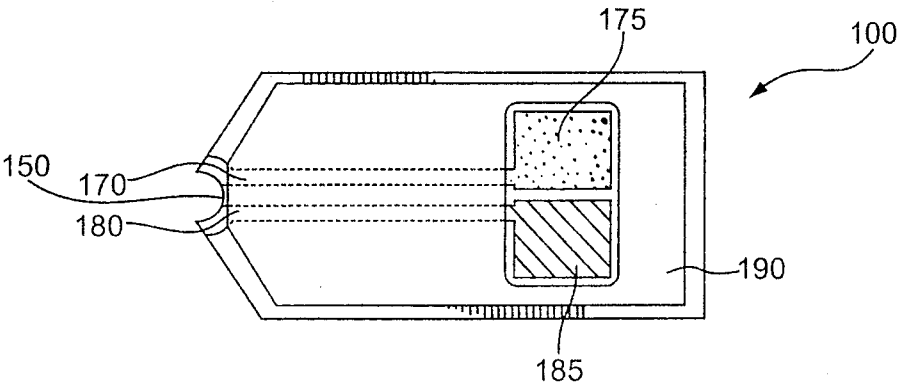


Fig. 1B

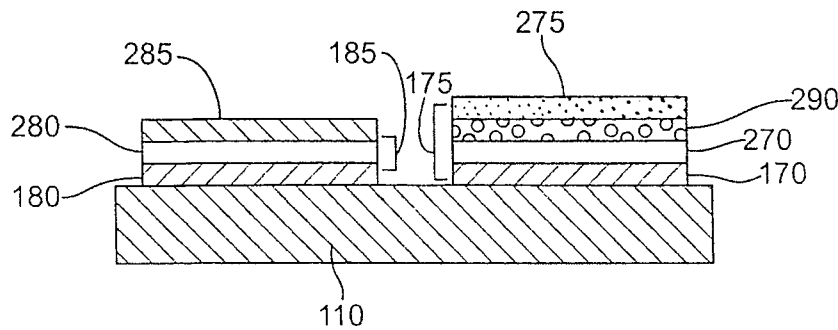


Fig. 2

2/12

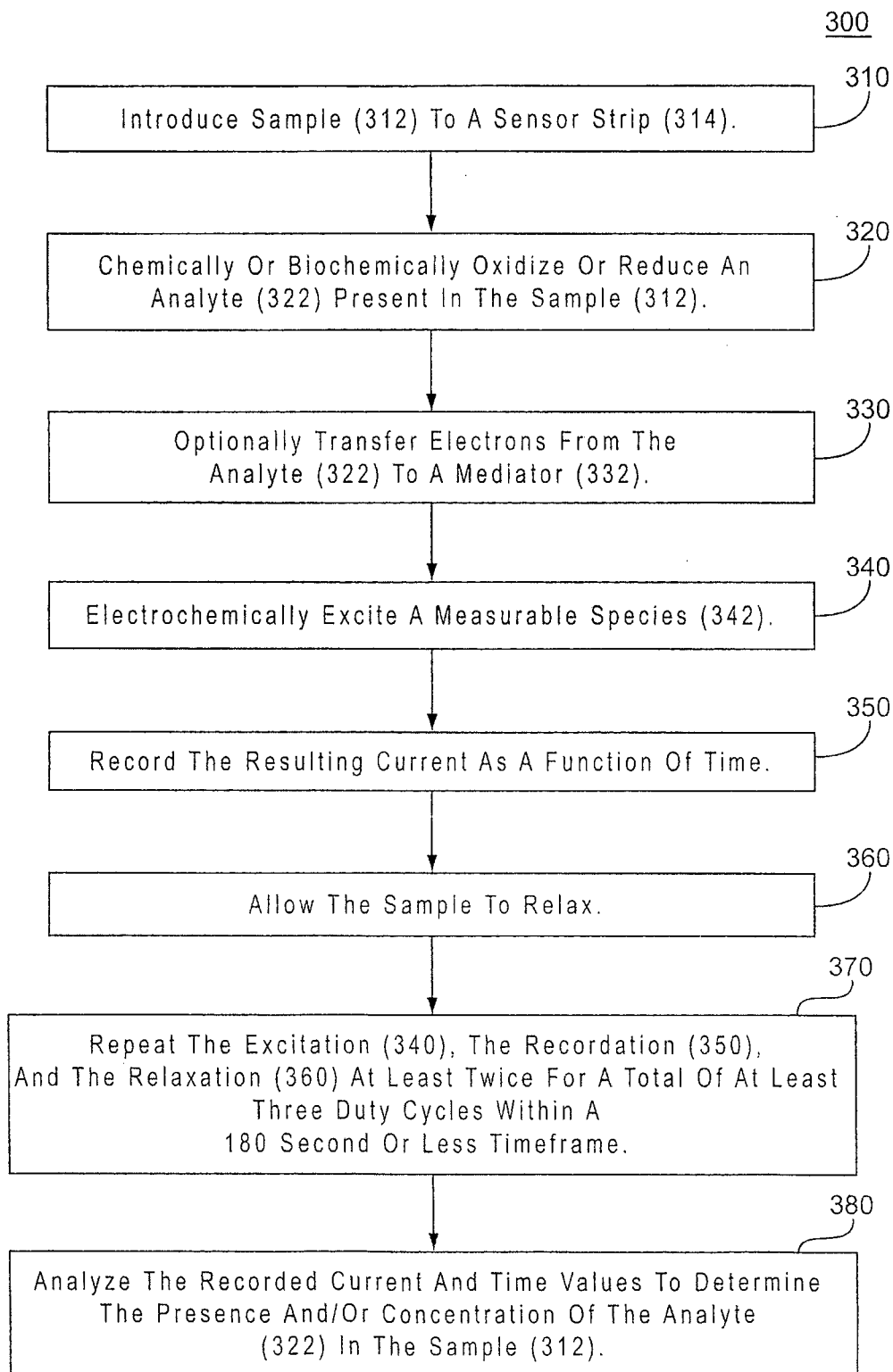


Fig.3

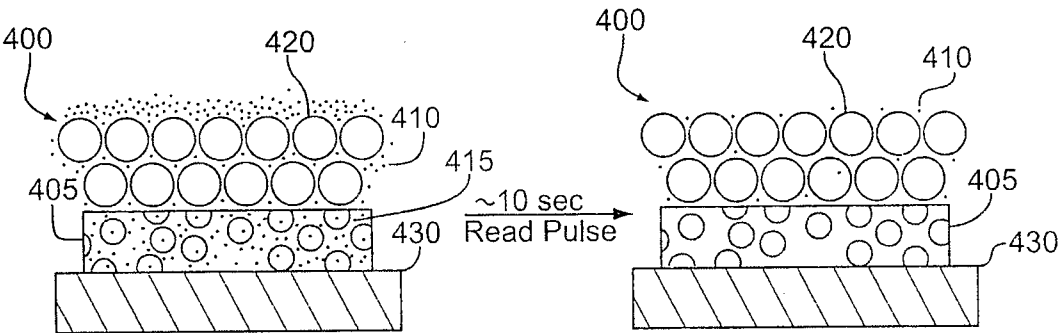


Fig.4A

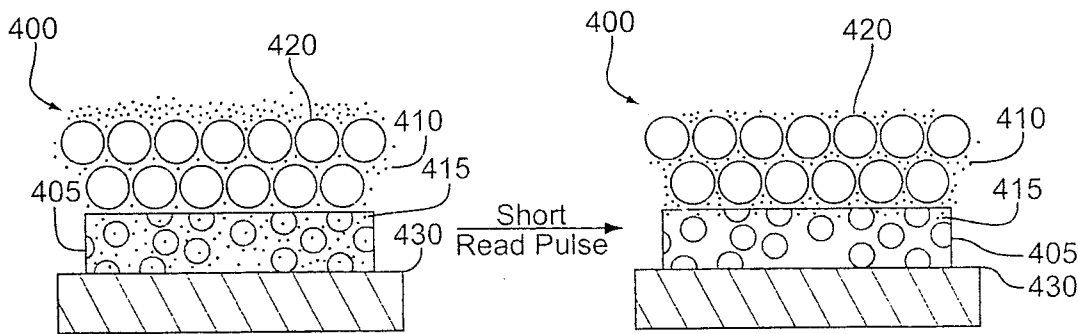
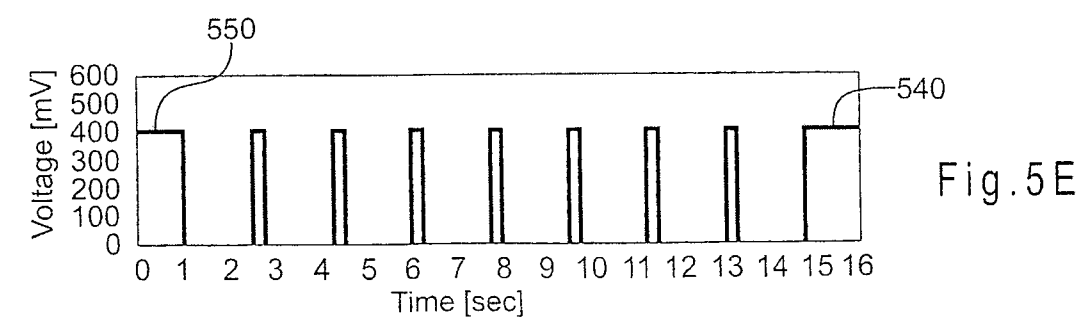
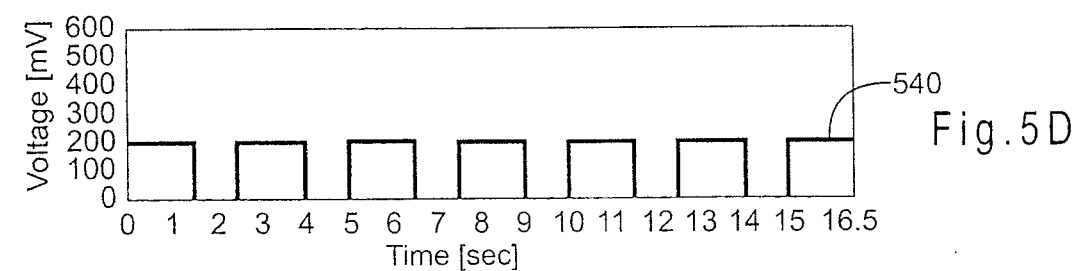
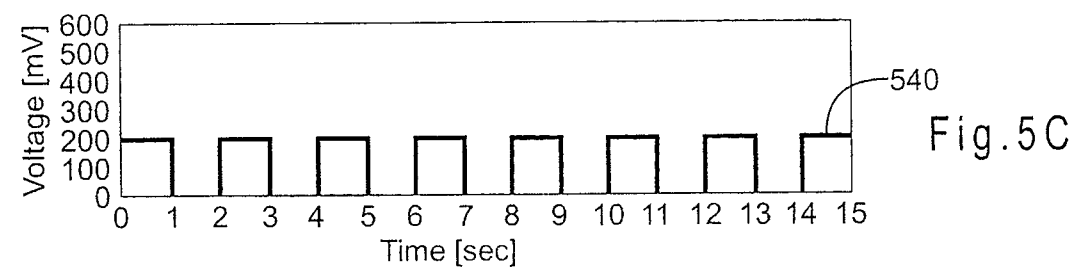
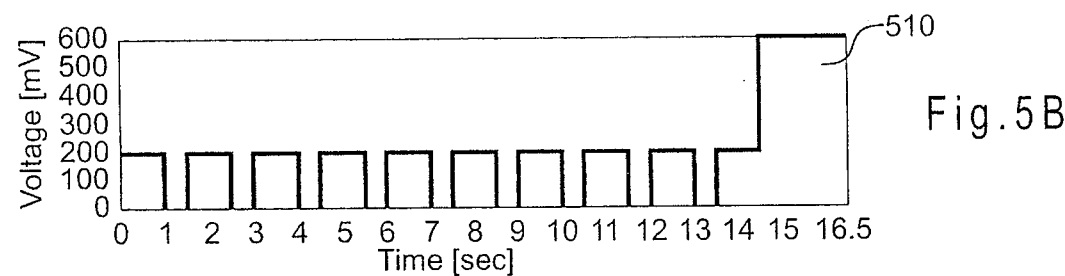
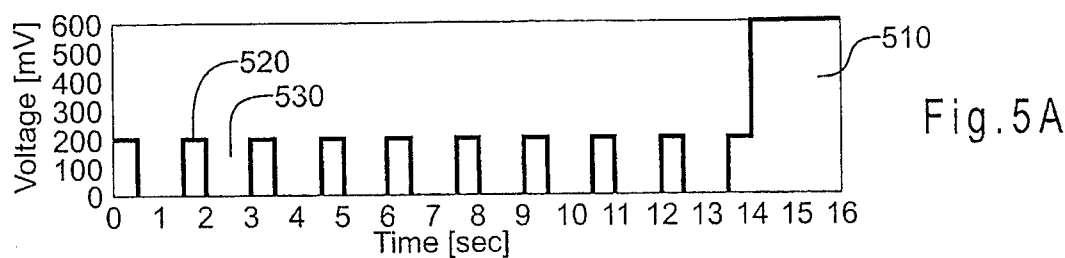


