

Método electroquímico enzimático para la cuantificación de analitos en muestras de fluidos biológicos

La presente invención se refiere a un método electroquímico enzimático para la determinación y cuantificación de analitos en muestras fisiológicas que se basa en la medida diferencial de intensidades de corriente proporcionadas por dos tiras biosensoras que contienen enzimas y mediadores implicados en una reacción redox del analito a determinar. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de los métodos analíticos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La detección y cuantificación de analitos en muestras fisiológicas para determinar directa o indirectamente una patología es de gran relevancia para la sociedad actual, por lo que existe gran variedad de métodos y dispositivos para la detección de analitos de interés como glucosa, colesterol, ácido úrico, etc. Una estrategia habitual para estas detecciones es la aplicación de reacciones electroquímicas, especialmente reacciones en las que el analito es sustrato de una enzima y en la que esta interacción desencadena un flujo de electrones que puede traducirse en la concentración de analito de interés. Documentos como US2016/0177365, US2010/0270175 o EP1770396 describen métodos y sensores basados en estos procesos, aunque estos métodos están dirigidos a analitos específicos en un rango de detección limitado.

Sin embargo, algunos de los sensores desarrollados con este objetivo acaban siendo dispositivos grandes y complejos cuyo uso queda restringido al laboratorio, lo que supone que tener la información necesaria para determinar un diagnóstico o tratamiento sea un proceso más largo. Por otro lado, estos sensores se aplican generalmente a la detección de moléculas en un rango de concentración alto. Además, existe el problema añadido de

las interferencias en muestras tan heterogéneas como la orina o la sangre, que presentan numerosos componentes.

5 Por estas razones existe una necesidad de disponer de aparatos que minimicen las interferencias en la matriz de la muestra y proporcionen medidas precisas incluso a bajas concentraciones del analito y que además sean manejables.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10

La presente invención se refiere a un método electroquímico enzimático para la determinación y cuantificación de analitos en muestras fisiológicas que se basa en la medida diferencial de intensidades de corriente medidas a temperatura ambiente entre una tira biosensora A (denominada habitualmente *blanco*) modificada con una enzima y un mediador y una tira biosensora B (denominada *completo*) que además de la enzima y el mediador contiene un cofactor, y su conversión en concentración del analito a determinar se obtiene usando los parámetros de calibración correspondientes al lote de tiras biosensoras utilizado.

20

El método de medida se basa en la técnica electroquímica amperométrica, en la que se aplica un potencial constante durante un tiempo específico y se registra la corriente producida por la reacción electroquímica ocurrida en la celda en ese tiempo. La conversión de corriente a concentración de analito se produce a través de una recta de calibrado previamente establecida con el dispositivo de medida y tiras biosensoras del mismo lote. La muestra es analizada en paralelo por dos tiras biosensoras diferentes (*blanco* y *completo*). Los resultados obtenidos con ambas tiras se restan, eliminando de esta manera el efecto de los interferentes y aislando la señal que
30 corresponde sólo a la determinación del analito.

Cada lote de tiras biosensoras se calibra previamente usando la correspondiente muestra de “fluido biológico sintético” dopada con concentraciones conocidas del analito a determinar en el rango de interés y son medidas electroquímicamente por amperometría. Con esto se generan
5 unos códigos de calibración que serán utilizados posteriormente para el cálculo de las concentraciones de analito en muestras reales. El “fluido biológico sintético” es una disolución que contiene los principales interferentes de la muestra biológica y que se aproxima por su comportamiento electroquímico a la matriz real. Su uso junto con el sistema
10 dual de tiras biosensoras permite la determinación de bajas concentraciones de analitos en fluidos biológicos reales sin necesidad de pretratamiento de las muestras.

En la presente invención, una tira biosensora consta de al menos tres
15 electrodos serigrafiados: un electrodo de referencia, que puede ser de Ag/AgCl, Ag, Pt, Au; un electrodo auxiliar (o contra-electrodo), que puede ser de grafito, carbono, Pt, Au; y un electrodo de trabajo, que puede ser de carbono, grafito, grafeno, Au. Los electrodos serigrafiados se depositan en un sustrato, preferiblemente PET, cerámico o papel. Preferiblemente, una
20 capa de tinta aislante es serigrafiada encima de los electrodos, protegiéndolos de su contacto directo con la disolución y delimitando el área de trabajo. La enzima, el mediador, el cofactor y otros componentes de la modificación, si los hubiese, se depositan sobre el electrodo de trabajo dentro de cada tira reactiva.

25

El potencial aplicado en esta invención varía entre -0,2 V y +0,2 V vs. Ag/AgCl. La corriente obtenida para cada concentración de analito vs. la concentración conocida de dicho analito proporciona la curva de calibración para todas las tiras biosensoras producidas en el mismo lote.

