

Establecimiento de condiciones más eficientes para la producción de biosensores de glucosa

Daimar Matos-Reinosa,* Idalmelis del Castillo-Puentes, Raychel Molina-Hernández, Antonio Melchor-Rodríguez
Centro de Inmunoensayo (CIE). La Habana, Cuba.

email: daimar.matos@cie.cu

Los biosensores son dispositivos móviles que permiten detectar de forma rápida y sencilla enfermedades del metabolismo e infecciones víricas de interés veterinario y clínico, como el rotavirus y la hepatitis B y C. Este trabajo tuvo como objetivo determinar las variables significativas del proceso de producción de los biosensores de glucosa fabricados en el Centro de Inmunoensayo (La Habana, Cuba). Se produjeron ocho corridas experimentales teniendo en cuenta los procedimientos normativos de operación implementados en la planta de producción de biosensores y se realizaron las evaluaciones de calidad correspondientes (pruebas de exactitud) para liberar analíticamente los lotes producidos. Los experimentos realizados proporcionaron información acerca de cuáles variables deben controlarse con más cuidado durante la producción a fin de evitar altos niveles de productos no conformes o el comportamiento errático del proceso. Las variables seleccionadas para el estudio fueron las relacionadas con la preparación de la solución enzimática. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión múltiple para determinar los factores estadísticamente significativos del modelo, obteniéndose un coeficiente de determinación superior al 90%, logrando explicar el 98,637% de la variación entre los valores de porcentaje de exactitud y la media. Los factores que resultaron ser significativos fueron la concentración de la enzima glucosa oxidasa, la concentración del mediador eléctrico y la conductividad del agua ultrapura para un nivel de confianza del 95%. El análisis realizado arrojó resultados satisfactorios demostrando que variando parámetros del proceso productivo es posible disminuir los valores del porcentaje de exactitud.

Palabras clave: Biosensores, glucosa, glucosa oxidasa.

Introducción

Los programas de vigilancia epidemiológica de Cuba se enfocan en prevenir y controlar la aparición y propagación de enfermedades e infecciones virales, desarrollando además métodos de detección o autocontrol que respondan a las necesidades de salud (1). Debido a la alta sensibilidad, rapidez de respuesta, facilidad de uso y bajo costo que presentan los biosensores, éstos constituyen una de las herramientas analíticas que complementarían la vigilancia desde el diagnóstico de la enfermedad hasta el tratamiento de la misma, incluyendo el uso eficaz de vacunas humanas (2).

Los biosensores constituyen dispositivos analíticos compactos que contienen un elemento de detección biológico acoplado a un transductor físico-químico que convierte la señal biológica en una señal electrónica. Se componen de tres partes fundamentales: el sensor biológico que es un elemento que puede ser tomado de la naturaleza o ser un producto de la biología sintética, como enzimas, células, anticuerpos o fragmentos de

ADN; el transductor que consiste en un electrodo que traduce la señal emitida por el sensor y el detector que da la respuesta a la señal.

Generalmente, se clasifican de acuerdo al elemento de reconocimiento biológico en: inmunobiosensor o genobiosensor y en cuanto al método de transducción en: ópticos, electroquímicos, piezoeléctricos o térmicos (3).

Estos dispositivos presentan características que le confieren alta selectividad y especificidad, las cuales se deben principalmente a las interacciones entre el elemento de reconocimiento y el analito diana, como las de tipo antígeno/anticuerpo, enzimáticas y celulares, lo cual posibilita el uso en la detección de infecciones como el rotavirus y la hepatitis B y C (3).

Los biosensores son también usados para detectar colesterol, ácido úrico, triglicéridos y glucosa, siendo este último vital para el autocontrol de pacientes que padecen de diabetes mellitus.

Para el control de la glicemia se han utilizado múltiples pruebas de laboratorio que le permiten al paciente

* Ing. Química, Jefe Producción de la Planta de Biosensores.

un correcto manejo de su enfermedad; durante mucho tiempo se contó exclusivamente con técnicas semicualitativas, progresivamente se perfeccionaron hasta obtener equipos de medición más exactos como los biosensores de glucosa, que se basan fundamentalmente en métodos electroquímicos en los que se inmoviliza una enzima y un mediador electrónico en el electrodo de trabajo (4-6).