Fig.4B

4/12



5/12

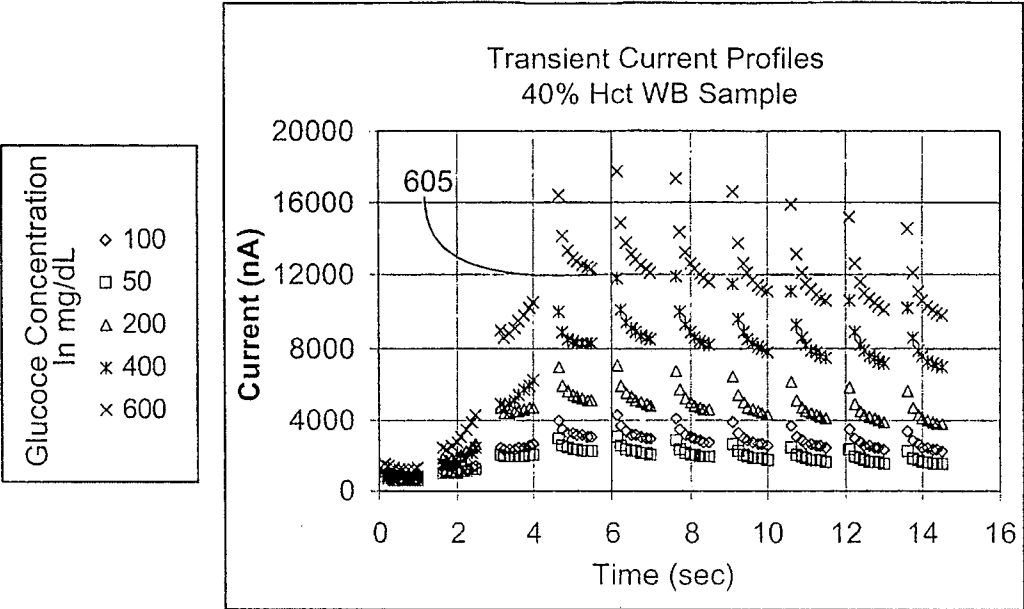


Fig.6A

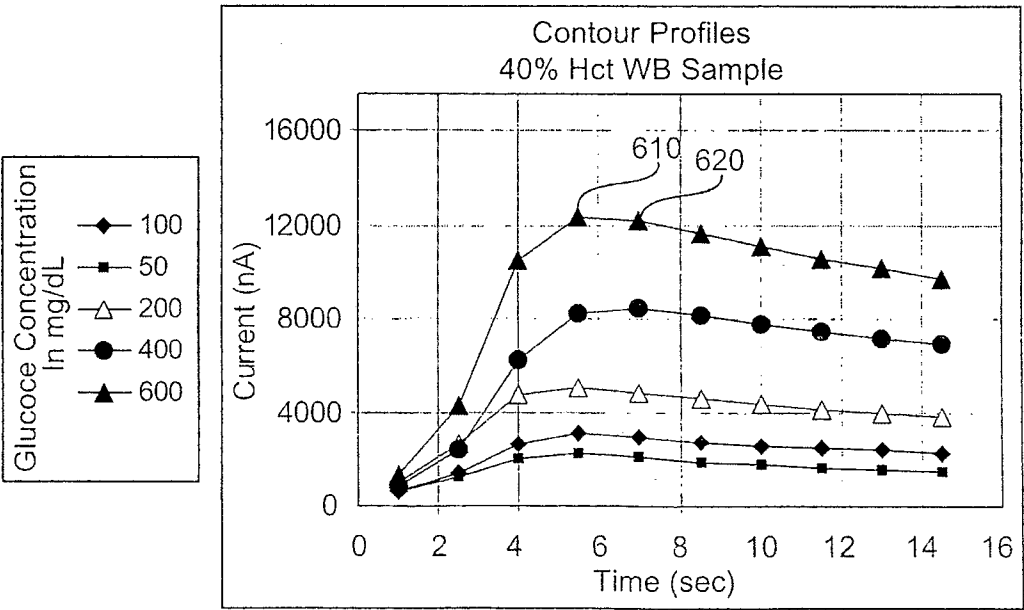


Fig.6B

6/12

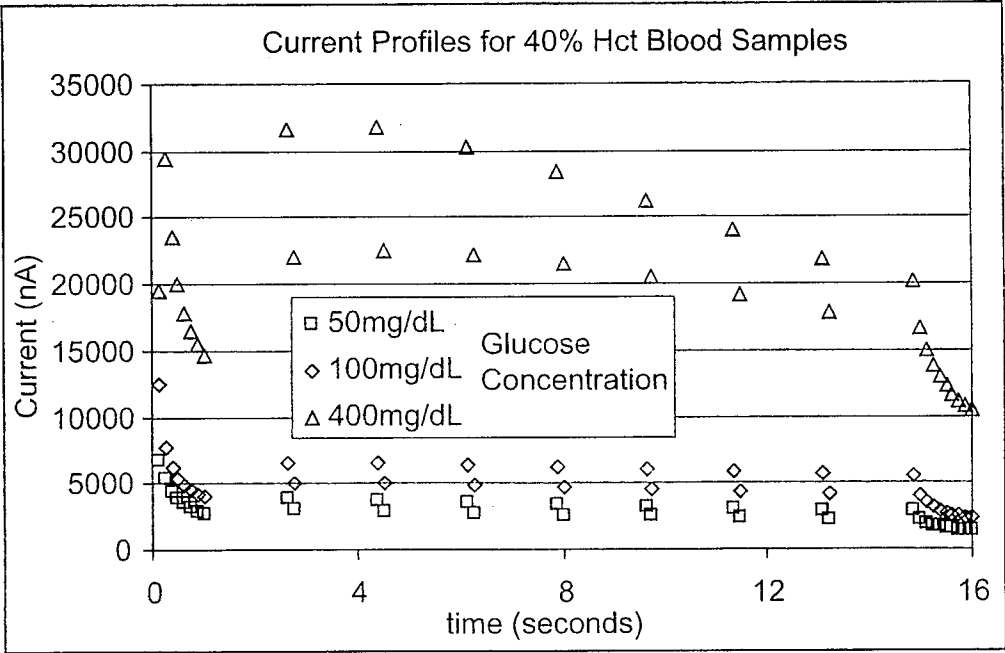


Fig.6C

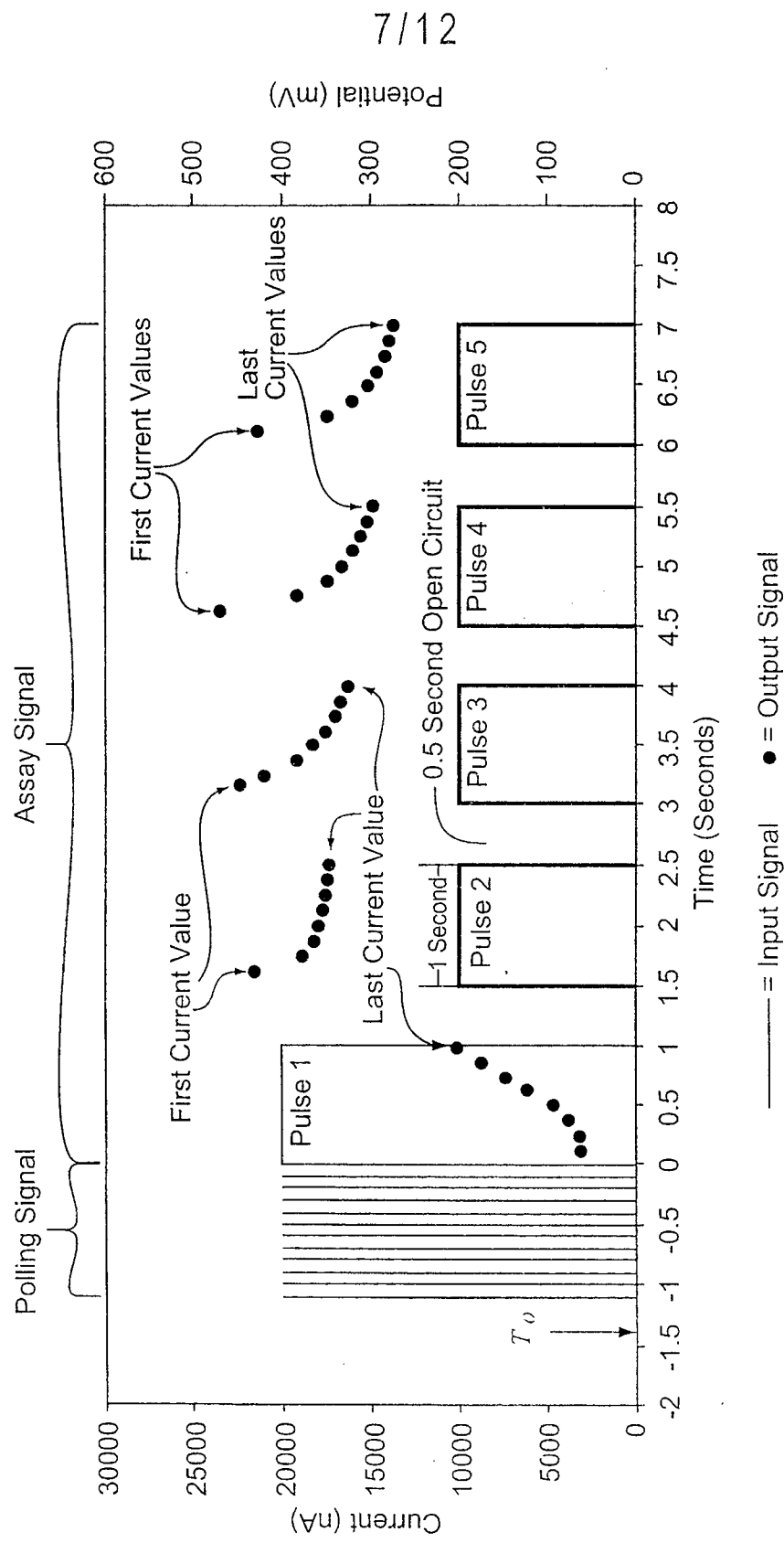


Fig.6D

8/12

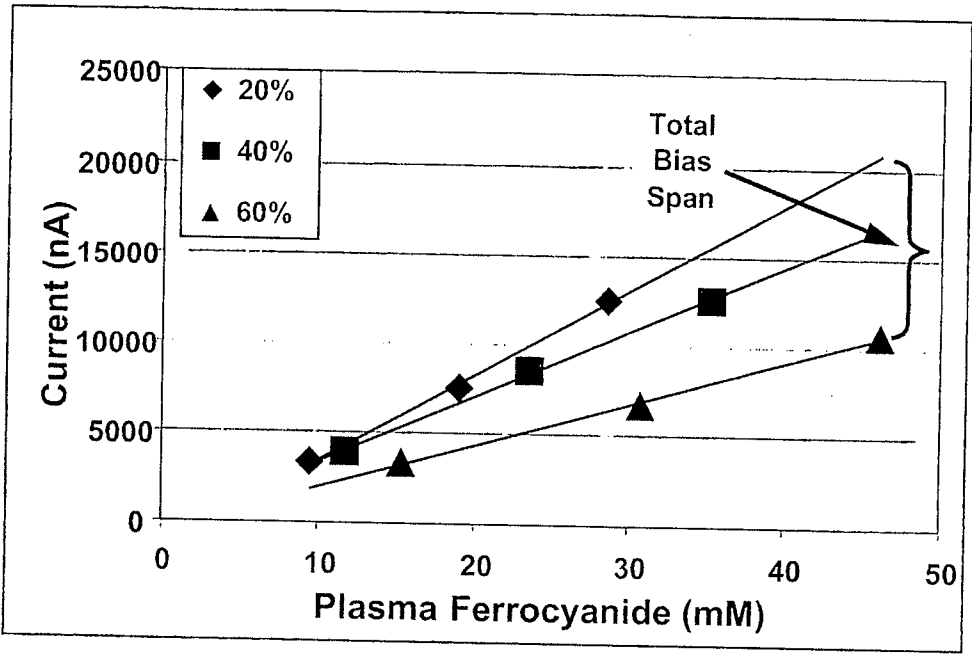


Fig.7A

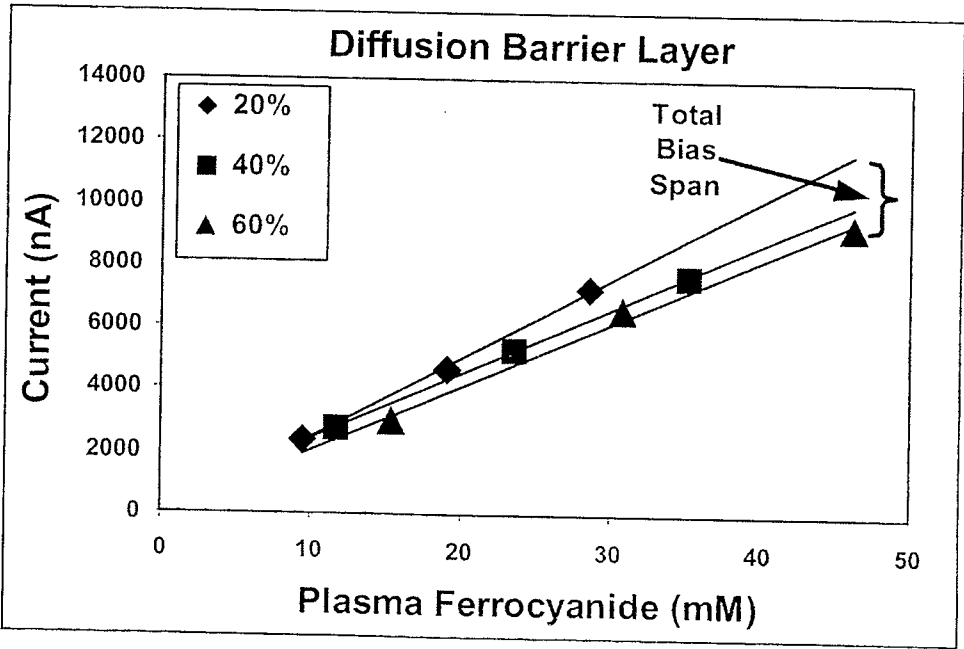


Fig.7B

9/12

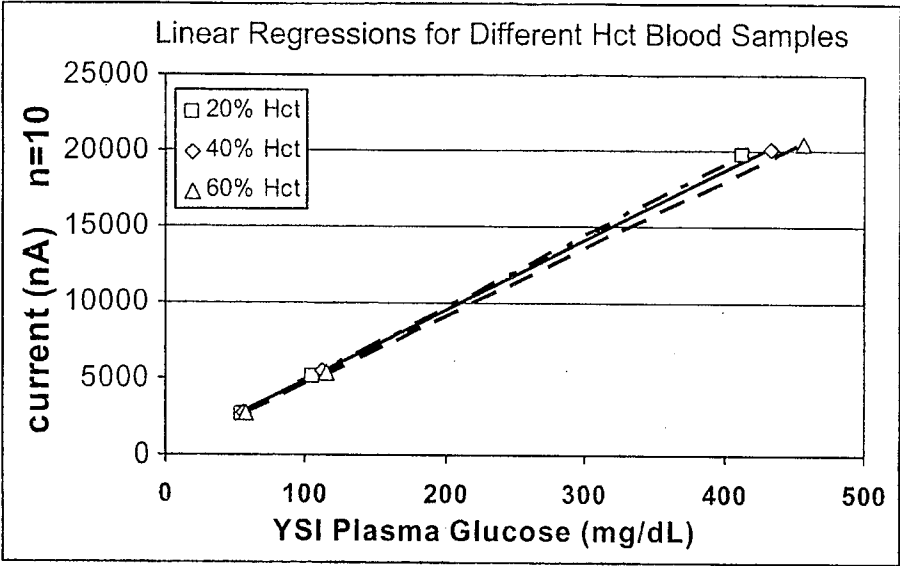


Fig.7C

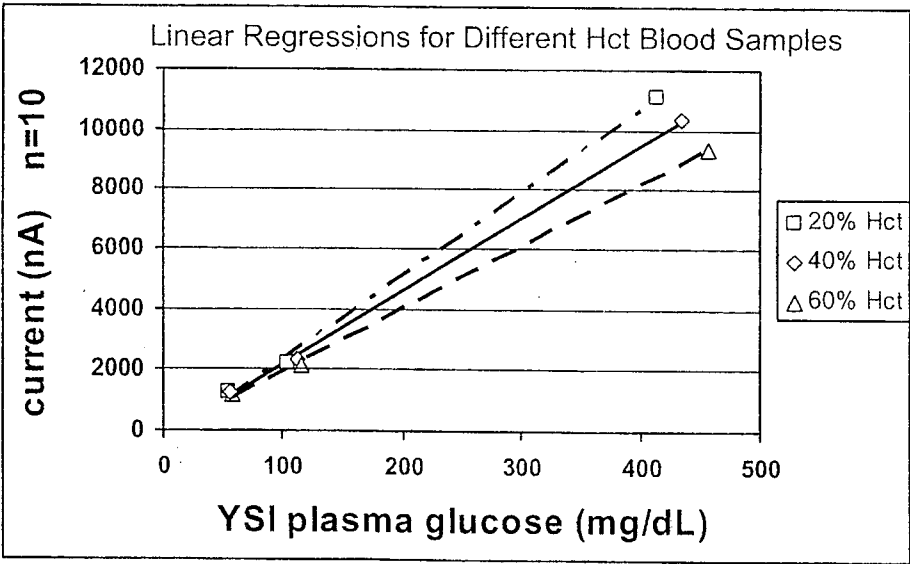


Fig.7D

10/12

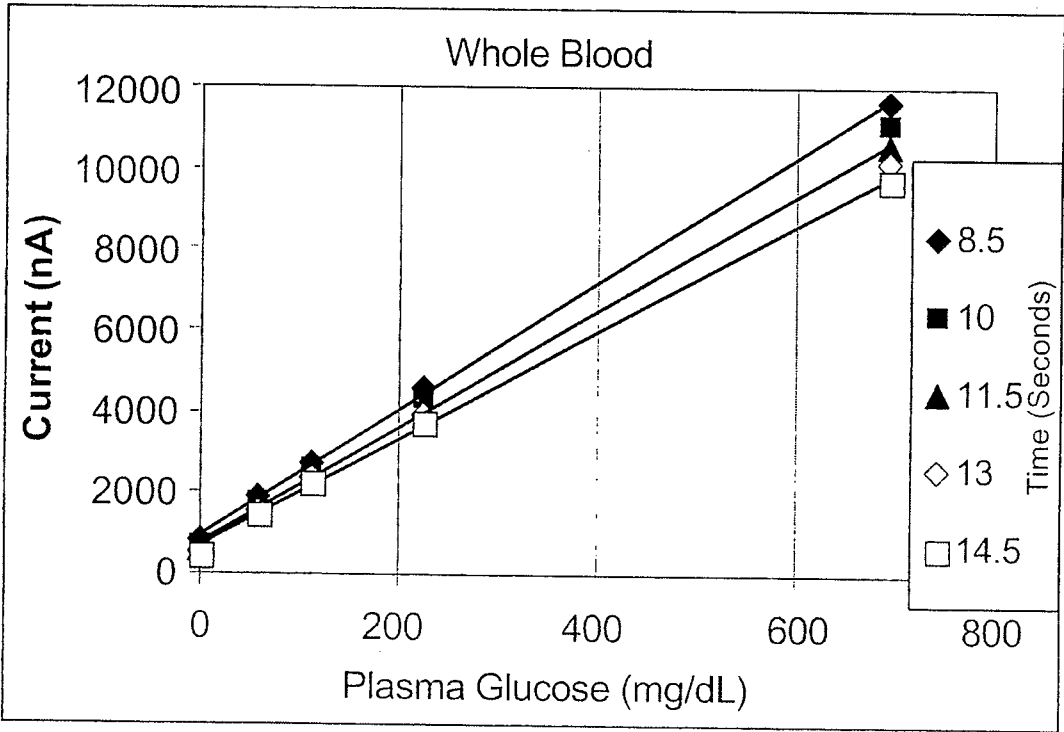
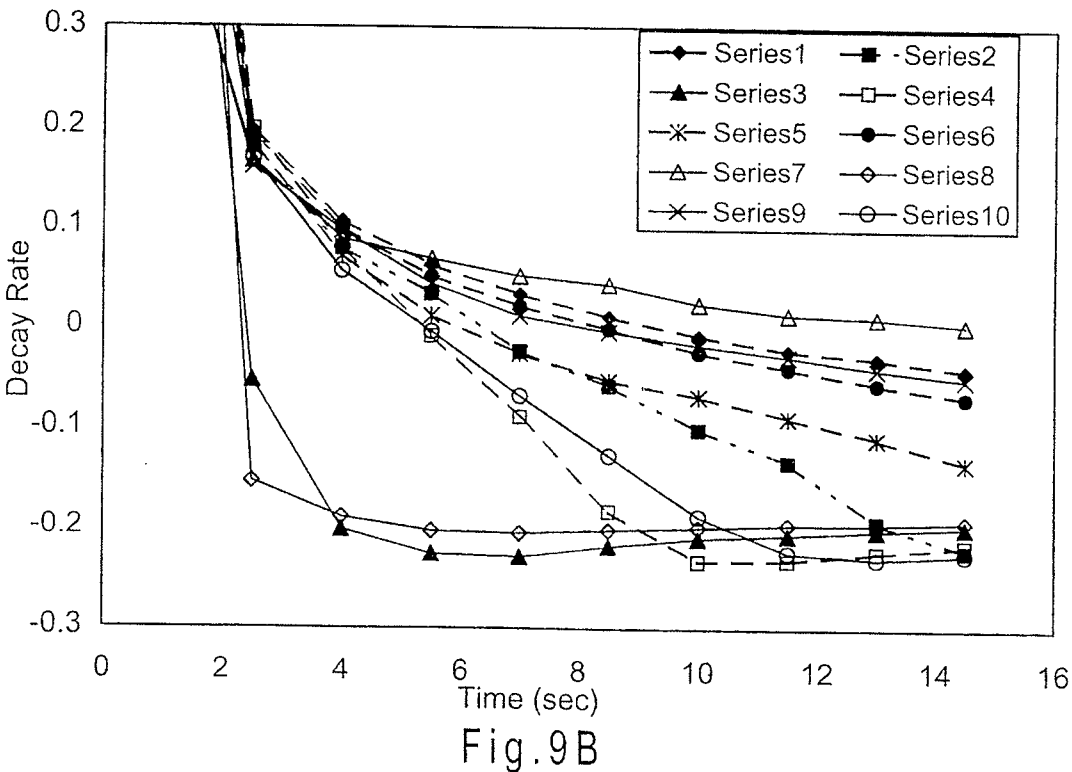
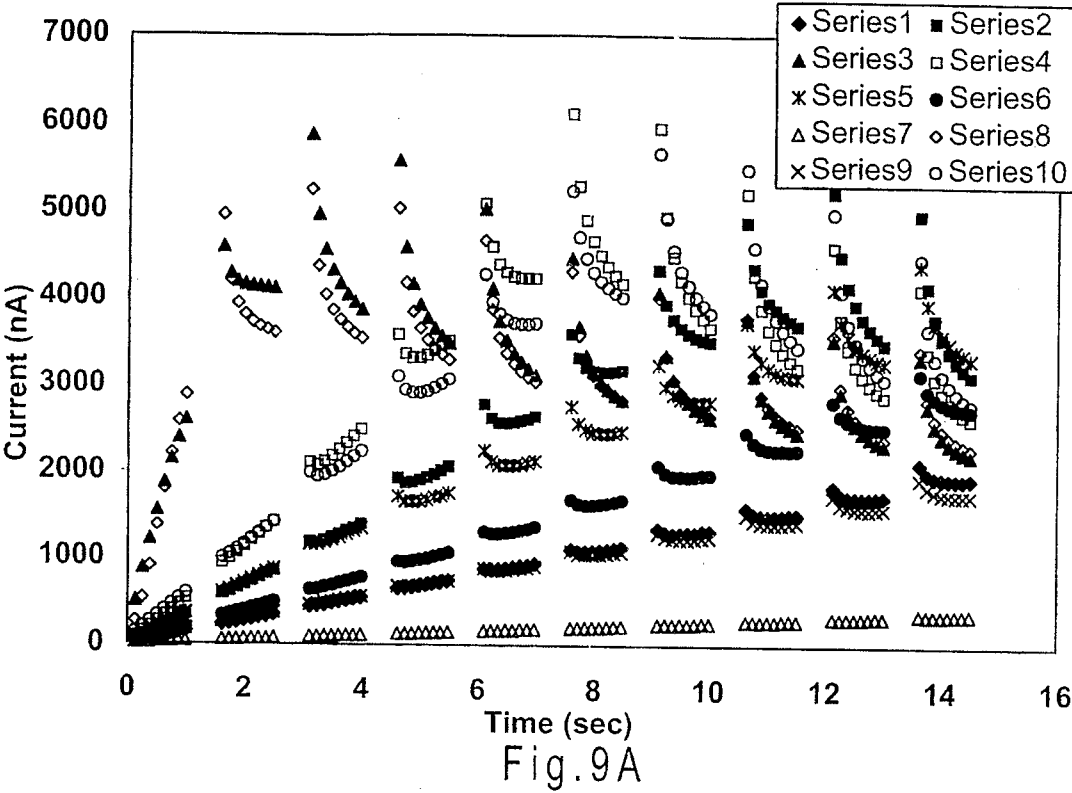


Fig.8

11/12



12/12

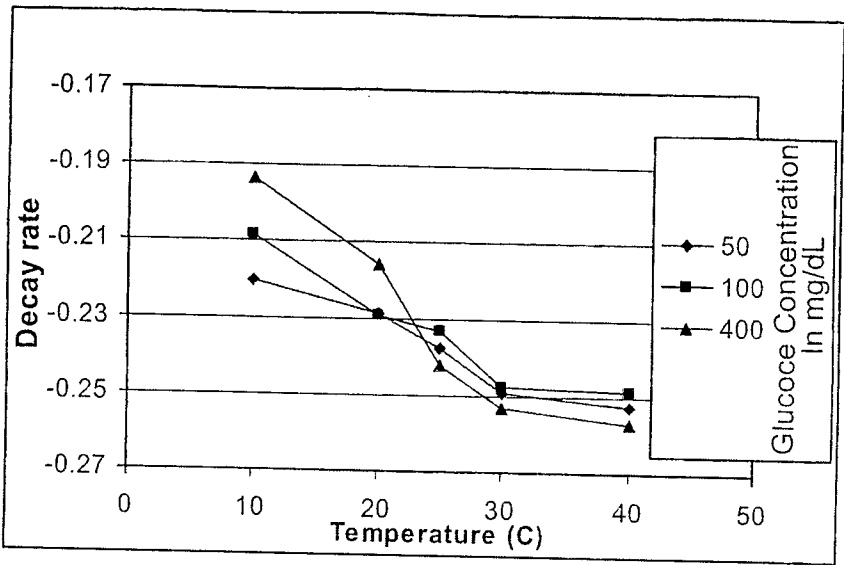


Fig.10

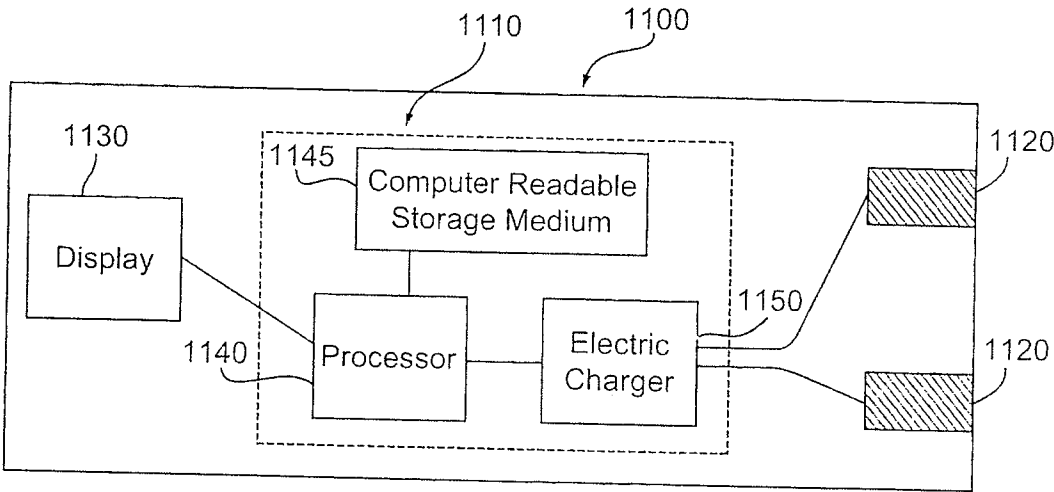


Fig.11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/028013

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N27/49 G01N33/487 C12Q1/00 A61B5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N C12Q A61B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2006/042304 A (BAYER HEALTHCARE) 20 April 2006 (2006-04-20) cited in the application paragraph [0064] - paragraph [0106] paragraph [0111] - paragraph [0120] paragraph [0130] - paragraph [0139] figures 1,2,8-10B,14A-15 ----- -/--	1-9, 18, 20, 24-32, 40-64



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 November 2006

Date of mailing of the international search report

06/12/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Johnson, Keith

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/028013

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	WO 98/58250 A2 (ELAN CORPORATION) 23 December 1998 (1998-12-23) page 18, line 2 - page 28, line 15 figures 1A,1B,4A-4C,5,7 -----	1-10,18, 20, 24-33, 35, 40-49,65 19 11-13, 17,21, 22,34, 37,50, 51,55, 57-59, 62,64
X Y A	WO 01/21827 A (ROCHE DIAGNOSTICS) 29 March 2001 (2001-03-29) page 3, line 1 - line 16 page 11, line 3 - page 14, line 29 figures 1-5,7,8,10; example 2 -----	17,65 19 1-11,18, 20-24, 26, 28-30, 32-35, 40-64
X	WO 96/14026 A (ELAN MEDICAL TECHNOLOGIES]) 17 May 1996 (1996-05-17) page 33, line 1 - page 39, line 10 figures 8-14 -----	1-10,18, 24-33, 40-49,65
X	GUNASINGHAM H ET AL: "Pulsed amperometric detection of glucose using a mediated enzyme electrode" JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY AND INTERFACIAL ELECTROCHEMISTRY, vol. 287, no. 2, 25 July 1990 (1990-07-25), pages 349-362, XP002328306 ISSN 0022-0728 the whole document -----	1-7,9, 10,12, 18,20, 24-32, 40-49,65
X	US 2004/072158 A1 (HENKENS R W ET AL) 15 April 2004 (2004-04-15) paragraph [0265] - paragraph [0278] figure 7 ----- -/--	1,4,6-8, 18, 24-32, 40-49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/028013

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 798 031 A (CHARLTON S C ET AL) 25 August 1998 (1998-08-25) cited in the application column 2, line 45 - column 4, line 35 figure 1 -----	50-61, 63

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/028013

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006042304	A	20-04-2006	NONE	
WO 9858250	A2	23-12-1998	AU 8031898 A	04-01-1999
			CA 2294610 A1	23-12-1998
			EP 0990151 A2	05-04-2000
			JP 2002505008 T	12-02-2002
			TW 380046 B	21-01-2000
WO 0121827	A	29-03-2001	AU 7590300 A	24-04-2001
			CA 2385842 A1	29-03-2001
			EP 1218532 A1	03-07-2002
			JP 3655587 B2	02-06-2005
			JP 2003510570 T	18-03-2003
WO 9614026	A	17-05-1996	AT 205686 T	15-10-2001
			AU 693279 B2	25-06-1998
			AU 3880095 A	31-05-1996
			CA 2204370 A1	17-05-1996
			DE 69522821 D1	25-10-2001
			DE 69522821 T2	11-04-2002
			EP 0789540 A1	20-08-1997
			IE 940865 A1	15-05-1996
			JP 10508518 T	25-08-1998
			NZ 295458 A	29-04-1999
			ZA 9509309 A	29-05-1996
US 2004072158	A1	15-04-2004	NONE	
US 5798031	A	25-08-1998	AT 293251 T	15-04-2005
			AU 724236 B2	14-09-2000
			AU 6482198 A	12-11-1998
			CA 2236132 A1	12-11-1998
			DE 69829707 D1	19-05-2005
			DE 69829707 T2	02-03-2006
			DK 878708 T3	11-07-2005
			EP 0878708 A1	18-11-1998
			ES 2241073 T3	16-10-2005
			JP 10318971 A	04-12-1998
			NZ 329793 A	25-11-1998
			TW 400433 B	01-08-2000

AMPEROMETRÍA REGULADA

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 60/700.787 titulada "Gated Amperometry" presentada el 20 de julio de 2005, y de la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 60/746,771 titulada "Abnormal Output Detection System for a Biosensor" presentada el 8 de mayo de 2006, las que se incorporan a la presente como referencia.

ANTECEDENTES

[002] La determinación cuantitativa de analitos en fluidos biológicos es útil en el diagnóstico y tratamiento de anomalías fisiológicas. Por ejemplo, la determinación del nivel de glucosa en fluidos biológicos, tal como sangre, es importante para los individuos diabéticos quienes deben revisar frecuentemente su nivel de glucosa en sangre para regular sus dietas y/o medicación.

[003] Para este tipo de análisis se han usado sistemas electroquímicos. Durante el análisis, el analito experimenta una reacción redox con una enzima o con especies similares para generar una corriente eléctrica que se puede medir y correlacionar con la concentración del analito. Se puede proveer un beneficio sustancial al usuario a través de la disminución del tiempo que se requiere para el análisis a la vez que se aporta la exactitud y precisión que se desean.

[004] Un ejemplo de un sistema de sensor electroquímico para el análisis de analitos en fluidos biológicos incluye un dispositivo de medición y una tira sensora. La tira sensora incluye reactivos con los que reaccionar y transferir electrones desde el analito durante el análisis y electrodos para pasar los electrones a través de conductores que conectan la tira con el dispositivo.

El dispositivo de medición incluye contactos para recibir los electrones desde la tira y la habilidad para aplicar una diferencia de tensión entre los contactos. El dispositivo puede registrar la corriente que pasa a través del sensor y traducir los valores de corriente en una medida del contenido de analito de la muestra. Estos sistemas de sensores pueden analizar una gota individual de sangre completa (WB), como por ejemplo de 1-15 microlitros (μl) de volumen.