30

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método electroquímico enzimático para la cuantificación de analitos en muestras aisladas de fluidos biológicos que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) introducir dicha muestra en un sistema electroquímico formado por al menos una tira biosensora A caracterizada por comprender al menos:
 - un electrodo de trabajo modificado con al menos una enzima y un mediador electroquímico,
 - un electrodo de referencia y
 - 10 - un electrodo auxiliar o contraelectrodo
- y al menos una tira biosensora B caracterizada por comprender al menos:
 - un electrodo de trabajo modificado con la misma enzima y el mismo mediador electroquímico que la tira A y adicionalmente al menos un cofactor,
 - 15 - un electrodo de referencia y
 - un electrodo de auxiliar o contraelectrodo;
- b) aplicar un potencial constante durante un periodo de tiempo determinado;
- 20 c) medir la intensidad de corriente producida por la re-oxidación del cofactor en el electrodo de trabajo, facilitada por el mediador, después de haberse reducido inicialmente debido a la reacción entre la enzima y el analito, sobre cada uno de los electrodos de las tiras biosensoras y restar la respuesta obtenida en cada uno de los electrodos de la tira A a la respuesta obtenida
- 25 en cada uno de los electrodos correspondientes de la tira B;
- d) traducir los datos de intensidad de corriente obtenidos en la etapa (c) mediante una curva de calibrado obtenida a partir de muestras sintéticas del fluido biológico de la muestra que comprenden diferentes concentraciones
- 30 del analito a determinar.

- En una realización preferida, la enzima presente en el electrodo de trabajo de las tiras reactivas es una oxidorreductasa. En una realización más preferida, la enzima es una deshidrogenasa, que opcionalmente puede ser NAD^+ o NADP^+ dependiente. En una realización aún más preferida, la
- 5 enzima deshidrogenasa se selecciona de entre lactato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, metanol deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, malatodeshidrogenasa, glicerol-3-fosfatodeshidrogenasa, glicerol deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, D-xilosa-1-deshidrogenasa.
- 10 En otra realización preferida, el mediador presente en el electrodo de trabajo de las tiras biosensoras se selecciona de entre tetrametilbenzidina (TMB), ferricianuropotásico, azul de toluidina, hidroquinona, tetratiofulvaleno (TTF), ferroceno.
- 15 En otra realización preferida, el cofactor presente en el electrodo de trabajo de la tira biosensora B se selecciona de entre NAD^+ , NADP^+ , FAD, FMN. Preferiblemente el cofactor no forma parte de la estructura de la enzima.
- 20 En otra realización preferida, el potencial aplicado en la etapa (b) está entre -0,2 V y +0,2V vs. Ag/AgCl. En una realización más preferida, el potencial aplicado en la etapa (b) está entre -0,05 V y +0,15 V vs. Ag/AgCl.
- 25 En otra realización preferida, el tiempo durante el que se aplica el potencial en la etapa (b) está entre 20 y 120 s. En una realización más preferida el tiempo durante el que se aplica el potencial en la etapa (b) está entre 30 y 90 s.
- 30 En otra realización preferida, la muestra fluida es una muestra biológica aislada que se selecciona de entre orina, sangre, suero, plasma, líquido pleural o saliva.

Para llevar a cabo el método de la invención es posible usar cualquier enzima que tenga como sustrato el analito a determinar, aunque preferiblemente la enzima presente en los electrodos es una oxidorreductasa, más preferiblemente una deshidrogenasa, y aún más
5 preferiblemente una deshidrogenasa, que preferiblemente puede ser dependiente de cofactores como NAD^+ o NADP^+ . La enzima deshidrogenasa se selecciona de entre lactato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, metanol deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, malatodeshidrogenasa, glicerol-3-fosfatodeshidrogenasa, glicerol
10 deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, D-xilosa-1-deshidrogenasa.

En la presente invención, se entiende como “mediador” un compuesto con actividad redox que se encarga de facilitar la transferencia de electrones entre el cofactor y la superficie del electrodo de trabajo de cada tira reactiva,
15 de manera que se puedan utilizar potenciales menores (en valor absoluto) para el reconocimiento del analito. Preferiblemente, el mediador presente en los electrodos se selecciona de entre tetrametilbenzidina (TMB), ferricianuropotásico, azul de toluidina, hidroquinona, tetratiofulvaleno (TTF), ferroceno.

20

Preferiblemente el cofactor se selecciona de entre FAD, FMN, NAD^+ , NADP^+ .

Preferiblemente, el cofactor es exterior y no forma parte de la estructura de
25 la enzima.

El método de la invención es aplicable a cualquier muestra fluida biológica, aunque preferiblemente, la muestra biológica aislada se selecciona de entre orina, sangre, suero, plasma, líquido pleural o saliva y más preferiblemente,
30 orina.

La etapa de calibrado descrita se realiza utilizando disoluciones de analito en muestras de fluidos biológicos sintéticos. Habitualmente se utiliza un estándar del analito preparado en muestra de fluido biológico sintético, que se diluye progresivamente en la misma muestra sintética para obtener las
5 muestras para la calibración. Preferiblemente, estas concentraciones varían dependiendo del analito, y cada medida se hace al menos por triplicado. Se entiende como “muestra de fluido biológico sintético” una matriz artificial que presenta características similares a la muestra biológica natural (orina, sangre, plasma, etc.) y que se obtiene añadiendo los componentes que
10 habitualmente la componen tales como sales, proteínas, azúcares, etc.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos,
15 ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20 DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Muestra la correlación entre las intensidades de corriente de las tiras biosensoras de D-xilosa de la presente invención y las concentraciones de D-xilosa, en diferentes medios.

