

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 173**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

**G01N 33/552** (2006.01)

**G01N 33/52** (2006.01)

**G01N 21/84** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2009 PCT/EP2009/064757**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2010 WO10052306**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2009 E 09753073 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2359136**

54 Título: **Sustancias de relleno de grano fino para películas de reacción fotométricas**

30 Prioridad:

**07.11.2008 EP 08168666**

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

**29.07.2019**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstraße 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**KNAPPE, WOLFGANG-REINHOLD;  
HILLER, BERND;  
LEHR, URSULA;  
ZIMMER, VOLKER;  
PETRICH, WOLFGANG y  
BEDON-GOMEZ, LUIS, DAVID**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 721 173 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Sustancias de relleno de grano fino para películas de reacción fotométricas

## 5 Campo de la invención

La invención se refiere a un elemento de prueba de diagnóstico para detectar un analito en una muestra de fluido corporal y un procedimiento para producir este tipo de elemento de prueba de diagnóstico. Este tipo de elementos de prueba de diagnóstico se utilizan, por ejemplo, para detectar uno o más analitos en fluidos corporales, como sangre entera, por ejemplo, para detectar glucosa, ácido úrico, etanol o lactato o analitos similares. Sin embargo, otras aplicaciones son posibles.

## Estado de la técnica

15 Se conocen numerosos elementos de prueba de diagnóstico del estado la técnica anterior, que se pueden usar para detectar al menos un analito en una muestra de fluido corporal. Al menos un analito puede ser, por ejemplo, un metabolito. Puede haber una detección cualitativa y/o cuantitativa del analito. Los analitos conocidos son, por ejemplo, glucosa, en particular, glucosa en sangre, ácido úrico, etanol y/o lactato. Alternativa o adicionalmente, se pueden detectar otros tipos de analitos. El fluido corporal puede ser, por ejemplo, sangre pura, plasma sanguíneo, fluido intestinal, saliva, orina u otros tipos de fluidos corporales. A continuación, se describirá la invención, sin limitarla a otras posibles configuraciones, fundamentalmente con referencia a la detección de glucosa en sangre entera.

Los elementos de prueba generalmente presentan al menos un reactivo de detección para la detección cualitativa y/o cuantitativa del analito. Un reactivo de detección generalmente se debe entender como una sustancia química o una mezcla de sustancias químicas que, en presencia de al menos un analito, altera al menos una propiedad detectable, en particular, una propiedad detectable física y/o químicamente. Preferiblemente, este cambio de propiedad se encuentra específicamente solo en presencia del al menos un analito que se desea detectar, pero no en presencia de otras sustancias. Sin embargo, en la práctica, un cambio que no sea específico en una propiedad se puede tolerar hasta cierto punto, en presencia de otras sustancias químicas cuya presencia en la muestra de fluido corporal es generalmente improbable y/o que están presentes en una concentración muy baja.

Al menos un cambio en una propiedad puede ser, por ejemplo, el cambio de una propiedad que se puede detectar visualmente, en particular, un cambio de color. En la técnica, se conocen bien ejemplos de elementos de prueba de diagnóstico con reactivos de detección óptica. Por ejemplo, el documento EP 0 821 234 B1, al que en gran medida se puede hacer referencia en el ámbito de la presente invención, describe un soporte de prueba de diagnóstico para determinar un analito a partir de sangre entera por medio de un sistema reactivo contenido en el soporte, que incluye un reactivo formador de color. El soporte de prueba de diagnóstico comprende un campo de prueba que tiene un lado de aplicación de muestra donde se coloca la muestra y un lado de detección que como resultado de la reacción del analito con el sistema de reactivo experimenta un cambio que se puede detectar visualmente. El campo de prueba está configurado de manera tal que los eritrocitos contenidos en la muestra no acaban en el lado de detección. El campo de prueba comprende además una película transparente y una primera capa de película y una segunda capa de película aplicada a la primera capa de película. La primera capa que se encuentra en la película transparente es sustancialmente menos dispersante de la luz en estado húmedo que la segunda capa sobre ella. La primera capa de película comprende una sustancia de relleno cuyo índice de refracción es cercano al índice de refracción del agua, mientras que la segunda capa comprende un pigmento con un índice de refracción de preferiblemente al menos o incluso  $> 2,0$ , en particular, al menos  $2,2$ , en una concentración de preferiblemente al menos 25 % del peso o incluso más del 25 % del peso, respecto a la segunda capa seca. Por ejemplo, la primera capa puede comprender como sustancia de relleno un silicato de sodio y aluminio.

El documento US 4.312.834 da a conocer un agente de diagnóstico para la detección de un componente material. En este caso, se da a conocer una película insoluble en agua, que se compone de un formador de película y un abridor de película en forma de partículas orgánicas o inorgánicas insolubles. El abridor de película sirve para hacer que la película sea porosa y permita así tomar suficiente muestra a través de la película. Por consiguiente, por ejemplo, se propone usar pigmentos, es decir, partículas de un tamaño de partícula grande, por ejemplo, pigmentos de dióxido de titanio, como abridores de película.

El documento WO 2006/065900 A1 describe una tira reactiva o un sensor electroquímico para medir la cantidad de un analito en un fluido biológico. Esto comprende un sistema enzimático para la reacción con el analito. El sistema reactivo se mezcla en una matriz polimérica hinchable, soluble en agua, que comprende partículas insolubles en agua que tienen un tamaño nominal de aproximadamente 0,05 a 20 micrómetros. De esta manera, se describe una porosidad reducida utilizando pequeñas partículas.

El documento DE 33 32 144 A1 describe un elemento para determinar analíticamente un componente específico en una muestra líquida que comprende capas esenciales sucesivas en forma de una capa receptora y una capa de distribución sobre un soporte. Dicho elemento contiene un agente de transferencia de electrones, un precursor de

tinte, una coenzima de tipo oxidación y un reactivo capaz de convertir la coenzima de tipo oxidación mediante el componente específico.

5 Sin embargo, los elementos de prueba conocidos de la técnica anterior, en particular, los elementos de prueba con al menos un campo de prueba, presentan desventajas y desafíos técnicos en la práctica. Se ha demostrado que los campos de prueba habituales, como se conocen de la técnica anterior, pueden conducir a una formación de color granulado y no homogéneo. Sin embargo, esta formación de color no homogéneo generalmente es irrelevante para los equipos de pruebas analíticas convencionales, ya que tienen puntos de medición relativamente grandes. Por ejemplo, los medidores ópticos de glucosa en sangre disponibles en el mercado presentan puntos de medición de 10 aproximadamente 1,5 mm de diámetro. Con este tipo de diámetros, un coeficiente de variación promedio, es decir, la relación de desviación respecto al estándar y una media de la medición se sitúa en un rango de aproximadamente 10 a 600 mg por dl de glucosa en la sangre, típicamente, alrededor del 1,5 %.

15 Desde el punto de vista del equipo, sin embargo, hay una tendencia hacia usar dispositivos de medición analíticos con puntos de medición más pequeños. Sin embargo, en el caso de los puntos de medición más pequeños, la falta de homogeneidad, en particular, en la formación del color de la reacción de detección, se hace más notoria. De esta manera, en el caso de los puntos de medición con un diámetro inferior a 0,5 mm aumenta significativamente, por ejemplo, el coeficiente de variación, en particular, por encima del valor clínicamente aceptable de alrededor del 4 %. Dado que el desarrollo de sistemas integrados de medición de glucosa en sangre conduce a volúmenes de sangre cada vez más pequeños, hasta aproximadamente 100 nanolitros, debe ser posible trabajar con puntos de medición del orden de 10 micrómetros por 10 micrómetros, en particular, cuando se utilizan ópticas de resolución espacial. Sin embargo, los campos de prueba conocidos generalmente no tienen la precisión requerida para este propósito.

#### Objeto de la invención

25 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un elemento de prueba de diagnóstico, un procedimiento para producir un elemento de prueba de diagnóstico y un procedimiento para detectar un analito en una muestra de fluido corporal, que permita evitar, al menos en gran medida, las desventajas de los elementos de prueba de diagnóstico conocidos y los procedimientos conocidos. En particular, una detección cuantitativa de alta precisión de al menos un analito debe ser posible incluso en las cantidades más pequeñas de líquido.

#### Divulgación de la invención

35 Este objetivo se consigue mediante la invención con las características de las reivindicaciones independientes. Las variantes ventajosas de la invención, que pueden implementarse por separado o en cualquier combinación, se muestran en las reivindicaciones dependientes. Aquí, se propone un elemento de prueba de diagnóstico para detectar un analito en una muestra de fluido corporal, un procedimiento para producir un elemento de prueba de diagnóstico para detectar un analito en una muestra de fluido corporal y un procedimiento para detectar un analito en una muestra de fluido corporal. En este caso, el elemento de prueba de diagnóstico se puede producir en una o más de las configuraciones propuestas mediante un procedimiento de acuerdo con la invención, y el procedimiento de preparación se puede usar para producir un elemento de prueba de diagnóstico en una o más de las configuraciones descritas. Por consiguiente, para la descripción de posibles configuraciones del elemento de prueba de diagnóstico, se puede hacer referencia a la descripción del procedimiento de preparación o viceversa. Sin embargo, en principio, son posibles otras configuraciones. El procedimiento propuesto para detectar un analito en una muestra de fluido corporal se realiza utilizando un elemento de prueba de diagnóstico en una o más de las configuraciones descritas a continuación.

50 Por lo tanto, en un primer aspecto de la presente invención, se propone un elemento de prueba de diagnóstico para detectar un analito en una muestra de fluido corporal. Para las posibles configuraciones de este elemento de prueba, en principio se puede hacer referencia a la descripción de la técnica anteriormente mencionada. Por lo tanto, el al menos un analito se puede detectar, por ejemplo, cuantitativa o cualitativamente. El al menos un analito puede ser, en particular, uno o varios de los analitos, glucosa, ácido úrico, etanol, lactato o una combinación de estos analitos y/u otros analitos. Sin embargo, en principio, también se pueden detectar otros analitos, por ejemplo, uno o varios de los analitos mencionados anteriormente. La muestra de fluido corporal puede ser, en particular, sangre entera. Sin embargo, en principio, son posibles otras configuraciones, en las que se puede hacer referencia a la descripción anterior.

55 El elemento de prueba de diagnóstico comprende al menos un campo de prueba con al menos un reactivo de detección.

60 En este caso, se debe entender un campo de prueba como una superficie continua del reactivo de detección, en particular, una película con una o varias capas, que, como se explicará con más detalle a continuación, se puede aplicar, por ejemplo, a al menos un elemento soporte. El reactivo de detección está configurado para realizar al menos un cambio detectable en presencia del analito. En particular, este cambio detectable puede ser un cambio que se puede detectar de forma física y/o química. A continuación, se hace una referencia particular a los cambios físicos en forma de un cambio que se puede detectar visualmente, en particular, un cambio de color. Sin embargo, en principio, se pueden concebir otros tipos de cambios que se pueden detectar de manera alternativa o adicional, por ejemplo, cambios que se pueden detectar de manera química y/o electroquímica. El reactivo de detección puede comprender,

en particular, al menos una enzima, por ejemplo, glucosa deshidrogenasa (por ejemplo, FAD, NAD +o dependiente de PQQ) y/o glucosa oxidasa. En general, por lo tanto, se pueden usar detecciones de glucosa que comprenden uno o varios de los siguientes reactivos de detección o reactivos de detección enzimáticos: GOD, GlucDOR (GDH dependiente de PQQ y sus mutantes), FADGDH, GDH dependiente de NAD con mediador (por ejemplo, diaforasa) para transferir los equivalentes redox de NADH a un mediador de nitrosoanilina.

Además, el reactivo de detección puede comprender, alternativa o adicionalmente, uno o varios mediadores, es decir, sustancias que pueden transferir cargas eléctricas de una sustancia a otra. En particular, se pueden utilizar mediadores que sean adecuados para la transferencia de electrones. Por ejemplo, esta sustancia puede ser nitrosoanilina. Además, de nuevo alternativa o adicionalmente, el reactivo de detección puede comprender al menos un indicador. Como indicador se puede entender una sustancia que, como tal, puede cambiar al menos una propiedad que se puede detectar, dependiendo de la forma en que esté presente esta sustancia. Por ejemplo, es posible usar sustancias que en forma oxidada y reducida pueden tener diferentes propiedades ópticas, por ejemplo, diferentes colores. De forma alternativa o adicional, el indicador puede comprender una sustancia que tiene diferentes propiedades ópticas en diferentes estados de carga, por ejemplo, diferentes propiedades de color. En general, por lo tanto, se puede entender un reactivo de detección como una sustancia única o una mezcla de sustancias, por ejemplo, como se mencionó anteriormente, una mezcla de al menos una enzima, al menos un mediador y al menos un indicador. Dichos reactivos de detección se conocen básicamente de la técnica anterior, por ejemplo, de la técnica anterior descrita anteriormente.

El campo de prueba presenta al menos una capa de detección que comprende el reactivo de detección. En este caso, se puede usar un sistema con una sola capa de detección, o se pueden usar varias capas de detección que se pueden aplicar directamente una sobre otra o intercalando una o varias capas adicionales. Sin embargo, se prefiere particularmente un sistema con una sola capa de detección. En el ámbito de la presente invención, por capa se entiende en general un elemento en el que un material en capa se aplica de forma plana a un elemento de soporte o que tiene la forma de una película separada. Aunque no necesariamente debe ser así, la capa puede estar configurada para ser cerrada, pero también, por ejemplo, puede tener aberturas. Sin embargo, como se explicará con mayor detalle más adelante, se prefiere particularmente una configuración homogénea, sustancialmente uniforme, preferiblemente sin orificios, de la capa de detección con un espesor de capa homogéneo. El espesor de la capa, es decir, el espesor promedio de la capa de detección, es preferiblemente de 3 a 60 micrómetros, en particular, de 5 a 15 micrómetros, por ejemplo, de 8 micrómetros.

La capa de detección presenta partículas. En el ámbito de la presente invención, por partículas se entiende generalmente sólidos en el rango micrométrico o en el rango nanométrico, que no están conectados directamente entre sí y que pueden formar en estado seco y que pueden formar sin otras sustancias de la capa de detección, por ejemplo, un polvo que fluye libremente. Por ejemplo, las partículas generalmente pueden formar componentes sólidos de errosoles, suspensiones o polvos.

De acuerdo con la invención, se propone que las partículas presenten una distribución de tamaño de las partículas, en particular, en estado seco de la capa de detección, en el que al menos el 90 % de todas las partículas de la capa de detección presente un tamaño de partícula real inferior a 10 micrómetros, preferiblemente inferior a 3 micrómetros o incluso inferior a 1 micrómetro.

Como capa de detección a la que se aplica esta condición, se debe entender la capa de detección completa, cuyo cambio se puede medir. En particular, cuando se mide un cambio que se puede detectar visualmente como, por ejemplo, un cambio de color, se trata de toda la capa de detección que se puede detectar visualmente, opcionalmente, incluso también una capa de reflexión o capa de separación, que se aplica a la capa de detección del lado de aplicación de la muestra, como se explicará con mayor detalle más adelante. Por lo tanto, como se explicará más adelante, la capa de detección puede estar superpuesta, por ejemplo, con al menos una capa adicional, que puede presentar, por ejemplo, propiedades reflectantes. No es necesario que las capas estén claramente separadas unas de otras. Por local se entiende, visto desde el lado de detección, la capa de detección debajo de cada capa de detección que se desea medir hasta, por ejemplo, las partículas reflectantes y/u otro objeto reflectante de una capa directa o indirectamente contiguo.