El Centro de Inmunoensayo de La Habana, Cuba (CIE) instaló una planta para la producción de biosensores de glucosa, los cuales deben cumplir con los requerimientos establecidos en la norma ISO 15197:2003 “Sistema de prueba de diagnóstico in vitro-Requerimientos para el sistema de monitoreo de glucosa en sangre para autoensayo en el control de la Diabetes Mellitus”, donde se establecen requisitos para la evaluación analítica del producto (7).

Actualmente los porcentajes de exactitud de los lotes de biosensores producidos en el CIE se encuentran muy cercanos al valor establecido en la norma, por tanto se decidió diseñar un experimento para determinar los parámetros de proceso que influyen en esta variable. Esto permitirá obtener biosensores de glucosa más exactos y por consiguiente una producción más eficiente dando cumplimiento a los requisitos establecidos.

Materiales y Métodos

Para la realización de esta investigación se emplearon los procedimientos normativos de operación implementados en las áreas de trabajo de la Planta de Biosensores del CIE.

La preparación de la solución enzimática fue realizada con solución reguladora (ácido cítrico monohidrato/citrato de sodio, pH 5,0; 0,1 mol/L), hexacianoferrato (III) de potasio ($K_3Fe(CN)_6$), enzima glucosa oxidasa (GOD) y una solución amortiguadora. La dispensación de dicha solución en la zona de reacción (área o canal donde el paciente aplica la muestra de sangre extraída), es una de las etapas más importantes en el proceso de producción de los biosensores y se realiza mediante el equipo DIGISPENSE 3020 fabricado por la compañía inglesa IVEK Corporation.

Este equipo está compuesto por dos módulos, el controlador y el actuador. El módulo controlador contiene los componentes para la programación y monitoreo de las operaciones mediante una pantalla con tablero ubicado en su parte frontal. El módulo actuador contiene una bomba del tipo pistón de cilindro con movimiento

positivo, que es la que succiona el líquido del recipiente y lo dispensa en la lámina de polietileno tereftalato (PET), garantizando que el volumen dispensado siempre se corresponda con el valor programado por el operador.

Los biosensores fabricados fueron calibrados asignándoles un código en función de la calidad obtenida mediante el muestreo de al menos tres tiras por cada lámina de PET, las que se probaron con las soluciones de glucosa de concentraciones conocidas. El código asignado a las tiras le permite al glucómetro corregir el resultado de la prueba para que sea más exacto y éstos se evalúan analíticamente, realizando una comparación entre las concentraciones de glucosa de varias muestras de pacientes obtenidas con el glucómetro y el analizador químico del hospital (8-10).

Para obtener resultados aceptables de exactitud, el biosensor de glucosa debe cumplir con los requerimientos establecidos en la norma ISO 15197:2003. Esta norma internacional es aplicable a los fabricantes de sistemas de monitoreo de glucosa in vitro que miden las concentraciones de glucosa en muestras de sangre capilar y la misma establece los siguientes requisitos de obligatorio cumplimiento:

Requisitos	Límite de aceptación
Evaluación de exactitud	
Concentraciones $\leq 4,2$ mmol/L (≤ 75 mg/dL)	Desviación $\pm 0,83$ mmol/L (± 15 mg/dL)
Concentraciones $> 4,2$ mmol/L (> 75 mg/dL)	% Error relativo (ER) $\pm 20\%$

En aras de asegurar la calidad final del producto y cumplir con holgura el requisito de exactitud, se diseñó un experimento con el objetivo de reducir el porcentaje de exactitud relativa de los lotes de biosensores. Por tanto se determinó este parámetro como variable respuesta del experimento.

Los factores que influyen en esta variable son:

- Conductividad del agua ultrapura usada en la preparación
- Concentración de la enzima (GOD) en el líquido enzimático (mg/mL)
- Concentración del mediador eléctrico ($K_3Fe(CN)_6$) en el líquido enzimático (mg/mL)

Para llevar a cabo el experimento se realizaron ocho corridas experimentales (lotes de producción de 120 tiras cada uno), efectuando tres réplicas de cada experimento. Se emplearon los factores establecidos con dos niveles

Tabla 1. Relación de las variables y sus niveles.

Variables	Niveles	
	-1	+1
X ₁ (Concentración de GOD (mg/mL))	6	8
X ₂ (Concentración de K ₃ Fe(CN) ₆ (mg/mL))	80	100
X ₃ (Conductividad del agua ultrapura (μS/cm))	0,5	1,5

cada uno y realizando un diseño factorial 2³ completo, según se expone en la Tabla 1.