[005] Entre los ejemplos de dispositivos de medida de mesada se incluye al Analizador BAS 100B disponible de BAS Instruments en West Lafayette, Indiana; el Analizador Instrumental CH disponible de CH Instruments en Austin, Texas; la Estación de Trabajo Electroquímica Cypress disponible de Cypress Systems en Lawrence, Kansas; y el Instrumento Electroquímico EG&G disponible de Princeton Research Instruments en Princeton, Nueva Jersey. Entre los ejemplos de dispositivos de medida portátiles se incluye a los medidores Ascensia Breeze® y Elite® de Bayer Corporation.

[006] La tira sensora puede incluir un electrodo de trabajo donde el analito experimenta la reacción electroquímica y un electrodo contador donde ocurre la reacción electroquímica opuesta, permitiendo de esa manera que la corriente fluya entre los electrodos. De esa manera, si ocurre oxidación en el electrodo de trabajo, ocurre reducción en el electrodo contador. Véase, por ejemplo, *Fundamentals Of Analytical Chemistry*, 4^o Edición, D.A. Skoog y D.M. West; Philadelphia: Saunders College Publishing (1982), pp 304-341.

[007] La tira sensora también puede incluir un electrodo de referencia verdadero para proveer un potencial de referencia no variante al dispositivo de medición. A pesar de que se conocen múltiples materiales para electrodos de referencia, es típica una mezcla de plata (Ag) y cloruro de plata (AgCl) debido a

la insolubilidad de la mezcla en el entorno acuoso de la solución de análisis. Un electrodo de referencia también se puede usar como electrodo contador. Una tira sensora con dicha combinación de electrodo de referencia-contador se describe en la Patente de los EE.UU. No. 5.820.551.

[008] La tira sensora puede estar hecha de electrodos impresos sobre un sustrato aislante usando diferentes técnicas, como por ejemplo las que se describen en la Patentes de los EE.UU. Nos. 6.531.040; 5.798.031; y 5.120.420. Se pueden formar una o más capas de reactivo por medio de recubrimiento de uno o más de los electrodos, como por ejemplo el electrodo de trabajo y/o el contador. En un aspecto, más de uno de los electrodos puede recubrirse con la misma capa de reactivo, tal como cuando los electrodos de trabajo y contador se recubren con la misma composición. En otro punto de vista, se pueden imprimir o micro-depositar capas de reactivo con diferentes composiciones sobre los electrodos de trabajo y contador usando el método que se describe en una solicitud de patente provisional de los EE.UU. presentada el 24 de octubre de 2003, Nro de Acta 60/513.817. De esa manera, la capa de reactivo sobre el electrodo de trabajo puede contener la enzima, el intermediario, y un aglutinante, mientras que la capa de reactivo sobre el electrodo contador contiene una especie redox soluble, que podría ser la misma que el intermediario o diferente, y un aglutinante.

[009] La capa de reactivo puede incluir un agente ionizante para facilitar la oxidación o reducción del analito, así como cualquier intermediario u otra sustancia que asista en la transferencia de electrones entre el analito y el conductor. El agente ionizante puede ser una enzima específica de analito, como por ejemplo glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa, para catalizar la

oxidación de glucosa en una muestra de WB. La capa de reactivo también puede incluir un aglutinante que soporte a la enzima y al intermediario, juntos. La Tabla I, más adelante, provee combinaciones convencionales de enzimas e intermediarios para usar con analitos específicos.

Analito	Enzima	Mediador
Glucosa	Glucosa Oxidasa	Ferricianuro
Glucosa	Glucosa Deshidrogenasa	Ferricianuro
Colesterol	Colesterol Oxidasa	Ferricianuro
Lactato	Lactato Oxidasa	Ferricianuro
Ácido Úrico	Uricasa	Ferricianuro
Alcohol	Alcohol Oxidasa	Fenilendiamina

Tabla I

[0010] El aglutinante puede incluir diferentes tipos y pesos moleculares de polímeros, como por ejemplo CMC (carboxi metil celulosa) y/o PEO (óxido de polietileno). Además de aglutinar los reactivos, el aglutinante puede asistir en el filtrado de las células rojas sanguíneas, previniendo que recubran la superficie del electrodo.

[0011] Entre los ejemplos de sistemas de sensores electroquímicos convencionales para el análisis de analitos en fluidos biológicos se incluye a los biosensores Precision® disponibles de Abbott en Abbott Park, Illinois; biosensores Accucheck® disponibles de Roche en Indianapolis, Indiana; y biosensores OneTouch Ultra® disponibles de Lifescan en Milpitas, California.

[0012] Un método electroquímico, que se ha usado para cuantificar analitos en fluidos biológicos, es la coulombimetría. Por ejemplo, Heller et al. describió el método coulombimétrico para medidas de glucosa en sangre

completa en la Patente de los EE.UU. No. 6,120,676. En coulombimetría, la concentración del analito se cuantifica por medio de la oxidación exhaustiva del analito en un pequeño volumen e integrando la corriente durante el tiempo de oxidación para producir la carga eléctrica que representa a la concentración de analito. En otras palabras, la coulombimetría captura la cantidad total de glucosa dentro de la tira sensora.

[0013] Un aspecto importante de la coulombimetría es que hacia el final de la curva de integración de carga vs. tiempo, la velocidad a la que cambia la corriente con el tiempo se hace sustancialmente constante para dar una condición de estado estacionario. Esta porción de estado estacionario de la curva coulombimétrica forma una región de meseta relativamente plana, permitiendo de esa manera la determinación de la corriente correspondiente. Sin embargo, el método coulombimétrico requiere la conversión completa de todo el volumen de analito para alcanzar la condición de estado estacionario. Como resultado, este método consume tiempo y no provee los resultados rápidos que demandan los usuarios de dispositivos electroquímicos, como por ejemplo de los productos de monitoreo de glucosa. Otro problema con la coulombimetría es que se debe controlar el pequeño volumen de la celda sensora para proveer resultados precisos, lo que puede ser difícil con un dispositivo producido en masa.

[0014] Otro método electroquímico que se ha usado para cuantificar analitos en fluidos biológicos es la Amperometría. En Amperometría, se mide la corriente durante un pulso de lectura de potencial constante (tensión) que se aplica a través de los electrodos de trabajo y contador de la tira sensora. La corriente que se mide se usa para cuantificar el analito en la muestra. La

amperometría mide la velocidad a la cual se oxida o reduce la especie activa electroquímicamente, y por lo tanto el analito, cerca del electrodo de trabajo. Se han descrito muchas variaciones del método amperométrico para biosensores, por ejemplo en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5,620,579; 5,653,863; 6,153,069; y 6,413,411.

[0015] Una desventaja de los métodos amperométricos convencionales es la naturaleza de estado no estacionario de la corriente luego de que se aplica un potencial. La velocidad del cambio de corriente con respecto al tiempo es inicialmente muy rápida y se convierte en más lenta a medida que procede el análisis debido a la naturaleza cambiante del proceso de difusión que se está produciendo. No se puede obtener un estado estacionario de corriente hasta que la velocidad de consumo del intermediario reducido en la superficie del electrodo iguale a la velocidad de difusión. De esa manera, para los métodos de Amperometría, la medición de la corriente durante el período de transición antes de que se alcance una condición de estado estacionario se puede asociar con mayor imprecisión que una medida tomada durante un período de tiempo de estado estacionario.

[0016] El "efecto hematocrito" provee un impedimento para analizar de manera exacta la concentración de glucosa en muestras WB. Las muestras WB contienen células sanguíneas rojas (RB) y plasma. El plasma es mayormente agua, pero contiene algunas proteínas y glucosa. El hematocrito es el volumen del componente de células RB en relación al volumen total de la muestra WB y frecuentemente se expresa como un porcentaje. Las muestras de sangre completa generalmente tienen porcentajes de hematocrito que están en el rango de entre 20% y 60%, con ~40% de promedio.

[0017] En las tiras sensoras convencionales para la determinación de concentraciones de glucosa, se puede oxidar a la glucosa a través de una enzima, que luego transfiere el electrón a un intermediario. Este intermediario reducido viaja luego al electrodo de trabajo donde el mismo se oxida electroquímicamente. La cantidad de intermediario que se oxida se puede correlacionar con la corriente que fluye entre los electrodos de trabajo y contador de la tira sensora. Cuantitativamente, la corriente que se mide en el electrodo de trabajo es directamente proporcional al coeficiente de difusión del intermediario. El efecto hematocrito interfiere con este proceso debido a que las células bloquean la difusión del intermediario al electrodo de trabajo. Subsiguientemente, el efecto hematocrito influye sobre la cantidad de corriente que se mide en el electrodo de trabajo sin ninguna conexión con la cantidad de glucosa en la muestra.

[0018] Las muestras de WB que tienen concentraciones variables de células RB pueden causar inexactitudes en la medición debido a que el sensor puede no distinguir entre una concentración de intermediario baja y una concentración de intermediario más alta, donde las células RB bloquean la difusión hacia el electrodo de trabajo. Por ejemplo, cuando se analizan muestras WB que contienen niveles idénticos de glucosa, pero que tienen hematocritos de 20, 40, y 60%, se registrarán tres lecturas distintas de glucosa a través de un sistema de sensor convencional basado en una configuración de constantes de calibración (pendiente e intercepción, por ejemplo). A pesar de que las concentraciones de glucosa son las mismas, el sistema informará que la muestra de hematocrito de 20% contiene más glucosa que la muestra de

hematocrito de 60% debido a que las células RB interfieren con la difusión hacia el electrodo de trabajo.

[0019] El rango de hematocrito normal (concentración de RBC) para humanos es de entre 20% y 60%, y está centrado alrededor de 40%. La dispersión de hematocrito se refiere a la diferencia entre la concentración de glucosa de referencia que se obtiene con un instrumento de referencia, como por ejemplo el YSI 2300 STAT PLUS™ disponible de YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, y una lectura de glucosa experimental obtenida a partir de un sistema de sensor portátil para muestras que contienen diferentes niveles de hematocrito. La diferencia entre las lecturas de referencia y experimental resulta de los niveles de hematocrito variables entre muestras de sangre completa específicas.

[0020] Además del efecto hematocrito, las inexactitudes en las medidas también pueden aparecer cuando la concentración de la especie medible no se correlaciona con la concentración del analito. Por ejemplo, cuando un sistema sensor determina la concentración de un intermediario reducido que se generó en respuesta a la oxidación de un analito, cualquier intermediario reducido no generado por la oxidación del analito llevará al sistema sensor a indicar que hay más analito presente en la muestra que lo correcto debido al ruido del intermediario.

[0021] Además de los efectos de hematocrito y de ruido de intermediario, otros factores también pueden llevar a inexactitudes en la capacidad de un sistema sensor electroquímico convencional para determinar la concentración de un analito en la muestra. En un aspecto, estas inexactitudes se pueden introducir debido a que la porción de la tira sensora que contiene la muestra

puede variar en volumen de tira a tira. Las inexactitudes también se pueden introducir cuando no se provee suficiente muestra para llenar completamente el volumen debajo de la tapa, una condición denominada de sub-llenado. En otros aspectos, se pueden introducir inexactitudes en la medición a través de "ruido" al azar y cuando el sistema sensor carece de capacidad para determinar exactamente los cambios de temperatura en la muestra.

[0022] En un intento por superar una o más de estas desventajas, los sistemas sensores convencionales han probado múltiples técnicas, no solamente con respecto al diseño mecánico de la tira sensora y a la selección del reactivo, sino también con respecto a la manera en la que el dispositivo de medición aplica el potencial eléctrico a la tira. Por ejemplo, los métodos convencionales para reducir el efecto hematocrito en los sensores amperométricos incluyen el uso de filtros, como los que se discuten en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.708.247 y 5.951.836; que revierten la polaridad de la corriente aplicada, como se expone en WO 01/57510; y a través de métodos que maximizan la resistencia inherente de la muestra, como se expone en la Patente de los EE.UU. No. 5.628.890.

[0023] Se han usado múltiples métodos para aplicar el potencial eléctrico a la tira, comúnmente denominados métodos de pulsos, de secuencias, o de ciclos, para manejar las inexactitudes en la concentración del analito determinado. Por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. No. 4.897.162 el método de pulsos incluye una aplicación continua de potenciales de tensión que suben y bajan que se combinan para dar una onda de forma triangular. Más aún, WO 2004/053476 y los Documentos de Patente de los EE.UU. Nos. 2003/0178322 y 2003/0113933 describen métodos en pulso que incluyen la

aplicación continua de potenciales de tensiones crecientes y decrecientes que también cambian de polaridad.

[0024] Otros métodos convencionales combinan una configuración de electrodo específica con una secuencia de pulsos adaptada a esa configuración. Por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 5.942.102 combina la configuración de electrodo específica provista por una celda de capa delgada con un pulso continuo de manera que los productos de reacción del electrodo contador arriben al electrodo de trabajo. Esta combinación se usa para dirigir la reacción hasta que el cambio de corriente versus tiempo se haga constante, alcanzando de esa manera una condición de estado estacionario verdadera para el movimiento del intermediario entre los electrodos de trabajo y contador durante el paso de potencial. Mientras que cada uno de estos métodos compensa diferentes ventajas y desventajas, ninguno es ideal.

[0025] Como se puede ver a partir de la descripción de más adelante, hay una necesidad continua por mejorar los sistemas de sensores electroquímicos, especialmente aquellos que puedan proveer una determinación cada vez más exacta de la concentración de analito en menos tiempo. Los sistemas, dispositivos y métodos de la presente invención superan al menos una de las desventajas asociadas con los sistemas convencionales.

RESUMEN

[0026] Se provee un método para determinar la concentración de un analito en una muestra que incluye aplicar una secuencia de pulsos a la muestra, en donde la secuencia de pulsos incluye al menos 3 ciclos de trabajo en 180 segundos. Los ciclos de trabajo pueden incluir cada uno una excitación a un potencial fijo, durante el que se puede registrar una corriente, y una

relajación. La secuencia de pulsos puede incluir un pulso de lectura terminal y se puede aplicar a una tira sensora que incluya una capa de barrera de difusión (DBL) sobre un electrodo de trabajo. La concentración de analito determinada puede incluir menos dispersión atribuible al ruido del intermediario que el mismo u otro método sin la secuencia de pulsos que incluye al menos 3 ciclos de trabajo en 180 segundos. A través del uso de datos de corriente transitoria, se puede determinar la concentración del analito cuando no se alcanza una condición de estado estacionario durante las porciones de excitación de los ciclos de trabajo de la secuencia de pulsos. Se puede aplicar un tratamiento de datos a las corrientes medidas para determinar la concentración del analito en la muestra.

[0027] Se provee un dispositivo de medición de analito de mano para determinar la concentración de un analito en una muestra. El dispositivo incluye un dispositivo de medición amperométrica regulada [*gated*] adaptado para recibir una tira sensora. El dispositivo de medición amperométrica regulada incluye al menos dos contactos de dispositivo en comunicación eléctrica con una pantalla a través de un circuito eléctrico. La tira sensora incluye al menos un primer y segundo contacto de tira sensora. El primer contacto de tira sensora está en comunicación eléctrica con un electrodo de trabajo y el segundo contacto de tira sensora está en comunicación eléctrica con un electrodo contador a través de conductores. En al menos uno de los electrodos hay una primera capa de reactivo, e incluye una oxidoreductasa y al menos una especie de un par redox.

[0028] Se provee un dispositivo de medición de mano adaptado para recibir una tira sensora para determinar la concentración de un analito en una

muestra. El dispositivo incluye contactos, al menos una pantalla, y un circuito electrónico que establece una comunicación eléctrica entre los contactos y la pantalla. El circuito incluye un cargador eléctrico y un procesador, en donde el procesador está en comunicación eléctrica con un medio de almacenamiento accesible por computadora. El medio incluye un código de programa accesible por computadora, que cuando es ejecutado por el procesador, produce que el cargador implemente una secuencia de pulsos que comprende al menos 3 ciclos de trabajo en 180 segundos entre los contactos.

[0029] Se provee un método para reducir la dispersión atribuible a ruido del intermediario en una concentración determinada de un analito en una muestra, que incluye aplicar una secuencia de pulsos que incluye al menos 3 ciclos de trabajo en 180 segundos a la muestra.

[0030] Se provee un método para determinar la duración de una secuencia de pulsos que incluye al menos 3 ciclos de trabajo en 180 segundos, para determinar la concentración de un analito en una muestra que incluye determinar una pluralidad de configuraciones de constantes de calibración determinadas a partir de las corrientes registradas durante los al menos 3 ciclos de trabajo, y determinar la duración de la secuencia de pulsos en respuesta a la concentración determinada del analito en la muestra.

[0031] Se provee un método de aviso para el usuario para agregar muestra adicional a una tira sensora que incluye determinar si la tira sensora está sub-llena por medio de la determinación de una constante de decaimiento a partir de las corrientes registradas durante una secuencia de pulsos amperométricos regulados, y avisar al usuario para que agregue muestra adicional a la tira sensora si la tira está sub-llena.

[0032] Se provee un método para determinar la temperatura de una muestra contenida en una tira sensora que incluye determinar una constante de decaimiento para las corrientes registradas durante una secuencia de pulsos amperométricos regulados y correlacionar la constante de decaimiento con un valor de temperatura.

[0033] Se provee un método para determinar la duración de una secuencia de pulsos para determinar la concentración de un analito en una muestra que incluye determinar la temperatura de una muestra contenida en una tira sensora a partir de las constantes de decaimiento determinadas a partir de las corrientes registradas durante una secuencia de pulsos amperométricos regulados.

[0034] Se incluyen las siguientes definiciones para proveer un entendimiento claro y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

[0035] El término "analito" se define como una o más sustancias presentes en una muestra. El análisis determina la presencia y/o concentración del analito presente en la muestra.

[0036] El término "muestra" se define como una composición que puede contener una cantidad desconocida del analito. Típicamente, una muestra para análisis electroquímico está en forma líquida, y preferiblemente la muestra es una mezcla acuosa. Una muestra puede ser una muestra biológica, tal como sangre, orina, o saliva. Una muestra también puede ser un derivado de una muestra biológica, como por ejemplo un extracto, una dilución, un filtrado o un precipitado reconstituido.

[0037] El término “especie medible” se define como cualquier especie activa electroquímicamente que se puede oxidar o reducir bajo un potencial apropiado en el electrodo de trabajo de una tira sensora electroquímica. Entre los ejemplos de especies medibles se incluye a analitos, oxidoreductasas, e intermediarios.

[0038] El término “amperometría” se define como un método de análisis en donde se determina la concentración de un analito en una muestra midiendo electroquímicamente la velocidad de oxidación o reducción del analito a un potencial.

[0039] El término “sistema” o “sistema sensor” se define como una tira sensora en comunicación eléctrica a través de sus conductores con un dispositivo de medición, el que permite la cuantificación de un analito en una muestra.

[0040] El término “tira sensora” se define como un dispositivo que contiene la muestra durante el análisis y provee comunicación eléctrica entre la muestra y el dispositivo de medición. La porción de la tira sensora que contiene la muestra se denomina frecuentemente el “espacio debajo de la tapa”.

[0041] El término “conductor” se define como una sustancia eléctricamente conductora que permanece estacionaria durante un análisis electroquímico.

[0042] El término “dispositivo de medición” se define como uno o más dispositivos electrónicos que pueden aplicar un potencial eléctrico a los conductores de una tira sensora y medir la corriente resultante. El dispositivo de medición también puede incluir la capacidad procesadora para determinar la

presencia y/o concentración de uno o más analitos en respuesta a los valores de corriente registrados.

[0043] El término "exactitud" se define como cuan cerca está una cantidad de analito medida a través de una tira sensora a la cantidad verdadera de analito en la muestra. En un aspecto, la exactitud se puede expresar en términos de dispersión.

[0044] El término "precisión" se define como cuan cerca están múltiples medidas de analito para la misma muestra. En un aspecto, la precisión se puede expresar en términos de distribución o varianza entre múltiples medidas.

[0045] El término "reacción redox" se define como una reacción química entre dos especies que involucra la transferencia de al menos un electrón de una primera especie a una segunda especie. De esta manera, una reacción redox incluye una oxidación y una reducción. La hemi-celda de oxidación de la reacción involucra la pérdida de al menos un electrón por parte de la primera especie, mientras que la hemi-celda de reducción involucra el agregado de al menos un electrón a la segunda especie. La carga iónica de una especie que se oxida se hace más positiva en una cantidad igual al número de electrones eliminados. De la misma manera, la carga iónica de una especie que se reduce se hace menos positiva en una cantidad igual al número de electrones ganados.

[0046] El término "intermediario" se define como una sustancia que se puede oxidar o reducir y que puede transferir uno o más electrones. Un intermediario es un reactivo en un análisis electroquímico y no es el analito de interés, pero provee una medida indirecta del analito. En un sistema simplificado, el intermediario experimenta una reacción redox en respuesta a la

oxidación o reducción del analito. El intermediario oxidado o reducido luego experimenta la reacción opuesta en el electrodo de trabajo de la tira sensora y se regenera a su número de oxidación original.

[0047] El término “aglutinante” se define como un material que provee soporte físico y contención a los reactivos a la vez que tiene compatibilidad química con los reactivos.

[0048] El término “ruido del intermediario” se define como la dispersión que se introduce en la concentración medida del analito atribuible a especies medibles que no responden a la concentración subyacente de analito.

[0049] El término “sub-llenado” se define como cuando se introduce insuficiente muestra a la tira sensora para obtener un análisis exacto.

[0050] El término “par redox” se define como dos especies conjugadas de una sustancia química que tienen diferentes números de oxidación. La reducción de la especie que tiene mayor número de oxidación produce la especie que tiene el menor número de oxidación. De manera alternativa, la oxidación de la especie que tiene el menor número de oxidación produce la especie que tiene el mayor número de oxidación.

[0051] El término “número de oxidación” se define como la carga iónica formal de una especie química, tal como un átomo. Un número de oxidación más alto, tal como (III), es más positivo, y un número de oxidación bajo, tal como (II), es menos positivo.

[0052] El término “especie redox soluble” se define como una sustancia que es capaz de experimentar oxidación o reducción y que es soluble en agua (pH 7, 25° C) a un nivel de al menos 1,0 gramo por litro. Entre las especies redox solubles se incluye a moléculas orgánicas electro-activas, complejos

metálicos de organotransición y complejos de coordinación de metales de transición. El término “especie redox soluble” excluye a metales elementales y a iones metálicos solos, especialmente aquellos que son insolubles o escasamente solubles en agua.

[0053] El término “oxidoreductasa” se define como cualquier enzima que facilita la oxidación o reducción de un analito. Una oxidoreductasa es un reactivo. El término oxidoreductasa incluye a “oxidasas”, que facilitan las reacciones de oxidación donde el oxígeno molecular es el aceptor de electrones; “reductasas”, que facilitan las reacciones de reducción donde el analito se reduce y el oxígeno molecular no es el analito; y “deshidrogenasas”, que facilitan las reacciones de oxidación donde el oxígeno molecular no es el aceptor de electrones. Véase, por ejemplo, *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Edición Revisada*, A.D. Smith, Ed., Nueva York: Oxford University Press (1997) pp. 161, 476, 477 y 560.

[0054] El término “molécula orgánica electro-activa” se define como una molécula orgánica que carece de un metal que sea capaz de experimentar una reacción de oxidación o reducción. Las moléculas orgánicas electro-activas pueden servir como intermediarios.

[0055] El término “complejo organometálico de transición”, también denominado “complejo OTM”, se define como un complejo donde un metal de transición está unido a por lo menos un átomo de carbono a través de un enlace sigma (carga formal de -1 sobre el átomo de carbono unido por enlace sigma al metal de transición) o un enlace pi (carga formal de 0 sobre el átomo de carbono unido por enlace pi al metal de transición). Por ejemplo, el ferroceno es un complejo OTM con dos anillos ciclopentadienilo (Cp), cada uno

unido a través de sus cinco átomos de carbono a un centro hierro por dos enlaces pi y un enlace sigma. Otro ejemplo de un complejo OTM es el ferricianuro (III) y su contraparte reducida ferrocianuro (II), en donde seis ligandos ciano (carga formal de -1 sobre cada una de los 6 ligandos) están unidos por enlace sigma a un centro hierro a través de los átomos de carbono.