Como tamaño de partícula se debe entender el diámetro equivalente de una partícula, es decir, un diámetro de una esfera que presenta el mismo volumen y/o área de superficie que la partícula. Se pueden usar diferentes procedimientos para determinar la distribución de tamaño de las partículas. Es importante distinguir entre diferentes casos. Para materias primas, como uno o varias sustancias de relleno, que pueden ser componentes de la capa de detección, el tamaño de partícula se puede calcular, por ejemplo, mediante dispersión láser y/o difracción láser. Los procedimientos ópticos también se pueden usar en una estructura de capa, por ejemplo, de la capa de detección y opcionalmente de una capa de separación aplicada sobre ella, por ejemplo, se pueden aplicar procedimientos basados en reconocimiento de imágenes. De esta manera, por ejemplo, se puede calcular una distribución de tamaño de las partículas, por ejemplo, dentro de la capa de detección, hasta un rango de 3 micrómetros a 10 micrómetros. De nuevo alternativa o adicionalmente, también se pueden usar otros procedimientos, tales como microscopía electrónica de barrido en muestras, por ejemplo, secciones transversales de microtomo. Por medio de este tipo de procedimientos se pueden calcular, por ejemplo, los tamaños de partícula y las distribuciones de tamaño de las partículas en la capa de detección y opcionalmente también en una o varias capas que se apliquen a esta, tales como, por ejemplo, la capa

de separación opcional. También se puede realizar una clara identificación de las partículas, por ejemplo, mediante el uso adicional de espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (EDX). Cuando se utiliza el procedimiento de microscopía electrónica, la resolución alcanza típicamente en el rango de nanómetros, por ejemplo, se pueden detectar todas las partículas con un tamaño de partícula  $> 1$  nanómetro. En general, los dispositivos y procedimientos para determinar la distribución de tamaño de las partículas son conocidos por los expertos en la técnica y están disponibles comercialmente. En el ámbito de la presente invención, dado que el cambio que se puede detectar es preferiblemente un cambio que se puede detectar visualmente, se puede emplear una determinación óptica de la distribución de tamaño de las partículas. Por ejemplo, puede ser un análisis de imagen automático de una imagen de la capa de detección, como se explicará con mayor detalle más adelante. Este reconocimiento automático de imágenes puede tener lugar, por ejemplo, capturando una imagen de al menos parte de la capa de detección por medio de una cámara u otro detector de imágenes de resolución espacial y luego reconociendo partículas individuales mediante reconocimiento de imágenes y asignándolas a una distribución de tamaño. En general, todas las partículas detectadas se pueden usar para determinar la distribución de tamaño de las partículas. Sin embargo, dado que en la práctica las partículas solo se reconocen como tales por encima de un tamaño mínimo, por ejemplo, solo las partículas por encima de un tamaño mínimo predeterminado se pueden tener en cuenta en la determinación de la distribución de tamaño de las partículas, por ejemplo, solo a partir de un tamaño mínimo de 10 nanómetros a 200 nanómetros, en particular, de un tamaño de partícula de 50 nanómetros a 100 nanómetros. En el ámbito de la presente invención, como tamaño de partícula real se debe entender el tamaño de partícula de las partículas en la capa de detección, en la forma en que las partículas están realmente presentes en la capa de detección. Si las partículas en la capa de detección están compuestas por varias partículas primarias, por ejemplo, en forma de aglomerados y/o agregados que se pegan entre sí, se debe usar el diámetro equivalente del agregado o aglomerado, mas no el diámetro equivalente de las partículas primarias. Por lo tanto, no están contemplados por la presente invención los casos en los que la capa de detección se produce de tal manera que se usan polvos que presentan nominalmente las propiedades establecidas pero en los que las partículas del polvo, por ejemplo, durante la preparación de la capa de detección, interactúan entre sí de manera que en la capa de detección acabada y preferiblemente seca están presentes aglomerados y/o agregados por lo que ya no se cumple la condición anteriormente mencionada para todas las partículas en la capa de detección final.

En particular, al menos 80 % de todas las partículas de la capa de detección pueden presentar un tamaño de partícula real inferior a 5 micrómetros, en particular, inferior a 1 micrómetro. Al menos 70 % de todas las partículas de la capa de detección presentan un tamaño de partícula real inferior a 900 nanómetros, preferiblemente inferior a 800 nanómetros.

En el ámbito de la presente descripción, las partículas de la capa de detección pueden ser, en particular, un tamaño medio de partícula de 10 nanómetros a 5 micrómetros, preferiblemente inferior a 1 micrómetro. Preferiblemente, el tamaño medio de partícula puede ser de 20 nanómetros a 1 micrómetro, y se prefiere particularmente de 20 nanómetros a 500 nanómetros. Alternativa o adicionalmente, el tamaño medio de partícula puede ser preferiblemente de 70 nanómetros a 5 micrómetros, en particular, de 70 nanómetros a 1 micrómetro, y se prefiere particularmente de 70 nanómetros a 500 nanómetros.

En el ámbito de la presente descripción, las partículas de la capa de detección pueden presentar, en particular, un tamaño medio de partícula inferior a 1 micrómetro, en particular, inferior a 500 nanómetros y se prefiere particularmente de 300 nanómetros como máximo, o incluso inferior a 100 nanómetros, por ejemplo, 25 nanómetros o menos.

Como tamaño medio de partícula se puede entender, por ejemplo, la mediana de todos los tamaños de partícula de la distribución de tamaño de las partículas, lo que generalmente se denomina  $d_{50}$ . Esta mediana se selecciona de manera que aproximadamente 50 % de las partículas presenten un tamaño de partícula inferior al valor  $d_{50}$ , y aproximadamente 50 % de las partículas presenten un tamaño de partícula superior a esta mediana.

En particular, las partículas pueden comprender uno o varios de los siguientes materiales:  $\text{SiO}_2$ ; tierra de diatomeas; un silicato, en particular, aluminosilicato de sodio; un óxido metálico, en particular, óxido de aluminio y/o óxido de titanio; un material oxidado sintético, en particular, un material oxidado nanoparticulado, en particular, óxido de silicio nanoparticulado y/u óxido de aluminio y/o óxido de titanio; caolín; polvo de vidrio; sílice precipitada; sulfato de calcio  $\times 2 \text{H}_2\text{O}$ .

Se prefiere particularmente que todas las partículas de la capa de detección con un tamaño de partícula mayor a 10 nanómetros, en particular, mayor a 20 nanómetros o mayor a 100 nanómetros sean partículas inorgánicas. Como ya se definió anteriormente, el término "partícula" no pretende comprender un formador de película orgánico y una película orgánica que se forme a base de este, ya que las películas generalmente no están compuestas de partículas sueltas que no están conectadas entre sí, sino porque las películas típicamente forman una capa continua. Sin embargo, como se explicará con mayor detalle más adelante, las partículas de la capa de detección se pueden incrustar en al menos una de estas películas.

La capa de detección puede presentar, en particular, un índice de refracción de 1,1 a 1,8, preferiblemente de 1,2 a 1,5. Por lo tanto, la capa de detección, en particular, ya sea en estado seco o también en estado húmedo, puede presentar un índice de refracción cercano al índice de refracción del agua (alrededor de 1,33).

El elemento de prueba de diagnóstico, en particular, el al menos un reactivo de detección y/o la al menos una capa de detección, puede configurarse de manera tal que el cambio que se puede detectar finalice dentro de un período de tiempo inferior a 60 segundos, preferiblemente, inferior a 40 segundos y, en particular, preferiblemente de 20 segundos o menos. Este período de tiempo también se puede denominar tiempo de reacción. Si, por ejemplo, el cambio que se puede detectar contiene un cambio óptico en la forma de un cambio de color, entonces el tiempo de reacción se puede definir, por ejemplo, como el período de tiempo desde la aplicación de la muestra en el campo de prueba dentro del cual se ha completado una reacción de color hasta el punto de que a continuación la remisión relativa cambia menos del 1 % por medio segundo. La remisión relativa puede ser, por ejemplo, la relación entre la remisión y la remisión de un elemento de prueba sin una muestra y/o un estándar de calibración. El tiempo de reacción se puede ajustar, por ejemplo, mediante una selección apropiada de la química de prueba del reactivo de detección y/o por la composición completa del campo de prueba y/o solo por la distribución de tamaño de las partículas utilizada en el ámbito de la presente invención.

En particular, el campo de prueba puede presentar un lado de aplicación para aplicar la muestra de fluido corporal y un lado de detección para detectar un cambio en el reactivo de detección, en particular, un cambio óptico, por ejemplo un cambio de color. El campo de prueba presenta también al menos una capa de separación. Esta capa de separación puede presentar varias funciones. Por ejemplo, se puede configurar para separar los componentes gruesos de la muestra, en particular, para separar eritrocitos. Alternativa o adicionalmente, la capa de separación también se puede configurar para cubrir el color natural de la muestra, por ejemplo, el color de la sangre. Para este propósito, como se explicará con mayor detalle más adelante, la capa de separación comprende, por ejemplo, al menos un pigmento, preferiblemente al menos un pigmento blanco. De nuevo alternativa o adicionalmente, la capa de separación también se puede configurar para cumplir una función de reflexión, por ejemplo, para reflejar una luz de medición que se disperse en la capa de detección y/o la luz emitida en la capa de detección, como, por ejemplo, luz fluorescente.

La capa de separación está dispuesta en el lado más cercano al lado de aplicación de la capa de detección. Por ejemplo, la capa de separación se puede aplicar directa o indirectamente a la capa de detección. Como aplicación indirecta se puede entender, por ejemplo, intercalar una o varias capas adicionales. La capa de separación se puede configurar, en particular, para que los componentes gruesos de la muestra, en particular, en el caso de los eritrocitos de sangre entera, no puedan acabar en el lado de detección de la capa de detección o ni siquiera puedan acabar en la capa de detección.

Como componentes gruesos, generalmente es posible que se entiendan los componentes que tienen un tamaño, por ejemplo, un tamaño de partícula y/o un diámetro equivalente de más de 1 micrómetro, en particular, de más de 5 micrómetros. En particular, los eritrocitos que presentan un color natural característico e intenso pueden alterar o incluso impedir la detección del color habitual de la glucosa en sangre, por ejemplo, por medio de los reactivos de detección descritos anteriormente, en el lado de detección.

En particular, la capa de separación puede ser de grano grueso, es decir, también puede tener una estructura particulada, siendo posible que las partículas de esta capa de separación tengan una configuración de grano más grueso que las partículas de la capa de detección. En particular, la capa de separación puede presentar partículas con un tamaño de partícula de más de un micrómetro. La capa de separación presenta al menos un pigmento, es decir, un colorante particulado, preferiblemente un colorante inorgánico con partículas que presentan un tamaño medio de partícula, que se encuentra por encima de la longitud de onda de la luz utilizada para la detección óptica, por ejemplo, por encima de una longitud de onda de 660 nanómetros. En particular, la capa de separación, como se ha mencionado anteriormente, presenta al menos un pigmento para la cobertura óptica del color natural de la sangre. La capa de separación puede comprender, en particular, al menos un pigmento de color blanco (pigmento blanco). La capa de separación puede comprender, por ejemplo, uno o varios de los siguientes pigmentos: dióxido de titanio; dióxido de circonio; titanato de bario; circonato de bario; silicato de circonio. Es posible una combinación de los pigmentos mencionados y/o de otros. Se prefiere particularmente el uso de dióxido de circonio y/o dióxido de titanio. El pigmento tiene para la reflexión óptima de la luz preferiblemente un tamaño medio de partícula entre 200 nanómetros y 400 nanómetros.

Alternativa o adicionalmente, la capa de separación puede presentar opcionalmente al menos una sustancia de relleno, preferiblemente una sustancia de relleno con un índice de refracción  $< 2,0$ . Por medio de esta sustancia de relleno se puede, por ejemplo, ajustar un comportamiento de succión y/o una translucidez de la capa de separación. La al menos una sustancia de relleno puede comprender, por ejemplo, sílice y/o un silicato. Por ejemplo, la sustancia de relleno puede presentar un tamaño medio de partícula  $< 5$  micrómetros.

En particular, la capa de separación puede presentar un pigmento con un índice de refracción de al menos 2,0, preferiblemente de al menos 2,2 o incluso al menos 2,5, en una concentración de al menos 25 % del peso, basado en una capa seca, es decir, una capa de separación seca. En particular, este pigmento pueden ser partículas de dióxido de titanio y/o partículas de dióxido de circonio, o el pigmento puede comprender estos tipos de partículas. Sin embargo, otras configuraciones son posibles. Las partículas de dióxido de titanio o las partículas de dióxido de circonio pueden presentar, en particular, un tamaño medio de partícula de, por ejemplo, al menos aproximadamente 300 nanómetros. Sin embargo, se pueden tolerar las desviaciones preferiblemente no mayores a 50 % y, en particular preferiblemente no mayores a 10 %. Un tamaño de partícula de 300 nanómetros suele ser óptimo para un pigmento blanco que refleja

la luz visible. Las partículas de dióxido de titanio presentan propiedades particularmente de dispersión de la luz, por lo que la capa de separación también puede actuar como una capa de reflexión para remitir o reflejar la luz del lado de detección de la luz reflejada. Alternativa o adicionalmente, sin embargo, la estructura de capa del campo de prueba también puede comprender al menos una capa de reflexión, que puede tener las propiedades mencionadas.

El elemento de prueba de diagnóstico, como se ha mencionado anteriormente, puede estar configurado como una estructura de capas y/o puede comprender una estructura de capas. Además de la al menos una capa de detección, puede comprender además la al menos una capa de separación y/o al menos una capa de reflexión. El campo de prueba se puede aplicar con su lado de detección a al menos un elemento de soporte. En particular, el elemento de prueba de diagnóstico puede comprender, por lo tanto, al menos un elemento de soporte, en el que el elemento de soporte presenta preferiblemente al menos una región transparente. El campo de prueba se puede aplicar con su lado de detección al área transparente. El elemento de soporte puede ser, por ejemplo, un elemento de soporte plano, en particular, un elemento de soporte en forma de tira. El elemento de soporte puede comprender, por ejemplo, una capa de plástico, una capa de papel, una capa de cerámica o una estructura laminada y/o una combinación de las capas mencionadas. El elemento de soporte fuera del área transparente se puede configurar, por ejemplo, mayoritariamente opaco, para que el lado de detección del campo de prueba solo se pueda ver a través del área transparente. El lado de aplicación de la muestra se puede disponer en un lado del campo de prueba que esté más alejado del elemento de soporte. El elemento de prueba de diagnóstico se puede configurar de manera que la muestra de fluido corporal se aplique directamente al lado de aplicación para que, por ejemplo, un usuario del elemento de pruebas de diagnóstico pueda acceder directamente al lado de aplicación, por ejemplo, para aplicar la muestra a la que se puede acceder, al menos parcialmente, directamente sobre la superficie del lado de aplicación por goteo, con pequeños golpes o de otra manera. Alternativamente, también se podría prever un sistema de transporte, que se configura para transportar la muestra de fluido corporal desde un punto de aplicación dispuesto en otra ubicación al lado de aplicación, pero esto es menos preferido.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la capa de detección puede comprender, además de las partículas y el reactivo de detección, otras sustancias. Las partículas preferiblemente no son idénticas al reactivo de detección o al menos no completamente idénticas al reactivo de detección, en el que, como se ha descrito anteriormente, el reactivo de detección también puede ser una mezcla de varios reactivos de detección o varias sustancias que juntas forman el reactivo de detección. La capa de detección se puede configurar, por ejemplo, de manera análoga a la primera capa de película del soporte de prueba de diagnóstico descrito en el documento EP 0 821 234 B1, al margen de la distribución de tamaño de las partículas descrita anteriormente. Por lo tanto, la capa de detección puede comprender, por ejemplo, al menos un formador de película orgánica. Este al menos un formador de película puede comprender, por ejemplo, una dispersión de propionato de polivinilo. Alternativa o adicionalmente, sin embargo, se pueden usar otros formadores de película.

En un segundo aspecto de la presente invención, se propone un procedimiento para preparar un elemento de prueba de diagnóstico para detectar un analito en una muestra de fluido corporal. Como se ha mencionado anteriormente, este elemento de prueba de diagnóstico puede ser, en particular, un elemento de prueba de diagnóstico de acuerdo con una o varias de las configuraciones descritas anteriormente o una o varias de las configuraciones que se describen a continuación. El elemento de prueba de diagnóstico presenta al menos un campo de prueba con al menos un reactivo de detección. El reactivo de detección está diseñado para sufrir al menos un cambio detectable en presencia del analito, en particular, un cambio óptico. El campo de prueba presenta al menos una capa de detección que comprende el reactivo de detección. En el caso del procedimiento se crea una capa de detección que presenta estas partículas, en las que al menos el 90 % de todas las partículas de la capa de detección presenta un tamaño de partícula real inferior a 10 micrómetros, preferiblemente inferior a 3 micrómetros o incluso inferior a 1 micrómetro. Para conocer las distribuciones de tamaño de las partículas particularmente preferidas, se puede hacer referencia a la descripción anterior.

La capa de detección se puede crear, en particular, por medio de al menos un procedimiento químico húmedo, en particular, a base de una o varias dispersiones, preferiblemente dispersiones acuosas. Este tipo de procedimientos de formación de capas a base de una o varias dispersiones son básicamente conocidos por el experto en la materia, en los que a su vez, a modo de ejemplo, se puede hacer referencia, por ejemplo, a la técnica anterior mencionada anteriormente, en particular, al documento EP 0 821 234 B1.