25

Fig. 2. Muestra la curva de calibración obtenida a partir de intensidades de corriente normalizadas resultante de medir muestras de orina sintética que contienen concentraciones variables de D-xilosa. Las corrientes normalizadas son el resultado de restar las intensidades de corriente de una
30 tira biosensora completa y una tira biosensora blanco.

Fig. 3. Muestra el porcentaje de recuperación de D-xilosa obtenido al medir muestras de orina reales, expresado como la proporción entre la concentración calculada y la concentración real de D-xilosa.

5 EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del método de la invención.

10

Ejemplo 1: Determinación de D-xilosa en diferentes medios

Determinación de la concentración de D-xilosa en diferentes matrices, usando las tiras biosensoras descritas anteriormente en la invención y modificadas para medir D-xilosa. En este ejemplo, las tiras biosensoras contienen D-xilosa deshidrogenasa como elemento de reconocimiento biológico, NAD⁺ como cofactor enzimático y azul de toluidina (TBO) como mediador. El tampón es tampón fosfato 200 mM pH 8 y la orina sintética contiene 150 mM KCl y 10g / L urea. En la figura 1 se muestran las corrientes eléctricas en nanoamperios obtenidas en tampón, orina sintética y muestras de orina humana con concentraciones variables de D-xilosa, medidas a 0 V. Los resultados demuestran que la tira biosensora para D-xilosa de la presente invención tiene una respuesta lineal respecto a la concentración de D-xilosa en el intervalo de aproximadamente 0,75 mg / dL a aproximadamente 15 mg / dL, en diversos medios. Además, se puede observar que la curva de calibración en el buffer era bastante diferente a la curva de calibración en muestras de orina humana. Sin embargo, la curva de calibración en orina sintética es bastante similar a la curva de calibración en muestras de orina humana, y puede usarse para la determinación de alta precisión de D-xilosa en orina humana (ver figura 1).

Ejemplo 2: Exactitud del método de la invención para la determinación de la concentración de D-xilosa en muestras de orina humana.

- El método consiste en dos tiras biosensoras: la tira blanco, que contiene TBO y D-xilosa deshidrogenasa (XDH) y la tira completa, que contiene TBO, D-XDH y NAD⁺. Se analizaron muestras de orina humana con diferentes concentraciones de D-xilosa usando el método de bi-tira con las formulaciones de reactivos descritas anteriormente. Las corrientes obtenidas de ambas tiras se restaron para separar el efecto de la matriz de la respuesta del analito. Las concentraciones de D-xilosa en las muestras se calcularon aplicando la curva de calibración previamente medida en orina sintética. % de error (RSD, n = 3) de todas las mediciones fueron inferiores al 10% (ver figura 2).
- La Tabla 1 muestra las corrientes eléctricas en nanoamperios de varias muestras de orina humana que contienen diferentes concentraciones de D-xilosa y el % de precisión con respecto a la concentración real de D-xilosa.

	Muestra de orina 1		Muestra de orina 2		Muestra de orina 3	
[D-xilosa]/ mg*dL-1	i / nA	%recuperación	i / nA	%recuperación	i / nA	%recuperación
0.75	134.8	112.9	119.7	94.3	121.1	96.1
1.25	181.7	102.3	175.3	97.6	178.9	100.2
2.0	275.8	107.3	256.0	98.2	260.0	100.0
3.75	449.1	99.8	431.5	95.5	415.9	91.7
15	1462.0	87.2	1572.3	94.0	1403.7	83.6

Ejemplo 3: Comparación de la precisión del método de la invención.

Para realizar la comparativa del método de la invención respecto a métodos conocidos, se procedió a determinar D-xilosa en muestras de orina humana usando un método basado en un biosensor de una sola tira y el método de la invención basado en dos tiras.

Se midió una misma muestra de orina real, con diferentes concentraciones de D-xilosa, usando:

- 10 1- solo una tira biosensora completa de la invención, como se describió anteriormente en el ejemplo 2;
 - 2- una tira biosensora blanco y una tira biosensora completa de la invención, como se describió anteriormente en el ejemplo 2.
- 15 Las mediciones se realizaron a 0 V y la corriente obtenida se utilizó para calcular la concentración de D-xilosa correspondiente por medio de la curva de calibración obtenida previamente en orina sintética. La Figura 3 muestra el porcentaje de recuperación de D-xilosa expresado como la proporción de niveles de concentración obtenidos usando las tiras biosensoras de la
- 20 invención con respecto a los niveles de concentración reales, aplicando solamente una tira completa o el sistema biosensor de bi-tiras propuesto anteriormente en la invención. Como se puede observar, este sistema mejoró notablemente la precisión del sistema del sensor, especialmente a bajas concentraciones de analito.