[0056] El término “complejo de coordinación” se define como un complejo que tiene una geometría de coordinación bien definida, como por ejemplo octaédrica o cuadrado plana. Al contrario de los complejos OTM, que se definen por sus enlaces, los complejos de coordinación se definen por su geometría. De esta manera, los complejos de coordinación pueden ser complejos OTM (tal como el antes mencionado ferricianuro), o complejos donde átomos no metálicos distintos a carbono, como por ejemplo heteroátomos que incluyen a nitrógeno, azufre, oxígeno, y fósforo, están enlazados de manera dativa al centro de metal de transición. Por ejemplo, la hexaamina de rutenio es un complejo de coordinación que tiene una geometría octaédrica bien definida donde seis ligandos NH_3 (carga formal de 0 sobre cada uno de los 6 ligandos) están unidos de manera dativa al centro de rutenio. Una discusión más completa sobre complejos organometálicos de transición, complejos de coordinación y enlaces de metales de transición se puede encontrar en Collman et al., *Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry* (1987) y Miessler & Tarr, *Inorganic Chemistry* (1991).

[0057] El término “estado estacionario” se define como cuando el cambio en la señal electroquímica (corriente) con respecto a su variable de entrada independiente (tensión o tiempo) es sustancialmente constante, como por ejemplo entre ± 10 o $\pm 5\%$.

[0058] El término “punto de transición” se define como el valor de corriente que se obtiene en función del tiempo cuando una velocidad de difusión de una especie medible a una superficie conductora en aumento tiene una transición hacia una velocidad de difusión relativamente constante. Antes del punto de transición, la corriente cambia rápidamente con el tiempo. De manera similar, luego del punto de transición, la velocidad de decaimiento de corriente se hace relativamente constante, reflejando de esa manera la velocidad de difusión hacia una superficie conductora relativamente constante de una especie medible.

[0059] El término “relativamente constante” se define como cuando el cambio en un valor de corriente o de una velocidad de difusión está entre ± 20 , ± 10 , o $\pm 5\%$.

[0060] El término “espesor inicial promedio” se refiere a la altura promedio de una capa antes de la introducción de una muestra líquida. El término promedio se usa debido a que la superficie superior de la capa es irregular, teniendo picos y valles.

[0061] El término “intensidad redox” (RI) se define como el tiempo de excitación total dividido por la suma de los retrasos del tiempo de excitación total y del tiempo de relajación total para una secuencia de pulsos.

[0062] El término “dispositivo de mano” se define como un dispositivo que se puede sostener en una mano humana y que es portátil. Un ejemplo de un dispositivo de mano es el dispositivo de medición que acompaña al Ascensia® Elite Blood Glucose Monitoring System, disponible de Bayer HealthCare, LLC, Elkhart, IN.

[0063] El término “sobre” se define como “por encima” y es relativo a la orientación que se está describiendo. Por ejemplo, si se deposita un primer elemento sobre al menos una porción de un segundo elemento, se dice que el primer elemento está “depositado sobre” el segundo. En otro ejemplo, si un primer elemento está presente por encima de al menos una porción de un segundo elemento, se dice que el primer elemento está “sobre” el segundo. El uso del término “sobre” no excluye la presencia de sustancias entre los elementos superior e inferior que se están describiendo. Por ejemplo, un primer elemento puede tener un recubrimiento sobre su superficie superior, y todavía un segundo elemento por encima de al menos una porción del primer elemento, y su recubrimiento superior se puede describir como “sobre” el primer elemento. De esta manera, el uso del término “sobre” puede significar o no que los dos elementos que se relacionan lo hacen con contacto físico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0064] La invención se puede entender mejor con referencia a los siguientes dibujos y descripción. Los componentes en las figuras no están necesariamente a escala, poniendo en su lugar el énfasis en la ilustración de los principios de la invención. Más aún, en las figuras, los números referenciados de la misma manera designan partes correspondientes a lo largo de las diferentes vistas.

[0065] La FIG. 1A es una representación en perspectiva de una tira sensora armada.

[0066] La FIG. 1B es un diagrama de vista superior de una tira sensora, sin la tapa.

[0067] La FIG. 2 representa un diagrama de vista del extremo de la tira sensora de la FIG. 1B.

[0068] La FIG. 3 representa un método analítico electroquímico para determinar la presencia y concentración de un analito en una muestra.

[0069] La FIGs. 4A y 4B describen un electrodo de trabajo que tiene un conductor de superficie y un DBL durante la aplicación de pulsos de lectura cortos y largos.

[0070] Las FIGs. 5A-5E representan cinco ejemplos de secuencias de pulsos en donde se aplican múltiples ciclos de trabajo a la tira sensora luego de la introducción de la muestra.

[0071] La FIG. 6A muestra las corrientes de salida transitoria de la secuencia de pulsos representada en la FIG. 5B para muestras de WB con 40% de hematocrito que contienen 50, 100, 200, 400 y 600 mg/dl de glucosa.

[0072] La FIG. 6B muestra perfiles de contorno de corriente preparados mediante la gráfica y conexión del valor de corriente final para cada uno de los perfiles de corriente transitoria mostrados en la FIG. 6A.

[0073] La FIG. 6C muestra perfiles de contorno de corriente preparados a partir de perfiles de corriente transitoria que se generaron a través de la secuencia de pulsos que se representó en la FIG. 5E.

[0074] La FIG. 6D es un gráfico que ilustra señales de salida en relación con señales de entrada para un sistema electroquímico usando secuencias de pulsos amperométricos regulados.

[0075] Las FIGs. 7A y 7B son gráficos que ilustran la mejora en la exactitud de medida cuando un DBL se combina con un pulso de lectura corto.

[0076] Las FIGs. 7C y 7D son gráficos que ilustran la reducción en la dispersión de hematocrito que se puede obtener cuando una secuencia de pulsos amperométricos regulados se combina con un DBL.

[0077] La FIG. 8 grafica las corrientes de punto final registradas para múltiples ciclos de trabajo cuando se aplica la secuencia de pulsos de la FIG. 5B a muestras de WB que contienen diferentes concentraciones de glucosa.

[0078] La FIG. 9A representa los perfiles de corriente transitoria que se obtienen a partir de la secuencia de pulsos que se representó en la FIG. 5B cuando se introduce una muestra de 2,0 μ l a 10 tiras sensoras diferentes.

[0079] La FIG. 9B representa los perfiles de velocidad de decaimiento de cada secuencia de pulsos convertida a partir de la FIG. 9A como función del tiempo.

[0080] La FIG. 10 grafica las constantes K determinadas a partir de una secuencia de pulsos para concentraciones de glucosa de 50, 100 y 400 mg/dl en función de la temperatura.

[0081] La FIG. 11 es una representación esquemática de un dispositivo de medición.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0082] La presente invención hace uso del descubrimiento de que las secuencias de pulsos amperométricos regulados que incluyen ciclos de trabajo múltiples, pueden proporcionar mejor exactitud y precisión en un análisis a la vez que se reduce el tiempo para completar el análisis. Cada ciclo de trabajo incluye una excitación que se puede proporcionar a una tensión relativamente constante. Cada ciclo de trabajo también incluye una relajación que se puede proporcionar con un circuito abierto. Las secuencias de pulsos de la presente

invención pueden reducir el tiempo requerido para el análisis por eliminación de la necesidad de retardos y pulsos adicionales, tal como los retardos de la "incubación" para proporcionar la rehidratación del reactivo, los pulsos de "quemado" para renovar los electrodos, y los pulsos de regeneración del intermediario para renovar el estado de oxidación del intermediario, de manera de reducir el tiempo del análisis.

[0083] Aun con tiempos de análisis más cortos, las secuencias de los pulsos amperométricos regulados de la presente invención pueden mejorar la exactitud y/o precisión respecto a los métodos convencionales. En un aspecto, los errores de exactitud introducidos por el efecto del hematocrito y los errores de precisión introducidos por variación del volumen del espacio debajo de la tapa se pueden reducir a través de la combinación de una capa de barrera de difusión con las secuencias de pulsos de la presente invención. En otro aspecto, los errores que son el resultado por otra parte de una condición de un estado de no equilibrio del sensor y/o fondo del intermediario se pueden reducir. Las secuencias de pulsos regulados de la presente invención también permiten determinar la corriente transitoria y los perfiles de contorno que simulan una condición de estado de equilibrio. Los perfiles de las corrientes transitorias se pueden usar para proveer una pluralidad de conjuntos de constantes de calibración, detección de llenado insuficiente, y la capacidad para determinar la temperatura de la muestra, en lugar de confiar en la temperatura de dispositivo de medición.

[0084] Las FIGs. 1A y 1B describen una tira sensora 100 que se puede usar en la presente invención. La FIG. 1A es una representación perspectiva de una tira sensora 100 montada que incluye una base sensora 110, al menos

parcialmente cubierta por una tapa 120 con una abertura 130 incluida, un área cóncava 140, y una abertura terminal de entrada 150. Bajo la base 100 y la tapa 120 se forma un volumen parcialmente cerrado 160. También se pueden usar otros diseños de tiras sensoras compatibles con la presente invención, como aquéllos descritos en la Patente de EE.UU. Nos. 5.120.420 y 5.798.031.

[0085] Se puede transferir una muestra líquida para el análisis dentro del espacio debajo de la tapa 160 por introducción del líquido en la abertura 150. El líquido llena el espacio debajo de la tapa 160 mientras se expelle el aire previamente contenido a través de la abertura 130. El espacio debajo de la tapa 160 puede contener una composición (no se muestra) que ayude a la retención de la muestra líquida en el espacio debajo de la tapa. Los ejemplos de tales composiciones incluyen polímeros absorbentes de agua, como la carboximetil celulosa y el polietilenglicol; y matrices de polímero poroso, como el dextrano y la poliacrilamida.

[0086] La FIG. 1B describe una vista superior de la tira sensora 100, con la tapa 120 removida. Se pueden utilizar conductores 170 y 180 bajo una capa dieléctrica 190 desde la abertura 150 a un electrodo de trabajo 175 y un electrodo contador 185, respectivamente. En un aspecto, los electrodos de trabajo y contador 175, 185 pueden estar sustancialmente en el mismo plano, como se describe en la figura. En un aspecto relacionado, los electrodos de trabajo y contador 175, 185 se pueden separar por más de 200 ó 250 μm y se pueden separar de la porción superior de la tapa 120 por lo menos por 100 μm . La capa dieléctrica 190 puede cubrir los electrodos 175, 185 parcialmente y se puede hacer de cualquier material dieléctrico conveniente, tal como un polímero aislante.

[0087] El electrodo contador 185 balancea el potencial del electrodo de trabajo 175 de la tira sensora 100. En un aspecto, este potencial puede ser un potencial de referencia logrado por formación del electrodo contador 185 con un par redox, tal como Ag/AgCl, para proporcionar un electrodo combinado de referencia-contador. En otro aspecto, el potencial se puede proporcionar al sistema sensor por formación del electrodo contador 185 con un material inerte, tal como el carbono, que incluya especies redox solubles, tal como ferricianuro, dentro del espacio debajo de la tapa 160. Alternativamente, la tira sensora 100 se puede proporcionar con un tercer conductor y electrodo (no se muestra) para proveer un potencial de referencia al sistema sensor.

[0088] En la FIG. 2 se presenta un diagrama de visto desde el extremo de la tira sensora descrita en la FIG. 1B que muestra la estructura de la capa del electrodo de trabajo 175 y el electrodo contador 185. Los conductores 170 y 180 se pueden posicionar directamente sobre la base 110. Las capas de conductor de superficie 270 y 280 se pueden depositar opcionalmente en los conductores 170 y 180, respectivamente. Las capas de superficie conductora 270, 280 se pueden hacer del mismo o de diferentes materiales.

[0089] El material o materiales usados para formar los conductores 170, 180 y las capas de superficie conductora 270, 280 pueden incluir cualquier conductor eléctrico. Los conductores eléctricos de preferencia son no ionizantes, de manera que el material no sufra una oxidación neta o una reducción neta durante el análisis de la muestra. Los conductores 170, 180 incluyen preferentemente una capa delgada de una pasta de metal o metal, tal como oro, plata, platino, paladio, cobre, o tungsteno. Las capas de superficie conductora 270, 280 incluyen preferentemente carbono, oro, platino, paladio, o

combinaciones de ellos. Si en el conductor no hay presente una capa de superficie conductora, el conductor se hace preferentemente de un material no ionizante.

[0090] El material de la superficie conductora se puede depositar en los conductores 170, 180 por cualquier medio convencional compatible con el funcionamiento de la tira sensora, que incluye deposición de capas, deposición de vapor químico, deposición de suspensión, y similares. En el caso de la deposición de suspensión, la mezcla se puede aplicar como una tinta a los conductores 170, 180, como se describe en la Patente de EE.UU. No. 5.798.031.

[0091] Las capas de reactivo 275 y 285 se pueden depositar en los conductores 170 y 180, respectivamente, e incluir los reactivos y opcionalmente un aglutinante. El material aglutinante es preferentemente un material polimérico que sea por lo menos parcialmente soluble en agua. Los materiales poliméricos parcialmente solubles en agua adecuados para el uso como aglutinante pueden incluir óxido de poli(etileno) (PEO), carboximetilcelulosa (CMC), alcohol polivinílico (PVA), hidroxietilencelulosa (HEC), hidroxipropilcelulosa (HPC), metilcelulosa, etilcelulosa, etil hidroxietilcelulosa, etil carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona (PVP), ácidos poliamínicos tal como el polilisina, sulfonato de poliestireno, gelatina, ácido acrílico, ácido metacrílico, almidón, o sales de anhídrido maleico de ellos, derivados de ellos y combinaciones de ellos. Entre los materiales aglutinantes anteriores, se prefieren PEO, PVA, CMC, y PVA, siendo CMC y PEO los más preferidos en la actualidad.

[0092] Además del aglutinante, las capas de reactivo 275 y 285 pueden incluir los mismos o diferentes reactivos. En un aspecto, los reactivos presentes en la primera capa 275 se pueden seleccionar para el uso con el electrodo de trabajo 175, mientras los reactivos presentes en la segunda capa 285 se puede seleccionar para el uso con el electrodo contador 185. Por ejemplo, los reactivos en la capa 285 pueden facilitar el flujo libre de electrones entre la muestra y el conductor 180. De manera similar, los reactivos en la capa 275 pueden facilitar la reacción del analito.

[0093] La capa de reactivo 275 puede incluir una oxidoreductasa específica para el analito que puede facilitar la reacción del analito mientras mejora la especificidad por el analito del sistema sensor, sobre todo en muestras biológicas complejas. Más adelante en la Tabla II se muestran ejemplos de algunas oxidoreductasas específicas y sus analitos correspondientes.

Oxidoreductasa (capa de reactivo)	Analito
Glucosa deshidrogenasa	β -glucosa
Glucosa oxidasa	β -glucosa
Colesterol esterasa; colesterol oxidasa	Colesterol
Lipoproteína lipasa; glicerol quinasa; glicerol-3-fosfato oxidasa	Triglicéridos
Lactato oxidasa; lactato deshidrogenasa; diaforasa	Lactato
Piruvato oxidasa	Piruvato
Alcohol oxidasa	Alcohol
Bilirrubina oxidasa	Bilirrubina
Uricasa	Acido úrico

Oxidoreductasa (capa de reactivo)	Analito
Glutación reductasa	NAD(P)H
Monóxido de carbono oxidoreductasa	Monóxido de carbono

Tabla II

En la actualidad, las oxidoreductasas especialmente preferidas para el análisis de glucosa incluyen la glucosa oxidasa, glucosa deshidrogenasa, derivados de ellas, o combinaciones de ellas.

[0094] La capa de reactivo 275 también puede incluir un intermediario para comunicar más efectivamente los resultados de la reacción del analito a la superficie conductora 270 y/o al conductor 170. Complejos de OTM, complejos de coordinación, y moléculas orgánicas electro-activas son ejemplos de intermediarios. Ejemplos específicos incluyen compuestos de ferroceno, ferrocianuro, ferricianuro, coenzimas de pirroloquinolin quinonas sustituidas o no sustituidas (PQQ), 3 fenilimino-3H-fenotiazinas sustituidas o no sustituidas (PIPT), 3-fenilimino-3H-fenoxazina (PIPO), benzoquinonas sustituidas o no sustituidas, naftoquinonas sustituidas o no sustituidas, N óxidos, nitrosocompuestos, hidroxilaminas, oxinas, flavinas, fenazinas, derivados de fenazinas, fenotiazinas, indofenoles, e indaminas. Éstos, y otros intermediarios que se pueden incluir en la capa de reactivo se pueden encontrar en las Patentes de EE.UU. Nos. 5.653.863; 5.520.786; 4.746.607; 3.791.988; y en las Patentes EP Nos. 0354441 y 0330517.

[0095] En la actualidad, los intermediarios especialmente preferidos para el análisis de glucosa incluyen ferricianuro, hexaamina de rutenio, PIPT, PIPO, o combinaciones de ellos. Se puede encontrar una revisión de los

intermediarios electroquímicos útiles para los sistemas redox biológicos en *Analytica Clinica Acta*. 140 (1982), páginas 1-18.

[0096] Las capas de reactivo 275, 285 se pueden depositar por cualquier medio conveniente, tal como impresión, deposición líquida o deposición por chorro de tinta. En un aspecto, las capas se depositan por impresión. Con otros factores iguales, el ángulo de la hoja de impresión puede afectar inversamente el espesor de las capas de reactivo. Por ejemplo, cuando la hoja se mueve con un ángulo de aproximadamente 82° con la base 110, la capa puede tener un espesor de aproximadamente $10\ \mu\text{m}$. De manera similar, cuando se utiliza un ángulo de hoja de aproximadamente 62° con la base 110, se puede producir una capa más gruesa de $30\ \mu\text{m}$. Así, los ángulos de hoja más bajos pueden proporcionar capas de reactivo más gruesas. Además del ángulo de la hoja, otros factores, tal como la viscosidad de material a aplicar así como el tamaño de la pantalla y la combinación de la emulsión, pueden afectar el espesor resultante de las capas de reactivo 275, 285.

[0097] El electrodo de trabajo 175 también puede incluir una capa de barrera de difusión (DBL) integrada a la capa de reactivo 275 o que sea una capa diferente 290, como se describe en la FIG. 2. Así, la DBL se puede formar como una combinación reactivo/DBL en el conductor, como una capa diferente en el conductor, o como una capa diferente en la capa de reactivo. Cuando el electrodo de trabajo 175 incluye la DBL 290 diferente, la capa de reactivo 275 puede o no residir en la DBL 290. En lugar de residir en la DBL 290, la capa de reactivo 275 puede residir en cualquier porción de la tira sensora 100 que permite solubilizar el reactivo en la muestra. Por ejemplo, la capa de reactivo 175 puede residir en la base 110 o en la tapa 120.

[0098] La DBL proporciona un espacio poroso que tiene un volumen interno en donde pueden residir especies medibles. Se pueden seleccionar los poros de la DBL de manera que las especies medibles puedan difundir en la DBL, mientras se excluyen sustancialmente constituyentes físicamente más grandes de la muestra, tales como las células RB. A pesar que las tiras sensoras convencionales han usado variados materiales para filtrar de la superficie del electrodo de trabajo las células RB, una DBL proporciona un espacio poroso interno para contener y aislar una porción de las especies medibles de la muestra.

[0099] Cuando la capa de reactivo 275 incluye un aglutinante soluble en agua, cualquier porción del aglutinante que se solubiliza en la muestra antes de la aplicación de una excitación puede funcionar como una DBL integrado. El espesor promedio inicial de una capa combinada DBL/reactivo es preferentemente menor de 30 ó 23 micrómetros (μm) y más preferentemente menor de 16 μm . En la actualidad, un espesor promedio inicial especialmente preferido de una capa combinada de DBL/reactivo es de entre 1 y 30 μm o de entre 3 y 12 μm . El espesor promedio inicial deseado de una capa combinada de DBL/reactivo se puede seleccionar para una longitud de excitación específica sobre la base que cuando la velocidad de difusión de las especies medibles de la DBL a una superficie conductora, tal como la superficie conductora 170 o la superficie conductora 270 de la FIG. 2, se vuelve relativamente constante.

[00100] Además, el uso de una DBL demasiado gruesa con una longitud de excitación pequeña puede producir una demora cuando la velocidad de difusión de las especies medibles de la DBL a la superficie del conductor se

vuelve relativamente constante. Por ejemplo, cuando se aplican ciclos de trabajo que incluyen excitaciones secuenciales de 1 segundo separadas por relajaciones de 0,5 segundos a un electrodo de trabajo que usa una capa combinada de DBL/reactivo con un espesor inicial promedio de 30 μm , no se puede alcanzar una velocidad de difusión de preferencia hasta que se hayan aplicado por lo menos 6 ciclos de trabajo ($> \sim 10$ segundos). Por el contrario, cuando se aplican los mismos ciclos de trabajo a un electrodo de trabajo que usa una capa combinada de DBL/reactivo que tiene un espesor inicial promedio de 11 μm , se puede alcanzar una velocidad de difusión relativamente constante luego de la segunda excitación ($\sim 2,5$ segundos). Por lo tanto hay un límite superior para el espesor inicial promedio preferido de la DBL durante un ciclo de trabajo dado. Un tratamiento más profundo de la correlación entre el espesor de DBL, longitud de la excitación, y el tiempo para alcanzar una velocidad de difusión relativamente constante se puede encontrar en la solicitud Provisional de los EE.UU. No. 60/655.180, presentada el 22 de febrero de 2005, titulada "Concentration Determination in a Diffusion Barrier Layer".

[00101] La DBL 290 diferente puede incluir cualquier material que proporcione el espacio de poro deseado, a la vez que sea soluble parcial o lentamente en la muestra. En un aspecto, la DBL 290 diferente puede incluir un material aglutinante reactivo carente de reactivos. La DBL 290 diferente puede tener un espesor inicial promedio de por lo menos 5 μm , preferentemente, de entre 8 y 25 μm , y más preferentemente de entre 8 y 15 μm .

[00102] En la FIG. 3 se representa un análisis electroquímico 300 para la determinación de la presencia y opcionalmente la concentración de un analito 322 en una muestra 312. En 310, la muestra 312 se introduce a una tira

sensora 314, como la tira sensora descrita en las FIGs. 1A-1B y 2. Las capas de reactivo, tales como la 275 y/o la 285 de la FIG. 2, comienzan a solubilizarse en la muestra 312, esto permite así la reacción. En este momento del análisis, puede ser beneficioso proporcionar un retardo inicial de tiempo, o “período de incubación”, para permitir reaccionar los reactivos con la muestra 312. Preferentemente, el retardo inicial de tiempo puede ser de entre 1 y 10 segundos. Un tratamiento más profundo de los retardos iniciales de tiempo se puede encontrar en las Patentes de EE.UU. Nos. 5.620.579 y 5.653.863.

[00103] Durante la reacción, una porción del analito 322 presente en la muestra 312 se oxida o reduce química o bioquímicamente en 320, tal como por una oxidoreductasa. En la oxidación o reducción, los electrones se pueden transferir opcionalmente entre el analito 322 y un intermediario 332 en 330.

[00104] En 340, una especie medible 342, que pueden ser los analitos 322 cargados de 320 o el intermediario 332 cargado de 330 se excita de manera electroquímica (se oxida o se reduce). Por ejemplo, cuando la muestra 312 es la sangre entera que contiene glucosa que se oxidó en 320 por la glucosa oxidasa, la cual transfiere luego un electrón para reducir un intermediario ferricianuro (III) a ferrocianuro (II) en 330, la excitación de 340 oxida el ferrocianuro (II) a ferricianuro (III) en el electrodo de trabajo. De este modo, se transfiere selectivamente un electrón del analito de glucosa al electrodo de trabajo de la tira sensora el cual se puede detectar por un dispositivo de medición.