Para garantizar que las condiciones mencionadas de distribución de tamaño de las partículas estén presentes en la capa de detección acabada, se pueden usar varios procedimientos. En particular, para proporcionar las partículas en la capa de detección se puede usar al menos un polvo, por ejemplo, un polvo de pigmento. Este polvo puede presentar aglomerados de partículas primarias que ya pueden estar presentes directamente en el polvo de partida o que también se pueden formar temporalmente durante el procedimiento de preparación, por ejemplo, en la dispersión. Sin embargo, en el caso del procedimiento de preparación propuesto, el polvo de pigmento se procesa por medio de al menos un procedimiento de dispersión mecánica para descomponer al menos parcialmente los aglomerados para que la capa de detección tenga la distribución de tamaño de las partículas mencionada anteriormente. Por procedimiento de dispersión se entiende generalmente un procedimiento en el que el polvo, por ejemplo, el polvo de pigmento se dispersa en al menos un medio líquido, preferiblemente un medio acuoso, sin que el polvo se disuelva en este medio y se forme así una dispersión. A la dispersión se pueden añadir otras sustancias. A diferencia de los procedimientos

de dispersión química, que también se pueden usar, pero que son menos preferidos, por procedimiento de dispersión mecánica se entiende un procedimiento de dispersión en el que la distribución del polvo en el medio se mantiene por medio de una acción mecánica aplicada a la dispersión. El tipo de acción mecánica puede ser, en particular, una que en el caso de esta acción mecánica, fuerzas potentes de cizallamiento actúen sobre la dispersión y, en particular, sobre el polvo y los aglomerados que este contiene, entre los cuales también se deben detectar agregados, para romperlos así al menos parcialmente, y se formen así partículas más pequeñas que cumplan la condición de distribución de tamaño de las partículas mencionada anteriormente.

En particular, se puede utilizar un disolvente para llevar a cabo el proceso de dispersión mecánica. Por disolución, se entiende generalmente un dispositivo que permite mantener una distribución del polvo en un medio, en particular, una distribución sustancialmente homogénea, y puede ejercer simultáneamente fuerzas potentes de cizallamiento sobre la dispersión. Estas fuerzas de cizallamiento se pueden ejercer, por ejemplo, por medio de dos o varias superficies separadas la una de la otra que se puedan mover una contra la otra, entre las que se recibe la dispersión. Los disolventes, por ejemplo, en forma de agitadores de disco están disponibles comercialmente, en los que se ejercen fuerzas potentes de cizallamiento sobre la dispersión por medio de un disco agitador, que se coloca en rotación, para separar así los aglomerados. Alternativa o adicionalmente, los disolventes se pueden utilizar de acuerdo con un principio de rotor/estator. Así, por medio de estos disolventes, se puede producir o preparar una dispersión, a base de la cual se crea la capa de detección para que cumpla así la condición mencionada anteriormente de la distribución de tamaño de las partículas.

Alternativa o adicionalmente, se puede utilizar un molino de tres rodillos (también llamado molino de tres cilindros) para llevar a cabo el procedimiento de dispersión mecánica, en particular, para dispersar las sustancias de relleno. En el caso de este tipo de molino de tres rodillos, se utilizan al menos tres rodillos o cilindros, que funcionan a diferentes velocidades entre sí. Generalmente se ajusta una distancia entre los rodillos o cilindros que, en comparación, es pequeña, por ejemplo, de 1 mm a menos del rango del nanómetro.

Para proporcionar las partículas, por un lado, como se explicará con mayor detalle más adelante, se pueden usar partículas disponibles comercialmente que cumplan la condición establecida para la distribución de tamaño de las partículas. Alternativa o adicionalmente, sin embargo, se pueden usar otros procedimientos de molienda. Así, para proporcionar las partículas se puede usar, por ejemplo, al menos un polvo, en particular, al menos un pigmento en polvo, en el que el polvo haya sido sometido a al menos una etapa de molienda. Por etapa de molienda se entiende un procedimiento en el que el polvo se muele en estado seco o húmedo por la acción de fuerzas mecánicas. Se conocen diferentes procedimientos de molienda. La al menos una etapa de molienda puede comprender, por ejemplo, una etapa de molienda húmeda, en particular, en un molino de bolas, y/o una etapa de molienda en seco, en particular, en un molino de chorro de aire. El experto en la técnica conoce también otros procesos de molienda que están disponibles comercialmente, por lo que se pueden seleccionar los molinos correspondientes que se puedan adaptar al tipo de polvo y/o al tipo de distribución de tamaño de las partículas deseada.

Al proporcionar las partículas, en particular, se puede usar un polvo de un material oxidico sintético. Este tipo de materiales oxidantes sintéticos, como se explicará en mayor detalle más adelante a modo de ejemplo, ya están parcialmente disponibles comercialmente en los tamaños de partículas mencionados, por ejemplo, de fabricantes de materiales que se han especializado en micromateriales o nanomateriales. El al menos un material oxidico sintético puede ser, en particular, un material oxidico nanoparticulado. En el ámbito de la presente invención, por material nanoparticulado se entiende generalmente un material cuyas partículas presentan un tamaño medio de partícula inferior a 100 nanómetros. El material oxidado puede ser, en particular, óxido de silicio y/o óxido de aluminio y/o óxido de titanio, por ejemplo,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  y/o  $\text{TiO}_2$  y/o  $\text{SiO}_2$ . En particular, los óxidos mencionados anteriormente, que también pueden estar presentes como óxidos mixtos, pueden estar presentes en forma de nanopartículas. En otro aspecto de la presente invención, se propone un procedimiento para detectar un analito en una muestra de fluido corporal, en particular, sangre entera. En este caso, se emplea un elemento de prueba de diagnóstico en una o varias de las configuraciones descritas anteriormente y/o en una o varias de las formas de realización descritas con mayor detalle más adelante. La muestra presenta un volumen inferior a 2 microlitros, en particular, inferior a 0,5 microlitros y, en particular, preferiblemente inferior a 0,3 microlitros, por ejemplo, de 100 nanolitros. El cambio que se puede detectar de al menos un reactivo de detección del campo de prueba del elemento de prueba de diagnóstico utilizado, como ha mencionado anteriormente, puede ser, en particular, un cambio que se puede detectar ópticamente. En este caso, se prefiere particularmente utilizar un detector óptico de resolución espacial para detectar el cambio detectable. Por detector óptico de resolución espacial se entiende un detector óptico que presenta múltiples sensores ópticos que no pueden evaluar regiones completamente superpuestas del lado de detección de la capa de detección. El detector óptico de resolución espacial puede comprender, en particular, al menos un sensor de imagen, es decir, una serie de detectores ópticos, que pueden estar configurados unidimensional o bidimensionalmente. El detector óptico puede comprender, en particular, un chip CCD y/o CMOS. Además, el detector óptico de resolución espacial puede comprender al menos un elemento óptico para formar imágenes del lado de detección y/o de la capa de detección sobre una superficie sensible a la imagen del detector óptico de resolución espacial. En el caso de un detector óptico de resolución espacial y los pequeños volúmenes de muestra mencionados, las ventajas de la presente invención, que se describirán con mayor detalle más adelante, se vuelven particularmente perceptibles, ya que en las capas de detección convencionales debido a los efectos de humectación desventajosos y la irregularidad del cambio detectable, en particular, del cambio detectable ópticamente, el nivel de incertidumbre en la detección es alto.

El elemento de prueba de diagnóstico propuesto, el procedimiento de preparación propuesto y el procedimiento de detección propuesto presentan muchas ventajas respecto a los tipos de dispositivos y procedimientos conocidos mencionados. Por lo tanto, una base importante de la presente invención es reconocer que cuando se usan pequeñas partículas en forma de partículas para producir una capa de detección, generalmente aparecen formaciones de agregados, que impiden que la capa de detección se beneficie del tamaño pequeño de partícula de las partículas primarias. Una tira de prueba, se produce de acuerdo con los procedimientos conocidos del estado de la técnica a base de materiales que tienen los tamaños de partículas descritos presenta generalmente solo partículas en un estado agregado. Los tamaños de partícula conocidos por los procedimientos de producción habituales, que se emplean como material de partida en polvos, son, por lo tanto, solo valores nominales que generalmente no se encuentran en la distribución de tamaño real de las partículas en la capa de detección. En general, en la producción de la capa de detección, el material de partida (que aquí generalmente se denomina sustancia de relleno o que puede contener al menos una sustancia de relleno) debe estar finamente dispersado. En el caso de algunas sustancia de relleno, por ejemplo, Aerosil y/o Aerioxide, generalmente no es necesario tener esto en cuenta, ya que en muchos casos el fabricante ha optimizado estos materiales para facilitar el manejo del disco.

Por el contrario, de acuerdo con la invención, la producción del elemento de prueba de diagnóstico se puede llevar a cabo con una capa de detección, lo que conduce a una distribución de tamaño de las partículas considerablemente más favorable en la capa de detección acabada. De esta manera, los polvos de partida se pueden usar, por ejemplo, con tamaños medios de partículas de, por ejemplo, hasta 50 nanómetros, preferiblemente hasta 30 nanómetros, en los que se puede prever una dispersión de las partículas antes de la producción de la capa de detección, por ejemplo, antes de la aplicación de una dispersión para producir la capa de detección al elemento de soporte para que los tamaños de partícula cumplan la condición establecida. En este caso, por ejemplo, los tamaños de partícula de las partículas primarias del polvo de partida mayoritariamente se pueden retener o la aglomeración y/o agregación de las partículas primarias durante la preparación solo puede ocurrir en menor medida.

En este caso, como materiales de partida para la producción de la dispersión se pueden usar materiales disponibles comercialmente, por ejemplo, los polvos disponibles comercialmente que ya tienen el tamaño de partícula deseado o la distribución del tamaño de las partículas. Sin embargo, alternativa o adicionalmente, también se puede concebir que al menos partes de los materiales de partida, por ejemplo, del al menos un polvo, se muelan primero antes de producir la capa de detección, como se describe anteriormente, para lograr una distribución de tamaño de las partículas que corresponda a los tamaños de partícula preferidos.

Además, se ha demostrado que, como se explicará con mayor detalle más adelante, no todos los materiales son adecuados para este tipo de proceso porque, dependiendo del material seleccionado durante la dispersión, este tipo de materiales también pueden actuar como un espesante lo que puede causar una gelificación. En particular, ciertos materiales, por ejemplo, con una concentración mayor al 3 % del peso, en particular, mayor al 5 % del peso o incluso mayor al 20 % del peso, respecto a la dispersión, en ciertas circunstancias actúan como espesantes. Sin embargo, los materiales mencionados anteriormente han demostrado ser particularmente ventajosos ya que, en al menos a concentraciones de hasta el 3% del peso en la dispersión, preferiblemente más, por ejemplo, de hasta el 5 % del peso o hasta el 20 % del peso, no ocurre este tipo de efecto de espesamiento o al menos generalmente no ocurre.

La presente invención se basa además en la superación de los prejuicios técnicos que a menudo se asocian a las capas de detección de grano fino. Por ejemplo, el efecto de las partículas pequeñas en la profundidad del color y el tiempo de reacción en las capas de detección hasta ahora ha sido desconocido. Para lograr la precisión requerida, por ejemplo, en el caso de la detección óptica, por lo general se deben alcanzar diferencias de remisión, también conocidas como carrera de reacción, mayores al 40 %, preferiblemente mayores al 50 % o incluso mayores al 60 % de remisión relativa respecto al valor en blanco de la capa de detección seca, entre las concentraciones de glucosa de 10 mg/dl y 600 mg/dl, que típicamente forman un rango de medición. Por remisión se entiende generalmente la reflexión difusa, no dirigida de las ondas, en particular, de la luz, en contraste con una reflexión regular dirigida. La remisión a menudo se refiere a la superficie del lado de detección y también se denomina grado de remisión. Por grado de remisión se debe entender la relación de la luminancia reflejada por una superficie respecto a una luminancia de una superficie en un blanco de referencia. La remisión en elementos de prueba ópticos, como, por ejemplo, los elementos de prueba descritos anteriormente en el estado de la técnica, es una medida común y los expertos en la materia la conocen.

Además, en el caso de los elementos de prueba de diagnóstico convencionales, los tiempos de reacción por lo general son inferiores a 10 segundos. Por tiempo de reacción se debe entender un tiempo en el que se ha establecido un estado sustancialmente estacionario tras haber aplicado la muestra al campo de prueba. Sin embargo, en particular con respecto a los tiempos de reacción, se temía hasta ahora que los componentes más densos de la capa de detección necesitaran más tiempo para penetrar y disolverse en el líquido de la muestra. El líquido de muestra puede ser, por ejemplo, sangre o plasma sanguíneo obtenido a partir de la separación de los eritrocitos.

Fue más sorprendente aún que, como se explicará con mayor detalle más adelante, en las distribuciones de tamaño preferidas de las partículas, la carrera de remisión prácticamente no cambió en comparación con las capas de detección de grano grueso y el tiempo de reacción permaneció al menos aproximadamente igual. Al mismo tiempo,

sin embargo, se pudo lograr un humedecimiento mucho más homogéneo de los campos de prueba, lo que permitió que, como también se explicará con mayor detalle más adelante, en particular, el coeficiente de variación se pudiera reducir significativamente. Al superar los prejuicios mencionados anteriormente, se pueden producir elementos de prueba de diagnóstico que presentan una precisión significativamente mayor que los elementos de prueba de diagnóstico convencionales y que también son adecuados para la medición de muestras de muy pequeño volumen, en particular, con detectores ópticos de resolución espacial.

Breve descripción de las figuras

Otros detalles y características de la invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción de ejemplos de realización preferidos, en particular, junto con las reivindicaciones secundarias. Los ejemplos de realización se muestran, al menos de manera parcialmente esquemática, en las figuras. Los mismos números de referencia en cada una de las figuras denotan los mismos elementos o los elementos con la misma función o los mismos con respecto a sus funciones. La invención no está limitada a los ejemplos de realización.

En detalle:

La Figura 1 muestra una representación esquemática en sección transversal de un elemento de prueba de diagnóstico de acuerdo con la presente invención.

Las Figuras 2A y 2B muestran ejemplos de la humectación de una superficie de campo de prueba de un campo de prueba de un elemento de prueba de diagnóstico convencional (Figura 2A) y de un elemento de prueba de diagnóstico de acuerdo con la invención (Figura 2B).

La Figura 3 muestra las curvas de remisión de los elementos de prueba de diagnóstico conforme a las Figuras 2A y 2B.

La Figura 4 muestra otros ejemplos de realización de los elementos de prueba de diagnóstico de acuerdo con la presente invención.

La Figura 5 muestra las curvas de remisión de muestras con ingredientes dispersos de manera diferente.

Las Figuras 6A a 6D muestran micrografías de muestras con granularidad diferente.

Las Figuras 7A y 7B muestran desviaciones estándar de los valores de gris de las Figuras 6A a 6D, y las Figuras 8A y 8B muestran funciones de autocorrelación de los valores de gris de las Figuras 6A a 6D.

**Ejemplos de realización**

La Figura 1 muestra esquemáticamente una posible estructura de un elemento de prueba de diagnóstico 110 en una representación en sección transversal, que también se puede usar en el ámbito de la presente invención. En este ejemplo de realización, el elemento de prueba de diagnóstico 110 comprende un elemento de soporte 112, que puede estar configurado, por ejemplo, como una tira. En general, el elemento de prueba de diagnóstico 110 puede estar configurado como una tira de prueba.

El elemento de soporte 112 comprende al menos una área transparente 114. En el área del área transparente 114, se aplica una estructura de capas al elemento de soporte 112, que puede cubrir total o parcialmente el área transparente 114. En el ejemplo de realización ilustrado, esto comprende dos capas y forma un campo de prueba 116. En el ejemplo de realización ilustrado, este campo de prueba 116 comprende, a modo de ejemplo, una capa de detección 118 con una cara de detección del lado del elemento de soporte 112 y del área transparente 114. Además, en el ejemplo de realización ilustrado, el campo de prueba 116 comprende una capa de separación 122 en el lado de la capa de detección 118 más alejado del elemento de soporte 112. Esta capa de separación 122 sirve para separar los componentes gruesos de una muestra 126 de fluido corporal, que se puede aplicar a una superficie de campo de prueba 124 sobre un lado de aplicación 128.