Por la estrecha relación que existe entre los factores y la variable respuesta se realizó un análisis de regresión múltiple utilizando el software estadístico Statgraphics Centurion XV. Como hipótesis nula se planteó la existencia de independencia entre las variables con respecto a la variable respuesta y como hipótesis alternativa la dependencia entre las variables, lo cual significa que los distintos niveles del factor influyen sobre los valores de la variable cuantitativa. El valor de referencia para aceptar o rechazar la hipótesis nula es el nivel de significación (p-valor), el cual debe ser mayor que 0,05 para aceptar la hipótesis nula y menor de este valor para rechazarla y aceptar la hipótesis alternativa. Mediante el análisis de varianza se determinó la ecuación de ajuste del modelo y el R-cuadrado que describe la misma, con un nivel de confianza del 95%.

Resultados y Discusión

La correcta preparación y dispensación de la solución enzimática determina la exactitud en el resultado de la prueba del paciente, por lo que en la etapa de dispensación se comprobó que el volumen de la

solución dispensada fuera el correcto (1,825 μL). En esta comprobación se verificó que el peso de cinco gotas de solución enzimática estuviera comprendido en el intervalo de 9 a 9,5 mg desde el inicio de la producción y cada 10 PET dispensados.

Estas comprobaciones evitaron los posibles errores en el volumen dispensado provocados por:

- Presencia de aire u obstrucciones en las mangueras
- Mal estado de la aguja
- Líquido remanente en la punta de la aguja.

Estos aspectos fueron chequeados periódicamente por el operador durante todo el proceso, por lo que se considera que el volumen de la solución enzimática dispensada es un factor controlable; no siendo así, sin embargo, su preparación, la que está sujeta a errores en el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio visualmente no detectables y que pueden alterar la composición de esta solución y provocar un comportamiento errático del proceso.

Existen otras variables asociadas a la preparación de la solución enzimática que pueden ser controladas desde esta etapa, relacionadas específicamente con la concentración de la enzima, el mediador eléctrico y la conductividad del agua ultrapura (11).

En la Tabla 2 se muestran los resultados alcanzados durante las ocho corridas experimentales y los porcentajes de exactitud relativa obtenidos analíticamente.

Los datos fueron introducidos en el programa Statgraphics Centurion XV, analizándose primero las interacciones de los factores con respecto a la

Tabla 2. Parámetros de proceso de las corridas y porcentajes de exactitud relativa.

Lote	X ₁		X ₂		X ₃		V _R
	mg/mL	Código	mg/mL	Código	μS/cm	Código	
1	6	-1	100	1	0,5	-1	14,5
2	8	1	100	1	0,5	-1	8
3	8	1	100	1	1,5	1	12
4	8	1	80	-1	0,5	-1	5,5
5	6	-1	80	-1	1,5	1	16
6	6	-1	100	1	1,5	1	17,5
7	6	-1	80	-1	0,5	-1	13,5
8	8	1	80	-1	1,5	1	9,5

V_R: Variable respuesta (Porcentaje de exactitud relativa)

variable respuesta mediante un análisis de varianza y se obtuvieron los siguientes resultados:

Análisis de regresión múltiple

Parámetros	Error estándar	Estadístico T	p-valor
$X_1 X_2$	0,3125	0,0625	0,1257
$X_1 X_3$	-0,3125	0,0625	0,1257
$X_2 X_3$	-0,0625	0,06125	0,5000

Análisis de varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio
Modelo	119,188	6	19,8646
Residuo	0,03125	1	0,03125
Total	119,21925	7	

R-cuadrado = 99,97%

R-cuadrado (ajustado para GL) = 99,81%

Estadístico Durbin-Watson = 1,5

Los p-valores obtenidos de las interacciones entre las tres variables son mayores que 0,05, por lo tanto se acepta la hipótesis nula, la cual plantea que no hay una relación significativa entre las interacciones de los factores y la variable respuesta. Estas interacciones fueron eliminadas y se construyó un nuevo modelo de regresión con los factores independientes, obteniéndose los siguientes resultados:

Análisis de regresión múltiple

Parámetros	Error estándar	Estadístico T	p-valor
X_1	0,225347	-14,6996	0,0001
X_2	0,225347	4,16025	0,0141
X_3	0,225347	-7,48845	0,0017