[00105] La corriente que es el resultado de la excitación 340 se puede registrar durante la excitación 340 en una función del tiempo en 350. En 360, la

muestra se relaja. Preferentemente, la corriente no se registra durante la relajación 360.

[00106] En 370, se repiten por lo menos dos veces la excitación 340, el registro 350, y la relajación 360 por un total de por lo menos tres ciclos de trabajo con un intervalo de 180 segundos o menos. Se puede analizar la corriente registrada y los valores de tiempo para determinar la presencia y/o concentración del analito 322 en la muestra 312 en 380.

[00107] Los sistemas sensores amperométricos aplican un potencial (tensión) a la tira sensora para excitar las especies medibles mientras se monitorea la corriente (amperaje). Los sistemas sensores amperométricos convencionales pueden mantener el potencial mientras se mide la corriente para una longitud de pulso de lectura continua de entre 5 y 10 segundos, por ejemplo. Contrariamente con los métodos convencionales, los ciclos de trabajo usados en el análisis electroquímico 300 reemplazan los pulsos de lectura continuos, de larga duración por excitaciones y relajaciones múltiples de corta duración.

[00108] El análisis 300 puede aumentar la exactitud y/o precisión de la determinación del analito cuando las especies medibles excitadas en el electrodo de trabajo en 540 se alejan sustancialmente del interior de una DBL, a diferencia de las especies medibles presentes en el espacio debajo de la tapa de la tira. En las FIGs. 4A y 4B se describe un electrodo de trabajo 400 que tiene una superficie conductora 430 y una DBL 405 diferente durante la aplicación de un pulso de lectura largo y una excitación corta. Cuando una muestra de WB se aplica al electrodo de trabajo 400, las células RB 420 cubren la DBL 405. El analito presente en la muestra forma especies medibles

externas 410 externas a la DBL 405. Una porción de las especies medibles externas 410 difunde en la DBL 405 diferente para dar las especies medibles internas 415.

[00109] Como se muestra en la FIG. 4A, cuando se aplica un pulso de lectura continuo de 10 segundos al electrodo de trabajo 400, ambas especies medibles externas e internas 410 y 415 se excitan en la superficie conductora 430 por un cambio en el estado de oxidación. Durante el pulso de lectura largo, la especie medible externa 410 difunde a través de la región de la muestra en la cual residen las células RB 420 y a través de la DBL 405 a la superficie conductora 430. La difusión de las especies medibles externas 410 a través de las células RB 420 durante el pulso de lectura introducen el efecto del hematocrito al análisis. Dado que una porción sustancial de las especies medibles excitadas en la superficie conductora 430 se origina desde fuera de la DBL 420, un pulso de lectura largo aplicado a una tira sensora que tiene una DBL puede funcionar similarmente con respecto al efecto de hematocrito a un pulso de lectura corto aplicado a una tira sin una DBL.

[00110] Por el contrario, en la FIG. 4B se representa la situación en la cual se aplica una excitación corta a la tira sensora equipada con DBL 400 para excitar las especies medibles internas 415, mientras se excluye sustancialmente de la excitación las especies medibles externas 410 a la DBL 405. Durante la excitación corta, las especies medibles 410 o permanecen externas a la DBL 405 o no difunden sustancialmente a través de la DBL para alcanzar la superficie conductora 430. De este modo, la excitación corta puede proporcionar una reducción sustancial en la influencia del efecto del hematocrito en el análisis.

[00111] Con el control de la longitud de la excitación en el electrodo de trabajo, se pueden analizar las especies medibles internas a la DBL, mientras las especies medibles externas al DBL se pueden excluir sustancialmente del análisis. Respecto a la superficie conductora 430 del electrodo de trabajo, se cree que el espesor y el volumen interno de la DBL 405 altera la velocidad de difusión de las especies medibles externas 410 respecto a la velocidad de difusión de las especies medibles internas 415.

[00112] Dado que las especies medibles internas a la DBL pueden difundir a una velocidad distinta al conductor del electrodo de trabajo que las especies medibles externas al DBL, la longitud de la excitación en el electrodo de trabajo puede seleccionar la especie medible que se analiza de manera preferencial. De mismo modo que desde el punto de vista molecular, las diferentes velocidades de difusión de las especies medibles internas y externas a la DBL pueden permitir la diferenciación.

[00113] Mientras no se desee tener en cuenta alguna teoría en particular, actualmente se cree que la velocidad de difusión de las especies medibles desde fuera de la DBL hacia la DBL varía, mientras que la velocidad de difusión de las especies medibles del volumen interno de la DBL hacia el conductor es relativamente constante. La variación de las velocidades de difusión de las especies medibles fuera de la DBL puede ser causada por las células RB y otros constituyentes presentes en la muestra y puede dar lugar al efecto del hematocrito. De esta manera, los errores en el análisis (desviación) introducidos por los constituyentes de la muestra, incluso las células RB, se puede reducir limitando sustancialmente el análisis a las especies medibles que tienen una velocidad de difusión relativamente constante con el conductor.

[00114] Otra ventaja de analizar selectivamente las especies medibles internas a la DBL es una reducción de la imprecisión en la medición de las tiras sensoras que tienen volúmenes variables de espacio debajo de la tapa. Si un pulso de lectura continúa más allá del tiempo que cuando se analizaron sustancialmente todas las especies medibles presentes en el espacio debajo de la tapa, el análisis ya no representa la concentración de especies medibles en la muestra, pero en cambio se determinó la cantidad de especies medibles en el espacio debajo de la tapa; una medida muy diferente. Cuando la longitud de la excitación se vuelve relativamente larga respecto al volumen de espacio debajo de la tapa, la medición de corriente dependerá del volumen de espacio debajo de la tapa, no de la concentración del analito subyacente. De esta manera, los pulsos de lecturas largos pueden resultar en medidas que son muy inexactas con respecto a la concentración del analito cuando la longitud del pulso “rebasa” las especies medibles presentes en el espacio debajo de la tapa.

[00115] Como se describe en la solicitud de Patentes Provisional de EE.UU. No. 60/617.889, presentada el 12 de octubre de 2004, titulada “Concentration Determination in a Diffusion Barrier Layer”, se puede seleccionar un simple pulso de lectura o excitación para limitar sustancialmente la excitación de la especie medible a una DBL. Cuando se utiliza una sola excitación, se puede seleccionar preferentemente la longitud de la excitación y el espesor de la DBL para que se alcance durante la excitación una velocidad de difusión relativamente constante de las especies medibles de la DBL a la superficie del conductor. Si no se alcanza una velocidad de difusión relativamente constante durante la excitación, la concentración de las especies

medibles dentro de la DBL puede no representar con precisión la concentración de las especies medibles en la muestra, de manera que afecta adversamente el análisis. Más aun, la excitación simple no puede reducir eficazmente la señal de fondo del intermediario.

[00116] Con referencia a la FIG. 3, la excitación 340, el registro 350, y la relajación 360 constituyen un solo ciclo de trabajo que se puede aplicar por lo menos a una tira sensora tres veces durante un período de tiempo de 180 segundos o menos. Más preferentemente, se aplican por lo menos 4, 6, 8, 10, 14, 18, ó 22 ciclos de trabajo durante un período de tiempo independientemente seleccionado de 120, 90, 60, 30, 15, 10, ó 5 segundos. En un aspecto, los ciclos de trabajo se aplican durante un período de tiempo de entre 5 y 60 segundos. En otro aspecto, se pueden aplicar entre 3 y 18 o entre 3 y 10 ciclos de trabajo dentro de 30 segundos o menos. En otro aspecto, se pueden aplicar entre 4 y 8 ciclos de trabajo dentro de entre 3 y 16 segundos.

[00117] El potencial que se aplicó durante la porción de excitación 340 del ciclo de trabajo se aplica preferentemente con una tensión y polaridad sustancialmente constantes a lo largo de su duración. Esto contrasta directamente con los pulsos de lecturas convencionales en dónde la tensión se cambia o "barre" a través de los potenciales de tensión y/o polaridades múltiples durante el registro de los datos. En un aspecto, la duración de la excitación 340 es a lo sumo de 4 ó 5 segundos, y preferentemente menor de 3, 2, 1,5, ó 1 segundo. En otro aspecto, la duración de la excitación 340 es de entre 0,01 y 3 segundos, de entre 0,01 y 2 segundos, o de entre 0,01 y 1,5 segundos. Más preferentemente, la duración de la excitación 340 es de entre 0,1 y 1,2 segundos.

[00118] Luego de la excitación 340, en 360 el dispositivo de medición puede abrir el circuito a través de la tira sensora 314, de esta manera permitir relajar el sistema. Durante la relajación 360, el corriente presente durante la excitación 340 está por lo menos sustancialmente reducida a la mitad, preferentemente en un orden de magnitud, y más preferentemente a cero. Preferentemente, un estado de corriente cero se proporciona por un circuito abierto u otro método conocido por aquéllos con experiencia en la materia para proporcionar sustancialmente un flujo de corriente cero. Por lo menos se pueden proporcionar 3 relajaciones durante los ciclos de trabajo de la secuencia de pulsos.

[00119] En un aspecto, la relajación 360 es de por lo menos 10, 5, 3, 2, 1,5, 1, ó 0,5 segundos de duración. En otro aspecto, la relajación 360 es de entre 0,1 y 3 segundos, de entre 0,1 y 2 segundos, o de entre 0,1 y 1,5 segundos de duración. Más preferentemente, la relajación 360 es de entre 0,2 y 1,5 segundos de duración y se proporciona por un circuito abierto.

[00120] Durante la relajación 360, el agente ionizante puede reaccionar con el analito para generar las especies medibles adicionales sin los efectos de un potencial eléctrico. De este modo, para un sistema sensor de glucosa que incluye glucosa oxidasa y un intermediario ferricianuro como reactivos, se puede producir el ferrocianuro adicional (intermediario reducido) sensible a la concentración del analito de la muestra sin la interferencia de un potencial eléctrico durante la relajación 360.

[00121] Muchos métodos de análisis convencionales aplican continuamente una tensión durante la duración del pulso de lectura. La tensión aplicada puede tener un potencial fijo o puede tener un potencial que se barre

de un potencial positivo a uno negativo o de un potencial positivo o uno negativo a un potencial de cero en referencia a un potencial. Incluso con un potencial referido de cero, estos métodos drenan la corriente continuamente de la tira sensora durante el pulso de lectura que permite a la reacción electroquímica continuar a lo largo del pulso de lectura. De esta manera, la reacción sensible a la concentración del analito que produce las especies medibles y la difusión de las especies medibles al electrodo de trabajo, son ambos afectados por la corriente durante la porción de potencial cero de un pulso de lectura convencional.

[00122] Los métodos convencionales que aplican continuamente tensión y drenan la corriente de la tira sensora, incluso a potenciales cero con referencia a un potencial, son fundamentalmente diferentes de las relajaciones de la presente invención. Los ciclos de trabajo múltiples aplicados por la presente invención son también notablemente diferentes de los métodos convencionales que usan un solo pulso de duración largo con múltiples mediciones, tales como aquéllos descritos en la Pat de EE.UU. No. 5.243.516, debido a las relajaciones múltiples de la presente invención. A diferencia de estos métodos convencionales, cada ciclo de trabajo de las secuencias de pulsos de la presente invención proporciona una difusión y un tiempo de reacción de analito independientes durante la relajación.

[00123] En las FIGs. 5A-5E se describen cinco ejemplos de secuencias de pulsos amperométricos regulados en los cuales se aplicaron ciclos de trabajo múltiples a la tira sensora luego de la introducción de la muestra. En estos ejemplos, se usaron pulsos de onda cuadrada; sin embargo, también se pueden usar otros tipos de onda compatibles con el sistema sensor y la

muestra en estudio. En las FIGs. 5C-5D se describen las secuencias de pulsos que incluyen ciclos de trabajo múltiples que tienen los mismos tiempos de excitación y de retardo de circuito abierto.

[00124] En las FIGs. 5A-5B se describen las secuencias de pulsos que incluyen 9 ciclos de trabajo que tienen los mismos tiempos de excitación y de retardo de circuito abierto además de un pulso final de lectura 510 de duración más larga que aumenta en tensión. La tensión aumentada de este pulso final de lectura proporciona la capacidad de detectar especies que tienen un potencial de oxidación más alto. Una discusión más completa con respecto a los pulsos finales de lectura se puede encontrar en la solicitud Provisional de Patentes de los EE.UU. No. 60/669.729, archivada el 8 de abril de 2005, titulada "Oxidizable Species as an Internal Reference in Control Solutions for Biosensors".

[00125] En la FIG. 5A se describe una secuencia de pulsos de 9 ciclos de trabajo en la cual las excitaciones de 0,5 segundos están separadas por retardos de circuito abierto de 1 segundo para dar una intensidad redox (RI) de 0,357 (5/14). Por lo tanto, en la FIG. 5A, el segundo ciclo de trabajo tiene una porción de excitación 520 y una porción de relajación 530. En la FIG. 5B se describe una secuencia de pulsos de 9 ciclos de trabajo en la cual las excitaciones de 1 segundo están separadas por retardos de circuito abierto de 0,5 segundos para dar un RI de 0,69 (10/14,5). En la FIG. 5C se describe una secuencia de pulsos de 7 ciclos de trabajo en la cual las excitaciones de 1 segundo están separadas por retardos de circuito abierto de 1 segundo para dar un RI de 0,53 (8/15). Se aplicó un pulso de lectura final 540 de la misma duración y tensión como aquéllos utilizados durante los 7 ciclos de trabajo. En

la FIG. 5D se describe una secuencia de pulsos de 6 ciclos de trabajo en la cual las excitaciones de 1,5 segundos están separadas por retardos de circuito abierto de 1 segundo para dar un RI de 0,636 (10,5/16,5). Como en la FIG. 5C, se aplicó un pulso de lectura final 540 de la misma duración y tensión como los pulsos de los ciclos de trabajo anteriores. En la FIG. 5E se describe una secuencia de pulsos de 7 ciclos de trabajo en la cual las excitaciones relativamente cortas de 0,25 segundos están separadas por relajaciones relativamente largas de 1,5 segundos. La secuencia de pulsos de la FIG. 5E comienza con un pulso inicial de 1 segundo 550 y termina con un pulso de lectura final de 1,25 segundos 540 para proporcionar un RI de 0,25 (4/16).

[00126] Cuanto más alto el RI para una secuencia de pulsos, menor el ruido que se introduce por el intermediario en el análisis. Las secuencias de pulsos representadas en las FIGs. 5A-5E son pulsos de oxidación, diseñados para excitar (es decir oxidar) un intermediario reducido, que es la especie medible. Por lo tanto, cuanto mayor fue la corriente de oxidación que se aplicó a la tira sensora en un período dado de tiempo, menor fue la oportunidad de que el intermediario reducido por mecanismos distintos que la oxidación del analito contribuya a los valores de corriente registrados.

[00127] La tabla III, más adelante, provee la pendiente, intersección, y la relación intersección/pendiente para los perfiles de contorno de los últimos cuatro ciclos de trabajo de secuencias del pulsos (a) y (b). La secuencia de pulsos (a) fue:

$9 \times (0,5 \text{ segundos encendido} + 1,0 \text{ segundos apagado}) + 0,5 \text{ segundos} = 14 \text{ segundos}$, $RI = 5/14 = 0,357$.

La secuencia de pulsos (b) fue: 9 x (1,0 segundos encendido + 0,375 segundos apagado) + 1,0 segundos = 13,375 segundos, $RI = 10/13,375 = 0,748$

	Secuencia de pulsos (a), RI = 0,357			Secuencia de pulsos (b), RI = 0,748		
Pulso #	Pendiente	Intersección	Int/Pendiente	Pendiente	Intersección	Int/Pendiente
7	20,5	2581,6	125,93	14,07	741,29	52,69
8	19,99	2239,4	112,03	13,47	649,93	48,25
9	19,53	1973,4	101,04	12,92	580,94	44,96
10	19,1	1762,5	92,28	12,45	525,26	42,19

Tabla III

[00128] Las relaciones intersección/pendiente proporcionan un indicativo de la cantidad de señal de ruido atribuible al intermediario, en donde valores de relación más altos indican una mayor relación de señal registrada atribuible al ruido del intermediario. Por lo tanto, mientras la frecuencia de pulsos (número de excitaciones / tiempo de ensayo total en segundos) de las secuencias (a) y (b) es similar a aproximadamente $0,7 \text{ segundos}^{-1}$, el aumento en RI proporcionado por la secuencia de pulsos (b) proporciona menos de la mitad de la señal de ruido. En combinación, las excitaciones múltiples de la secuencia de pulsos pueden eliminar la necesidad de un pulso inicial para renovar el estado de la oxidación del intermediario. Mientras la corriente de fondo pueda ser influenciada por el intermediario, para el ferricianuro, se prefieren secuencias de pulsos que tengan valores de RI de por lo menos 0,01, 0,3, 0,6, ó 1, con valores de RI de entre 0,1 y 0,8, de entre 0,2 y 0,7, o de entre 0,4 y 0,6 con más preferencia.

[00129] En referencia a la FIG. 3 de más arriba, en 350 la corriente que pasa a través de los conductores del sensor 314 durante cada ciclo de trabajo de la secuencia de pulsos se puede registrar en una función del tiempo. En la FIG. 6A se muestran las corrientes de salida graficadas como una función del tiempo para la secuencia de pulsos representada en la FIG. 5B para un hematocrito de 40% de muestras de WB que contienen 50, 100, 200, 400, y 600 mg/dl de glucosa. En lugar de un pulso de lectura convencional de larga duración que produce la oxidación extensa de las especies medibles, cada excitación es seguida por una interrupción en el perfil de corriente.

[00130] En la FIG. 6A, cuando se grafican las corrientes de salida en función del tiempo, cada excitación produce un perfil de corriente transitoria que tiene un valor de corriente alto inicial que decae con el tiempo. Preferentemente, los ciclos de trabajo incluyen excitaciones y relajaciones cortas e independientes que inhiben al sistema de alcanzar un estado de equilibrio o una condición de decaimiento de corriente lenta durante cada excitación, como se requiere durante los pulsos de lectura de sistemas convencionales. En lugar del estado de equilibrio convencional o de las corrientes de lentas, se obtienen valores de corrientes transitorias (de decaimiento rápido) con secuencias de pulsos amperométricos regulados porque la reacción electroquímica de las especies medibles en el electrodo de trabajo es más rápida que la velocidad a que la especie medible es provista por difusión al electrodo de trabajo.

[00131] En la FIG. 6B se muestra un gráfico de perfil de contorno realizado por unión del valor de corriente final de cada uno de los perfiles de corriente transitorias (es decir el valor final de corriente de cada excitación)

mostrados en la FIG. 6A. El perfil de contorno se puede usar para simular los datos obtenidos por un sistema convencional en estado de equilibrio en el cual el cambio de corriente con tiempo es sustancialmente constante.

[00132] Los perfiles de corriente transitorias obtenidos de las secuencias de pulsos amperométricos regulados y los valores de corriente de contorno derivados son fundamentalmente diferentes de los perfiles de corrientes obtenidos por un análisis convencional que utiliza un solo pulso de lectura. Mientras las corrientes registradas de un solo pulso de lectura deriven de una sola relajación/difusión, cada punto de tiempo en el perfil de contorno de las corrientes transitorias origina de una excitación luego de un proceso de relajación/difusión independiente. Más aun, cuando la longitud de una excitación aumenta, la correlación entre la corriente y la concentración del analito puede disminuir, a menudo debido al efecto del hematocrito. De este modo, la exactitud de un análisis que utiliza excitaciones múltiples y cortas se puede aumentar comparado con un análisis que utiliza un pulso de lectura más largo que tiene la duración de las excitaciones múltiples combinado.

[00133] En referencia a la FIG. 6A de más arriba, se alcanza un punto transitorio 605 en el perfil de corriente cuando el último valor en el tiempo de corriente obtenido de una excitación representa el valor en el tiempo más grande de corriente obtenido de cualquier excitación. De este modo, para la FIG. 6A el punto transitorio se alcanza en aproximadamente 5 segundos. Para cada una de las concentraciones de glucosa, se puede alcanzar el equilibrio respecto a la re-hidratación de DBL al valor de corriente más alto en el perfil de contorno para cada concentración de glucosa. De este modo, cuando las corrientes transitorias de la FIG. 6A se convierten a corrientes de contorno en

la FIG. 6B, la lectura de 610 (el más alto) y 620 (el más bajo) establece que el equilibrio se alcanzó respecto a la difusión de las especies medibles en la DBL y la re-hidratación de la DBL en aproximadamente cinco segundos para la concentración de glucosa de 600 mg/dl.

[00134] Los valores de corriente registrados a una velocidad de difusión relativamente constante minimizan inexactitudes que de otro modo se introducirían por las variaciones en la rehidratación y las velocidades de difusión de los reactivos. De este modo, una vez que se alcanza una velocidad de difusión relativamente constante, los valores de corriente registrados corresponden más exactamente a la concentración de las especies medibles, y por lo tanto al analito. Más aun, para la FIG. 6B, se puede completar el todo el análisis en tan solo siete segundos porque una vez que se conoce el valor de corriente 610 más alto del perfil de contorno, su valor se puede correlacionar directamente con la concentración del analito. Se pueden obtener los puntos de datos adicionales para reducir el error por ruido atribuible al intermediario, como se discute previamente.

[00135] En la FIG. 6C se muestran los perfiles de corriente de contorno realizados de perfiles de corriente transitoria generados por la secuencia de pulsos descrita en la FIG. 5E. Durante cada excitación de 0,25 segundos, se registraron los valores de corriente a la mitad (~0,125 segundos) y al final (~0,25 segundos) que se pueden usar para determinar una constante de decaimiento. Con el uso del pulso inicial más largo con las excitaciones cortas y las relajaciones relativamente largas, el análisis se puede completar en aproximadamente cuatro segundos.

[00136] La FIG. 6D es un gráfico que ilustra la señal de salida en relación a la señal de entrada para un sistema electroquímico que utiliza las secuencias de pulsos amperométricos regulados. Las señales de entrada son potenciales aplicados a una muestra de fluido biológico. Las señales de entrada incluyen una señal de entrada de interrogación y una señal de entrada del ensayo. Las señales de salida son corrientes generadas por la muestra. Las señales de salida incluyen una señal de salida de interrogación y una señal de salida del ensayo. La muestra genera la señal de salida del ensayo por una reacción redox de la glucosa en sangre entera en respuesta a la señal de entrada del ensayo. Las señales de entrada y salida pueden ser para un biosensor que tenga electrodos de trabajo y contador. Se pueden usar otros biosensores incluso aquéllos con electrodos adicionales y configuraciones diferentes. Se pueden medir otras concentraciones de analito incluso aquéllas en otros fluidos biológicos. Se pueden generar otras señales de salida incluso aquellas que decaen inicialmente y aquellas que decaen en todos los pulsos.

[00137] Durante el uso, se deposita una muestra del fluido biológico en un biosensor. El biosensor aplica una señal de interrogación a la muestra desde aproximadamente los -1,25 segundos hasta aproximadamente 0 segundos. Los pulsos tienen un ancho de pulso de aproximadamente 5–10 ms y un intervalo de pulso de aproximadamente 125 ms. El biosensor genera una señal de salida de interrogación en respuesta a la señal de entrada de interrogación. El biosensor mide la señal de salida de interrogación. Los biosensores pueden tener un potencióstato que proporciona la señal de salida de interrogación a la entrada de un dispositivo de comparación analógico.

[00138] Cuando la señal de salida de interrogación es igual a o mayor que un umbral de interrogación, el biosensor aplica la señal de entrada de ensayo a los electrodos desde aproximadamente los 0 segundos hasta aproximadamente los 7 segundos. El valor umbral de interrogación puede ser de aproximadamente 250 nA. El dispositivo de comparación puede comparar la señal de salida de interrogación con el valor del umbral de interrogación. Cuando la señal de salida de interrogación excede el valor del umbral de interrogación, la señal de salida del dispositivo de comparación puede disparar el lanzamiento de la señal de salida del ensayo.