El área transparente 114 puede estar configurada, por ejemplo, simplemente como una abertura, por ejemplo, como un orificio, en el elemento de soporte 112. En particular, en este caso, pero también en otras formas de realización, además del elemento de soporte 112, se puede aplicar una película de soporte u otro tipo de soporte, preferiblemente, una película de soporte transparente. Esta película de soporte opcional está designada por el número de referencia 119 en la Figura 1. Esta lámina de soporte 119 se puede introducir, por ejemplo, entre el elemento de soporte 112 y la capa de detección 118 en la estructura de capa que se muestra en la Figura 1. Por ejemplo, la película de soporte 119 puede estar diseñada como parte de una película de reacción, en la que la al menos una capa de detección 118 y opcionalmente la al menos una capa de separación 122 se aplican a la película de soporte 119, por ejemplo, por medio de un proceso de presión y/o un método de cámara cerrada. Posteriormente, esta película de reacción se aplica luego al elemento de soporte real 112 con el área transparente 114, para que la capa de detección 118 se pueda ver

a través del área transparente 114. Sin embargo, alternativamente el área transparente 114 también puede estar completa o parcialmente llena de un material transparente, por ejemplo, un material plástico transparente, y/o todo el elemento de soporte 112 puede estar configurado como un elemento de soporte transparente. En particular en este caso, pero también en otros casos, la estructura de capas con al menos una capa de detección 118 y opcionalmente con la al menos una capa de separación 122 también se puede aplicar directamente al elemento de soporte 112. Alternativamente, de acuerdo con las realizaciones anteriores, aquí también se puede usar una película de reacción que se aplica al elemento de soporte 112.

Se debe tener en cuenta que la estructura del elemento de prueba de diagnóstico que se muestra en la Figura 1 se debe entender solo a modo de ejemplo y que son posibles otros tipos de estructuras. Por ejemplo, se pueden prever varias capas de detección 118 y/o múltiples capas de separación 122. Además, la estructura que se muestra en la Figura 1 se puede complementar con otros varios elementos, que no se muestran. Por ejemplo, se puede prever una red de expansión en la superficie del campo de prueba 124. Además, se puede cubrir parte de la superficie del campo de prueba 124, por ejemplo, con un material hidrófobo, por ejemplo, solo para permitir que una parte del lado de aplicación 128 permanezca accesible para aplicar adicionalmente muestra 126. Para posibles configuraciones del elemento de prueba de diagnóstico 110, se puede hacer referencia, por ejemplo, al documento EP 0 821 234 B1 mencionado anteriormente o a otras estructuras de tiras de prueba conocidas.

#### Ejemplo 1

La presente invención se refiere esencialmente a la configuración y a la preparación de la capa de detección 118. Con el fin de comparar los elementos de prueba de diagnóstico 110 con la distribución de tamaño de las partículas descrita anteriormente de acuerdo con la invención con los elementos de prueba de diagnóstico convencionales, se podrían usar básicamente estructuras de capas, como se describe, por ejemplo, en el documento EP 0 821 234 B1. En el presente ejemplo, sin embargo, se utilizan estructuras de capas del campo de prueba 116, que se preparan de la siguiente manera:

#### Muestra A:

Como muestra comparativa (muestra A), se prepara un elemento de prueba de diagnóstico 110 de acuerdo con la siguiente estructura:

#### a) Capa de detección:

Para preparar una dispersión para la capa de detección 118, se preparan primero dos soluciones parciales (solución parcial 1 y 2), que luego se combinan para formar una mezcla parcial. El término "solución" se usa en este contexto, independientemente de si realmente existe una verdadera solución o simplemente una dispersión, por ejemplo. Se prepara una solución de enzima, y se mezclan la mezcla parcial 1 y la solución de enzimas para formar una masa de recubrimiento. El procedimiento es el siguiente:

Solución parcial 1: Se disuelven 0,34 g de goma de xantano en 35,5 g de tampón de fosfato de glicerol-3 0,02 M de pH 6,5 durante 24 horas y se mezclan con 5,0 g de dispersión de propionato de polivinilo.

Solución parcial 2: Se dispersan 5,2 g de Transpafill en 21,5 g de agua durante 10 minutos con un Ultraturrax.

Mezcla parcial 1: Se combinan ambas soluciones parciales y, tras añadir 0,15 g de cloruro de tetraetilamonio, 0,17 g de NOctanoilNMetilglucamida, 0,06 g de metiloctadeceniltaurato de sodio ("Gerocon T 77") y 0,88 g de PVP (PM 25 000) se agitan moderadamente durante 1 hora con un agitador de paletas. Luego se añaden las siguientes soluciones parciales en este orden:

- 0,10 g de cloruro de amonio bis(2-hidroxiethyl) (4-hidroxiiminociclohexa2,5-dienilidina) en 1,5 g de agua,
- 0,65 g de sal de hexasodio del ácido fosfomolibdico 2,18 en 1,5 g de agua, que permite ajustar el pH a 6,7 con NaOH.

Solución de enzimas: A 25,6 g de tampón de fosfato de glicerol 0,1 M de pH 6,5 se añaden 5 mg de sal sódica de PQQdi y 0,28 g de GDH (mutante 31) y 0,16 g de una solución de CaCl 2 1 M y se agita durante > 3 horas.

La mezcla parcial 1 y la solución de enzimas se mezclan con una solución de 20 mg de K3[Fe(CN) 6] en 0,4 g de agua y 1,0 g de 2Methyl2butanol y agitan durante 30 min. Esto da como resultado una masa de recubrimiento para preparar la capa de detección 118.

La masa de recubrimiento preparada de esta manera se aplica a una película de soporte con un peso por unidad de área de 90 g/m<sup>2</sup> 119 en forma de una película de policarbonato con un espesor de 125 micrómetros y se seca.

Transpafill® es un polvo de silicato de aluminio y sodio disponible en el mercado producido por Evonik Industries AG. El efecto de mejora de la precisión del metiloctadecenilaurato de sodio ("Geropon T 77") se ha descrito en el documento EP 0 995 994.

5 b) Capa de separación:

Además, para la preparación de la capa de separación 122, en el presente ejemplo de realización primero se preparan dos soluciones parciales (solución parcial 1 y solución parcial 2) y luego estas se combinan. En este caso el procedimiento es el siguiente:

10 Solución parcial 1: A una suspensión de 1,37 g de Gantrez S 97 en 13,5 g de agua se añaden 2,2 g de NaOH al 16 % y se deja en remojo durante la noche. Luego, se añaden 0,40 g de cloruro de tetraetilamonio, 0,34 g de NOctanoilNMetilglucamida, 0,06 g de metiloctadecenilaurato de sodio ("Geropon T 77") y 1,87 g de PVP (MW 25,000) y se agitan durante 1 hora.

15 Solución parcial 2: 14,3 g de dióxido de titanio E 1171 de la empresa Kronos y 1,95 g de sílice precipitada FK 320 de la empresa Degussa se dispersan en 36,4 g de agua durante 10 minutos con un Ultraturrax.

20 Tras mezclar las soluciones parciales, se añaden 5,7 g de dispersión de propionato de polivinilo, 0,15 g de cloruro de amonio bis(2-hidroxietil)(4-hidroximinociclohexa2,5-dienilidina) en 4,2 g de agua, 1,85 g de sal de hexasódica de ácido 2,18-fosfomoláxico en 4,2 g de agua, 10 mg K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] en 0,4 g de agua y se ajusta el pH a 6,8 con NaOH. Tras haber añadido 1,0 g de 2Metil2butanol, se agita durante una 1 hora más.

25 El término Gantrez® es el nombre de un producto de ISP International Specialty Products, Colonia, Alemania. Químicamente, este es un copolímero de ácido maleico y metilviniléter.

La masa de recubrimiento preparada de esta manera combinando las soluciones parciales 1 y 2 luego se aplica con un peso por unidad de área de 45 g/m<sup>2</sup> a la película de soporte 119 de policarbonato con su primer recubrimiento, descrita anteriormente, es decir, a la capa de detección 118 y se seca.

30 Muestra B:

35 Para preparar un elemento de prueba de diagnóstico 110 de acuerdo con la invención, en la capa de detección 118, la materia prima Transpafill®, que es esencialmente responsable del grosor de esta capa de detección 118, se somete a un proceso de molienda. Opcionalmente, la diatomita, que también es una materia prima de grano grueso de la capa de separación 122, que actúa como sílice precipitada, también se puede someter a un proceso de molienda. Por el contrario, en la capa de separación 122, no se debe moler el dióxido de titanio, que sirve como pigmento blanco y, por lo tanto, debe presentar una reflectividad para la luz irradiada, por ejemplo, la luz de longitud de onda de 660 nanómetros. Esta luz se irradia, por ejemplo, a través del área transparente 114, pasa a través de la capa de detección 118 y se refleja en la capa de separación 122, para que la capa de separación 122 pueda servir al mismo tiempo como capa de reflexión en el ejemplo de realización mostrado en la Figura 1.

45 Para triturar las sustancia de relleno de grano grueso Transpafill® y opcionalmente sílice precipitada mencionados anteriormente, estas se someten a una etapa de molienda húmeda. Esto se puede llevar a cabo con un molino agitador de bolas, por ejemplo, durante 20 minutos, lo que conduce a la medida correspondiente de un tamaño de partícula d<sub>50</sub> de aproximadamente 0,3 micrómetros y un tamaño de partícula d<sub>90</sub> de aproximadamente 0,5 micrómetros. El valor d<sub>90</sub> denota el tamaño de partícula en el que 90 % de las partículas son más finas que el valor d<sub>90</sub>.

50 Con las muestras A y B preparadas de este modo, se pueden llevar a cabo varios experimentos comparativos. Por medio de estos experimentos comparativos, es posible eliminar, en particular, el perjuicio de que con ingredientes más densamente empacados, se requiere un tiempo más prolongado para la penetración y, por lo tanto, la disolución mediante el líquido de la muestra. En las Figuras 2A y 2B, se muestran experimentos de humectación que se realizaron en muestras Tipo A (Figura 2A) y Tipo B (Figura 2B). Estos experimentos muestran primero la influencia de la etapa de molienda en la humectación. Cada experimento comparativo muestra campos de prueba 116 con una superficie de campo de prueba 124 a la que se ha aplicado una gota 130 de la muestra 126. En este caso, las imágenes parciales 132 en las Figuras 2A y 2B muestran respectivamente imágenes de microscopio de la superficie del campo de prueba 124, mientras que las imágenes parciales 134 registran un cambio en el valor de gris en el microscopio a lo largo de una línea de sección 136 a través de la gota 130 de la muestra 126. Como muestra 126, se utilizó un líquido de prueba con una concentración de 50 mg/dl de glucosa.

60 En las imágenes parciales 134, la posición de píxel indicada por # se grafica en el eje vertical a lo largo de la línea de sección 136 en unidades arbitrarias. El eje horizontal indica el tiempo t en segundos tras la aplicación de la muestra 126. En cada caso, los cambios de valor de gris se muestran en la imagen parcial 134. A la derecha, en esta imagen parcial, se muestra una escala, que indica los cambios en el valor de gris ΔI en unidades arbitrarias. La Figura 2A muestra una superficie de campo de prueba 124 de la muestra A, es decir, un material de campo de prueba, como se

65

usa actualmente en tiras de prueba disponibles comercialmente. La Figura 2B muestra un campo de prueba 116 con el material del campo de prueba de acuerdo con la muestra B de acuerdo con la presente invención.

5 Sin entrar en detalles numéricos de la medición, las imágenes parciales 134 del cambio en el valor de gris de las Figuras 2A y 2B muestran, en particular, una comparación directa, que la molienda del material del campo de prueba provoca un cambio de tiempo mucho más homogéneo en las características de remisión a lo largo de la línea de sección 136. En consecuencia, en el ejemplo de realización de acuerdo con la Figura 2B, el inicio de la reacción, que es específico para la detección del analito que se desea detectar, tiene lugar casi simultáneamente a lo largo de la línea de sección 136, mientras que en el experimento con material de campo de prueba sin moler de acuerdo con la  
10 Figura 2A, se registra un fuerte desplazamiento temporal del inicio de la reacción. Por lo tanto, puede ocurrir un desplazamiento temporal entre diferentes puntos a lo largo de la línea de sección 136, que puede ser de hasta 3 segundos o más. Además, se observan puntos a lo largo de la línea de sección 136 en los que la reacción se produce instantáneamente, así como puntos donde la reacción no parece si quiera ocurrir.

15 Además, en las Figuras 2A y 2B se pueden reconocer varias partículas 137 en la capa de detección 118. La capa de detección 118 es casi exclusivamente visible en las imágenes de microscopio de las imágenes parciales 132, ya que los rayos de luz que entran en la capa de detección 118 a través del área transparente 114 se reflejan a más tardar en los pigmentos de la capa de separación 122, en particular, los pigmentos de dióxido de titanio.

20 Se puede ver claramente que las partículas 137 en la muestra convencional A de acuerdo con la Figura 2A son considerablemente más grandes y presentan una distribución de tamaño más amplia de las partículas que las partículas 137 en la muestra B de acuerdo con la invención de acuerdo con la Figura 2B. Por medio de este tipo de imágenes de microscopio de acuerdo con la imagen parcial 132 de las Figuras 2A y 2B, mediante reconocimiento de imágenes y reconocimiento automático de partículas se puede lograr fácilmente una distribución de tamaño de las  
25 partículas con la ampliación correspondiente. Alternativa o adicionalmente, también se podría acercar un cambio de valor de gris de acuerdo con las imágenes parciales 134. Este tipo de procedimientos de evaluación con reconocimiento automático de imágenes son bien conocidos por los expertos en el campo del procesamiento de imágenes.

30 En general, se puede observar que el primer efecto positivo del uso de un material de campo de prueba molido hace que el curso de la reacción específica del analito sea uniforme. Además, como se desprende claramente de las Figuras 2A y 2B, es posible obtener una homogeneización total de la reacción más allá de la superficie del campo de prueba humedecido 124.

35 Además, en general el tiempo de reacción en los experimentos con muestras molidas y sin moler sigue siendo en promedio aproximadamente el mismo. Así, se concluyó un tiempo de reacción de aproximadamente 6 a 7 segundos en todos los casos. Sin embargo, como se puede desprender de los resultados descritos anteriormente, el tiempo de reacción local en el lugar en el caso de los materiales del campo de prueba molidos está altamente homogenizado para que las variaciones locales en los tiempos de reacción debidas al material del campo de prueba molido se puedan  
40 mejorar significativamente.

En un experimento adicional, los experimentos para la carrera de remisión se llevan a cabo con las muestras A y B. De acuerdo con el prejuicio descrito anteriormente respecto a que los materiales de campo de prueba molidos resultan en una penetración incompleta de la capa de detección 118, se tendría que registrar una reducción significativa en la  
45 carrera de remisión para muestras de tipo B porque la muestra 126 solo debería penetrar en una zona pequeña de la capa de detección 118, por lo tanto, debería estar disponible para la reacción de detección.

Los resultados de estas mediciones de remisión se muestran en la Figura 3. En el eje horizontal, se muestra la concentración c de glucosa en la muestra 126, mientras que en el eje vertical, se grafica la remisión relativa R. Como muestra 126, se usó sangre venosa EDTA, por lo que se las concentraciones de glucosa se modificaron en este líquido de prueba. La curva 138 en la Figura 3 muestra las remisiones que se midieron en un elemento de prueba de diagnóstico convencional, es decir, una muestra de tipo A, mientras que la curva 140 muestra remisiones de una muestra de acuerdo con la invención de tipo B. Como se puede ver en estas representaciones, la carrera de remisión, es decir, el cambio en la remisión a lo largo de todo el rango de medición, que generalmente se sitúa entre 10 y 600  
55 mg/dl, prácticamente no cambia. Por lo tanto, la molienda en húmedo de las sustancias de relleno no conduce a un deterioro de las propiedades ópticas y/o las propiedades de detección.

Por lo tanto, los experimentos ilustrados en las Figuras 1 a 3 muestran claramente que el uso de sustancias de relleno molidas no implica un deterioro de las propiedades de los elementos de prueba de diagnóstico 110 en forma de una  
60 extensión del tiempo de reacción o en forma de un empeoramiento de la carrera de remisión. Al mismo tiempo, sin embargo,

las Figuras 2A y 2B demuestran claramente que la homogeneidad y la precisión de las mediciones se mejora significativamente con el uso de la química de campo de prueba molido. Ya en un dispositivo de medición tipo AccuChek® Active, en varias mediciones se registró una mejora en el coeficiente de variación CV (también conocido como "coefficient of variation"), que indica la relación entre la desviación estándar y el valor medio de las mediciones de 1,5 a 1,2 % en la transición de muestras de tipo A a tipo B.  
65

Como alternativa a la molienda húmeda descrita anteriormente con referencia a la muestra B, la molienda también se puede llevar a cabo, por ejemplo, alternativa o adicionalmente, con una etapa de molienda en seco. Por consiguiente, se puede usar, por ejemplo, un molino de chorro de aire, que permite alcanzar, en principio, tamaños de partículas de, por ejemplo, 100 nanómetros.