Análisis de varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio
Modelo	117,59	3	39,19
Residuo	1,62	4	0,40
Total	119,21	7	

R-cuadrado = 98,637%

R-cuadrado (ajustado para GL) = 97,61%

Estadístico Durbin-Watson = 2,75

En este análisis los p-valores obtenidos fueron menores que 0,05, lo cual explica que estas variables independientes son estadísticamente significativas en el modelo para un nivel de confianza del 95%, aceptándose por tanto la hipótesis alternativa. El coeficiente de determinación R-cuadrado fue superior a 90%, por lo que el ajuste del modelo se considera bueno y logra explicar el 98,64% de la variación entre los valores de porcentaje de exactitud y la media.

En el análisis de los residuos, se obtuvo que el estadístico Durbin-Watson muestra un p-valor superior a 0,05 por tanto no hay indicio de autocorrelación serial en los residuos (Fig. 1).

La ecuación que describe el modelo es la siguiente:

$$V_R = 12.0625 - 3.3125 \times X_1 + 0.9375 \times X_2 + 1.6875 \times X_3$$

El factor “concentración de enzima” codificado como X_1 tiene pendiente negativa, lo cual expresa que a mayor concentración de este reactivo menor porcentaje de exactitud se obtendrá en la evaluación analítica. Los factores X_2 y X_3 codificados como “concentración de mediador eléctrico y conductividad del agua” respectivamente, tienen pendiente positiva por lo que a menores valores de estos parámetros, se obtendrá menor porcentaje de exactitud.

Los resultados obtenidos se corresponden con lo reportado sobre los sistemas de monitoreo de glucosa in vitro que emplean métodos enzimáticos para la cuantificación de glucosa en sangre, en los cuales las enzimas usadas se encuentran en exceso para evitar la subestimación en las lecturas de corriente (11).

Por otra parte los mediadores eléctricos son capaces de acoplarse entre el centro activo de la enzima y la superficie del electrodo, mejorando la transferencia electrónica entre ambas partes y una cantidad adecuada del mismo permitirá una correcta reacción enzimática y por consiguiente una evaluación analítica eficaz (12).

En el caso de la conductividad del agua se ha reportado en la literatura que los valores superiores a 1,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pudieran incrementar la conductividad eléctrica en el área de interacción del electrodo con el compuesto enzima/mediador, provocando una sobrestimación en la lectura del biosensor debido a que mientras menor sea la concentración de electrolitos, mayor es la resistencia del medio a la transmisión de una corriente eléctrica (13), lo cual se corresponde con lo obtenido en el presente trabajo.

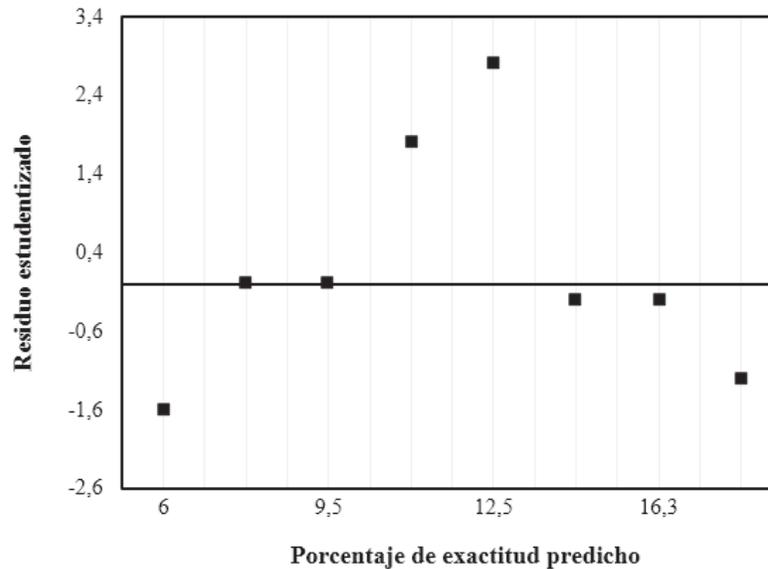


Fig. 1. Residuos con respecto a los valores reportados según el modelo obtenido.