[00139] Durante la señal de entrada del ensayo, el biosensor aplica un ciclo de trabajo con un primer pulso que posee un potencial de aproximadamente 400 mV durante aproximadamente 1 segundos a los electrodos de trabajo y contador. El primer pulso es seguido por una relajación de 0,5 segundos que puede ser esencialmente un circuito abierto o similar. Se mide la señal o corriente de salida de ensayo durante el primer pulso y se almacena en un dispositivo de memoria. El biosensor puede aplicar un segundo pulso a los electrodos de trabajo y contador de aproximadamente 200 mV durante aproximadamente 1 segundos. Se mide la señal o corriente de salida de ensayo del segundo pulso y se almacena en un dispositivo de memoria. El biosensor continúa aplicando pulsos de la señal de entrada de ensayo a los electrodos de trabajo y contador hasta el fin del período del ensayo o tanto como lo desee el biosensor. El período del ensayo puede ser de aproximadamente 7 segundos. El biosensor pueden medir y almacenar la señal o corriente de salida del ensayo en de cada pulso.

[00140] La señal de entrada de interrogación es una señal eléctrica, tal como una corriente o potencial, que se pulsa o se enciende y se apaga con una frecuencia o intervalo fijos. La muestra genera una señal de salida de interrogación en respuesta a la señal de entrada de interrogación. La señal de salida de interrogación es una señal eléctrica, tal como una corriente o potencial. El biosensor puede mostrar la señal de salida de interrogación en una pantalla y/o puede almacenar la señal de salida de ensayo en un dispositivo de memoria. El biosensor puede aplicar la señal de interrogación para detectar cuando una muestra contacta con los electrodos. El biosensor puede utilizar otros métodos y dispositivos para detectar cuando una muestra está disponible para el análisis.

[00141] La señal de entrada de interrogación es un ciclo de trabajo en el que una secuencia de pulsos de interrogación se separan por relajaciones de interrogación. Durante un pulso de interrogación, la señal eléctrica está encendida. Durante una relajación de interrogación, la señal eléctrica está apagada. El encendido puede incluir períodos de tiempo cuando hay una señal eléctrica presente. El apagado puede incluir períodos de tiempo cuando no hay una señal eléctrica presente. El apagado puede incluir períodos de tiempo cuando hay una señal eléctrica presente pero esencialmente no tiene amplitud alguna. La señal eléctrica se puede alternar entre encendida y apagada por cerrado o apertura de un circuito eléctrico, respectivamente. El circuito eléctrico se puede abrir y se puede cerrar mecánicamente, eléctricamente, o similares.

[00142] Una señal de entrada de interrogación puede tener uno o más intervalos de pulsos de interrogación. Un intervalo de pulsos de interrogación es la suma de un pulso de interrogación y una relajación de interrogación. Cada

pulso de interrogación tiene una amplitud y un ancho de pulso de interrogación. La amplitud indica la intensidad del potencial, la corriente, o similar de la señal eléctrica. La amplitud puede variar o ser una constante durante el pulso de interrogación. El ancho de pulso de interrogación es la duración de tiempo de un pulso de interrogación. El ancho de pulso de interrogación en una señal de entrada de interrogación puede variar o ser esencialmente el mismo. Cada relajación de interrogación tiene un ancho de relajación de interrogación que es la duración de tiempo de una relajación de interrogación. El ancho de relajación de interrogación en una señal de entrada de interrogación puede variar o puede ser esencialmente el mismo.

[00143] La señal de entrada de interrogación puede tener un ancho de pulso de interrogación de menos de aproximadamente 300 milisegundos (ms) y un intervalo de pulso de interrogación de menos de aproximadamente 1 segundos. La señal de entrada de interrogación puede tener un ancho de pulso de interrogación de menos de aproximadamente 100 ms y un intervalo de pulso de interrogación de menos de aproximadamente 500 ms. La señal de entrada de interrogación puede tener un ancho de pulso de interrogación en el rango de entre aproximadamente 0,5 ms y aproximadamente 75 ms y un intervalo de pulso de interrogación en el rango de entre aproximadamente 5 ms y aproximadamente 300 ms. La señal de entrada de interrogación puede tener un ancho de pulso de interrogación en el rango de entre aproximadamente 1 ms y aproximadamente 50 ms y un intervalo de pulso de interrogación en el rango de entre aproximadamente 10 ms y aproximadamente 250 ms. La señal de entrada de interrogación puede tener un ancho de pulso de interrogación de aproximadamente 5 ms y un intervalo de pulso de interrogación de

aproximadamente 125 ms. La señal de entrada de interrogación puede tener otros anchos de pulso e intervalos de pulso.

[00144] El biosensor pueden aplicar la señal de entrada de interrogación a la muestra durante un período de interrogación. El período de interrogación puede ser menos de aproximadamente 15 minutos, 5 minutos, 2 minutos, o 1 minuto. El período de interrogación puede ser más largo según como utilice el biosensor el usuario. El período de interrogación puede estar en el rango de entre aproximadamente 0,5 segundos (segundos) y aproximadamente 15 minutos. El período de interrogación puede estar en el rango de entre aproximadamente 5 segundos y aproximadamente 5 minutos. El período de interrogación puede estar en el rango de entre aproximadamente 10 segundos y aproximadamente 2 minutos. El período de interrogación puede estar en el rango de entre aproximadamente 20 segundos y aproximadamente 60 segundos. El período de interrogación puede estar en el rango de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 40 segundos. El período de interrogación puede tener menos de aproximadamente 200, 100, 50, ó 25 intervalos de pulsos. El período de interrogación puede tener entre aproximadamente 2 y aproximadamente 150 intervalos de pulsos. El período de interrogación puede tener entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 intervalos de pulsos. El período de interrogación puede tener entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15 intervalos de pulsos. El período de interrogación puede tener aproximadamente 10 intervalos de pulsos. Se pueden usar otros períodos de interrogación.

[00145] El biosensor aplica la señal de entrada de ensayo cuando la señal de salida de interrogación es igual a o mayor que un umbral de interrogación.

El umbral de interrogación puede ser mayor que aproximadamente 5 por ciento (%) de la señal de entrada de ensayo esperada al principio del primer pulso. El umbral de interrogación puede ser mayor que aproximadamente 15% de la señal de entrada de ensayo esperada al principio del primer pulso. El umbral de interrogación puede estar en el rango de entre aproximadamente 5 por ciento (%) y aproximadamente 50% de la señal de entrada de ensayo esperada al principio del primer pulso. Se pueden usar otros umbrales de interrogación. El biosensor pueden indicar en una pantalla si la señal de salida de interrogación es igual a o mayor que el umbral de interrogación.

[00146] La señal de entrada de ensayo es una señal eléctrica, tal como una corriente o potencial, que se pulsa o se enciende y se apaga a una frecuencia o intervalo fijos. La muestra genera una señal de salida de ensayo en respuesta a la señal de entrada de ensayo. La señal de salida de ensayo es una señal eléctrica, tal como una corriente o potencial.

[00147] La señal de entrada de ensayo es una secuencia de pulsos de ensayo separada por las relajaciones de ensayo. Durante un pulso de ensayo, la señal eléctrica está encendida. Durante la relajación del ensayo, la señal eléctrica está apagada. El encendido incluye los períodos de tiempo cuando hay una señal eléctrica presente. El apagado incluye los períodos de tiempo cuando no hay una señal eléctrica presente y no incluye los períodos de tiempo cuando hay una señal eléctrica presente pero no tiene esencialmente amplitud alguna. La señal eléctrica alterna entre encendida y apagada por cerrado y apertura de un circuito eléctrico, respectivamente. El circuito eléctrico se puede abrir y se puede cerrar mecánicamente, eléctricamente, o de modo similar.

[00148] Una señal de entrada de ensayo puede tener uno o más intervalos de pulsos de ensayo. Un intervalo de pulsos de ensayo es la suma de un pulso de ensayo y una relajación de ensayo. Cada pulso de ensayo tiene una amplitud y un ancho de pulso de ensayo. La amplitud indica la intensidad del potencial, la corriente, o similares de la señal eléctrica. La amplitud puede variar o puede ser una constante durante el pulso de ensayo. El ancho de pulso de ensayo es la duración de tiempo de un pulso de ensayo. Los anchos de pulso de ensayo en una señal de entrada de ensayo pueden variar o pueden ser esencialmente el mismo. Cada relajación de ensayo tiene un ancho de relajación de ensayo, que es la duración de tiempo de una relajación de ensayo. Los anchos de relajación de ensayo en una señal de entrada de ensayo pueden variar o pueden ser esencialmente el mismo.

[00149] La señal de entrada de ensayo puede tener un ancho de pulso de ensayo de menos de aproximadamente 5 segundos y un intervalo de pulso de ensayo de menos de aproximadamente 15 segundos. La señal de entrada de ensayo puede tener un ancho de pulso de ensayo de menos de aproximadamente 3, 2, 1,5 ó 1 segundos y un intervalo de pulso de ensayo de menos de aproximadamente 13, 7, 4, 3, 2,5 ó 1,5 segundos. La señal de entrada de ensayo puede tener un ancho de pulso de ensayo en el rango de entre aproximadamente 0,1 segundos y aproximadamente 3 segundos y un intervalo de pulso de ensayo en el rango de entre aproximadamente 0,2 segundos y aproximadamente 6 segundos. La señal de entrada de ensayo puede tener un ancho de pulso de ensayo en el rango de entre aproximadamente 0,1 segundos y aproximadamente 2 segundos y un intervalo de pulso de ensayo en el rango de entre aproximadamente 0,2 segundos y

aproximadamente 4 segundos. La señal de entrada de ensayo puede tener un ancho de pulso de ensayo en el rango de entre aproximadamente 0,1 segundos y aproximadamente 1,5 segundos y un intervalo de pulso de ensayo en el rango de entre aproximadamente 0,2 segundos y aproximadamente 3,5 segundos. La señal de entrada de ensayo puede tener un ancho de pulso de ensayo en el rango de entre aproximadamente 0,4 segundos y aproximadamente 1,2 segundos y un intervalo de pulso de ensayo en el rango de entre aproximadamente 0,6 segundos y aproximadamente 3,7 segundos. La señal de entrada de ensayo puede tener un ancho de pulso de ensayo en el rango de aproximadamente entre 0,5 segundos y aproximadamente 1,5 segundos y un intervalo de pulso de ensayo en el rango de entre aproximadamente 0,75 segundos y aproximadamente 2,0 segundos. La señal de entrada de ensayo puede tener un ancho de pulso de ensayo de aproximadamente 1 segundos y un intervalo de pulso de ensayo de aproximadamente 1,5 segundos. La señal de entrada de ensayo puede tener otros anchos e intervalos de pulsos.

[00150] El biosensor aplica la señal de entrada de ensayo a la muestra durante un período de ensayo. El período de ensayo puede tener una duración igual o diferente que el período de interrogación. El período de ensayo de la señal de entrada al ensayo puede ser menor de aproximadamente 180, 120, 90, 60, 30, 15, 10 o 5 segundos. El período de ensayo puede estar en el rango de entre aproximadamente 1 segundo y aproximadamente 100 segundos. El período de ensayo puede estar en el rango de entre aproximadamente 1 segundo y aproximadamente 25 segundos. El período de ensayo puede estar en el rango de entre aproximadamente 1 segundo y aproximadamente 10

segundos. El período de ensayo puede estar en el rango de entre aproximadamente 2 segundos y aproximadamente 3 segundos. El período de ensayo puede ser de aproximadamente 2,5 segundos. El período de ensayo puede tener menos de aproximadamente 50, 25, 20, 15, 10, 8, 6, o 4 intervalos de pulso de ensayo. El período de ensayo puede tener los intervalos de pulso de ensayo en el rango de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50. El período de ensayo puede tener intervalos de pulso de ensayo en el rango de aproximadamente entre 2 y aproximadamente 25. El período de ensayo puede tener intervalos de pulso de ensayo en el rango entre aproximadamente 2 y aproximadamente 15. El periodo de ensayo puede tener aproximadamente 10 intervalos de pulso de ensayo. Se pueden usar otros períodos de ensayo.

[00151] Las FIGs. 7A y 7B son gráficos que ilustran las mejoras en la exactitud de la medición cuando un DBL se combina con un pulso de lectura corto. Las muestras de sangre completa se combinaron con ferrocianuro en una proporción de dilución de 1:5 para representar una concentración de glucosa subyacente y se midió con un pulso de lectura de 1 segundo. De esa manera, las muestras de WB de hematocrito inicial de 20%, 40%, y 60% se diluyeron a 16%, 32%, y 48% de hematocrito (una reducción del 20% de los tres valores de hematocrito). Las líneas de 20%, 40%, y 60% representan la corriente medida para las muestras de sangre que contienen 16%, 32%, y 48% de hematocrito, respectivamente.

[00152] La FIG. 7A muestra las inexactitudes introducidas a través del efecto hematocrito y otros efectos para una tira sensora de conductor descubierto que carece de DBL. La inexactitud se representa como la diferencia entre las líneas de hematocrito de 20% y 60% (la amplitud total de la

dispersión del hematocrito) y representa la máxima inexactitud en la medición atribuible al efecto hematocrito. Valores de dispersión más pequeños representan un resultado más preciso. Un desempeño similar se observó cuando se usó un DBL con un pulso de lectura más largo como se discutió más arriba con respecto a la FIG. 4A.

[00153] Por el contrario, la FIG. 7B muestra una marcada disminución en la distancia entre las líneas de calibración de 20% y 60% cuando se combina un DBL con un pulso de lectura de 1 segundo. Se imprimió un DBL distinto de polímero PEO y 10% de KCl (sin reactivos) sobre un conductor como el que se usó para la FIG. 7A de más arriba. La amplitud total de la dispersión de hematocrito con DBL/ pulso de lectura corto fue de casi dos tercios menos que la amplitud total de la dispersión sin el DBL. De esa manera, las secuencias de pulsos que incluyen múltiples ciclos de trabajo en combinación con un DBL pueden incrementar significativamente la exactitud de las medidas y proveer una reducción deseable del ruido de intermediario.

[00154] Las FIGs. 7C y 7D ilustran la reducción en la dispersión de hematocrito que se puede obtener cuando se combina una secuencia de pulsos amperométricos regulados con una DBL. La FIG. 7C demuestra que la dispersión en las medidas atribuibles al efecto hematocrito está dentro de $\pm 5\%$ cuando se combinó una DBL con la secuencia de pulsos de la FIG. 5E y los valores de corriente se registraron a 14,875 segundos o 0,125 segundos a partir del último pulso. Como comparación, la FIG. 7D establece que la dispersión se incrementa en un $\pm 15\%$ cuando se usa para determinar la concentración de glucosa de la muestra el valor de corriente a los 16 segundos (1,25 segundos a partir del último pulso). De esa manera, cuanto más larga la

duración de la excitación, mayor es la dispersión del hematocrito que se observa.

[00155] Además de la capacidad de la presente invención para reducir la inexactitud debida al efecto hematocrito y al ruido de la señal del intermediario, se puede usar la combinación del perfil de corriente transitoria de cada excitación y los perfiles de contorno resultantes para proveer múltiples configuraciones de constantes de calibración al sistema sensor, incrementando de esa manera la exactitud del análisis. Cada grupo de constantes de calibración obtenido se puede usar para correlacionar una lectura de corriente específica con una concentración específica de especie medible en la muestra. De esa manera, es un aspecto, se puede obtener un incremento en la exactitud promediando los valores de la glucosa que se obtienen usando múltiples configuraciones de constantes de calibración.

[00156] Los sistemas convencionales de sensores electroquímicos generalmente usan un grupo de constantes de calibración, tal como la pendiente y la intercepción, para convertir las lecturas de corriente en concentraciones del analito correspondientes en la muestra. Sin embargo, un grupo simple de constantes de calibración puede resultar en inexactitudes en la concentración que se determina del analito a partir de valores de corriente registrados debido al ruido al azar que se incluye en la medida.

[00157] Tomando el valor de corriente a un tiempo fijo dentro de cada ciclo de trabajo de las secuencias de pulsos de la presente invención, se pueden establecer múltiples grupos de de constantes de calibración. La FIG. 8 grafica las corrientes de punto final registradas a 8,5, 10, 11,5, 13 y 14,5 segundos (ciclos de trabajo 6-9 y primera porción del pulso de lectura terminal)

cuando la secuencia de pulsos que se representa en la FIG. 5B se aplicó a muestras de WB que contienen diferentes concentraciones de glucosa. Cada una de estas cinco líneas de calibración son independientes una de la otra y se pueden usar en al menos dos manera.

[00158] Primero, se pueden usar múltiples configuraciones de constantes de calibración para determinar el número de ciclos de trabajo que se debería aplicar durante la secuencia de pulsos para obtener la exactitud, precisión y tiempo de ensayo que se desean. Por ejemplo, si los valores de corriente que se obtienen a partir de las primeras tres excitaciones indican una alta concentración de glucosa, tal como por ejemplo >150 o 200 mg/dl, el sistema sensor puede terminar el análisis en aproximadamente 5,5 segundos, acortando considerablemente de esa manera el tiempo que se requiere para el análisis. Dicho acortamiento puede ser posible debido a la imprecisión a altas concentraciones de glucosa es típicamente menor que a menores concentraciones de glucosa. Por el contrario, si los valores de corriente que se obtiene de las primeras tres excitaciones indican una concentración de glucosa baja, como por ejemplo ≤ 150 o 100 mg/dl, el sistema sensor puede extender el análisis a tanto como 7, o tanto como 8 ó 10 segundos, para incrementar la exactitud y/o precisión del análisis.

[00159] Segundo, se pueden usar las múltiples configuraciones de constantes de calibración para incrementar la exactitud y/o precisión del análisis, promediando. Por ejemplo, si el tiempo de medida de glucosa objetivo es 11,5 segundos, se puede utilizar la corrientes a 8,5, 10 y 11,5 segundos para calcular las concentraciones de glucosa usando las pendientes e intercepciones de las líneas de calibración correspondientes; por lo tanto, $G_{8,5} =$

$(i_{8,5} - \text{Int}_{8,5})/\text{Pendiente}_{8,5}$, $G_{10} = (i_{10} - \text{Int}_{10})/\text{Pendiente}_{10}$, y $G_{11,5} = (i_{11,5} - \text{Int}_{11,5})/\text{Pendiente}_{11,5}$. Teóricamente, estos tres valores de glucosa deberían ser equivalentes, difiriendo solamente por variaciones al azar. De esa manera, se pueden promediar los valores de glucosa $G_{8,5}$, G_{10} , y $G_{11,5}$ y se puede calcular el valor de glucosa final a partir de $(G_{8,5} + G_{10} + G_{11,5})/3$. El promedio de los valores de las líneas de calibración puede proveer una reducción en el ruido a la velocidad de $1/\sqrt{3}$.

[00160] Un beneficio inesperado de las secuencias de pulsos amperométricos regulados que incluyen excitaciones relativamente cortas y relajaciones relativamente largas, como por ejemplo la que se representa en la FIG. 5E, es la capacidad para simplificar la calibración. Mientras que las múltiples configuraciones de constantes de calibración que se pueden obtener a partir de los transitorios y de los perfiles de contorno pueden proveer una ventaja a la exactitud del análisis, una secuencia de pulsos como la que se representa en la FIG. 5E puede proveer una exactitud similar a la que se obtiene cuando se usan múltiples configuraciones de constantes de calibración a partir de un grupo de constantes de calibración individual. A pesar de que no se intenta estar ligado a ninguna teoría, este resultado se puede atribuir a los tiempos de relajación relativamente largos en comparación con las cortas relajaciones. Los tiempos de relajación largos pueden proveer un estado en donde la velocidad promedio de conversión de la especie medible durante la excitación está balanceada con la velocidad de difusión de la especie medible en la DBL. De esta manera, se pueden colapsar las múltiples configuraciones de constantes de calibración en un grupo simple y se puede simplificar la conversión de los datos registrados en una concentración de analito llevando a

cabo el proceso de promediar sobre los datos de corriente registrada antes de determinar la concentración del analito.

[00161] La combinación del perfil de corriente transitoria de cada excitación y los perfiles de contorno resultantes también se puede usar para determinar si la tira sensora está sin llenar con muestra, permitiendo de esa manera al usuario agregar muestra adicional a la tira sensora. Además de los electrodos de trabajo y contador, sistemas sensores convencionales pueden determinar una condición de sub-llenado a través del uso de un tercer electrodo o par de electrodos; sin embargo, el tercer electrodo o par de electrodos agrega complejidad y costo al sistema sensor.

[00162] Los sistemas convencionales de dos electrodos pueden ser capaces de reconocer que un análisis está “mal”, pero pueden no determinar si la razón del análisis fallido fue causado por un sub-llenado o por una tira sensora defectuosa. La capacidad para determinar si el sub-llenado causó la falla del análisis es beneficiosa debido a que se puede corregir mediante el agregado de muestra adicional a la misma tira y repetir el análisis, previniendo de esa manera a que una buena tira sea descartada.

[00163] La FIG. 9A representa los perfiles de corriente transitorias que se obtienen de la secuencia de pulsos que se representó en la FIG. 5B para 10 análisis, cada uno usando una tira sensora diferente, en donde se introdujo 2,0 μl de muestra a la tira. Dependiendo de la velocidad de llenado y del volumen de espacio debajo de la tapa de una tira sensora específica, 2,0 μl de muestra pueden ser suficientes o no para llenar la tira.

[00164] En la FIG. 9B los perfiles de corriente transitoria de la FIG. 9A se convirtieron a perfiles de contorno de decaimiento de velocidad como función

del tiempo. En un aspecto, la velocidad de decaimiento se puede representar como una constante K determinada por cualquiera de las siguientes ecuaciones:

$$K_1 = \frac{\ln(i_{0,125}) - \ln(i_{1,0})}{\ln(t_{0,125}) - \ln(t_{1,0})}$$

$$K_2 = \frac{\ln(i_{0,5}) - \ln(i_{1,0})}{\ln(t_{0,5}) - \ln(t_{1,0})}$$

donde los valores de 0,125, 0,5, y 1,0 están en segundos. De esa manera, usando la constante K de decaimiento de un proceso, los perfiles de corriente de la FIG. 9A se pueden convertir en los perfiles de decaimiento de la FIG. 9B.

[00165] La FIG. 9B establece que existe una diferencia sustancial entre los perfiles de decaimiento de sensores sin llenar y de sensores llenado normalmente, especialmente en el rango de tiempo entre 3 y 7 segundos. El sub-llenado se puede determinar a partir de los perfiles de constante de decaimiento comparando la diferencia entre la constante real de decaimiento y un valor seleccionado previamente. Por ejemplo, si se selecciona -0,1 como límite superior para un sensor normalmente llenado con respecto a la FIG. 9B, cualquier constante K_1 que tenga un valor menor a -0,1 determinada a partir de las excitaciones durante el periodo de tiempo entre 3 y 5 segundos, se puede considerar como llenado normal. De manera similar, cualquier sensor que tenga un valor de K_1 mayor a -0,1 se puede considerar como sub-llenado. De esta manera, se puede determinar el sub-llenado en respuesta a una velocidad de decaimiento obtenida a partir de un perfil de corriente transitoria.

[00166] De esa manera, en la FIG. 9B las tiras sensoras representadas por las series 3 y 8 estaban suficientemente llenas, mientras que ocho tiras sensoras representadas por las series 1-2, 4-7, y 9-10 estaban sin llenar. De

esta manera, secuencias de pulsos amperométricos regulados de la presente invención permiten la detección de sub-llenado en una tira sensora de dos electrodos, una función que típicamente requiere un tercer electrodo para sistemas sensores convencionales. Más aún, la determinación de sub-llenado se hizo en menos de diez segundos, lo que provee tiempo para que el dispositivo de medición le avise al usuario, como por ejemplo mediante el envío de una señal a un dispositivo que emita luz a una pantalla, que agregue más muestra a la tira.