Además, se llevaron a cabo experimentos en los que se molieron las masas de recubrimiento completas de la capa de detección 118 y la capa de separación 122. En la capa de detección 118, durante el proceso de molienda el reactivo de detección, en particular, la enzima, no se molieron junto con el resto debido a la aplicación de energía. Sin embargo, este tipo de procesos no trajo ninguna o solo una leve mejora de la homogeneidad, la carrera de remisión y el tiempo de reacción. La molienda de las masas de recubrimiento completas no tiene ninguna ventaja respecto a la molienda de la solución premezclada de las sustancias de relleno. Esto último, sin embargo, es considerablemente más simple en términos de producción, ya que se puede moler para mantener el nivel de existencias.

Ejemplo 2

La molienda de las materias primas para la capa de detección 118 es un paso adicional del proceso y puede aumentar los costes de los elementos de prueba de diagnóstico 110. Por lo tanto, en una segunda fase, se investigan las materias primas que están disponibles comercialmente y que desde el principio tienen un tamaño medio de partícula en el rango de << 1 micrómetro. Entre otras cosas, aquí puede servir la gama de productos de los llamados tipos de Aerosil de Evonik Industries AG. Estos son óxidos hidrófilos, nanoparticulados, en particular óxidos metálicos.

Por lo tanto, como sustitutos del Transpafill® descrito anteriormente en la muestra B, se ha identificado la siguiente sustancia sustituta:

*Tabla 1: Ejemplos de otros posibles sustitutos de Transpafill®.*

Material:	Tipo:	Tamaño medio de partículas:
SiO <sub>2</sub> :	Al dispersar apenas espesamiento: Aerosil EG 50, Aerosil 90	20 nm
	Al dispersar intenso espesamiento: Aerosil 200, Aerosil COK 84	
TiO <sub>2</sub> :	Aeroxide TiO <sub>2</sub> P 25	21 nm
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :	Aeroxide Alu 65	17 nm

Por “espesamiento al dispersar” o “no dispersarse durante la dispersión” se entiende la propiedad de ciertas sustancias que se puede determinar experimentalmente que estas sustancias causan un efecto espesante de la dispersión durante el proceso de dispersión.

Respecto al uso de estas sustancias sustitutas, existe el temor, en primer lugar, por supuesto debido al prejuicio mencionado anteriormente, de que los poros finalmente presenten un tamaño demasiado pequeño para permitir la penetración de la capa de detección 118 por lo que la carrera de remisión y los tiempos de reacción empeoren en comparación con las muestras estándares.

En consecuencia, se preparan muestras en las que, en comparación con la muestra A anterior, en la capa de detección 118 el Transpafill® se sustituye 1:1 por los siguientes materiales:

Muestra C:

SiO<sub>2</sub>, Aerosil COK 84 (óxido mixto con 10 % de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), tamaño medio de partícula 20 nm

Muestra D:

TiO<sub>2</sub>, Aeroxide TiO<sub>2</sub> P 25, tamaño medio de partícula 21 nanómetros y

Muestra E:

Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Aeroxide Alu 65, tamaño medio de partícula 17 nanómetros

Muestra F:

En una cuarta muestra en este segundo ejemplo, en comparación con la muestra A, en lugar de Ttranspafill® se usa una mezcla molida en húmedo de sílice precipitada y dióxido de titanio con un tamaño medio de partícula total de 0,3 micrómetros.

En estas muestras, nuevamente se llevan a cabo mediciones de remisión, de manera análoga al experimento de acuerdo con la Figura 3. Los resultados de estas mediciones se representan gráficamente en la Figura 4 en representación análoga a la Figura 4.

5 La curva 142 denota la remisión de la muestra A, la curva 144 la remisión de la muestra D, la curva 146 la remisión de la muestra E y la curva 148 la remisión de la muestra F.

10 Primero, se encontró que los tiempos de reacción de todas las muestras fueron de 6 segundos y, por lo tanto, no presentaron cambios en comparación con la muestra comparativa A. Además, las carreras de remisión, como se muestra claramente en la Figura 4, permanecen sustancialmente iguales en el rango de medición. Las curvas 142 y 148 incluso se superponen en muchas partes en la Figura 4.

15 Sin embargo, este experimento muestra que las sustancias de relleno con las partículas más finas se deben dispersar a casi su tamaño de partícula primaria para evitar la aglomeración y/o la formación de agregados. Para este propósito, se emplean disolventes convencionales, por ejemplo, en los que se puede recurrir, por ejemplo, a equipos de las empresas Kinematica AG tipo Polytron® o Megatron®, o a equipos de la empresa IKA Maschinenbau, por ejemplo, del tipo UltraTurrax®.

20 En el caso de los tipos de Aerosil SiO<sub>2</sub>, como por ejemplo, en las muestras C, de acuerdo con lo que se ha descrito anteriormente, se muestra que es difícil emplear disolventes. Por lo tanto, los disolventes se emplean preferiblemente para muestras del tipo D y E, es decir, para óxidos de titanio y óxidos de aluminio, en particular, con tamaños medios nominales de partículas del polvo de partida de 30 nanómetros o menos. En el caso de las muestras tipo C, sin embargo, el uso de disolventes conduce a una dispersión debido al efecto espesante de los tipos de Aerosil SiO<sub>2</sub> y a una gelificación solo hasta concentraciones de aproximadamente 3 % del peso en la mezcla de partida húmeda. Sin embargo, aquí es posible emplear agitadores con una tasa de cizallamiento más baja que en los experimentos arrojaron prácticamente los mismos resultados que las curvas en la Figura 4. Esto indica que la dispersabilidad del Aerosil ha sido optimizada. En el caso del Aeroxide TiO<sub>2</sub> P 25 y el Aeroxide Alu 65, el espesamiento ocurrió solo de manera insignificante en los experimentos.

30 Alternativamente o además de las sustancias de relleno mencionadas anteriormente, ya sea molidas o ya disponibles comercialmente como nanopartículas, se buscaron sustancias adicionales que se pudieran emplear como sustancias de relleno en la capa de detección 118, por ejemplo, como un sustituto del Transpafill® en la muestra A, descrita anteriormente. Además de los tipos de Aerosil descritos anteriormente, entre otras, se evaluaron las siguientes sustancias:

- 35
- Caolín
  - Vidrio en polvo (TROVOtech, Wolfen)
  - Sílice precipitada
  - Sulfato de calcio x 2 H<sub>2</sub>O
  - 40 • Silicatos de sodio y aluminio tales como Sipernat 44 MS (Degussa/Evonik).

45 Estas sustancias de relleno ya están disponibles en el tamaño de partícula o en la distribución de tamaño de las partículas deseada o se pueden procesar por molienda hasta obtener el tamaño de partícula o la distribución de tamaño de las partículas requerida. Esencialmente, los experimentos anteriores muestran que el fabricante ha recortado los tipos de Aerosil/Aeroxide para obtener una fácil dispersabilidad, para que su incorporación en gran medida no dependa del uso de una cizalla.

50 Para investigar más a fondo la necesidad de dispersión hasta el tamaño de partícula primaria, se están realizando experimentos adicionales. Para este propósito, la muestra D anterior se examina de nuevo de varias maneras. Para este propósito, Aeroxide TiO<sub>2</sub> P 25 se dispersa una vez con un disolvente (muestra G) y una vez con un agitador de hélice a bajas revoluciones. La adición de Aeroxide TiO<sub>2</sub> P 25 se lleva a cabo una vez tras mezclar con agua hasta formar una pasta (muestra H) y una vez mediante la entrada de sólidos en la solución espesante (goma xantana) (muestra I). Como muestra comparativa, se sigue utilizando la muestra A como se ha descrito anteriormente. En general, para el experimento descrito a continuación resultan las siguientes muestras:

55 Muestra A': como la muestra A anterior  
 Muestra G: como la muestra D, pero con dispersión de Aeroxide TiO<sub>2</sub> P 25 con disolvente  
 Muestra H: como la muestra D, pero con dispersión de los Aeroxide TiO<sub>2</sub> P 25 con agitador de hélice a pocas revoluciones, adición tras mezclar con agua a una pasta, y  
 60 Muestra I: como la muestra D, pero con dispersión con Aeroxide TiO<sub>2</sub> P 25 con un agitador de hélice a pocas revoluciones por incorporación de sólidos en la solución espesante (goma de xantano).

65 De esta manera, se preparan las muestras G a I en las que se sustituyó el Transpafill® 1:1 proporcionalmente al peso por Aeroxide TiO<sub>2</sub> P 25. De lo contrario, la preparación de los elementos de prueba de diagnóstico 110 se lleva a cabo como se describe anteriormente.

Con estas muestras de elementos de prueba de diagnóstico 110 en forma de tiras reactivas, en el sistema comercial para medir la glucosa en sangre AccuChek Active con 15 concentraciones diferentes de glucosa en sangre venosa EDTA, en las que se evalúan las mediciones individuales por concentración  $n = 10$ .

5 En la Figura 5, se muestran en una representación análoga a la Figura 4, curvas de remisión de estas muestras A', G, H e I, A', G, H e I. En este caso, la curva 150 denota las mediciones de remisión de la muestra A', la curva 152 de las mediciones de remisión de la muestra G, la curva 154 de las mediciones de remisión de la muestra H y la curva 156 de las mediciones de remisión de la muestra I. Las curvas de medición muestran que la profundidad del color en los cuatro recubrimientos diferentes es casi la misma. La velocidad de reacción en todas las muestras se sitúa en el rango de 6 a 8 segundos.

15 Esto muestra que el Aeroxide TiO 2 P 25 está finamente dispersado en los tres casos, es decir, en las muestras G, H e I, ya que los agregados tienen características de pigmento  $TiO_2$  y debilitarían el color de reacción. Un debilitamiento del color se debería a la presencia de un pigmento en la capa de detección 118 en el caso de la formación de agregados.

Sin embargo, el  $TiO_2$  finamente dispersado no es un pigmento porque en este caso el tamaño de partícula es más pequeño que la longitud de onda de la luz. Esta propiedad se aprovecha, por ejemplo, en productos de protección solar.

20 La principal ventaja de las películas de detección con sustancias de relleno de grano fino radica en la homogeneidad significativamente mejorada de los colores de reacción, lo que permite la medición de áreas más pequeñas y, por lo tanto, volúmenes de sangre más pequeños.

25 Esto se puede mostrar de nuevo en un experimento comparativo en el que se examinan diferentes muestras. Para este propósito, los elementos de prueba de diagnóstico 110 en forma de tiras de prueba se salpican con plasma que contiene 100 mg/dl de glucosa, y el color de reacción se mide con una cámara CCD. Como cada uno de los píxeles se puede leer por separado, se evalúa estadísticamente la precisión (es decir, su desviación estándar) de una cantidad de píxeles. En este caso, se evalúan 10 píxeles (longitud de borde 10 micrómetros) a la resolución más alta, es decir, un área total de  $1000 \mu m^2$ . A resoluciones más bajas, es decir, en áreas más grandes se promedian por más píxeles.

De nuevo, se analizan diferentes muestras, en analogía con las muestras anteriores:

35 Muestra A": como la muestra A anterior, sustancias de relleno sin moler, muestra comparativa

Muestra J: como la muestra A", pero Transpafill® y sílice precipitada molida,

Muestra A": como la muestra A anterior, sustancias de relleno sin moler, muestra comparativa, y

Muestra K: Sustitución de Transpafill® por Aeroxide  $TiO_2$  P 25.

40 Las Figuras 6A a 6C muestran imágenes de microscopio de los puntos de medición, que forman la base para las mediciones posteriores. La Figura 6A muestra una imagen de microscopio de una zona de la muestra A" salpicada con la solución, es decir, una muestra con sustancias de relleno sin moler. La Figura 6B muestra una imagen análoga de la muestra J, es decir, de una muestra con química de prueba molida. La Figura 6C muestra una imagen de la muestra A", que nuevamente representa esencialmente una muestra con ingredientes de grano grueso y corresponde a la muestra A", y la Figura 6D muestra una imagen análoga de la muestra K en la que Transpafill® se sustituye por Aeroxide  $TiO_2$  P 25.

50 Las etiquetas de los ejes en las Figuras 6A a 6D representan cada una la posición de los píxeles en un chip CCD en unidades arbitrarias. Además, en las Figuras 6A a 6C, los campos de medición se marcan por medio de los cuadrados correspondientes cuyas coordenadas se reproducen en las imágenes.

En cada una de las Figuras 7A y 7B, se muestran las desviaciones estándar de las muestras de las Figuras 6A a 6D. La desviación estándar  $s$  de los valores de gris en las Figuras 6A a 6D se representa en el eje vertical.

55 Esta desviación estándar  $s$  se indica como porcentaje basado en la carrera media de valor de gris entre una medida de medición y una muestra reaccionada. Esta desviación estándar  $s$  se indica como función del área A graficada en el eje horizontal por la que se promedió.

60 En este caso 7A muestra una comparación de las muestras A" y J, es decir, una comparación de la muestra estándar con una muestra con la química de prueba molida. La curva 158 muestra el curso de la desviación estándar de la muestra A" mientras que el número de referencia 160 la curva de la muestra J con la química de prueba molida. En la Figura 7B, se representa la muestra estándar A"(número de referencia 162) en su desviación estándar de la muestra K (número de referencia 164).

65 Los resultados de la medición muestran que, por debajo de aproximadamente  $30 \times 30 \mu m^2$ , es decir, con un área  $<0,01 mm^2$ , la desviación estándar  $s$  y, con ello, el posible error de medición aumentan considerablemente. También se puede observar que este aumento de la desviación estándar en el caso de la muestra J (curva 160) con la química molida es significativamente menor, por lo que para la miniaturización de los volúmenes de sangre, es decir, que para

la miniaturización del punto de medición en las Figuras 6A a 6D es ventajosa la química básica. Para la muestra K (curva 164 en la Figura 7B) se obtuvieron también resultados similares.

- Anteriormente, se han proporcionado varios procedimientos para determinar el tamaño de partícula de las muestras.
- 5 Una opción adicional, alternativa o aplicable adicionalmente es calcular las funciones de autocorrelación sobre la distribución de valores de gris en imágenes de microscopios como, por ejemplo, de acuerdo con las Figuras 6A a 6D. La función de autocorrelación es una función de correlación cruzada de una señal consigo misma, que es una función de un desplazamiento  $\tau$ .
- 10 En las Figuras 8A y 8B, se grafican las funciones de autocorrelación (indicadas por ACF) de las muestras A" a K. La Figura 8A muestra una comparación de la muestra comparativa A" (curva 166) y la muestra J con los ingredientes molidos (curva 168), y la Figura 8B muestra una comparación de la muestra comparativa A"" con ingredientes de grano grueso (curva 170) y la muestra K con ingredientes de grano fino (curva 172). La función de autocorrelación ACF se representa en el eje vertical y el desplazamiento  $\tau$  de la función de autocorrelación en milímetros, en el eje horizontal.
- 15 Las funciones de autocorrelación se determinaron mediante una evaluación de las Figuras 6A a 6D.

Al comparar las funciones de autocorrelación, se puede ver que las sustancias de relleno de grano grueso (curvas 166, 170) presentan funciones de autocorrelación significativamente más amplias que las sustancias de relleno de grano fino (curvas 168, 172). Estas representaciones muestran que la función de autocorrelación ACF se correlaciona con la distribución del tamaño de partícula. Por lo tanto, es posible determinar la granularidad de una muestra a base de imágenes de microscopio, por ejemplo, las imágenes en las Figuras 6A a 6D. Por ejemplo, la mitad del ancho de las funciones de autocorrelación 166 a 172 puede ser una medida de la granularidad de la capa de detección 118. No obstante, no es posible realizar una lectura inmediata de la distribución de tamaño de las partículas basándose en estas curvas 166 a 172. Por medio de una o varias mediciones de calibración en muestras con distribuciones de tamaño de las partículas conocidas, se puede concluir a partir de las curvas 166 a 172 directamente sobre el tamaño de partícula y la distribución de tamaño de partícula.