Teniendo en cuenta los niveles seleccionados en el experimento y los resultados derivados del mismo, se demuestra que los parámetros de proceso que permitirán obtener mejores porcentajes de exactitud que los que establece la norma, son: preparando la solución enzimática con 8 mg/mL de concentración de enzima, concentración de hexaciano ferrato III de potasio en 80 mg/mL y utilizando el agua ultrapura con una conductividad de 0,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Como conclusión, se puede decir que el análisis realizado ha permitido establecer condiciones de producción que elevan la calidad de los biosensores de glucosa y evitan altos niveles de productos no conformes, incrementando de esta forma la eficiencia del proceso productivo.

Referencias

- Rodríguez-Milord D. Vigilancia de la salud pública, un instrumento para la eficiencia y sostenibilidad del sistema de salud cubano. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2014;52(3):286-9.
- Ali J, Najeeb J, Asim-Ali M, Farhan-Aslam M, Raza A. Biosensors: Their Fundamentals, Designs, Types and Most Recent Impactful Applications: A Review. *J Biosensors and Bioelectronics* 2017;8:1. doi:10.4172/2155-6210.1000235.
- Hasan A, Nurunnabi MD, Morshed M, Paul A, Polini A, Kuila T, et al. Recent Advances in Application of Biosensors in Tissue Engineering. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:307519. doi: 10.1155/2014/307519.
- Clarke S. A history of blood glucose meters and their role in self-monitoring of diabetes mellitus. *British Journal of Biomedical Science* 2012;69(2):83-93.
- Varshney H, Pandey S, Singh S. Sensor for diabetes: Glucose biosensors by using different newer techniques: a review. *International Journal of Therapeutic Application* 2012;6 (2):28-37.
- Vaddiraju S, Burgess DJ, Tomazos I, Jain FC, Papadimitrakopoulos F. Technologies for continuous glucose monitoring: current problems and future promises. *J Diabetes Sci Technol.* 2010; 4 (6):1540-62.
- International Organization for Standardization. ISO 15197:2013. In vitro diagnostic test systems -- Requirements for blood-glucose monitoring systems for self-testing in managing diabetes mellitus. Geneva: ISO; 2013. Disponible en <https://www.iso.org/standard/54976.html>.
- Bailey T, Wallace JF, Greene C, Pardo S, Brown D, Plug B, Klaff L. Accuracy and user performance evaluation of the Contour Next Link 2.4. Blood glucose monitoring system. *Clinica Chimica Acta* 2015;448:139-45.
- Tonyushkina K, Nichols JH. Glucose meters: a review of technical challenges to obtaining accurate results. *J Diabetes Sci Technol.* 2009;3(2):971-80.
- Rebel A, Rice MA, Fahy BC. The accuracy of point-of-care glucose measurements. *J Diabetes Sci Technol.* 2012;6(2):396-411.
- Barry H. Factors affecting blood glucose monitoring: sources of errors in measurement. *J Diabetes Sci Technol.* 2009;3(4):903-13.
- Chaubey A, Malhotra B.D. Mediated biosensor. *J Biosensors & Bioelectronics.* 2002;17(6-7):441-56.
- Emerson Process Management. Theory and application of conductivity. ADS 43-018/rev.D. Barranca Parkway Irvine CA, USA: Rosemount Analytical Inc; 2010.

Establishment of more efficient conditions for the production of glucose biosensors

Abstract

Biosensors are mobile devices that allow rapid and easy detection of metabolic diseases and viral infections of veterinary and clinical interest, such as rotavirus and hepatitis B and C. The objective of this work was to determine the significant variables of the production process of the glucose biosensors manufactured in the Immunoassay Center (Havana, Cuba). Eight experimental runs were carried out taking into account the normative operating procedures of the biosensor production plant. Accuracy tests were carried out to release produced batches. The experiments provided information about which factors should be carefully controlled during the manufacture procedure in order to avoid high levels of faulty products or the erratic behavior of the process. The factors selected for the study were those related with the preparation of the enzymatic solution. A multiple regression analysis was carried out to determine the statistically significant factors of the model. The coefficient of determination was higher than 90%, and the 98.637% of the variation between the values of percentage of accuracy and the mean value could be explained. The significant factors were the concentration of the glucose oxidase enzyme, the electric mediator concentration, and the ultrapure water conductivity (95% confidence level). The analysis carried out showed satisfactory results. In the present study, it was demonstrated that varying parameters of the production process it is possible to decrease the accuracy percentage values.

Keywords: Biosensors, glucose, glucose oxidase.

Recibido: Enero de 2018

Aceptado: Febrero de 2018