[00167] Debido a que el sub-llenado se puede determinar a partir de los perfiles de corriente transitoria, los mismos valores de corriente que se usan para determinar la presencia y/o concentración del analito se pueden usar para determinar si existe una condición de sub-llenado. De esa manera, se puede determinar el sub-llenado durante los múltiples ciclos de trabajo de la secuencia de pulsos sin alargar la duración del análisis electroquímico más allá de lo que se requiere para la determinación de la concentración.

[00168] La combinación del perfil de corriente transitoria de cada excitación y el perfil de contorno resultante también se pueden usar para determinar si un cambio en la temperatura de la muestra puede afectar adversamente al análisis. Los sistemas sensores convencionales incluyen un termistor en el dispositivo de medición o sobre la tira para proveer la temperatura del dispositivo o tira, respectivamente. Mientras que esta temperatura es una aproximación de la temperatura de la muestra, típicamente, el dispositivo o tira está a una temperatura diferente que la de la muestra. La diferencia de temperatura entre el dispositivo o tira y la muestra puede introducir una desviación en el análisis.

[00169] Mediante la determinación de una velocidad de decaimiento, tal como con una constante K como se discutió previamente, se puede determinar la temperatura de la muestra. La FIG. 10 representa constantes K graficadas en función de la temperatura, las que se obtuvieron a partir de la quinta excitación de una secuencia de pulsos para concentraciones de glucosa de 50, 100 y 400 mg/dl. Las gráficas establecen que la velocidad de decaimiento se incrementa en valor absoluto con el incremento de la temperatura. Sin pretender estar ligado a una teoría en particular, este fenómeno se puede atribuir a las bajas temperaturas que detienen la velocidad de difusión de los diferentes constituyentes presentes en el espacio debajo de la tapa. De esta manera, se puede determinar la temperatura de una muestra en respuesta a una velocidad de decaimiento que se obtiene a partir de un perfil de corriente transitoria.

[00170] Debido a que la temperatura de la muestra se puede determinar a partir de los perfiles de corriente transitoria, los mismos valores de corriente que se usaron para determinar la presencia y/o concentración del analito se pueden usar para determinar la temperatura de la muestra. De esa manera, la temperatura de la muestra se puede determinar durante los múltiples ciclos de trabajo de la secuencia de pulsos sin alargar la duración del análisis electroquímico más allá de lo que se requiere para la determinación de la concentración.

[00171] En un aspecto, la temperatura de la muestra se puede determinar resolviendo K a partir de la siguiente ecuación:

$$K = \frac{\ln i_{0.125} - \ln i_{0.375}}{\ln(0.125) - \ln(0.375)}$$

donde $i_{0,125}$ e $i_{0,375}$ son las corrientes a 0,125 y 0,375 segundos de la excitación más sensible al cambio de temperatura, tal como la excitación que genera el decaimiento de corriente más sensible con respecto al cambio de temperatura. $\ln(0,125)$ y $\ln(0,375)$ son los términos logarítmicos naturales de los tiempos a 0,125 y 0,375 segundos, respectivamente. A partir del gráfico de estas constantes K versus la temperatura, como se representó en la FIG. 10, la temperatura de la muestra se puede determinar por medio de la función de correlación del gráfico. La función de correlación puede ser un ajuste polinómico de la curva. La temperatura que se determina a partir de este gráfico puede ser diferente de la temperatura del dispositivo y puede reflejar más exactamente la temperatura de la muestra.

[00172] Una ventaja de determinar la temperatura de la muestra, en oposición a la del dispositivo, es que la duración del análisis se puede ajustar para permitir un tiempo suficiente para la rehidratación de un DBL para llegar al equilibrio, incrementando de esa manera la exactitud del análisis. Por ejemplo, si la temperatura determinada de la muestra durante la secuencia de pulsos es al menos 5 o 10° C por debajo de la temperatura ambiente, la secuencia de pulsos puede prolongarse, como por ejemplo con ciclos de trabajo adicionales.

[00173] La FIG. 11 es una representación esquemática de un dispositivo de medición 1100 que incluye contactos 1120 en comunicación eléctrica con un circuito eléctrico 1110 y una pantalla 1130. En un aspecto, el dispositivo de medición 1100 es portátil y se adapta para ser de mano y para recibir una tira sensora, como por ejemplo la tira 100 de la FIG. 1A. En otro aspecto, el dispositivo de medición 1100 es un dispositivo de medición de mano adaptado

para recibir una tira sensora e implementar secuencias de pulsos amperométricos regulados.

[00174] Los contactos 1120 se adaptan para proveer comunicación eléctrica con el circuito eléctrico 1110 y los contactos de una tira sensora, como por ejemplo los contactos 170 y 180 de la tira sensora 100 que se representa en la FIG. 1B. El circuito eléctrico 1110 puede incluir un cargador eléctrico 1150, un procesador 1140, y un medio de almacenamiento accesible por computadora 1145. El cargador eléctrico 1150 puede ser un potenciómetro, generador de señal, o similar. De esa manera, el cargador 1150 puede aplicar una tensión a los contactos 1120 a la vez que registra la corriente resultante para funcionar como un cargador-registrador.

[00175] El procesador 1140 puede estar en comunicación eléctrica con el cargador 1150, el medio de almacenamiento accesible por computadora 1145, y la pantalla 1130. Si el cargador no se adapta para registrar la corriente, el procesador 1140 se puede adaptar para registrar la corriente en los contactos 1120.

[00176] El medio de almacenamiento accesible por computadora 1145 puede ser cualquier medio de almacenamiento, como por ejemplo magnético, óptico, de memoria semiconductora y similar. El medio de almacenamiento accesible por computadora 1145 puede ser un dispositivo de memoria fijo o un dispositivo de memoria renovable, como por ejemplo una tarjeta de memoria renovable. La pantalla 1130 puede ser analógica o digital, en un aspecto una pantalla de LCD adaptada para mostrar una lectura numérica.

[00177] Cuando los contactos de una tira sensora que contiene una muestra están en comunicación eléctrica con los contactos 1120, el procesador

1140 puede dirigir al cargador 1150 para aplicar una secuencia de pulsos amperométricos regulados a la muestra, comenzando de esa manera el análisis. El procesador 1140 puede comenzar el análisis en respuesta a la inserción de una tira sensora, la aplicación de una muestra a una tira sensora insertada previamente, o en respuesta a una entrada del usuario, por ejemplo.

[00178] Las instrucciones con respecto a la implementación de la secuencia de pulsos amperométricos regulados pueden proveerse mediante un código de programa accesible por computadora almacenado en el medio de almacenamiento accesible por computadora 1145. El código puede ser un código objeto o cualquier otro código que describa o controle la funcionalidad que se describe en esta solicitud. Los datos que resultan de la secuencia de pulsos amperométricos regulados se pueden someter a uno o más tratamientos de datos, incluyendo la determinación de velocidades de decaimiento, constantes K, pendientes, intercepciones, y/o temperatura de muestra en el procesador 1140 y los resultados, tal como una concentración de analito corregida, mostrados en la pantalla 1130. Como en el caso de las instrucciones con respecto a la secuencia de pulsos, el tratamiento de datos se puede implementar a través del procesador 1140 a partir del código de programa accesible por computadora almacenado en el medio de almacenamiento accesible por computadora 1145.

[00179] Sin limitar el alcance, aplicación, o implementación, los métodos y sistemas que se describen previamente se pueden implementar usando el siguiente algoritmo:

[00180] Paso 1: Encender el biosensor

[00181] Paso 2: Llevar a cabo el auto-chequeo del biosensor

[00182]	Paso 3:	Configurar una interrogación para la aplicación de muestra al sensor
		Configurar el potencial ASIC a $V_{interrogación}$
		Configurar nivel umbral de ASIC a $I_{disparador}$
		Configurar de reloj periódico de interrogación para que finalice en $int_{interrogación}$
[00183]	Paso 4:	Configuración para ensayar la corriente de sensor
		Esperar para que termine el reloj periódico de interrogación
		Habilitar bomba de carga ASIC
		Habilitar detector umbral ASIC ($I_{disparador}$)
		Habilitar potencial de interrogación ($V_{interrogación}$)
		Seleccionar canal sensor que aplica potencial al sensor
[00184]	Paso 5:	Esperar para tiempo de resolución $t_{interrogación}$
		Probar si la corriente del sensor excede el umbral
[00185]	Paso 6:	Demorar y probar la corriente de sensor otra vez
[00186]	Paso 7:	Al detectar la aplicación de la muestra:
		comenzar a contar el tiempo
		lanzar la secuencia de pulsos

- [00187]** Paso 8: Pulso 1 – Medida de corrientes de sensor $i_{1,1}$ e $i_{1,8}$
- Pulso 1 comienza a tiempo t_{p1}
 Configurar duración de Pulso 1 a d_{p1}
 Configurar potencial de sensor de Pulso 1 a V_{p1}
 Seleccionar canal sensor para aplicar potencial al sensor
 A tiempo $t_{1,1}$, medir señal de sensor, guardar valor como AD_{S11}
 A tiempo $t_{1,8}$, medir señal de sensor, guardar valor como AD_{S18}
- [00188]** Paso 9: Retraso 1 – Re-estandarizar la electrónica
- Retraso 1 comienza al final de lectura AD_2 , desconectar canal sensor
 Retraso 1 finaliza al comienzo de Pulso 2
 Configurar potencial a $V_{\text{estandarizar}}$
 A tiempo t_{c1} , seleccionar canal resistor de referencia luego medir señal, guardar valor como AD_{R1}
 A tiempo t_{c2} , seleccionar canal de compensación luego medir señal, guardar valor como AD_{O1}

Nota: corrientes de sensor que comienzan en Pulso 1 se calculan a partir de medidas de AD_{R1} y AD_{O1}

[00189]

Paso 10:

Pulso 2 - Medida de corrientes de sensor $i_{2,1}$ y

$i_{2,8}$

Pulso 2 comienza a tiempo t_{p2}

Configurar duración de Pulso 2 a d_{p2}

Configurar potencial sensor de Pulso 2 a v_{p2}

Seleccionar canal sensor para aplicar potencial a sensor

A tiempo $t_{2,1}$, medir señal de sensor, guardar valor como AD_{S21}

A tiempo $t_{2,8}$, medir señal de sensor, guardar valor como AD_{S28}

[00190]

Paso 11:

Retraso 2 –

Retraso 2 comienza al final de lectura AD_{S3} , desconectar canal sensor

Retraso 2 finaliza al comienzo de Pulso 3

Seleccionar canal de compensación para desconectar sensor

[00191]

Paso 12:

Pulso 3 - Medida de corrientes de sensor: $i_{3,1}$

y $i_{3,8}$

Pulso 3 comienza a tiempo t_{p3}

Configurar duración de Pulso 3 a d_{p3}

Configurar potencial sensor de Pulso 3 a v_{p3}

- Seleccionar canal sensor para aplicar potencial a sensor
- A tiempo $t_{3,1}$, medir señal de sensor, guardar valor como AD_{S31}
- A tiempo $t_{3,8}$, medir señal de sensor, guardar valor como AD_{S38}
- [00192]** Paso 13: Retraso 3 – T_1 e $i_{húmedo}$
- Retraso 3 comienza al final de lectura AD_{S38} , desconectar canal sensor
- Retraso 3 finaliza al comienzo de Pulso 4
- Configurar potencial a $V_{estandarizar}$
- A tiempo t_{c3} , seleccionar canal termistor luego medir señal, guardar valor como AD_{T1}
- A tiempo $t_{húmedo}$, seleccionar canal de compensación luego medir señal, guardar valor como $AD_{húmedo}$
- [00193]** Paso 14: Pulso 4 - Medida de corrientes de sensor: $i_{4,1}$, $i_{4,4}$, y $i_{4,8}$
- Pulso 4 comienza a tiempo t_{p4}
- Configurar duración de Pulso 4 a d_{p4}
- Configurar potencial sensor de Pulso 4 a v_{p4}
- Seleccionar canal sensor para aplicar potencial a sensor
- A tiempo $t_{4,1}$, medir señal de sensor, guardar valor como AD_{S41}

- A tiempo $t_{4,4}$, medir señal de sensor, guardar valor como AD_{S44}
- A tiempo $t_{4,8}$, medir señal de sensor, guardar valor como AD_{S48}
- [00194]** Paso 15: Retraso 4 –
Retraso 4 comienza al final de lectura AD_{S48} , desconectar canal sensor
Retraso 4 finaliza al comienzo de Pulso 5
Seleccionar canal de compensación para desconectar sensor
- [00195]** Paso 16: Pulso 5 - Medida de corrientes de sensor: $i_{5,1}$, $i_{5,4}$, y $i_{5,8}$
Pulso 5 comienza a tiempo t_{p5}
Configurar duración de Pulso 5 a d_{p5}
Configurar potencial sensor de Pulso 5 a v_{p5}
Seleccionar canal sensor para aplicar potencial a sensor
A tiempo $t_{5,1}$, medir señal de sensor, guardar valor como AD_{S51}
A tiempo $t_{5,4}$ medir señal de sensor, guardar valor como AD_{S54}
A tiempo $t_{5,8}$, medir señal de sensor, guardar valor como AD_{S58}
Deshabilitar funciones analógicas ASIC

- [00196]

Paso 17:

Buscar pendiente e intercepción para número de calibración de lote

S = Valor de pendiente para corriente número de calibración de lote

Int = Valor de Intercepción para corriente de número de calibración de lote
- [00197]

Paso 18:

Ajustar pendiente e intercepción para efecto de temperatura
- [00198]

Paso 19:

Calcular concentración de glucosa a 25°C
- [00199]

Paso 20:

Convertir a referencia objetivo (plasma vs. referencia WB)
- [00200]

Paso 21:

Revisar sub-llenado
- [00201]

Paso 22:

Revisar para “Comportamiento Anormal”
- [00202]

Paso 23:

Si la glucosa es baja, revisar otra vez para “Comportamiento Anormal”
- [00203]

Paso 25:

Revisar para niveles extremos de glucosas
- [00204]

Paso 26:

Mostrar resultado
- [00205]

El algoritmo puede tener otras sub-rutinas que incluyen aquellas para revisar errores tal como los de temperatura y condiciones de sub-llenado. Las constantes que se pueden usar en el algoritmo se dan en la Tabla III más adelante. Se pueden usar otras constantes.

[00206]

Constante	Descripción	Valor	Unidades
v_{poll}	tensión de interrogación	400	mV
int_{poll}	intervalo de interrogación	125	ms

Constante	Descripción	Valor	Unidades
t_{poll}	duración de interrogación	10	minutos
$i_{trigger}$	detección de umbral de corriente de disparo	250	nA
t_{p1}	tiempo de comienzo de pulso 1	0	segundos
d_{p1}	duración de pulso 1	1	segundos
v_{p1}	nivel de tensión de pulso 1	400	mV
$t_{1,1}$	tiempo de lectura corriente sensor 1	0,125	segundos
$t_{1,8}$	tiempo de lectura corriente sensor 2	1,00	segundos
t_{c1}	tiempo lectura compensación	1,125	segundos
t_{c2}	tiempo lectura Referencia	1,25	segundos
t_{p2}	tiempo de comienzo de pulso 2	1,5	segundos
d_{p2}	duración de pulso 2	1	segundo
v_{p2}	nivel de tensión de pulso 2	200	mV
$t_{2,1}$	tiempo de lectura corriente sensor 3	1,625	segundos
$t_{2,8}$	tiempo de lectura corriente sensor 4	2,50	segundos
t_{p3}	tiempo de comienzo de pulso 3	3	segundos
d_{p3}	duración de pulso 3	1	segundo
v_{p3}	nivel de tensión pulso 3	200	mV
$t_{3,1}$	tiempo de lectura de corriente de sensor 5	3,125	segundos
$t_{3,8}$	tiempo de lectura de corriente de sensor 6	4,00	segundos
t_{c3}	tiempo de lectura de termistor	4,125	segundos
$t_{húm}$	Tiempo de lectura corriente sensor húmedo	4,25	segundos
t_{p4}	tiempo de comienzo pulso 4	4,5	segundos

Constante	Descripción	Valor	Unidades
d_{p4}	duración de pulso 4	1	segundos
v_{p4}	nivel de tensión de pulso 4	200	mV
$t_{4,1}$	tiempo de lectura de corriente de sensor 7	4,625	segundos
$t_{4,4}$	tiempo de lectura de corriente de sensor 8	5,00	segundos
$t_{4,8}$	tiempo de lectura de corriente de sensor 9	5,50	segundos
t_{p5}	tiempo de comienzo de pulso 5	6	segundos
d_{p5}	duración de pulso 5	1	segundos
v_{p5}	nivel de tensión de pulso 5	200	mV
$t_{5,1}$	tiempo de lectura de corriente de sensor 10	6,125	segundos
$t_{5,4}$	tiempo de lectura de corriente de sensor 11	6,50	segundos
$t_{5,8}$	tiempo de lectura de corriente de sensor 12	7,00	segundos

TABLA III

[00207] A pesar de que se han descrito diferentes realizaciones de la invención, será evidente para aquellos expertos en la materia que son posibles otras realizaciones e implementaciones dentro del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES:

1. Un método para determinar la concentración de un analito en una muestra, que comprende:

aplicar una secuencia de pulsos a la muestra, donde dicha secuencia de pulsos comprende al menos 3 ciclos de trabajo en 180 segundos; y

determinar la concentración del analito en la muestra.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la concentración determinada del analito a partir del método incluye menos dispersión atribuible a ruido del intermediario que una concentración del analito determinada a partir de otro método que carece de la secuencia de pulsos que comprende al menos 3 ciclos de trabajo en 180 segundos.

3. El método de la reivindicación 1, en donde la concentración del analito determinada a partir del método incluye menos dispersión atribuible a ruido del intermediario que una concentración de analito determinada a partir del mismo método careciendo de la secuencia de pulsos que comprende al menos 3 ciclos de trabajo en 180 segundos.

4. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra es un líquido que comprende un fluido biológico.

5. El método de la reivindicación 1, en donde el analito es glucosa.

6. El método de la reivindicación 1, en donde cada uno de los ciclos de trabajo comprende una excitación a un potencial fijo y una relajación.

7. El método de la reivindicación 6, en donde se registra un valor de corriente durante cada una de las excitaciones.

8. El método de la reivindicación 1, en donde la secuencia de pulsos comprende un pulso de lectura terminal.

9. El método de la reivindicación 1, en donde la secuencia de pulsos se aplica a una tira sensora que incluye una capa de barrera de difusión sobre un electrodo de trabajo.

10. El método de la reivindicación 1, que comprende la medición de las corrientes resultantes y la determinación de una pluralidad de puntos de calibración a partir de las corrientes.

11. El método de la reivindicación 10, en donde la duración de las secuencias de pulso se determina a partir de la pluralidad de puntos de calibración.

12. El método de la reivindicación 10, en donde la determinación de la concentración de analito incluye un promedio de la señal que incluye la pluralidad de puntos de calibración.

13. El método de la reivindicación 1, que además comprende determinar si una tira sensora que contiene la muestra está sub-llena con la muestra.

14. El método de la reivindicación 13, en donde la determinación de si una tira sensora que contiene la muestra está sub-llena incluye determinar la velocidad de decaimiento.

15. El método de la reivindicación 1, que además comprende determinar la temperatura de la muestra contenida en una tira sensora.

16. El método de la reivindicación 15, en donde la determinación de la temperatura de la muestra contenida en una tira sensora incluye determinar una velocidad de decaimiento.

17. Un dispositivo de medición de analito de mano, para determinar la concentración de un analito en una muestra, que comprende un dispositivo de

medición amperométrica regulada adaptado para recibir una tira sensora, en donde

el dispositivo de medición amperométrica regulada comprende al menos dos contactos de dispositivo en comunicación eléctrica con una pantalla a través de circuito eléctrico, y

la tira sensora comprende al menos un primer y segundo contacto de tiras sensoras, donde el primer contacto de la tira sensora en comunicación eléctrica con un electrodo de trabajo y el segundo contacto de la tira sensora en comunicación eléctrica con un electrodo contador a través de conductores, donde

una primera capa de reactivo está sobre al menos uno de los electrodos, donde la primera capa de reactivo comprende una oxidoreductasa y al menos una especie de un par redox.

18. Un método para determinar la concentración de un analito en una muestra, que comprende:

aplicar una secuencia de pulsos a la muestra, donde la secuencia de pulsos comprende al menos 3 ciclos de trabajo en 180 segundos;

medir las corrientes resultantes;

aplicar un tratamiento de datos a las corrientes medidas; y

determinar la concentración del analito en la muestra.

19. Un dispositivo de medición de mano, para determinar la concentración de un analito en una muestra, donde el dispositivo está adaptado para recibir una tira sensora, en donde dicho dispositivo comprende:

contactos;

al menos una pantalla; y

un circuito electrónico que establece comunicación eléctrica entre los contactos y la pantalla, donde el circuito comprende un cargador eléctrico y un procesador en comunicación eléctrica, el procesador en comunicación eléctrica con un medio de almacenamiento accesible por computadora que comprende código de programa accesible por computadora, que cuando se ejecuta mediante el procesador, causa que el cargador implemente una secuencia de pulsos que comprende al menos 3 ciclos de trabajo en 180 segundos entre los contactos.

20. Un método para reducir la dispersión atribuible a ruido del intermediario en una concentración determinada de un analito en una muestra, que comprende:

aplicar una secuencia de pulsos a la muestra, donde la secuencia de pulsos comprende al menos 3 ciclos de trabajo en 180 segundos.

21. Un método para determinar la duración de una secuencia de pulsos que incluye al menos 3 ciclos de trabajo en 180 segundos, para determinar la concentración de un analito en una muestra, que comprende:

determinar una pluralidad de puntos de calibración determinados a partir de las corrientes registradas durante los al menos 3 ciclos de trabajo; y

determinar la duración de la secuencia de pulsos en respuesta a la concentración determinada del analito en la muestra.

22. Un método para avisar al usuario para que agregue muestra adicional a una tira sensora, que comprende:

determinar si la tira sensora está sub-llena por medio de la determinación de una constante de decaimiento a partir de las corrientes

registradas durante al menos dos excitaciones de una secuencia de pulsos que incluye al menos 3 ciclos de trabajo en 180 segundos; y

avisar al usuario para que agregue muestra adicional a la tira sensora si la tira está sub-llena.

23. Un método para determinar la temperatura de una muestra contenida por una tira sensora, que comprende:

determinar una constante de decaimiento a partir de las corrientes registradas durante al menos dos excitaciones de una secuencia de pulsos que incluye al menos 3 ciclos de trabajo en 180 segundos; y

correlacionar la constante de decaimiento con un valor de temperatura.

24. Un método para determinar la concentración de un analito, que comprende:

aplicar una secuencia de pulsos a una muestra de un fluido biológico durante un periodo de tiempo igual o menor a 180 segundos, donde la secuencia de pulsos tiene al menos tres ciclos de trabajo, es ciclo de trabajo tiene una excitación a una tensión sustancialmente constante, el ciclo de trabajo tiene una relajación;

medir al menos un perfil de corriente; y

determinar la concentración del analito en la muestra en respuesta al menos un perfil de corriente.

25. El método de la reivindicación 24, en donde la excitación es menor que 5 segundos.

26. El método de la reivindicación 24, en donde la relajación responde a un circuito abierto.

27. El método de la reivindicación 24, en donde la relajación es de al menos 0,5 segundos.

28. El método de la reivindicación 24, en donde el perfil de corriente es un perfil de corriente transitoria.

29. El método de la reivindicación 24, en donde la corriente durante una relajación es cero.

30. El método de la reivindicación 24, en donde la secuencia de pulsos comprende pulsos de onda cuadrada.

31. El método de la reivindicación 24, en donde la secuencia de pulsos tiene una intensidad redox de al menos 0,01.

32. El método de la reivindicación 24, que además comprende determinar la concentración del analito en respuesta a un perfil de corriente cuando se alcanza una velocidad de difusión de la especie medible relativamente constante.