20

25

#### Lista de referencias

- 30 110 Elemento de prueba de diagnóstico  
112 Elemento de soporte  
114 Área transparente  
116 Campo de prueba  
118 Capa de detección
- 35 119 Película de soporte  
120 Lado de detección  
122 Capa de separación  
124 Superficie de campo de prueba  
126 Muestra
- 40 128 Lado de aplicación  
130 Goteo  
132 Imagen parcial imagen de microscopio  
134 Imagen parcial cambio de valor de gris  
136 Línea de sección
- 45 137 Partículas  
138 Muestra de remisión A  
140 Muestra de remisión B  
142 Muestra de remisión A  
144 Muestra de remisión D
- 50 146 Muestra de remisión E  
148 Muestra de remisión F  
150 Muestra de remisión A'  
152 Muestra de remisión G  
154 Muestra de remisión H
- 55 156 Muestra de remisión I  
158 Desviación estándar prueba A"  
160 Desviación estándar prueba J  
162 Desviación estándar prueba A""  
164 Desviación estándar prueba K
- 60 166 Autocorrelación A"  
168 Autocorrelación prueba J  
170 Autocorrelación prueba A""  
172 Autocorrelación prueba K

## REIVINDICACIONES

1. Un elemento de prueba de diagnóstico (110) para detectar un analito en una muestra (126) de fluido corporal, en particular, sangre entera, que comprende al menos un campo de prueba (116) que tiene al menos un reactivo de detección, en el que el reactivo de detección está diseñado para sufrir al menos un cambio detectable en presencia del analito, en particular, un cambio óptico, en el que el campo de prueba (116) presenta al menos una capa de detección que comprende el reactivo de detección (118), en el que la capa de detección (118) presenta partículas (137), en las que al menos 90 % de todas las partículas (137) de la capa de detección (118) presentan un tamaño de partícula real inferior a 10 micrómetros, en las que se emplea un procedimiento de microscopía electrónica para determinar la distribución de tamaño de las partículas, en el que solo las partículas a partir de un tamaño de 200 nanómetros se tienen en cuenta para determinar la distribución de tamaño de las partículas, en el que el campo de prueba (116) presenta un lado de aplicación (128) para aplicar la muestra (126) y un lado de detección (120) para detectar un cambio en el reactivo de detección, en particular, un cambio óptico, en el que el campo de prueba (116) presenta además al menos una capa de separación (122), en la que la capa de separación (122) está dispuesta del lado más cercano al lado de aplicación (128) de la capa de detección (118), en la que la capa de separación (122) comprende al menos un pigmento, caracterizado por que al menos 70 % de todas las partículas (137) de la capa de detección (118) presenta un tamaño de partícula real inferior a 900 nanómetros.
2. Un elemento de prueba de diagnóstico (110) de acuerdo con la reivindicación anterior, en el que al menos 80 % de todas las partículas (137) de la capa de detección (118) presentan un tamaño de partícula real inferior a 5 micrómetros, en particular, inferior a 1 micrómetro.
3. Un elemento de prueba de diagnóstico (110) de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que las partículas (137) comprenden uno o varios de los siguientes materiales: SiO<sub>2</sub>; tierra de diatomeas; un silicato, en particular, aluminosilicato de sodio; un óxido metálico, en particular, óxido de aluminio y/o óxido de titanio; un material oxidado sintético, en particular, un material oxidado nanoparticulado, en particular, óxido de silicio nanoparticulado y/u óxido de aluminio y/o óxido de titanio; caolín; polvo de vidrio; sílice precipitada; sulfato de calcio x 2 H<sub>2</sub>O.
4. Un elemento de prueba de diagnóstico (110) de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que todas las partículas (137) de la capa de detección (118) que tienen un tamaño de partícula superior a 100 nm son partículas inorgánicas (137).
5. Un elemento de prueba de diagnóstico (110) de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que la capa de detección (118) presenta un índice de refracción entre 1,0 y 1,5, preferiblemente entre 1,2 y 1,4.
6. Un elemento de prueba de diagnóstico (110) de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que el pigmento comprende un pigmento blanco, preferiblemente un pigmento seleccionado entre uno o varios de los siguientes pigmentos: dióxido de titanio; dióxido de circonio; titanato de bario; circonato de bario; silicato de circonio.
7. Un elemento de prueba de diagnóstico (110) de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos un elemento de soporte (112), en el que el elemento de soporte (112) presenta al menos un área transparente (114), en el que el campo de prueba (116) con su lado de detección (120) se aplica, al menos parcialmente, al área transparente (114).
8. Un procedimiento para preparar un elemento de prueba de diagnóstico (110) para detectar un analito en una muestra (126) de fluido corporal, en particular, un elemento de prueba de diagnóstico (110) de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que el elemento de prueba de diagnóstico (110) comprende al menos un campo de prueba (116) que tiene al menos un reactivo de detección, en el que el reactivo de detección está diseñado para sufrir al menos un cambio detectable en presencia del analito, en particular, un cambio óptico, en el que el campo de prueba (116) presenta al menos una capa de detección (118) que comprende un reactivo de detección, en el que la capa de detección (118) se produce de forma tal que la capa de detección (118) presenta partículas (137), en las que al menos 90 % de todas las partículas (137) de la capa de detección (118) presentan un tamaño de partícula real inferior a 10 micrómetros, preferiblemente inferior a 1 micrómetro, en las que se emplea un procedimiento de microscopía electrónica para determinar la distribución de tamaño de las partículas, en el que solo las partículas a partir de un tamaño de 200 nanómetros se tienen en cuenta para determinar la distribución de tamaño de las partículas, en el que el campo de prueba (116) presenta un lado de aplicación (128) para aplicar la muestra (126) y un lado de detección (120) para detectar un cambio en el reactivo de detección, en particular, un cambio óptico, en el que el campo de prueba (116) presenta además al menos una capa de separación (122), en la que la capa de separación (122) está dispuesta del lado más cercano al lado de aplicación (128) de la capa de detección (118), en la que la capa de separación (122) comprende al menos un pigmento, caracterizado por que al menos 70 % de todas las partículas (137) de la capa de detección (118) presenta un tamaño de partícula real inferior a 900 nanómetros.

- 5 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior, en el que para proporcionar las partículas (137) se usa al menos un polvo, en el que el polvo presenta aglomerados de partículas primarias, en el que el polvo se procesa por medio de al menos un procedimiento de dispersión mecánica para descomponer los aglomerados, al menos parcialmente.
- 10 10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior, en el que se usa al menos un disolvente para llevar a cabo el procedimiento de dispersión mecánica, en el que se prepara una dispersión para producir la capa de detección (118).
- 10 11. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones del procedimiento anteriores, en el que para proporcionar las partículas (137) se usa al menos un polvo, en el que el polvo se somete a al menos una etapa de molienda.
- 15 12. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones del procedimiento anteriores, en el que cuando se proporcionan las partículas (137) se usa un polvo de un material oxidado sintético, en particular, un material oxidado nanoparticulado, en particular, óxido de silicio nanoparticulado y/u óxido de aluminio y/o óxido de titanio.
- 20 13. Un procedimiento para detectar un analito en una muestra (126) de fluido corporal, en particular, sangre entera, en el que se usa un elemento de prueba de diagnóstico (110) de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores en relación con un elemento de prueba de diagnóstico (110), en el que la muestra (126) presenta un volumen inferior a 2 microlitros, en particular, inferior a 0,5 microlitros.
- 25 14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior, en el que el cambio detectable es un cambio detectable ópticamente, en el que se usa un detector óptico de resolución espacial para detectar el cambio detectable.

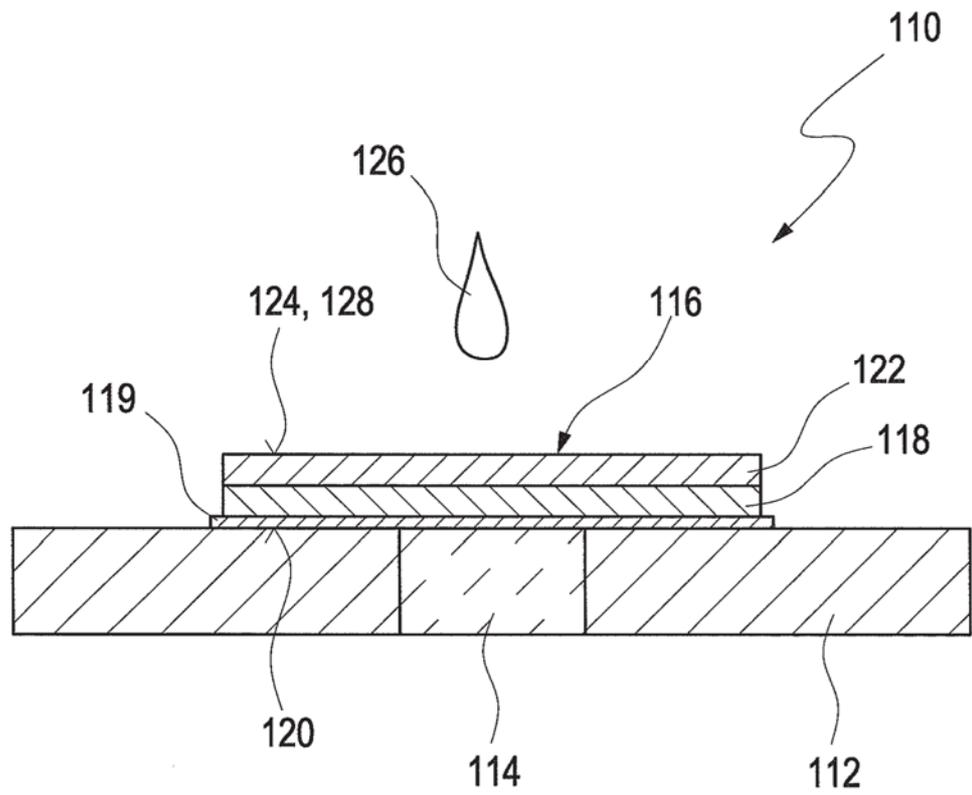


Fig. 1

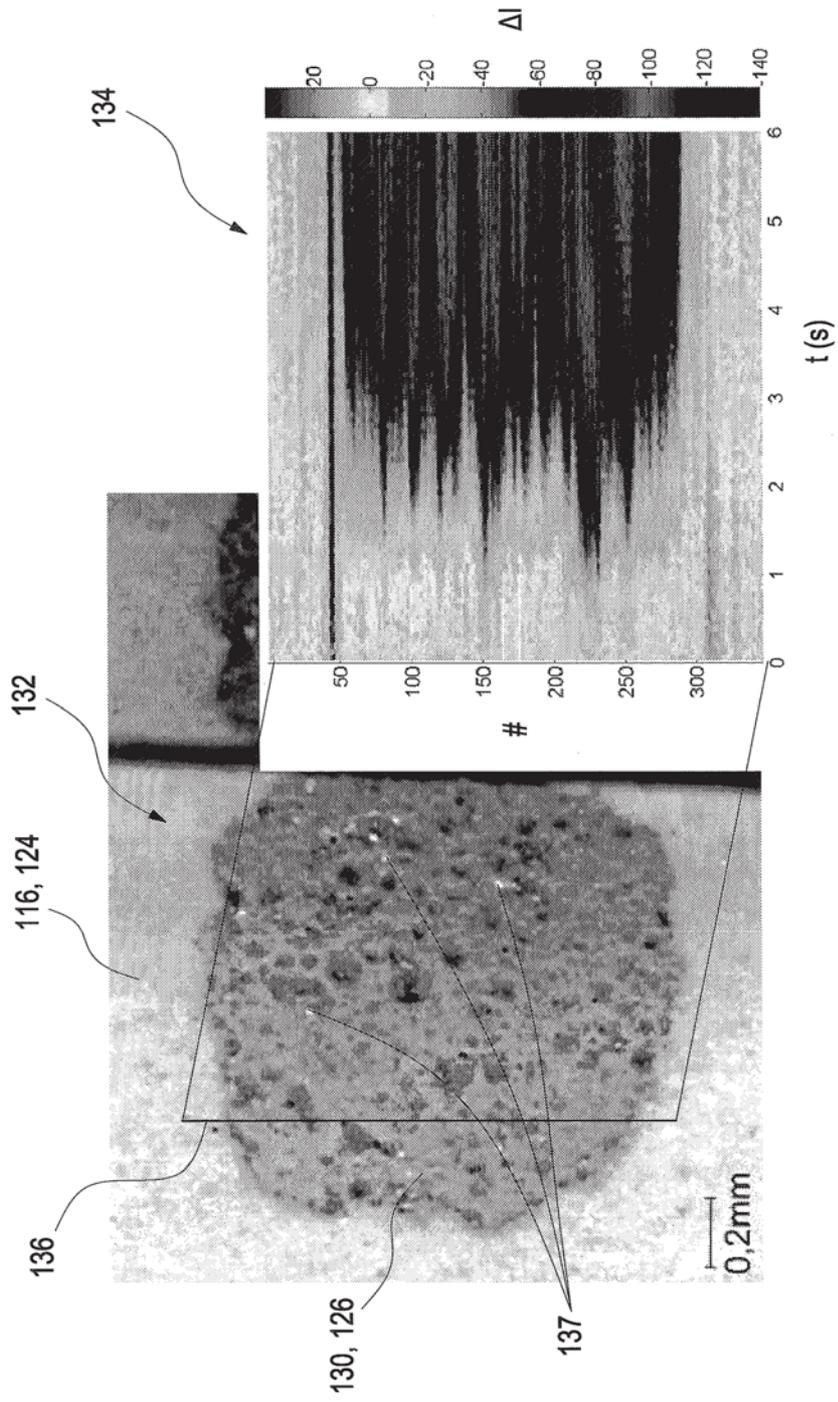


Fig. 2 A

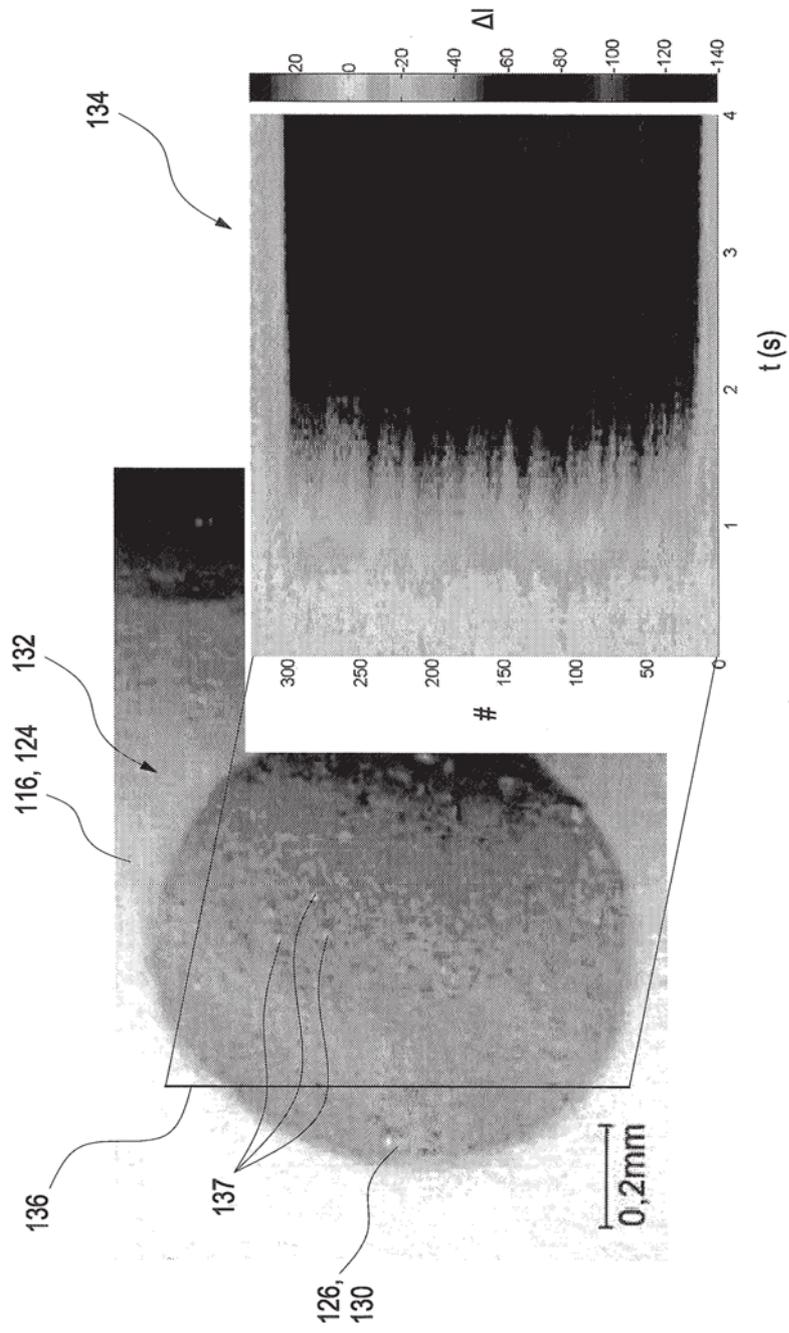


Fig. 2 B

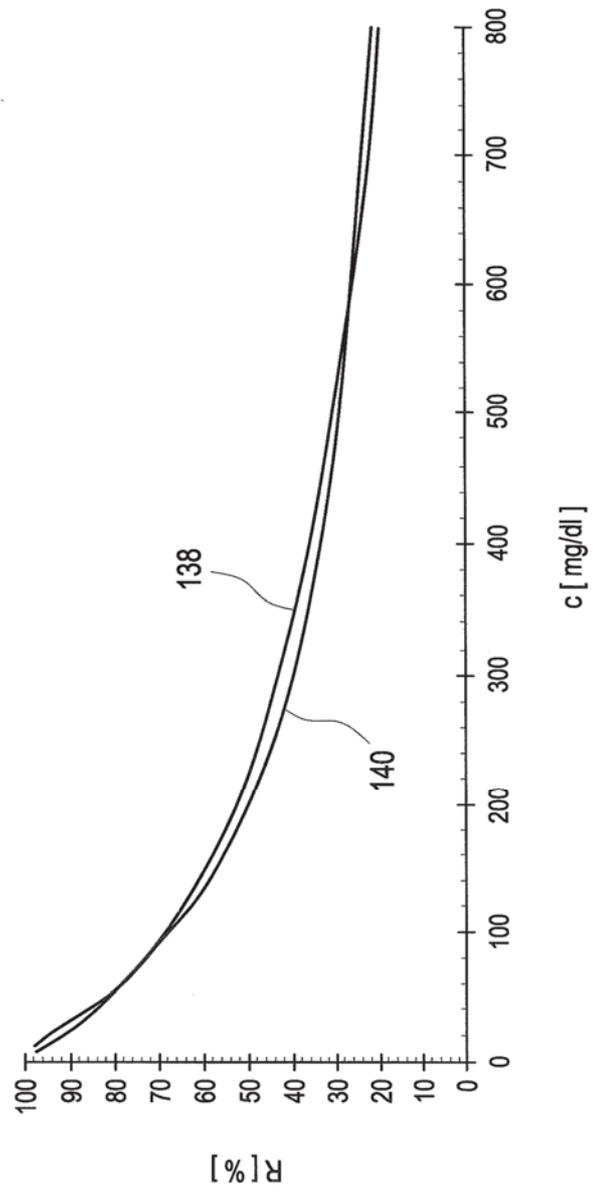


Fig. 3

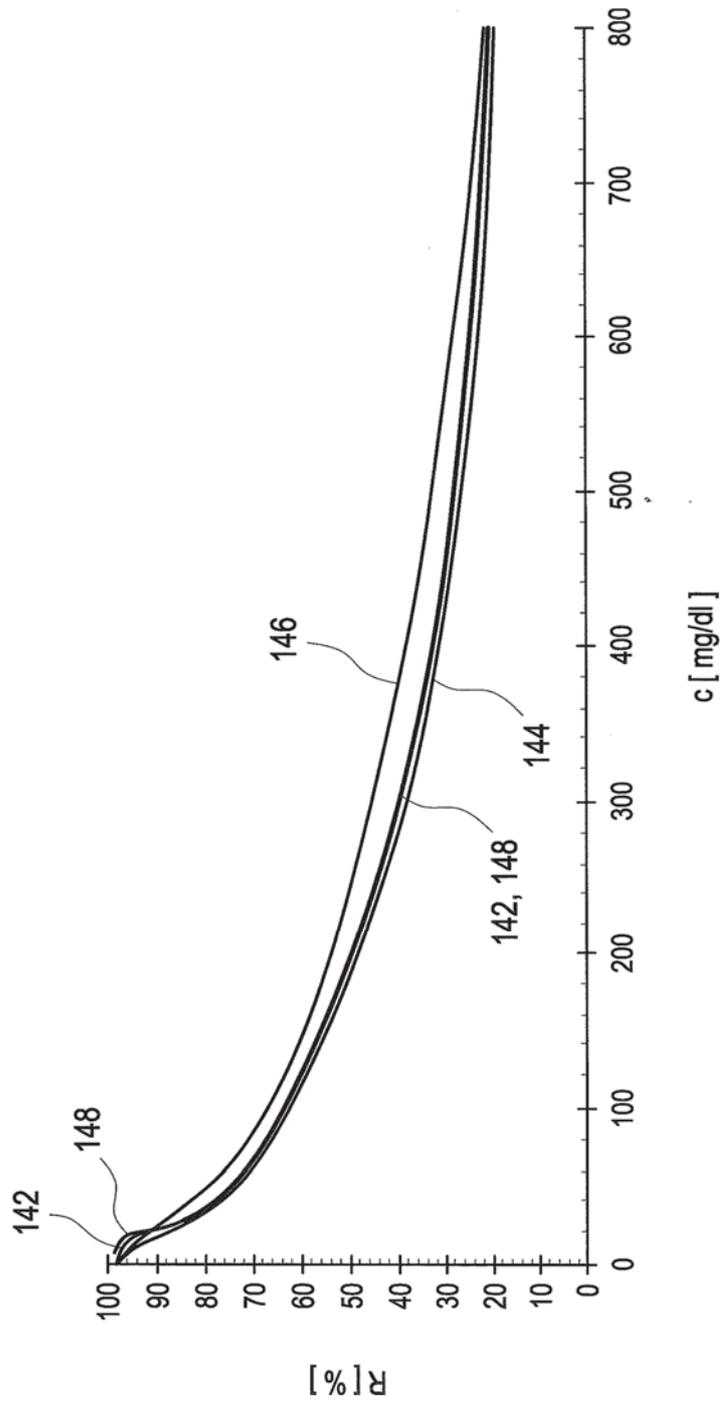


Fig. 4

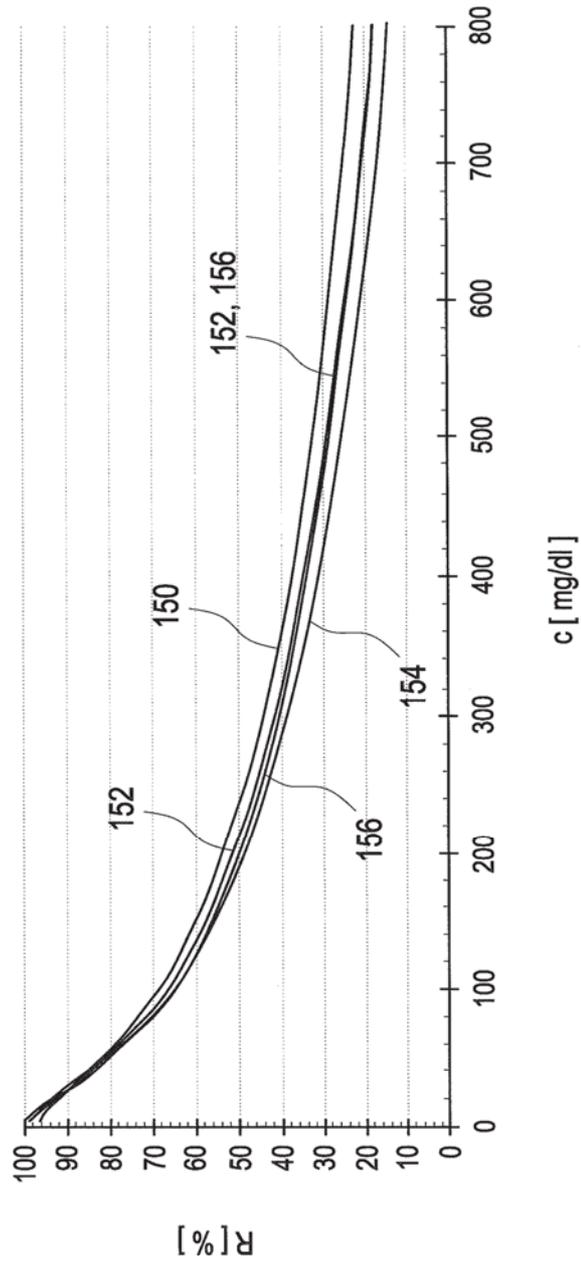


Fig. 5

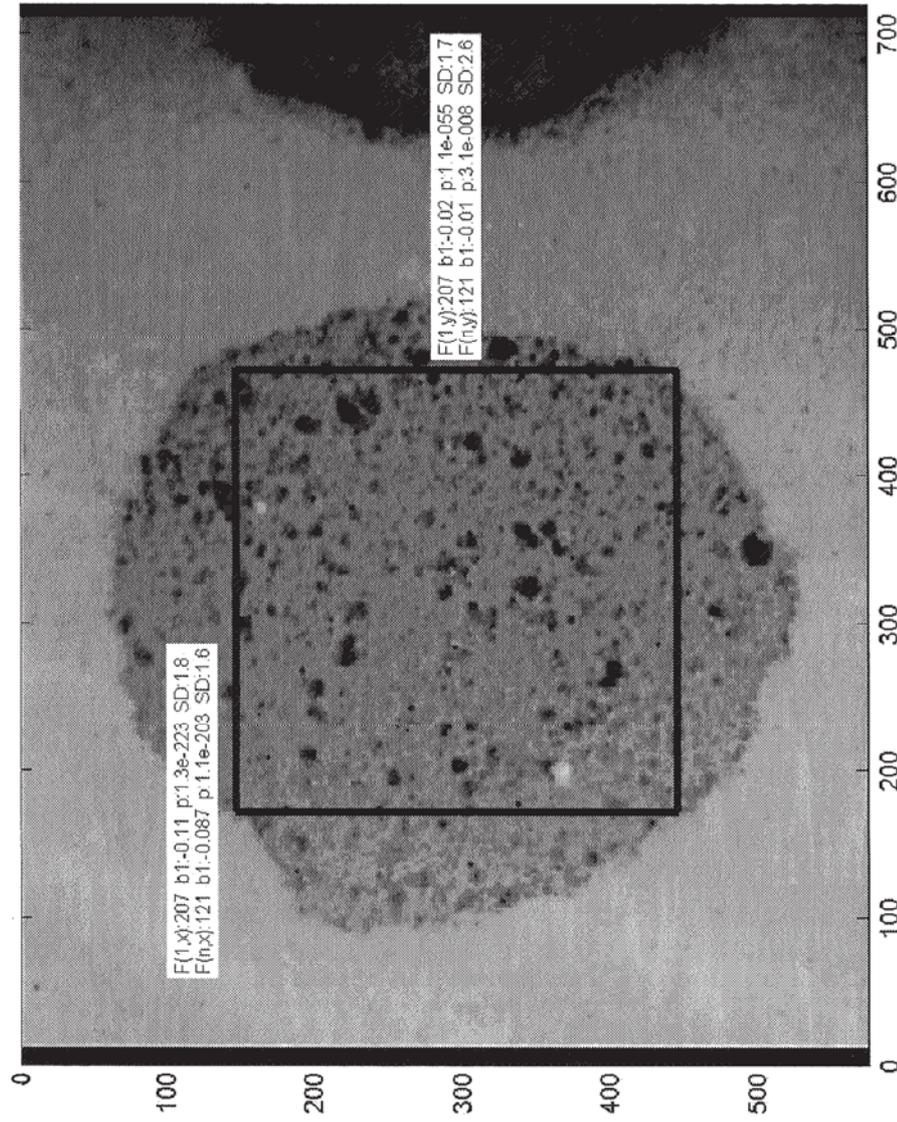


Fig. 6 A