33. El método de la reivindicación 24, que además comprende establecer múltiples configuraciones de constantes de calibración en respuesta a al menos un perfil de corriente.

34. El método de la reivindicación 33, que además comprende determinar el número de ciclos de trabajo en la secuencia de pulsos en respuesta a las múltiples configuraciones de constantes de calibración.

35. El método de la reivindicación 33, que además comprende:
determinar la concentración del analito en la muestra en respuesta a cada configuración de constantes de calibración; y
promediar las concentraciones del analito a partir de las configuraciones de las constantes de calibración.

36. El método de la reivindicación 24, que además comprende determinar cuando una tira sensora está sub-llena en respuesta al perfil de corriente.

37. El método de la reivindicación 36, que además permite determinar cuando una tira sensora está sub-llena, cuándo una velocidad de decaimiento del perfil de corriente es menor que un valor seleccionado.

38. El método de la reivindicación 37, en donde el valor seleccionado es -0,1.

39. El método de la reivindicación 24, que además comprende determinar una temperatura de la muestra como respuesta a una velocidad de decaimiento del perfil de corriente.

40. Un método para determinar un analito en un fluido biológico, que comprende:

introducir una muestra del fluido biológico en una tira sensora;

transferir al menos un electrón de un analito en la muestra a un intermediario en la tira sensora;

aplicar una secuencia de pulsos a la muestra durante un periodo de tiempo igual a o menor que 180 segundos, donde la secuencia de pulsos tiene al menos tres ciclos de trabajo, el ciclo de trabajo tiene una excitación a una tensión sustancialmente constante, el ciclo de trabajo tiene una relajación;

analizar una corriente en respuesta a la excitación de la especie medible; y

determinar un analito en la muestra en respuesta a la corriente.

41. El método de la reivindicación 40, que además comprende excitar electroquímicamente una especie medible.

42. El método de la reivindicación 41, que además comprende oxidar el analito en la muestra.

43. El método de la reivindicación 41, que además comprende reducir el analito en la muestra.

44. El método de la reivindicación 41, en donde la especie medible es el analito.

45. El método de la reivindicación 41, en donde la especie medible es un intermediario.

46. El método de la reivindicación 40, que además comprende registrar la corriente durante la excitación como una función del tiempo.

47. El método de la reivindicación 40, que además comprende determinar la presencia de un analito en la muestra.

48. El método de la reivindicación 40, que además comprende determinar la concentración del analito en la muestra.

49. El método de la reivindicación 40, que además comprende:
excitar la especie medible interna a una capa de barrera de difusión; y
excluir sustancialmente de la excitación la especie medible externa la capa de barrera de difusión.

50. Una tira sensora, que comprende:
una base sensora que tiene al menos dos conductores bajo una capa dieléctrica, donde dichos al menos dos conductores están conectados a por lo menos dos electrodos, al menos un electrodo tiene a capa de barrera de difusión; y

una tapa que cubre al menos parcialmente la base sensora, donde la tapa forma una abertura, la tapa tiene un área cóncava y un extremo de entrada abierto, y

en donde la base sensora y la tapa forman un espacio debajo de la tapa.

51. La tira sensora de la reivindicación 50, en donde la base sensora comprende un electrodo de trabajo y un electrodo contador, y en donde el electrodo de trabajo tiene la capa de barrera de difusión.

52. La tira sensora de la reivindicación 51, en donde los electrodos de trabajo y contador están sustancialmente en el mismo plano.

53. La tira sensora de la reivindicación 51, en donde los electrodos de trabajo y contador están separados por más de 200 μm .

54. La tira sensora de la reivindicación 51, en donde los electrodos de trabajo y contador están separados de una porción superior de la tapa por al menos 100 μm .

55. La tira sensora de la reivindicación 51, en donde el electrodo contador se configura para proveer un potencial de referencia.

56. La tira sensora de la reivindicación 51, en donde la capa dieléctrica cubre parcialmente los electrodos de trabajo y contador.

57. La tira sensora de la reivindicación 51, que además comprende al menos una capa de reactivo depositado sobre el conductores.

58. La tira sensora de la reivindicación 57, en donde dicha al menos una capa de reactivo incluye un reactivo.

59. La tira sensora de la reivindicación 57, en donde dicha al menos una capa de reactivo incluye al menos uno de un aglutinante y un intermediario.

60. La tira sensora de la reivindicación 50, en donde la capa de barrera de difusión está integrada a una capa de reactivo.

61. La tira sensora de la reivindicación 60, en donde la capa barrera de difusión y de reactivo combinada tiene un espesor promedio de 30 μm .

62. La tira sensora de la reivindicación 50, en donde la capa de barrera de difusión es distinta de una capa de reactivo.

63. La tira sensora de la reivindicación 62, en donde la capa de reactivo reside sobre al menos una de la base sensora y de la tapa.

64. La tira sensora de la reivindicación 62, en donde la capa de barrera de difusión tiene un espesor promedio de al menos 5 μm .

65. Un dispositivo de medición para determinar un analito en un fluido biológico, que comprende:

al menos dos contactos;

una pantalla; y

un circuito eléctrico que establece comunicación eléctrica entre los al menos dos contactos y la pantalla, donde el circuito eléctrico incluye un procesador en comunicación eléctrica con un cargador eléctrico y un medio de almacenamiento accesible por computadora,

en donde el procesador es operable para implementar una secuencia de pulsos a partir del cargador eléctrico a los al menos dos contactos durante un periodo de tiempo igual o menor a 180 segundos, la secuencia de pulsos tiene al menos tres ciclos de trabajo, el ciclo de trabajo tiene una excitación a una tensión sustancialmente constante, el ciclo de trabajo tiene una relajación,

en donde el procesador es operable para medir al menos un perfil de corriente en los al menos dos contactos, y

en donde el procesador es operable para determinar el analito en el fluido biológico en respuesta a al menos un perfil de corriente.

AMPEROMETRÍA REGULADA

RESUMEN

Sistema sensor, dispositivo y métodos para determinar la concentración de un analito en una muestra. Las secuencias de pulsos amperométricos regulados que incluyen múltiples ciclos de trabajo de excitaciones y relajaciones secuenciales pueden proveer un tiempo de análisis más corto y/o mejorar la exactitud y/o precisión del análisis. Las secuencias de pulsos amperométricos regulados que se exponen pueden reducir los errores de análisis que surgen del efecto hematocrito, de la varianza de los volúmenes debajo de la tapa, de condiciones de estado no transitorio, de ruido del intermediario, de sub-llenado, de cambios de temperatura en la muestra y de una configuración individual de constantes de calibración.

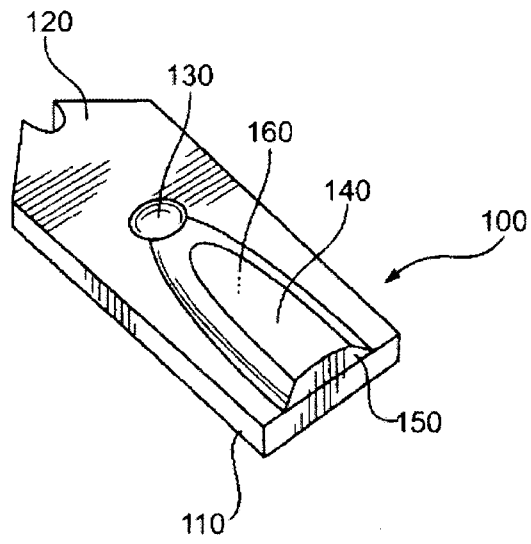


Fig. 1A

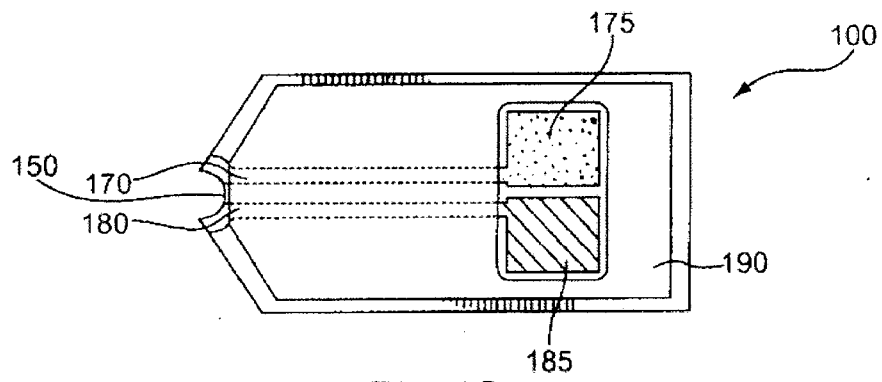


Fig. 1B

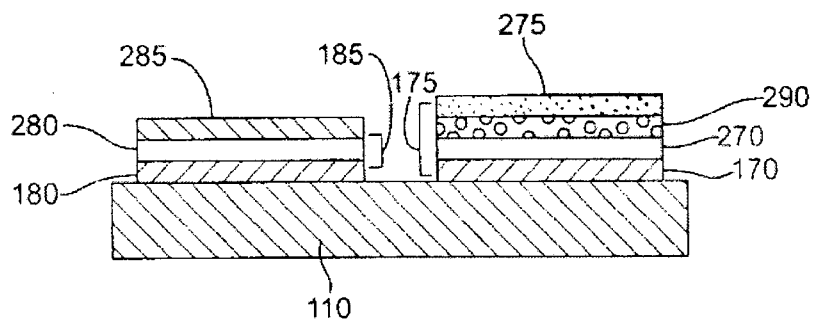


Fig. 2

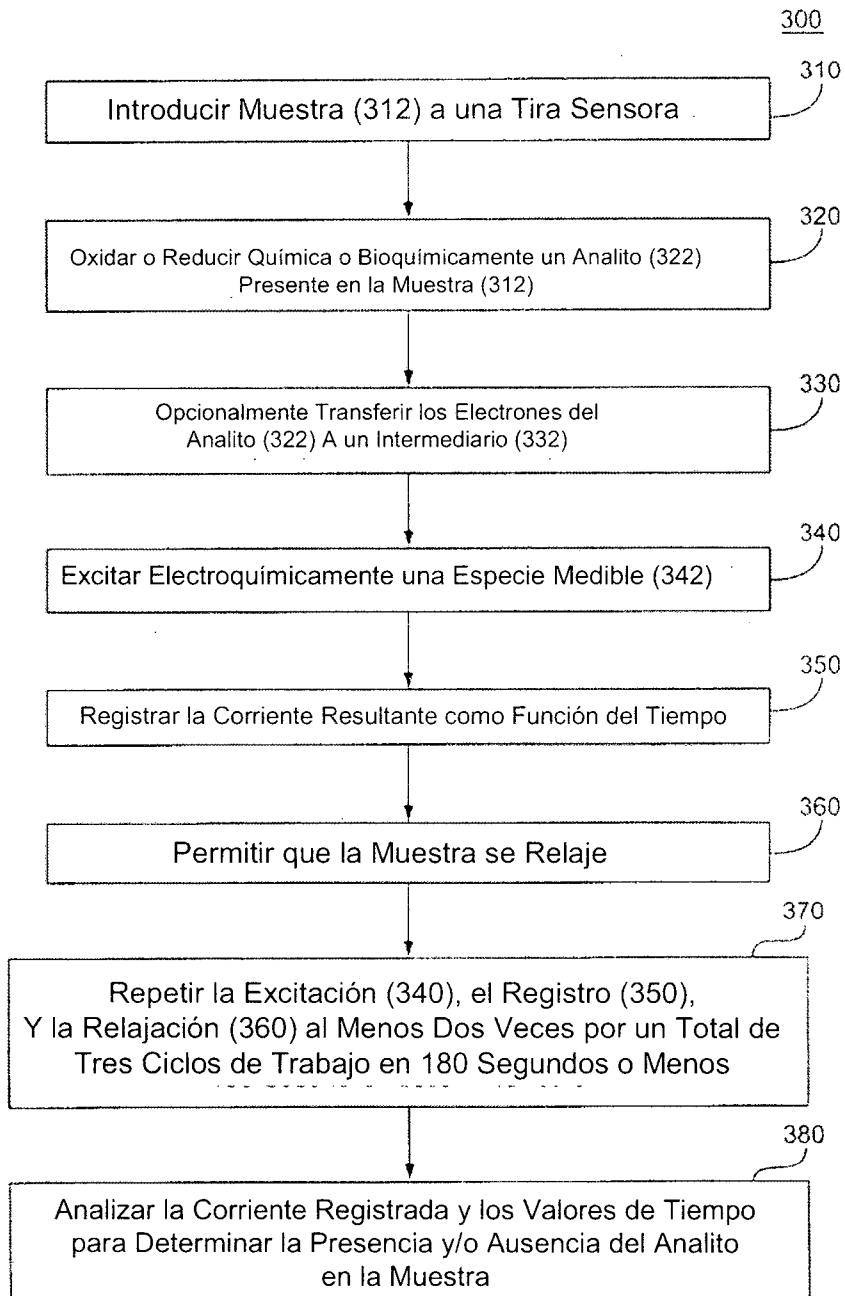
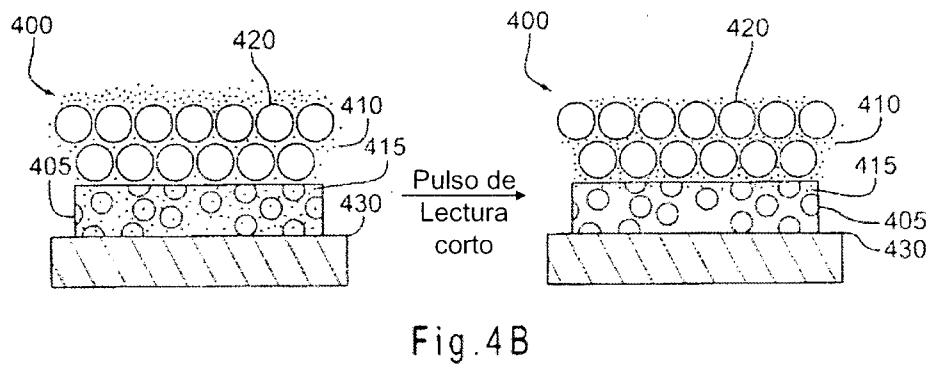
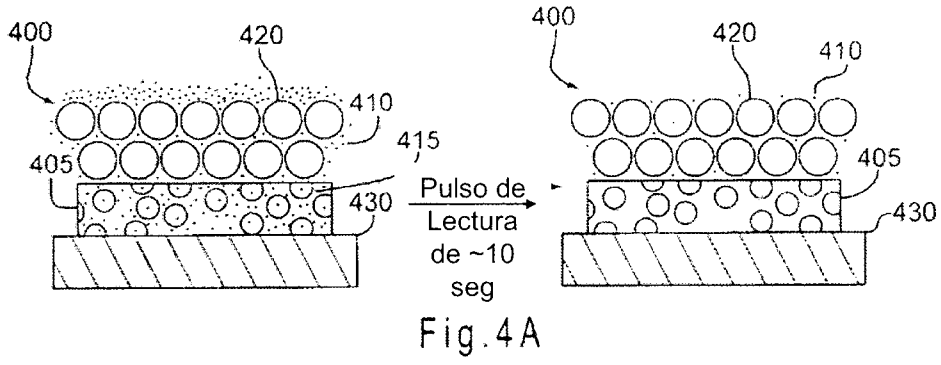
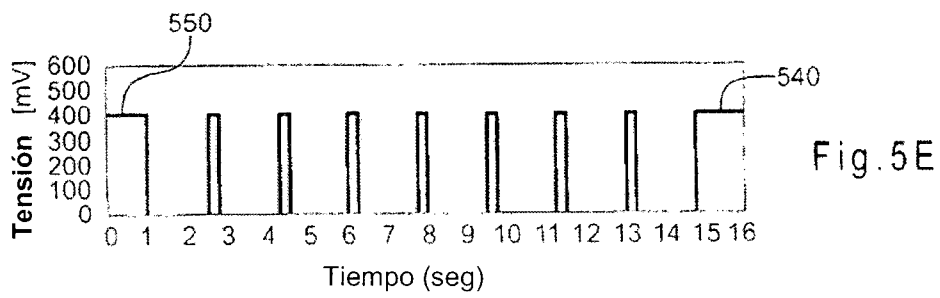
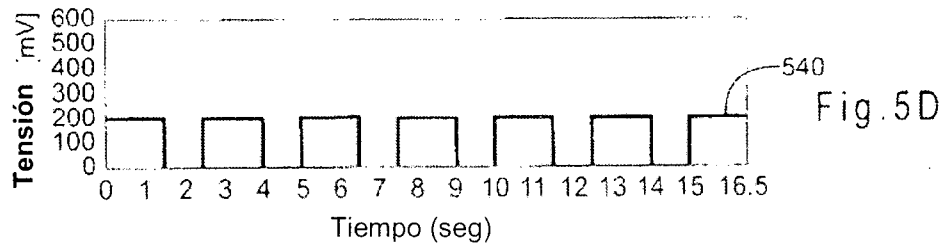
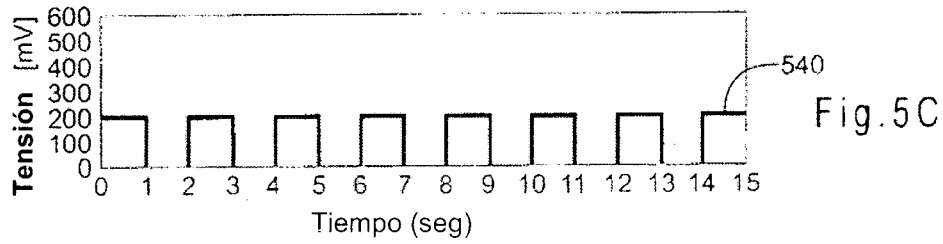
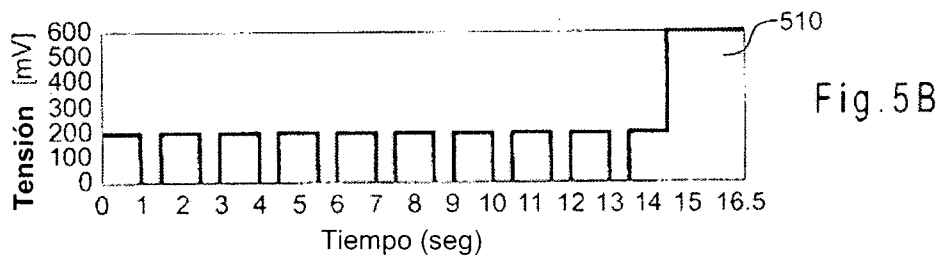
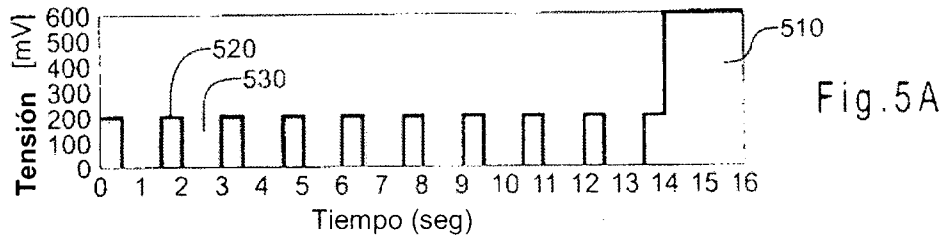


Fig.3





5/12

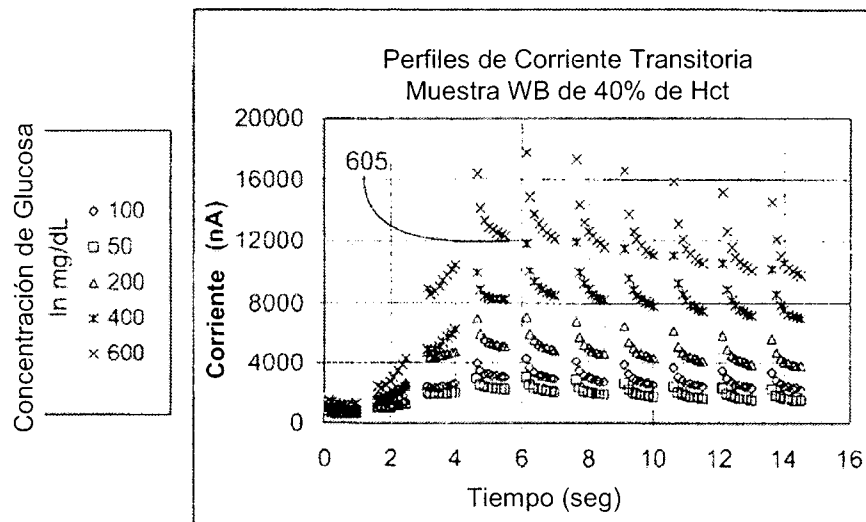


Fig.6A

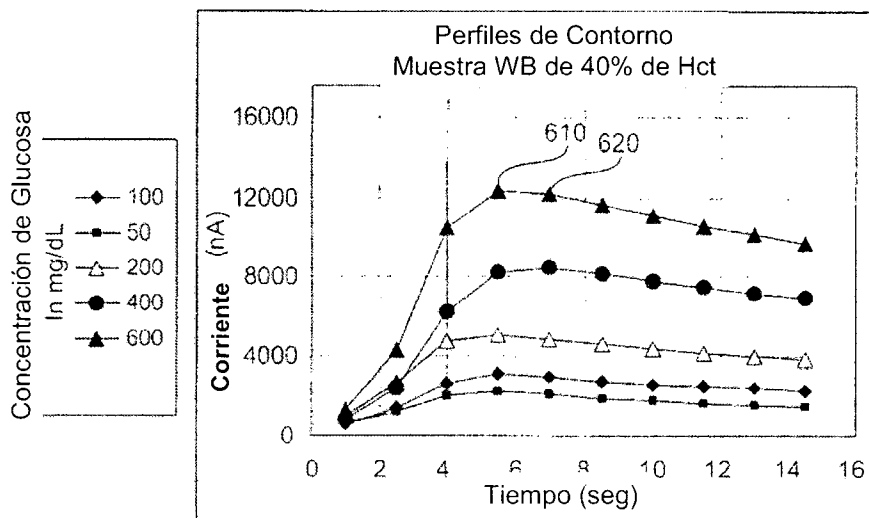
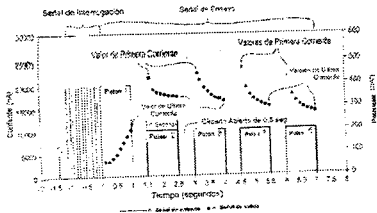
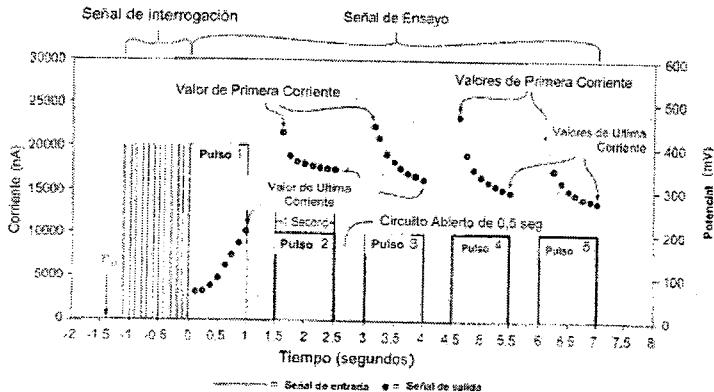


Fig.6B







No. 07-136140-00000-0000
 Fecha: 2007-12-26 15:43:45 Dep. 2020 NUECREACIONE
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 160



Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Claudia M. Neva Cortés
 Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
 Conmutador: 3 82 08 40
 Fax: 350 52 20
 E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
 Bogotá, D.C., Colombia