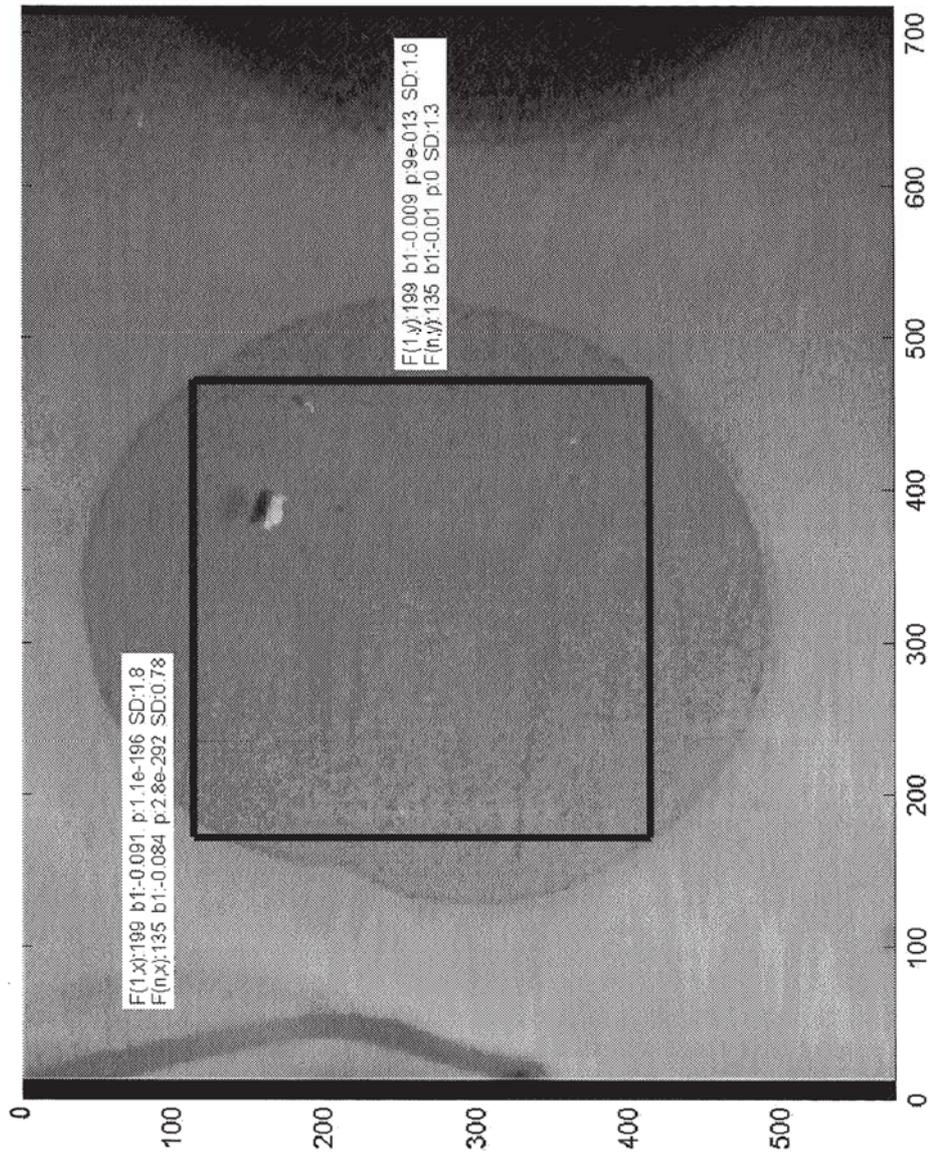


Fig. 6 B

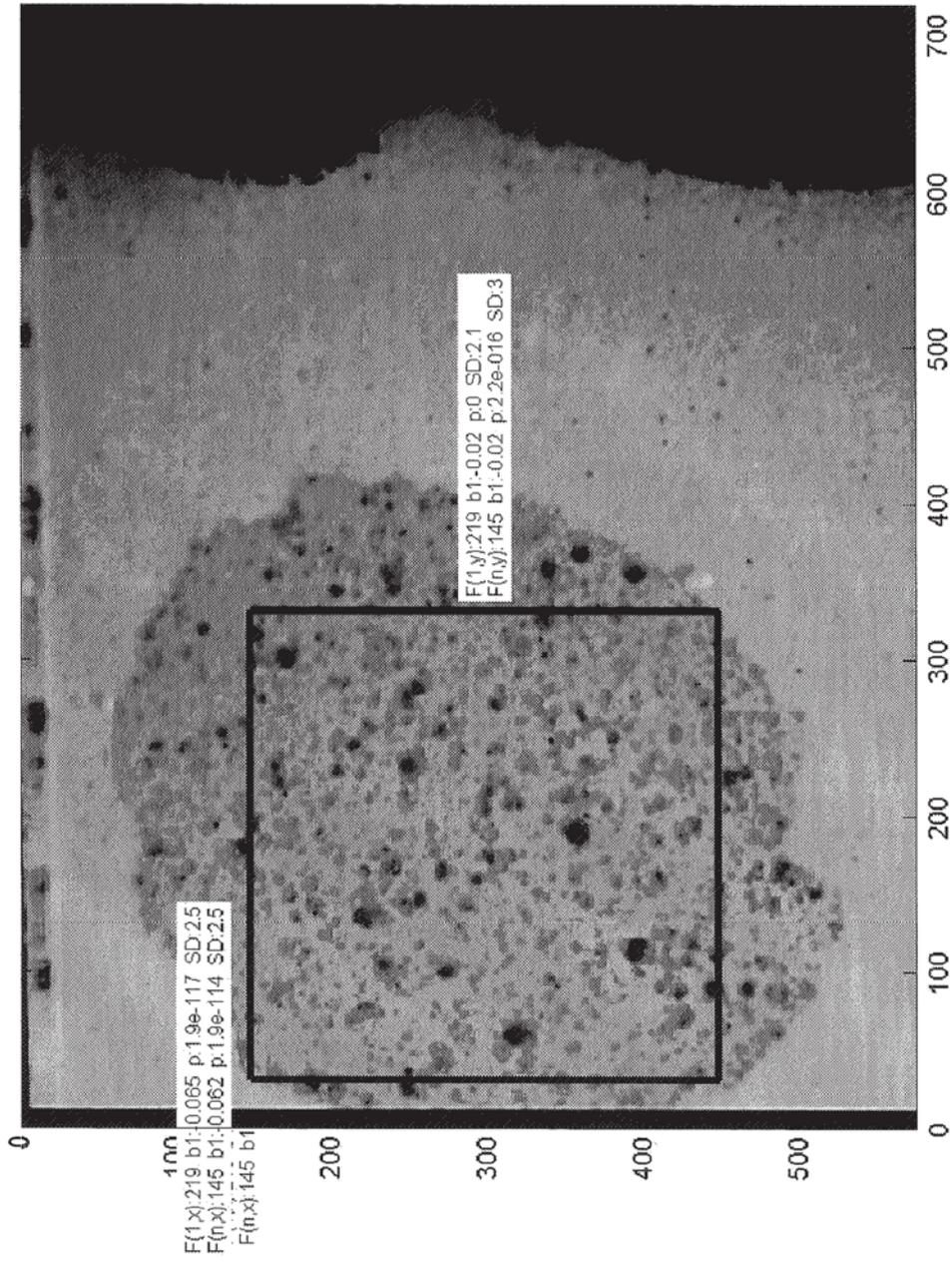


Fig. 6 C

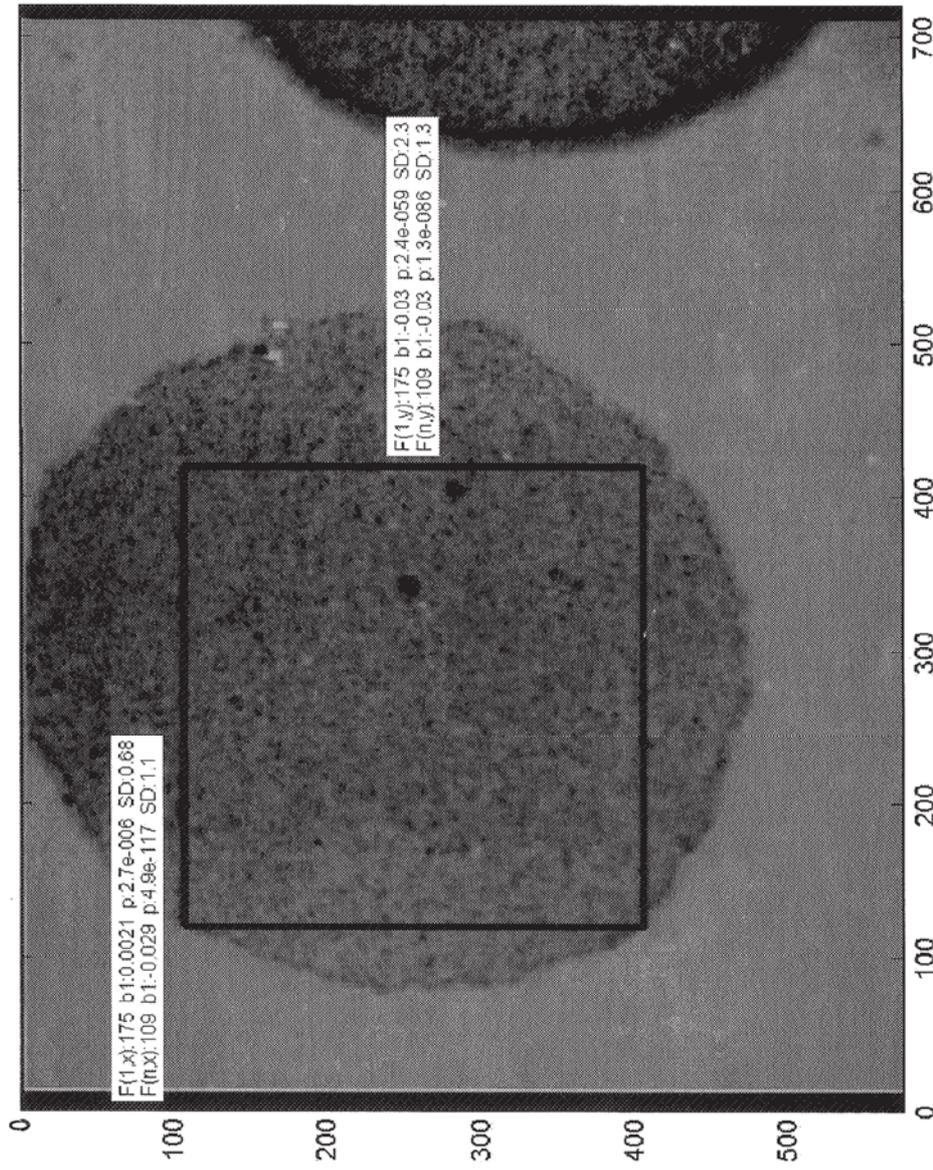


Fig. 6 D

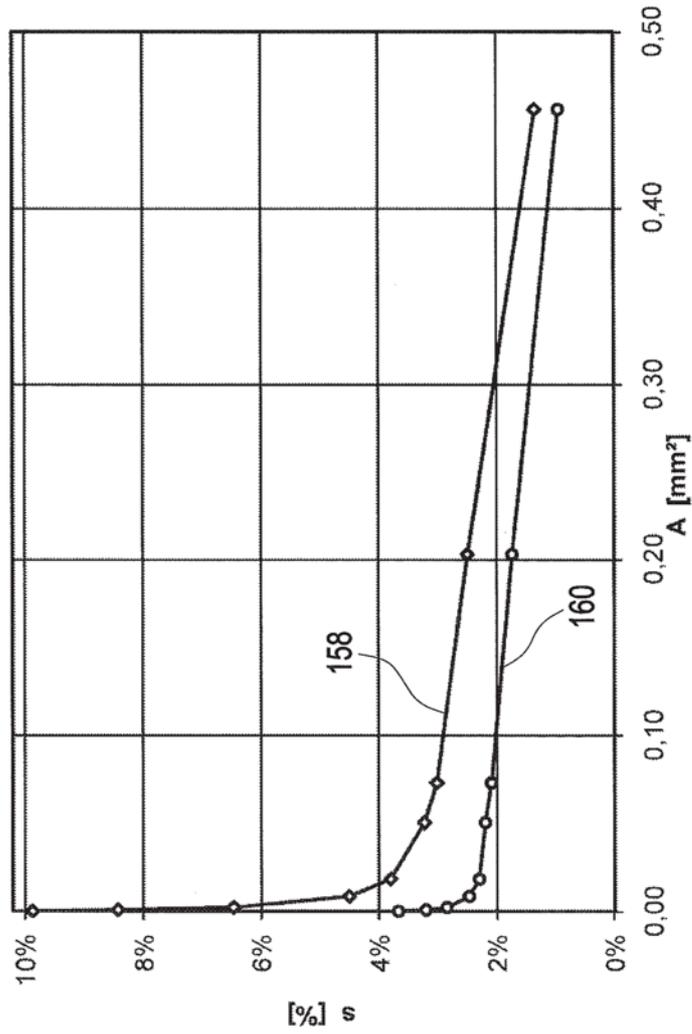


Fig. 7 A

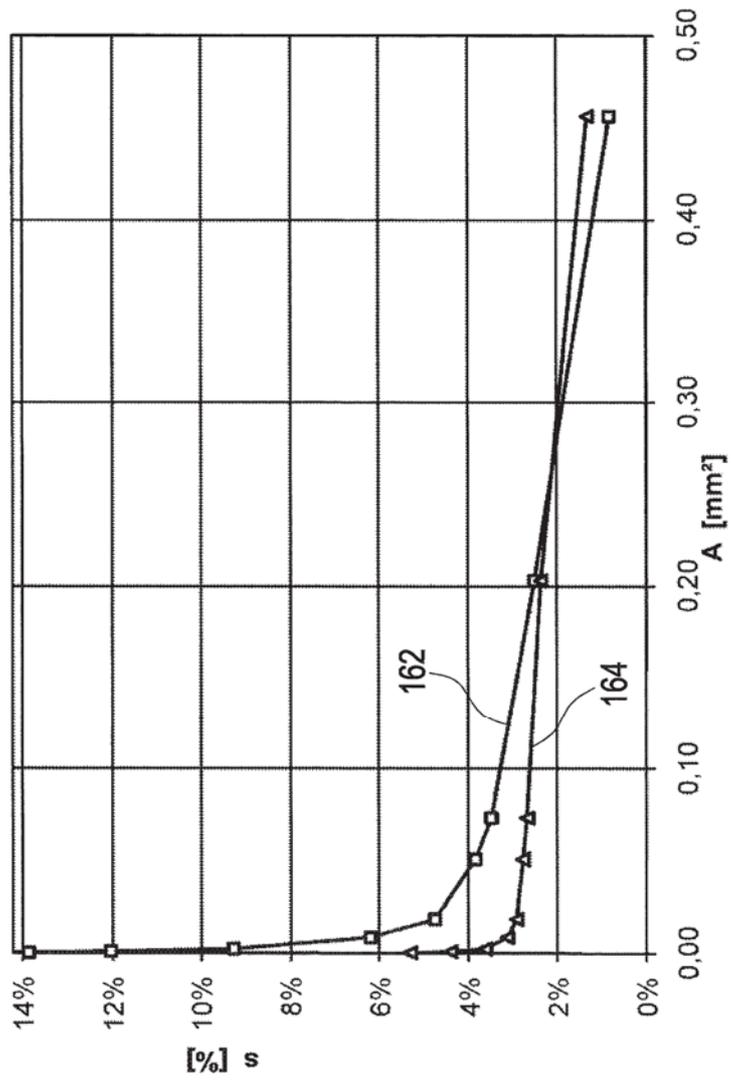


Fig. 7 B

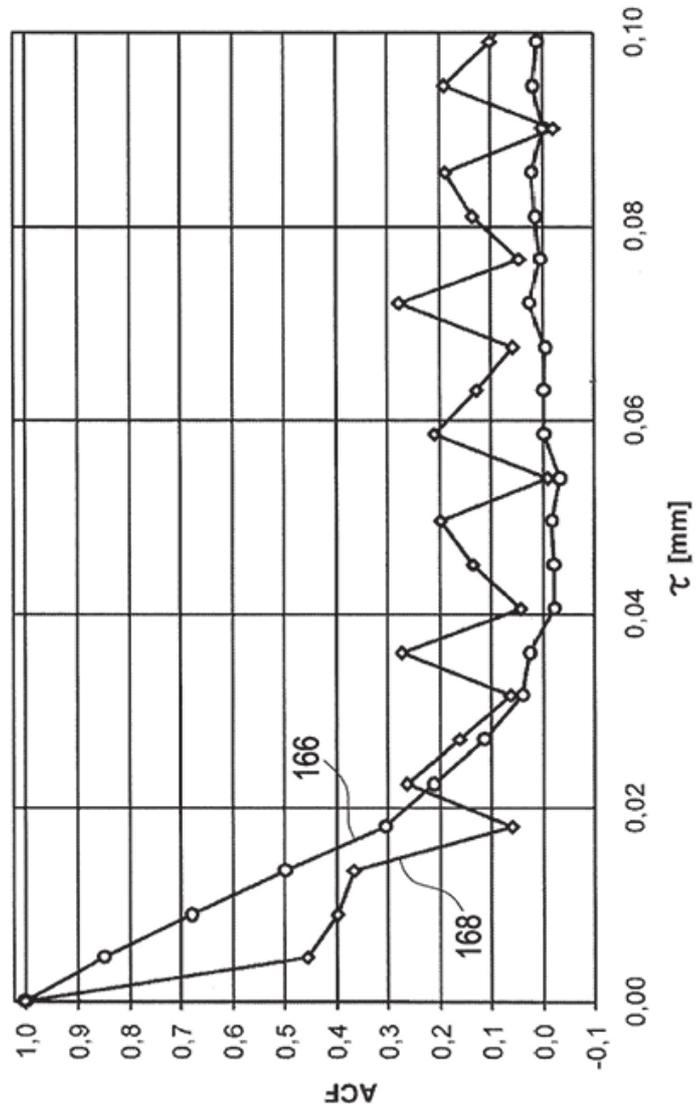


Fig. 8 A

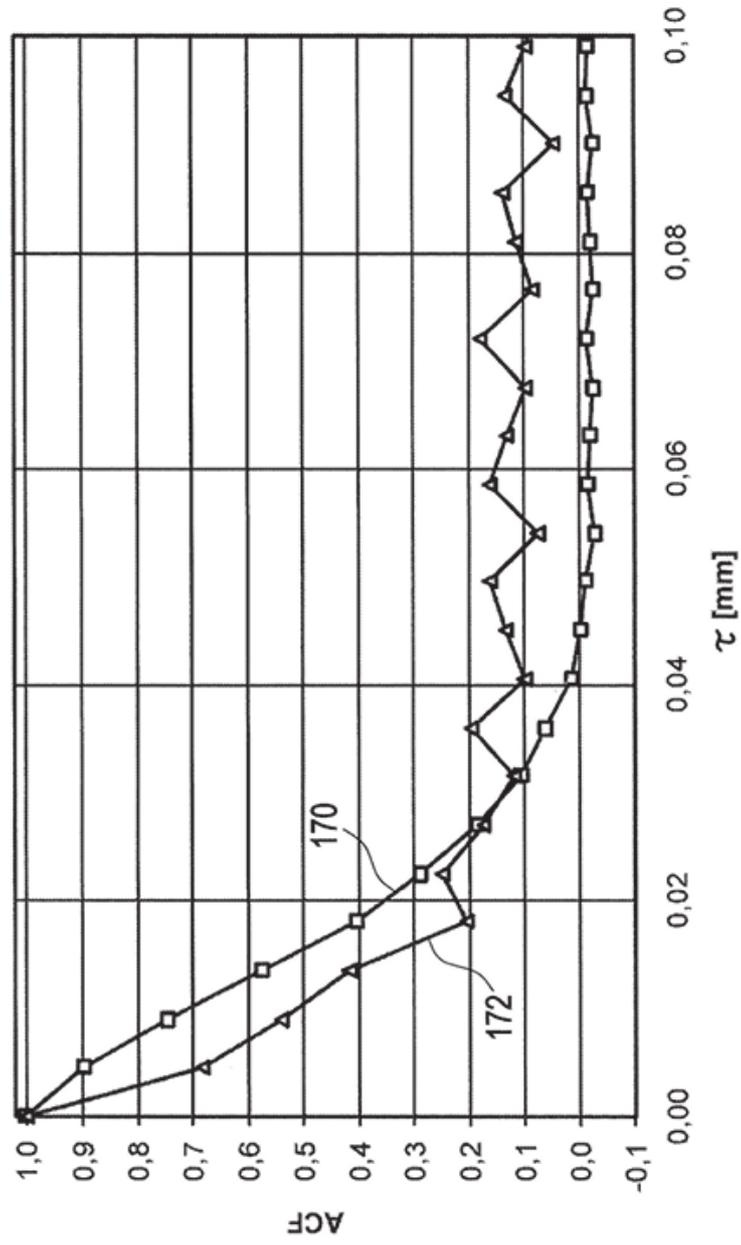


Fig. 8 B